

**Periplasmatische Elektronentransfer-Reaktionen in  
*Shewanella oneidensis* MR-1**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften,  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte  
DISSERTATION  
von

**Gunnar Sturm**

aus  
Kiel

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2014

## Danksagung

Lieber Johannes, vielen Dank für die Möglichkeit, diese Arbeit bei Dir anfertigen zu dürfen, für Dein Interesse, die Motivation, die Ideen, die Gespräche, die Retreats, Deine Mühe, das Vertrauen und für Deine Geduld! Vielen Dank, dass ich den Weg so lange mit Dir gehen und so viel von Dir lernen durfte!

Liebste Mimi – ohne Dich wär das alles und so viel darüber hinaus sowieso nicht möglich. Ich weiß nicht, wie ich Dir danken soll... DANKE! Ich freue mich riesig auf die Zeit mit Dir und bald mit Stürmchen – mal gucken, was der Knirps für einer wird!

Ich danke der gesamten AG Gescher „for the nice atmosphere“! Ihr seid ein tolles Team und macht es ziemlich leicht, gerne ins Labor zu kommen! Auch wenn ich das zwischenzeitlich vielleicht mal kurz vergessen habe – Ihr seid alle toll!

Mama und Papa: vielen Dank für Eure Unterstützung im gesamten Studium und darüber hinaus. Vielen Dank, dass Ihr mein Interesse an der Wissenschaft schon früh gefördert habt und mich habt machen lassen! Ich hoffe, Ihr seid mit dem Ergebnis zufrieden. ;)

Ich danke allen Kooperationspartnern für ihre großartige Unterstützung. Im Besonderen Dr. Andreas Dötsch vom IFG, Prof. Harald Horn und Dr. Gudrun Abbt-Braun vom EBI und Volker Zibat vom LEM.

Dittsche danke ich für die endlosen Gespräche über Statistik, MatLab und Linux und für die Hilfe bei der Berechnung von unzähligen Dingen.

Eli und Tim für die zahllosen Stunden des Müßiggangs, um das Labor mal zu vergessen!!

Dem KIT SC Fußball dafür, dass sie mir einen so einfachen Start in Karlsruhe ermöglicht haben und ich jetzt sogar auch mal mit kicken durfte...

Christiane für den Kicker – das war das großartigste Geschenk aller Zeiten!

## Erklärung an Eides statt

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

---

Ort, Datum

---

Gunnar Sturm

## Liste der Publikationen und Manuskripte

Teile dieser Arbeit wurden oder werden in folgenden Fachzeitschriften oder Büchern veröffentlicht:

1. Sturm G., Richter K., Doetsch A., Heide C., Louro R. O., Gescher J.: **A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime.** *Submitted to ISME 2014.*
2. Richter K., Golitsch F., Sturm G., Kipf E., Dittrich A., Kerzenmacher S., Gescher J.: **Unbalanced fermentation in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and connection to anodes in microbial fuel cells.** *submitted to Metabol. Engin. 2014*
3. Sturm G., Dolch K., Richter K., Rautenberg M., Gescher J.: **Metal reducers and reduction targets. A short survey about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of terminal electron acceptors.** *Microbial Metal Respiration*, (49-82). ISBN 978-3642328664.
4. Schicklberger M., Sturm G., Gescher J.: **Genomic Plasticity enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*.** *Appl Environ Microbiol.* 2013 Feb;79(4):1150-9. doi: 10.1128/AEM.03556-12. Epub 2012 Dec 7
5. Schütz B., Seidel J., Sturm G., Einsle O., Gescher J.: **Investigation of the electron transport chain to and the catalytic activity of the diheme cytochrome *c* peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*.** *Appl Environ Microbiol.* 2011 Sep;77(17):6172-80. doi: 10.1128/AEM.00606-11. Epub 2011 Jul 8.

Die Publikationen bzw. Manuskripte 1, 2, 4 und 5 sind ans Ende dieser Arbeit angefügt.

Darüber hinaus konnten die folgenden Manuskripte publiziert werden:

6. Sturm G., Jacobs J., Spröer C., Schumann P., Gescher J.: ***Leucobacter chromiirestiens* sp. nov., a chromate resistant strain.** *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011 Apr;61(Pt 4):956-60. doi: 10.1099/ijs.0.022780-0. Epub 2010 May 28.
7. Sturm G., Buchta K., Kurz T., Rensing S.A., Gescher J.: **Draft genome sequence of *Leucobacter chromiirestiens*, an extremely chromium-tolerant strain.** *J Bacteriol.* 2012 Jan;194(2):540-1. doi: 10.1128/JB.06413-11.

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
<i>S. oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
TMAO	Trimethylaminoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
DMR	Dissimilatorische Metallreduktion
DIR	Dissimilatorische Eisenreduktion
TEA	Terminaler Elektronenakzeptor
ESEM	Environmental scanning electron microscopy
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
OD	Optische Dichte
RT	Raumtemperatur
$\Delta$	Deletion

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>II</b>
<b>Liste der Publikationen und Manuskripte</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Energiegewinnung .....	3
2.1.1 Gärung.....	3
2.1.2 Atmung.....	4
2.1.3 Anaerobe Atmung.....	5
2.2 Das Gram-negative Problem.....	6
2.2.1 Das Periplasma.....	6
2.2.2 <i>Shewanella oneidensis</i> .....	8
2.2.3 Cytochrome.....	9
2.3 Dissimilatorische Eisenreduktion (DIR) .....	10
2.4 Elektronentransfer-Netzwerk Hypothese .....	15
2.5 Ziele dieser Arbeit:.....	18
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1 Chemikalien und Enzyme.....	19
3.2 Stammkultivierung .....	19
3.3 Bestimmung der Fe <sup>2+</sup> -Konzentration.....	22
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	23
3.5 Konjugation und Rekombination.....	30
3.7 Primer .....	33
3.8 Plasmide.....	39

3.8 Protein-biochemische Methoden.....	40
3.8.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
3.8.2 Häm-Färbung .....	42
3.8.3 Coomassie-Färbung .....	42
3.8.4 Proteinbestimmung .....	43
3.8.5 Affinitätschromatografie.....	44
3.8.6 Protein-Konzentration .....	45
3.8.7 Hämgruppen-Bestimmung.....	45
3.9 Bestimmung der Zellzahl .....	46
3.10 Netzwerk-Assay .....	47
3.11 Präparation der periplasmatischen Fraktion von <i>S. oneidensis</i> .....	47
3.12 Zellaufschluss.....	48
3.13 Präparation von Membran- und Cytoplasmafraktionen.....	48
3.14 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) .....	48
3.15 Berechnung des periplasmatischen Volumens von <i>S. oneidensis</i> .....	49
3.16 In silico Analyse der c-Typ Cytochrom-Verteilung.....	49
3.17 MudPIT Analyse .....	50
3.18 Transkriptomanalyse .....	51
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1 Verteilung der c-Typ Cytochrome.....	53
4.2 Berechnung des periplasmatischen Volumens .....	60
4.2.1 Berechnung des periplasmatischen Volumens in <i>S. oneidensis</i> .....	62
4.2.2 Bestimmung des Häm-Gehalts in <i>S. oneidensis</i> .....	63
4.2.3 Berechnung der periplasmatischen Häm-Konzentration .....	65
4.3 Expression der c-Typ Cytochrome in <i>S. oneidensis</i> .....	65
4.4 Elektronentransfer-Netzwerk.....	68

4.5 Wachstum der Doppelmutante $\Delta stc\Delta fccA$ .....	72
4.6 Charakterisierung des Suppressor-Phänotyps .....	76
4.6.1 <i>c</i> -Typ Cytochrom Expressionsmuster.....	76
4.6.2 Überexpression der identifizierten Cytochrome .....	77
4.6.3 Untersuchungen zum Suppressor-Phänotyp.....	78
4.7 Suppressor-Phänotyp der Nitrat-Reduktion.....	81
4.7.1 Untersuchungen der Nitrat-Reduktion .....	82
4.8 Transkriptom-Analyse.....	84
4.9 Elektronentransfer während der Nitrat-/Nitrit-Reduktion .....	86
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>89</b>
5.1 Verteilung der <i>c</i> -Typ Cytochrome.....	90
5.2 Das Periplasma als <i>c</i> -Typ Cytochrom-basierter Elektronentransfer-Raum.....	92
5.2.1 Bestimmung des periplasmatischen Volumens.....	92
5.2.2 Expressionsanalyse respiratorischer Reduktasen.....	93
5.2.3 Bestimmung des zellulären Häm-Gehaltes.....	94
5.3 Elektronentransfer-Netzwerk und Elektronen-Speicher im Periplasma.....	95
5.4 Funktionelle Redundanz der periplasmatischen Cytochrome .....	98
5.5 Die zentrale Rolle von <i>STC</i> und <i>FccA</i> .....	99
5.6 Strategien des Suppressor-Phänotyps.....	102
5.7 Transkriptom-Analyse.....	107
5.8 Fazit: <i>STC</i> und <i>FccA</i> als periplasmatische Elektronenverteiler .....	109
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>118</b>
Lebenslauf.....	118
Manuskripte.....	119



## 1 Zusammenfassung

Die dissimilatorische Eisenreduktion (dissimilatory iron reduction - DIR) ist eine unter Mikroorganismen weit verbreitete Form der anaeroben Atmung. Da viele Eisenverbindungen bei neutralem pH-Wert unlösliche Komplexe bilden, stellt die Fähigkeit, respiratorische Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren zu übertragen, eine Schlüsselqualifikation dieser Lebensweise dar. Besonders in Gram-negativen Bakterien bedeutet der Elektronentransfer durch das Periplasma und über die äußere Membran auf den externen Akzeptor dabei eine spezielle Herausforderung. *Shewanella oneidensis*, ein Modellorganismus der dissimilatorischen Eisenreduktion, bedient sich verschiedener *c*-Typ Cytochrome, um einen Elektronentransfer durch das Periplasma zu etablieren. Cytochrome sind Proteine mit Häm-Cofaktoren und dienen häufig als Elektronenüberträger bei Redox-Reaktionen. Das Genom von *S. oneidensis* enthält die genetische Information für 27 periplasmatische *c*-Typ-Cytochrome, welche häufig redundante Aktivitäten zeigen und deren Expression kaum reguliert ist. Daher stellt die Identifikation von an der Atmungskette beteiligter *c*-Typ Cytochrome im Periplasma eine große Herausforderung dar.

Ziel dieser Arbeit war es, ein tieferes Verständnis der Prozesse zu erlangen, die Cytochrom-vermittelt periplasmatischen Elektronentransfer in *S. oneidensis* ermöglichen. Zunächst wurde das Periplasma generell als Reaktionsraum in Gram-negativen Bakterien betrachtet. Eine vergleichende Analyse des *c*-Typ Cytochrom-Gehaltes verschiedener Proteobacteria erbrachte eine Übersicht der Anzahl im Genom enthaltener Cytochrome innerhalb dieser Abteilung. Eine Untersuchung des Cytochrom-Gehaltes bekannter Eisen-Reduzierer verdeutlichte die prinzipielle, aber nicht elementare Bedeutung einer großen Anzahl dieser Proteine für die Fähigkeit zur dissimilatorischen Eisenreduktion. Das durchschnittliche Volumen des Periplasmas wurde am Beispiel von Eisen-reduzierenden *S. oneidensis*-Zellen auf  $0,153 \pm 0,005$  fl bestimmt. Darüber hinaus wurde der zelluläre Hämgehalt mit ca. 700 000 Hämgruppen pro Zelle ermittelt. Daraus konnte eine periplasmatische Hämkonzentration von 3,76 mM in *S. oneidensis* errechnet werden

Der hohe Gehalt an periplasmatischen Cytochromen unter verschiedenen respiratorischen Bedingungen ist ein auffälliges Merkmal von *S. oneidensis*. Durch Analysen von Wachstums- und Cytochrom-Expressionsmustern mit mehreren Elektronenakzeptoren und von unterschiedlichen Mutanten konnte die gleichzeitige Expression funktioneller respiratorischer Ketten und darüber hinaus deren Verbindung gezeigt werden. Dabei

exprimiert *S. oneidensis* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen mit den Elektronenakzeptoren Eisen, DMSO, TMAO, AQDS, Nitrat, Fumarat und Thiosulfat dasselbe Cytochromsetup und ist auch nach Wachstum auf einem einzelnen Elektronenakzeptor in der Lage, Elektronen auf alle anderen Akzeptoren (mit Ausnahme von Thiosulfat) zu übertragen.

Die Redundanz der respiratorischen Elektronentransferketten spiegelt sich in der überlappenden Funktion vieler beteiligter Proteine. Bisher konnte in *S. oneidensis* mit MtrA lediglich ein für die Eisenreduktion essentielles periplasmatisches *c*-Typ Cytochrom identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Relevanz zweier weiterer Cytochrome – STC und FccA – um den Prozess des periplasmatischen Elektronentransfers zur Reduktion unlöslicher Eisenspezies zu ermöglichen. Diese beiden Proteine weisen bezüglich ihrer Funktion während des periplasmatischen Elektronentransfers eine funktionelle Redundanz auf und katalysieren zentrale Prozesse innerhalb des periplasmatischen Elektronentransfers während der dissimilatorischen Eisenreduktion. Darüber hinaus sind beide Proteine in die anaerobe Atmung mit DMSO und Nitrat als Elektronenakzeptor involviert. Im Falle der Nitrat-Reduktion dienen sie der Übertragung der respiratorischen Elektronen auf den terminalen Nitratreduktase-Komplex NapAB.

## 2 Einleitung

### 2.1 Energiegewinnung

Mikroorganismen sind in der Lage, Energie aus den vielfältigsten Quellen zu gewinnen. Anders als höher entwickelte Zellformen sind sie in der Lage, eine Vielzahl an reduzierten Verbindungen als Elektronenquelle zu verwenden. So finden sich unter den Elektronendonoren nicht nur Zucker oder deren Polymere wie z.B. Stärke, Cellulose oder Chitin, sondern auch Gärprodukte (z.B. Milchsäure), organische Moleküle (z.B. Methan) und sogar anorganische Verbindungen (z.B.  $H_2S$ ). Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Mikroorganismen in der Lage, Energie durch photosynthetische Reaktionen zu gewinnen.

Die durch die Substrat-Oxidation freigesetzten Elektronen können über unterschiedliche Wege zur Energiekonservierung genutzt werden. Grundsätzlich lassen sich diese Wege in drei Klassen einteilen: die Gärung, die Atmung und die Photosynthese (auf letztere wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen). Alle diese Wege führen letzten Endes zur Bildung von ATP, das von den Zellen für verschiedenste Prozesse genutzt werden kann.

#### **2.1.1 Gärung**

Die Gärung beschreibt eine Form der Energiegewinnung, bei der die durch die Substrat-Oxidation freigesetzten Elektronen durch Ermangelung eines extrazellulären Elektronenakzeptors auf einen internen Akzeptor übertragen werden. Bei dieser Form wird ATP überwiegend in der Form der Substratstufenphosphorylierung generiert. Eine Ausnahme bildet hier z.B. die Fumarat-Reduktase während der gemischten Säuregärung (Fuchs *et al.*, 2007). Typische Gärprodukte sind Alkohole (z.B. Ethanol) und organische Säuren wie z.B. Essigsäure und Milchsäure. Trotz der geringen Energieausbeute erlaubt die Gärung Energiegewinnung und dadurch Stoffwechsel und Wachstum, was gärenden Mikroorganismen in Elektronenakzeptor armen Umgebungen einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber obligat atmenden Organismen verschafft. Gärprozesse gliedern sich in der Natur häufig in zwei aufeinander folgende Reaktionen: in der primären Gärung werden Biopolymere wie Polysaccharide, Proteine und Fette in niedermolekulare Verbindungen wie z.B. Lactat, Succinat, Ethanol und Buttersäure vergoren, die dann von weiteren Mikroorganismen in einer sekundären Gärung zu z.B. Acetat,  $H_2$  und  $CO_2$  vergoren werden. Die mikrobielle Gärung bildet die Grundlage für eine Reihe biotechnologischer

Prozesse der Lebensmittelindustrie, wie z.B. der Herstellung von Käse, Bier, Wein, Joghurt oder Essig, sowie der Produktion von sog. „Bioenergie“ in Form von Biogas.

### 2.1.2 Atmung

Der Gärung gegenüber steht die Atmung. Atmung bedeutet, die durch Substratoxidation freigesetzten Elektronen auf einen externen Elektronenakzeptor zu übertragen. Bei diesem Vorgang werden die Elektronen von einem Elektronendonator mit niedrigem Potential (z.B. NADH) auf einen Akzeptor mit höherem Potential übertragen. Diese Übertragung entlang eines Potentialgradienten erlaubt an gewissen Membrankomplexen einen Transfer von Protonen über die Cytoplasmamembran, wodurch ein elektrochemisches Potential über die Membran generiert wird (Atmungskette). Dieses Potential wird letztendlich dazu genutzt, um über den Rückstrom der Protonen in das Cytoplasma ATP durch die ATP-Synthase zu generieren. Die Potentialdifferenz zwischen Elektronendonator und terminalem Elektronenakzeptor determiniert dabei die Anzahl an Protonen-pumpenden Schritten und dadurch die Menge an generiertem ATP. Viele Organismen sind zu aerober Atmung fähig, d.h. sie nutzen Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. Sauerstoff besitzt ein Potential von  $E^{0'} = 818 \text{ mV}$  und erlaubt so ein Maximum an Protonen-pumpenden Schritten. Für den Fall von NADH als Elektronendonator (z.B. aus dem Citratzyklus) ist es somit für diese Organismen möglich, 38 Mol ATP aus 1 Mol Glucose zu synthetisieren.

Mikrobielles Leben erstreckt sich allerdings über ein weitaus breiteres Spektrum an ökologischen Nischen, in denen Sauerstoff nur in einigen Fällen als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Viele Mikroorganismen sind in der Lage, Sauerstoff durch andere terminale Elektronenakzeptoren in der Atmungskette zu ersetzen. In diesem Fall spricht man von anaerober Atmung. Man unterteilt diese Organismen in solche, die sowohl mit Sauerstoff, als auch mit alternativen Elektronenakzeptoren Atmung betreiben (fakultativ anaerob) und solche, die ausschließlich mit alternativen Akzeptoren atmen (obligat anaerob).

### 2.1.3 Anaerobe Atmung

Die Fähigkeit zu anaerober Atmung ist eine der Schlüssel-Eigenschaften, die der unglaublichen Vielfalt mikrobieller Diversität zu Grunde liegt. Die Fähigkeit, Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmung zu ersetzen kennt man z.B. in Vertretern der Gattungen *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Geobacter* und *Shewanella*, um nur wenige zu nennen (Myers & Nealson, 1990, Potter & Cole, 1999, Schreiber *et al.*, 2007, Lovley, 1991). Für die anaerobe Atmung steht ihnen ein riesiges Spektrum an organischen und anorganischen Verbindungen zur Verfügung. Bakterien können unter anderem z.B. Nitrat, Nitrit, Sulfat, DMSO (Dimethylsulfoxid), TMAO (Trimethylaminoxid), Thiosulfat, molekularen Schwefel ( $S^0$ ) und Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Myers & Nealson, 1988, Odom & Peck, 1984, Gralnick *et al.*, 2006, Ringel *et al.*, 1996, Burns & DiChristina, 2009). In vielen Lebensräumen, die von Mikroorganismen besiedelt werden, bilden diese Stoffe die Grundlage zur Energiegewinnung. Der Unterschied zur aeroben Atmung liegt hauptsächlich in dem häufig geringen Potential des Elektronenakzeptors (Tab. 1). Die damit einhergehende geringere Potentialdifferenz bedingt kleinere Energieausbeuten.

**Tabelle 1:** Eine Auswahl an Redoxpaaren terminaler Elektronenakzeptoren der anaeroben Atmung im Vergleich zu Sauerstoff und dem Elektronendonator NADH. (Thauer *et al.*, 1977, Majzlan, 2013)

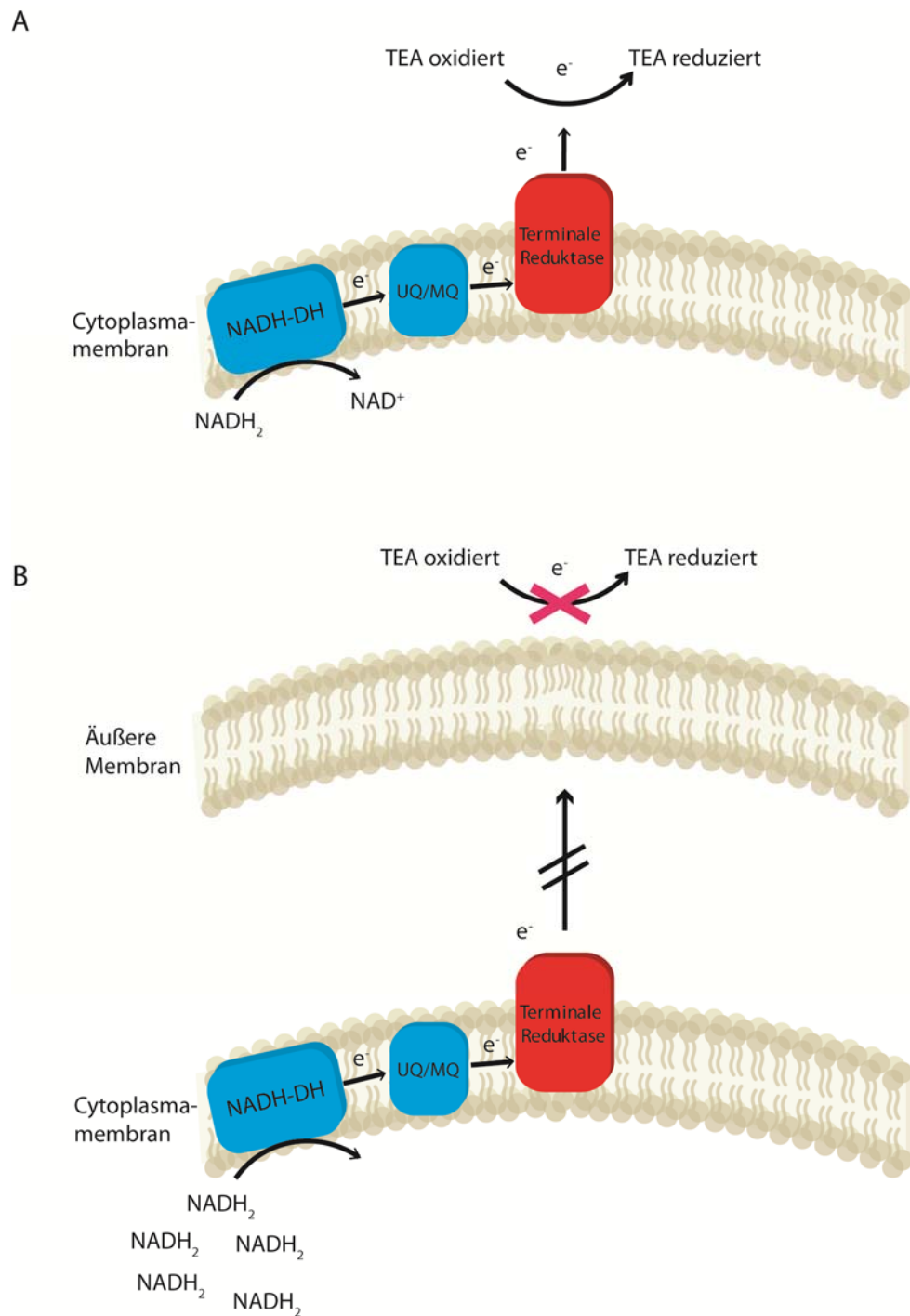
$O_2 / H_2O$	+818 mV
$NO_3^- / NO_2^-$	+430 mV
$Mn(IV) / Mn(II)$	+612 bis +269 mV
DMSO / DMS	+160 mV
TMAO / TMA	+130 mV
Fumarat / Succinat	+33 mV
$Fe(III) / Fe(II)$	+372 bis -177 mV
$H_2S / SO_4^{2-}$	-22 mV
$NAD^+ / NADH_2$	-320 mV

Eine besondere Form der anaeroben Atmung stellt die dissimilatorische Metallreduktion (DMR) dar. Bei dieser Art der Atmung verwendet die Zelle oxidierte Metallionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ) als terminale Elektronenakzeptoren. Diese liegen häufig (v.a. bei neutralen pH-Bereichen) als unlösliche Metall-(Hydr-)oxide vor. Durch diese Tatsache ergibt sich als Anpassungsaufgabe für Gram-negative Bakterien, im Rahmen der Evolution Elektronentransportketten zu entwickeln, die respiratorische Elektronen aus den Membrankomplexen der Cytoplasmamembran auf die terminalen, extrazellulären Elektronenakzeptoren zu übertragen vermögen. Dies ist im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

## **2.2 Das Gram-negative Problem**

### **2.2.1 Das Periplasma**

Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien, die nur über eine (Cytoplasma-)Membran verfügen, besitzen Gram-negative Bakterien eine weitere, die sog. äußere Membran. Zwischen diesen beiden Membranen befindet sich ein zusätzlicher Reaktionsraum – das Periplasma. Das Periplasma bildet somit ein, der eigentlichen Zelle aufgelagertes, „Kompartiment“. Dieses Kompartiment stellt für den Elektronentransfer eine Barriere zwischen der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran dar, die einen direkten Transfer respiratorischer Elektronen zwischen den Membranen verhindert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Darstellung des Periplasmas als potentieller Isolator. A: Bei Gram-positiven Zellen haben die Elektronenakzeptoren freien Zugang zu der terminalen Reduktase, NAD<sup>+</sup> kann regeneriert werden. B: Bei Gram-negativen Zellen bildet der periplasmatische Raum eine Barriere zwischen terminaler Reduktase und extrazellulärem Elektronenakzeptor. Ein Elektronenfluss ist nicht möglich, wodurch NAD<sup>+</sup> nicht regeneriert werden kann und NADH<sub>2</sub> akkumuliert. NADH-DH, NADH-Dehydrogenase; TEA, terminaler Elektronenakzeptor; UQ, Ubiquinon; MQ, Menaquinon.

Für den Metabolismus einer Zelle ist es von größter Bedeutung, die Reduktionsäquivalente (NAD(P)<sup>+</sup>) zu regenerieren. Bakterien, die zu DMR fähig sind, besitzen ein System, um diese Barriere zu überwinden und so den Elektronentransfer über die äußere Membran zu ermöglichen. Am Beispiel von *Shewanella oneidensis* soll gezeigt werden, wie dieses Problem auf zellulärer Ebene gelöst wurde.

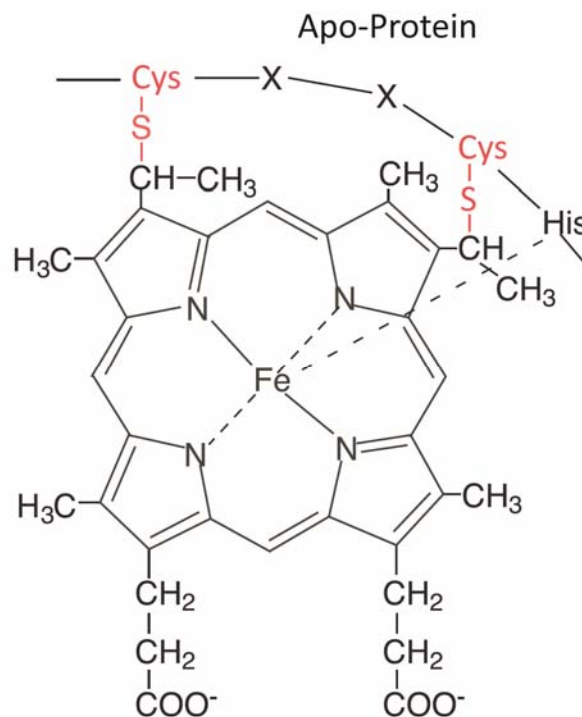
### **2.2.2 *Shewanella oneidensis***

*Shewanella oneidensis* MR-1 ist ein nicht-fermentatives, fakultativ anaerobes  $\gamma$ -Proteobakterium. Es wurde 1988 aus dem Lake Oneida in Upstate New York, USA durch Myers & Nealson isoliert (Myers & Nealson, 1988). Die wahrscheinlich bemerkenswerteste Eigenschaft von *S. oneidensis* ist die erstaunliche Vielfalt an Elektronenakzeptoren, die dieses Bakterium nutzen kann. Neben Sauerstoff in der aeroben Atmung ist es *S. oneidensis* möglich, die Oxidation von Kohlenstoffquellen an Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), Thiosulfat (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), Sulfid (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), elementarem Schwefel (S<sup>0</sup>), Glycin, Fumarat, DMSO, TMAO, Mangandioxid (MnO<sub>2</sub>) und Eisen (Fe<sup>3+</sup>) zu koppeln (Myers & Nealson, 1988; Gralnick *et al.*, 2006; Burns & DiChristina, 2009). Diese Vielfalt ist einer der Hauptmotivationsgründe für die intensive Forschung über dieses Bakterium. Ein besonderes Augenmerk der Forschung liegt hierbei auf der DMR. Insbesondere die Aufklärung der Mechanismen der dissimilatorischen Eisenreduktion (engl.: dissimilatory iron reduction, DIR) steht im Fokus der Arbeiten vieler Wissenschaftler. Wie bereits einleitend beschrieben, besteht die Herausforderung für *Shewanella* darin, die respiratorischen Elektronen aus der Cytoplasmamembran durch das Periplasma zu schleusen und über die äußere Membran auf die terminale Reduktase zu übertragen, welche dann die Elektronen auf den extrazellulären terminalen Akzeptor transferiert. Das Genom von *S. oneidensis* enthält eine Vielzahl von Genen, die für hypothetische *c*-Typ Cytochrome codieren (Meyer *et al.*, 2004). Zurzeit geht man von 41 potentiellen *c*-Typ Cytochromen aus, die sich je nach ihrer Lokalisation in drei Gruppen einteilen lassen: 9 in der Cytoplasmamembran, 5 in der äußeren Membran und 27 im Periplasma (Romine *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010).



### 2.2.3 Cytochrome

Cytochrome sind Proteine, die als prosthetische Gruppe einen oder mehrere Häm-Co-Faktoren tragen. Cytochrome des *c*-Typs zeichnen sich durch eine kovalente Bindung zwischen Apoprotein und Co-Faktor aus. *c*-Typ Cytochrome kennzeichnet ein Bindemotiv aus zwei Cysteinen und einem Histidin (-CxxCH-), an welches die Hämgruppe über zwei Thioetherbrücken an die Cysteine gebunden wird. Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung eines *c*-Typ Cytochroms.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Bindung des Häm-Co-Faktors an das Apoprotein mit dem Bindemotiv -CxxCH-. Die Hämgruppe wird über zwei Thioethergruppen kovalent an zwei Cysteinreste des Proteins gebunden (rot). Abbildungsausschnitt bearbeitet aus Tanaka et al., 2011.

Cytochrome spielen eine wichtige Rolle bei Elektronen-übertragenden Prozessen. Die Stickstoffatome der vier Pyrrol-Ringe des Häm-Co-Faktors koordinieren zentral ein Eisenatom. Dieses Eisenatom ist in der Lage, durch Aufnahme bzw. Abgabe eines Elektrons die Oxidationsstufe zwischen  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  zu wechseln. Das bedeutet, dass ein Cytochrom je nach Anzahl der vorhandenen Häm-Gruppen mehrere Elektronen aufnehmen kann. Aus *S. oneidensis* sind mehrere Multi-Häm-Cytochrome bekannt. Es gibt Di-Häm Cytochrome (z.B. BccP), Tetra-Häm-Cytochrome (z.B. STC, small tetraheme cytochrome; CymA

(cytoplasmic membrane protein A; FccA, Fumarat Reduktase), Penta-Häm Cytochrome (z.B. NrfA, Nitrit-Reduktase) bis hin zu Deca-Häm Cytochromen (z.B. MtrA, metal reducing protein A).

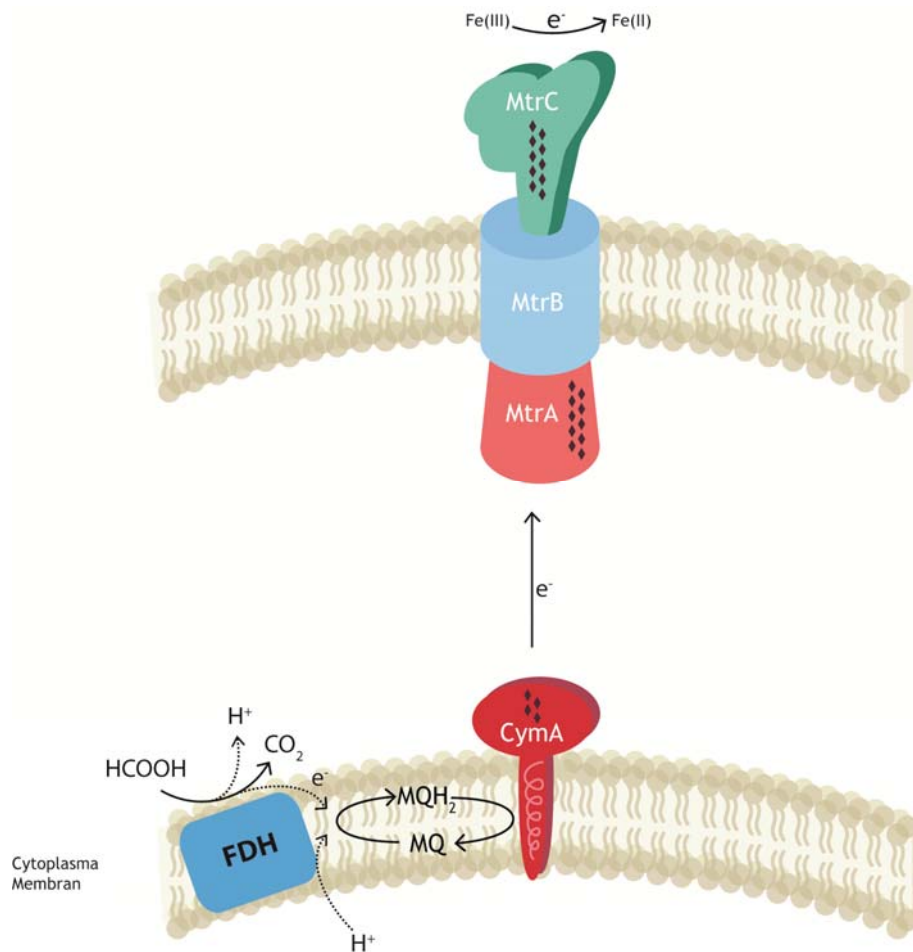
Die grundlegende Bedeutung der c-Typ Cytochrome in Bezug auf die anaerobe Atmung in *Shewanella* zeigte sich in Arbeiten von Bouhenni et al. und Dale et al. Sie konnten zeigen, dass Deletionen in den Genen für die c-Typ Cytochrom Maturation (*ccm*) in *S. oneidensis* zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit führte, anaerobe Elektronenakzeptoren zu reduzieren (Bouhenni *et al.*, 2005; Dale *et al.*, 2007).

Viele Arbeitsgruppen widmen sich seither der Erforschung der Elektronen-übertragenden Prozesse in *S. oneidensis*.

### **2.3 Dissimilatorische Eisenreduktion (DIR)**

Eisen ist das am häufigsten vorkommende Redox-aktive Metall in der Erdkruste (Richter *et al.*, 2012). Es ist also nicht verwunderlich, dass Bakterien Mechanismen evolviert haben, dieses Element als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen. Modellorganismen zur Erforschung der DIR sind *Geobacter* und *Shewanella* Spezies. Die DIR in *S. oneidensis* MR-1 ist besonders gut verstanden und dient im Folgenden als Beispiel für die Erläuterungen der relevanten Prozesse und beteiligten Proteine, die diesem Bakterium extrazelluläre Atmung auf unlösliche Elektronenakzeptoren, insbesondere Eisen, ermöglichen.

Die Aufklärung der Prozesse, bzw. die Identifikation der Proteine, die extrazellulären Elektronentransport vermitteln gelang nach und nach hauptsächlich durch Studien von knock-out Mutanten. Auf diese Weise war es möglich, ein Modell der beteiligten Proteine zu erstellen, die die essentielle Basis für die DIR bilden. Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht dieser Proteine und ihre mutmaßliche Interaktion.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der bei der DIR beteiligten essentiellen Proteine. Erklärungen zu den einzelnen Proteinen siehe Text. MQ, Menaquinon; MQH<sub>2</sub>, Menaquinol; FDH, Formiat-Dehydrogenase. Die Rauten stellen schematisch die Anzahl der Hämgruppen der beteiligten Proteine dar.

### Proteine der dissimilatorischen Eisenreduktion

Das erste essentielle Protein in der respiratorischen Elektronentransportkette in *S. oneidensis* ist CymA.

**CymA** ist ein integrales Membranprotein, dessen aktives Zentrum dem Periplasma zugewandt ist. Die Elektronen werden aus dem Menaquinol-Pool der Cytoplasmamembran auf CymA (cytoplasmic membrane protein A) übertragen - dies ist der Eintrittspunkt der Elektronen in das Periplasma. Von CymA aus werden zahlreiche respiratorische Wege mit Elektronen versorgt (Myers & Myers, 2000; Schwalb *et al.*, 2002; Schwalb *et al.*, 2003; Murphy & Saltikov, 2007). Eine  $\Delta cymA$  Mutante ist nicht mehr in der Lage Fe(III), Mn(IV), Nitrat oder Fumarat zu reduzieren (Myers & Myers, 1997). In dem aktuellen Modell der DIR

werden die Elektronen von CymA auf das nächste essentielle Protein MtrA und somit ins Periplasma übertragen.

**MtrA** ist ein monomeres, periplasmatisches Deca-Häm-Cytochrom. Seine Relevanz in Bezug auf die Eisenreduktion wurde bereits in vielen Arbeiten gezeigt (Bretschger *et al.*, 2007; Hartshorne *et al.*, 2009; Schicklberger *et al.*, 2011). Lange Zeit ging man davon aus, dass die Funktion von MtrA darin besteht, eine periplasmatische „Brücke“ zwischen CymA in der Cytoplasmamembran und der terminalen Reduktase (MtrC) in der äußeren Membran zu bilden. Diese Verbindung wäre auf zwei Arten möglich:

- i) eine, das Periplasma durchspannende, statische Verbindung oder
- ii) eine dynamische Verbindung, in der MtrA als Shuttle zwischen CymA und der terminalen Reduktase fungiert (Ross *et al.*, 2007).

Die experimentellen Daten von Ross *et al.* legen eine statische Assoziation von MtrA zusammen mit MtrB und MtrC als einen Komplex nahe. Weiterführende Arbeiten zeigten darüber hinaus allerdings eine periplasmatische Abundanz von MtrA, wodurch eine dynamische Shuttle-Funktion von MtrA wahrscheinlicher erscheint (Pitts *et al.*, 2003; Schuetz *et al.*, 2009). Die tatsächlich mögliche Elektronenübertragung von CymA auf MtrA wurde schließlich 2009 von Schütz *et al.* bewiesen (Schuetz *et al.*, 2009).

Zusätzlich zu der Elektronen-übertragenden Eigenschaft besitzt MtrA eine weitere, für die DIR essentielle Funktion. MtrC, MtrA und MtrB bilden wie bereits beschrieben einen Komplex in der äußeren Membran. Für die Ausbildung dieses Komplexes ist es wichtig, dass das  $\beta$ -barrel Protein MtrB korrekt in die Membran eingelagert wird. Erst dadurch ist eine Interaktion – und damit Elektronentransfer – zwischen MtrA als periplasmatischem Shuttle und MtrC als terminaler Reduktase möglich. Die erste Beobachtung, die MtrB als essentielles Protein in der Eisen- und Manganreduktion identifizierte, beschrieben Beliaev und Saffarini 1998 (Beliaev & Saffarini, 1998). Später konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Funktion von MtrA darin liegt, MtrB vor proteolytischem Abbau durch die Protease DegP zu schützen und dadurch die Etablierung eines funktionellen Komplexes zu gewährleisten (Schicklberger *et al.*, 2011).

**MtrC** ist die terminale Reduktase der DIR und eines der fünf äußeren Membran-Cytochrome (outer membrane cytochromes, OMCs) in *S. oneidensis*. Deletionsmutanten weisen eine drastische Verringerung der Eisenreduktionsfähigkeit auf (Myers & Myers, 2002). Die Redundanz der OMCs verhindert einen vollständigen Verlust der Aktivität, da z.B. OmcA

(outer membrane cytochrome A) ebenfalls eine Aktivität in Bezug auf Eisen- und Manganreduktion zeigt (Bücking *et al.*, 2010; Coursolle & Gralnick, 2012). Die Aufklärung der Proteinstruktur von MtrF, einem Homolog zu MtrC, zeigte die Exposition zweier Hämgruppen an der Außenseite des Proteins. Die Exposition erlaubt höchstwahrscheinlich einen direkten Elektronentransfer auf unlösliche Metalle und bietet eine Erklärung für die relative Unspezifität und dadurch redundante Aktivitäten der OMCs (Clarke *et al.*, 2011).

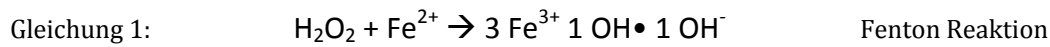
Neben den bisher beschriebenen Proteinen und Cytochromen, die für die DIR essentiell sind, finden sich im Periplasma von anaerob gewachsenen *S. oneidensis* Zellen eine Vielzahl an *c*-Typ Cytochromen, deren Funktion in Hinblick auf die tatsächliche DIR oder extrazellulären Elektronentransfer im Allgemeinen nicht bekannt ist. Nachfolgend werden diejenigen beschrieben, denen eine funktionelle Aufgabe zugeordnet werden kann.

**FccA** (Flavocytochrom A) ist ein Tetrahäm-Cytochrom, das einen Flavin-Cofaktor trägt. Es ist die einzige respiratorische Fumarat-Reduktase in *S. oneidensis* und ist in der Lage, Elektronen von CymA aufzunehmen (Schuetz *et al.*, 2009). Es gibt Spekulationen über eine Funktion von FccA, die über die Reduktase-Aktivität hinausgehen. Durch seine hohe Konzentration im Periplasma unter anaeroben Bedingungen und die Tatsache, dass ein Elektronentransfer zwischen sowohl CymA und FccA als auch FccA und MtrA möglich ist, kommt es als Elektronenspeicher-Protein in Frage, das Elektronen für eine gewisse Zeit aufnehmen könnte, ohne direkt an der Reduktion eines terminalen Elektronenakzeptors beteiligt zu sein (Schuetz *et al.*, 2009, Bücking *et al.*, 2013).

**BccP** (auch CcpA) ist ein Protein der Klasse der bakteriellen *c*-Typ Cytochrom Peroxidasen und ein Dihäm-Cytochrom. Seine Funktion ist die katalytische Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dadurch der Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). BccP erhält seine Elektronen nicht direkt von CymA, sondern von einem weiteren *c*-Typ Cytochrom: ScyA.

**ScyA** (small cytochrome A) ist ein Monohäm-Cytochrom. Seine Funktion besteht darin, Elektronen von z.B. CymA aufzunehmen und an BccP weiterzuleiten (Schütz *et al.*, 2011). Obwohl diese beiden Proteine eine zelluläre Schutzmaßnahme gegen Sauerstoffstress darstellen, findet man sie dennoch auch unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen. Der Grund dafür liegt in der Entstehung von ROS durch die sog. Fenton Reaktion (Gleichung 1), in deren Verlauf Radikal-Spezies entstehen, die massive Zellschäden verursachen können. Um der Entstehung dieser Reaktion vorzubeugen, führt die Expression

von ScyA und BccP zu einer Detoxifizierung auf Grund der katalytischen Umsetzung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Moleküle zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub>.



Neben FccA, Bccp und ScyA finden sich noch weitere *c*-Typ Cytochrome im Periplasma von *S. oneidensis*, für die physiologische Funktionen bekannt sind.

**NapB**, ein Dihäm-Cytochrom ist als Bestandteil des NapAB-Komplexes Teil der Nitrat-Reduktase. Die Funktion dieses Cytochroms besteht vermutlich darin, einen gesteigerten Elektronenfluss zur tatsächlichen Nitrat-Reduktase NapA zu bewirken, da eine  $\Delta napB$ -Mutante weiterhin in der Lage ist, Nitrat zu reduzieren, wenn auch mit verringerter Geschwindigkeit. In Wachstums-Kompetitionsassays zeigte sich jedoch ein deutlicher Nachteil der Mutante (Gao *et al.*, 2009).

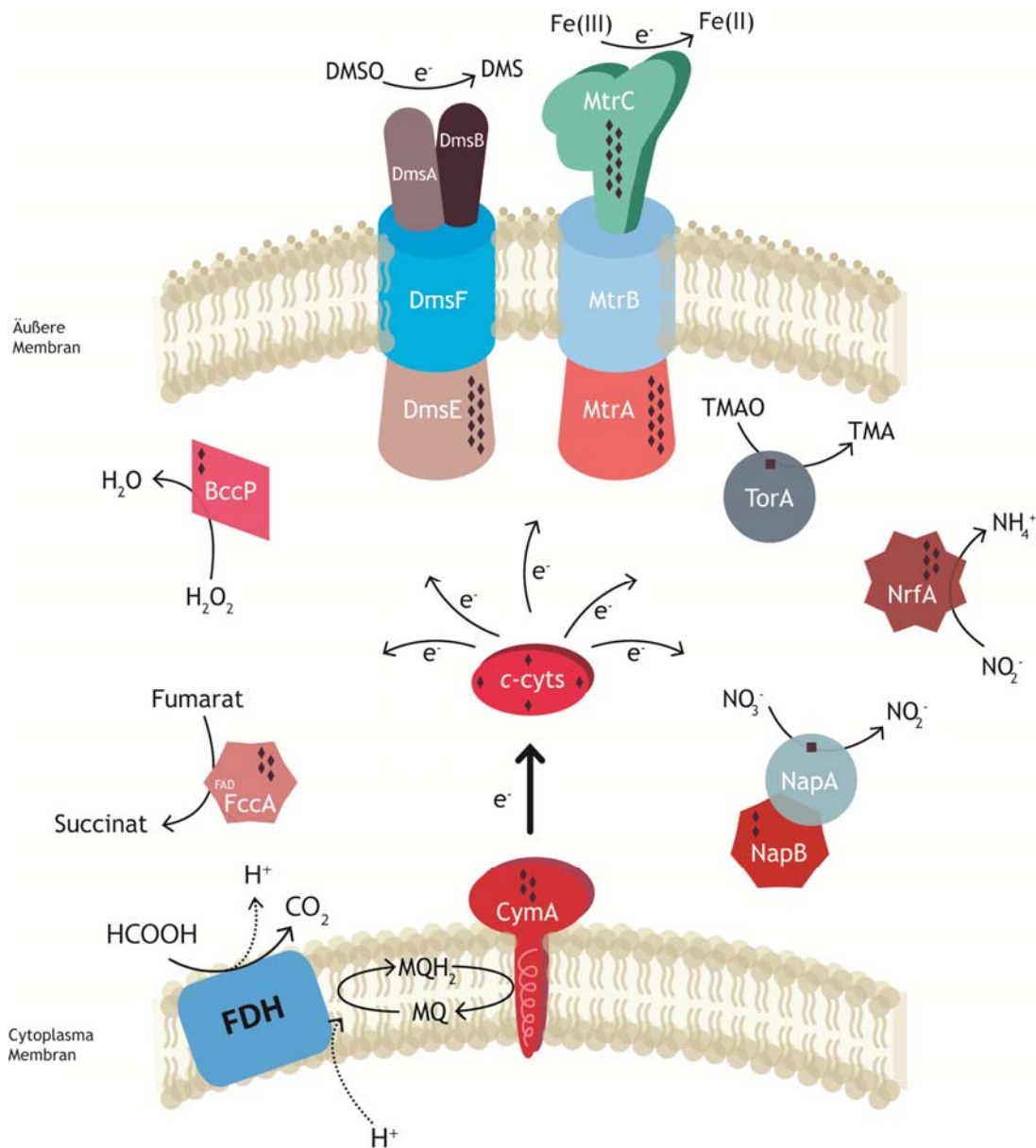
**NrfA**, ein Pentahäm-Cytochrom, ist die physiologische Nitrit-Reduktase und katalysiert die Umsetzung von Nitrit zu Ammonium. NrfA wird in *S. oneidensis* ebenfalls über CymA mit Elektronen versorgt und ist besonders unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen hoch-reguliert (Beliaev *et al.*, 2002). Diese Regulation ist vermutlich eine Schutzmaßnahme der Zelle, sich vor Nitrit, dem toxischen Zwischenprodukt der Nitrat-Reduktion, zu schützen.

Über diese Proteine mit bekannten Funktionen hinaus, gibt es eine Anzahl an Cytochromen, deren funktionelle Aufklärung noch andauert. Unter diesen Cytochromen befindet sich unter anderen STC (engl.: small tetraheme cytochrome).

STC wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Auch wenn es gelang, eine Proteinstruktur mit sehr hoher Auflösung zu charakterisieren, ist die Funktion des Cytochroms im Stoffwechsel bzw. beim extrazellulären Elektronentransfer in *S. oneidensis* bisher nicht geklärt (Leys *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2013). STC ist eines der am häufigsten vorkommenden *c*-Typ Cytochrome, die unter anaeroben Bedingungen in *Shewanella* exprimiert werden (Meyer *et al.*, 2004) und obwohl für dieses Protein eine wichtige Rolle während der Eisenreduktion in *S. frigidimarina* nachgewiesen werden konnte, bleibt seine Funktion in *S. oneidensis* weiterhin unklar (Gordon *et al.*, 2000; Tsapin *et al.*, 2001). Bisher ist bekannt, dass es Elektronen von CymA aufnehmen und auf MtrA übertragen kann, jedoch keine Übertragung auf FccA stattfindet (Fonseca *et al.*, 2013).

## **2.4 Elektronentransfer-Netzwerk Hypothese**

Die Anzahl an c-Typ Cytochromen im Periplasma von *S. oneidensis* ist auffällig hoch. Darüber hinaus werden viele terminale Reduktasen unter Bedingungen exprimiert, die zunächst einmal keine Verbindung zu dem eigentlichen terminalen Elektronen-Akzeptor erkennen lassen. Welchen Sinn macht es für eine Zelle, z.B. sowohl eine Fumarat-Reduktase als auch eine Nitrit-Reduktase unter Eisen-reduzierenden Bedingungen zu exprimieren? Eine Antwort auf diese Frage könnte die ökologische Nische des Organismus geben. *S. oneidensis* kommt in Lebensräumen vor, in denen ein häufiger Wechsel verschiedener Elektronenakzeptoren erfolgt (Fredrickson *et al.*, 2008). Eine generelle Verbindung mehrerer respiratorischer Wege bietet eine gute Möglichkeit für die Zelle, unmittelbar und unverzüglich auf Veränderungen in der Umwelt zu reagieren. Die Tatsache, dass viele dieser Wege direkt von CymA als initialem Elektronen-Donor für periplasmatische Cytochrome abhängen, ist ein weiteres Indiz für die physiologische Nische von *S. oneidensis* als Generalist. Abbildung 4 stellt eine schematische Übersicht über die periplasmatischen Elektronentransferwege in *S. oneidensis* dar.



**Abbildung 4:** Das periplasmatische Elektronentransfer-Netzwerk in *S. oneidensis*. Viele der unterschiedlichen terminalen Reduktasen scheinen über *c*-Typ Cytochrome miteinander verbunden zu sein (*c*-cyts). FDH, Formiat-Dehydrogenase; MQ, Menaquinon; MQH<sub>2</sub>, Menaquinol.

Aus der Elektronentransfer-Netzwerk-Hypothese lässt sich eine weitere hypothetische Funktion der beteiligten Cytochrome ableiten.



Die schiere Anzahl an Häm-Gruppen, die im Periplasma vorhanden ist (periplasmatische Fraktionen von *S. oneidensis* sind dunkelrot gefärbt) erlaubt theoretisch die Aufnahme einer großen Anzahl von Elektronen. Viele der Cytochrome können untereinander Elektronen übertragen, von daher ist es denkbar, dass die periplasmatischen Cytochrome eine Art Kondensator bilden, der als temporärer Elektronenspeicher dienen könnte. Eine ähnliche Hypothese existiert für das  $\delta$ -Proteobakterium *Geobacter sulfurreducens* (Esteve-Nunez *et al.*, 2008). Ein solcher Elektronenspeicher kann es dem Bakterium ermöglichen, auch in Ermangelung eines geeigneten Elektronenakzeptors bis zu einem gewissen Grad Stoffwechsel zu betreiben und Energie zu konservieren. Darüber hinaus ermöglicht diese „Strategie“ ebenfalls einen Vorteil in der Konkurrenz um C-Quellen, die diese Organismen verstoffwechseln können, wozu Organismen ohne einen solchen Speicher bei Nicht-Vorhandensein eines Elektronenakzeptors nicht in der Lage sind.

### **2.5 Ziele dieser Arbeit:**

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit war es, die periplasmatischen Elektronentransfer-Reaktionen in *Shewanella oneidensis* MR-1 besser zu verstehen. Die hohe Redundanz der Funktionen der c-Typ Cytochrome sorgte bis jetzt dafür, dass bis auf wenige Ausnahmen (MtrA) kein relevanter Phänotyp durch knock-out Studien in Eisen-gewachsenen *S. oneidensis* Kulturen auszumachen war.

Darüber hinaus sollte versucht werden, durch die genauere Betrachtung und Beschreibung des Periplasmas als Reaktionsraum die physiologische Nische von *Shewanella oneidensis* MR-1 als Generalist näher zu beschreiben und zu charakterisieren. Hierbei lag der Fokus auf den respiratorischen Elektronentransportprozessen, die *S. oneidensis* als Modellorganismus für extrazelluläre Atmung so interessant für die Forschung machen.

Ein besseres Grundlagenverständnis der metabolischen Prozesse in einem Bakterium wie *S. oneidensis* ist von großem Interesse in Bezug auf unterschiedliche Anwendungen, bedenkt man die Vielzahl an Elektronenakzeptoren, die diesem Bakterium zur Verfügung stehen. Abgesehen von rein technischen Anwendungen wie z.B. mikrobiellen Brennstoffzellen, bietet sich die Möglichkeit zur Remediation kontaminierter Standorte, da viele Schwermetalle in ihrer oxidierten Form eine hohe Wasser-Löslichkeit besitzen und so für viele Organismen in der Umwelt verfügbar sind, während ihre reduzierten Verbindungen häufig zur Präzipitation neigen und dadurch aus dem unmittelbaren Kreislauf entfernt werden.

Die Eisenatmung gilt als eine der ältesten Formen der Energiegewinnung seit der Entstehung des Lebens. Eine detaillierte Beschreibung der Prozesse, die dissimilatorische Eisenreduktion in *S. oneidensis* vermitteln, könnte helfen, ein erweitertes Verständnis der evolutionären Prozesse zu erhalten, die Energiegewinnung möglich machen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Enzyme

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

#### 3.2 Stammkultivierung

##### Verwendete Stämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Bakterien- und Hefe-Stämme verwendet.

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Stämme.

Stamm	Relevanter Genotyp	Quelle
7	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 Wildtyp	(Myers & Neilson, 1988)
22	<i>aci q</i> , PN25- <i>tetR</i> , SpR, <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$ , Phi80 <i>lacZDM15</i>	(Lutz & Bujard, 1997)
23	<i>E. coli</i> pMQ150	(Shanks <i>et al.</i> , 2006)
26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ
52	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$	(Schuetz <i>et al.</i> , 2009)
144	<i>E. coli</i> S17 $\lambda pir$	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
207	<i>S. oneidensis</i> $\Delta fccA$	(Schuetz <i>et al.</i> , 2009)
221	<i>S. oneidensis</i> $\Delta ccpA$	(Schütz <i>et al.</i> , 2011)
353	<i>S. oneidensis</i> $\Delta ifcA-1$	Diese Arbeit
355	<i>S. oneidensis</i> $\Delta SO_{3420}$	Diese Arbeit
381	<i>S. oneidensis</i> $\Delta SO_{4485}$	Diese Arbeit
383	<i>S. oneidensis</i> $\Delta SO_{4047}$	Diese Arbeit
384	<i>S. oneidensis</i> $\Delta SO_{4666}$	Diese Arbeit
385	<i>S. oneidensis</i> $\Delta nrfA$	Diese Arbeit

400	<i>S. oneidensis</i> $\Delta$ SO_4048	Diese Arbeit
437	<i>S. oneidensis</i> P <sub>pBAD</sub> :: <i>scyA</i> ( $\Delta$ <i>scyA</i> )	(Schütz <i>et al.</i> , 2011)
441	<i>S. oneidensis</i> $\Delta$ <i>cctA</i>	Diese Arbeit
684	<i>S. oneidensis</i> $\Delta$ <i>cctA</i> $\Delta$ <i>fccA</i>	Diese Arbeit
700	JG684 pBAD_ <i>cctA</i>	Diese Arbeit
717	JG684 pBAD_ <i>mtrA</i> _His	Diese Arbeit
718	JG684 pBAD_ <i>scyA</i> _His	Diese Arbeit
724	JG684 pBAD_ <i>nrfA</i> _His	Diese Arbeit
734	JG7 pBAD <i>napA</i> _His	Diese Arbeit
735	JG7 pBAD <i>napB</i> _His	Diese Arbeit
736	JG7 pBAD <i>nrfA</i> _His	Diese Arbeit
737	JG7 pBAD <i>cctA</i> _His	Diese Arbeit
738	JG684 pBAD_ <i>napB</i> _His	Diese Arbeit
739	JG684 pBAD_ <i>napA</i> _His	Diese Arbeit
740	JG684 pBAD_ <i>fccA</i> _His	Diese Arbeit
759	JG684 pBAD_ <i>crp</i>	Diese Arbeit
780	JG684 pBAD_ <i>cctA</i> _His	Diese Arbeit
837	JG684 pBAD_ <i>fccA</i>	Diese Arbeit
864	JG441 + pBAD_ <i>cctA</i> _his	Diese Arbeit

### Anzucht und Kultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden auf folgenden Medien kultiviert. Die Anzucht aus der Stammsammlung erfolgte stets in LB-Medium (lysogeny broth) nach Miller (Tab. 3) bei 30°C (*S. oneidensis*) bzw. 37°C (*E. coli*) unter ständigem Schütteln (180 rpm).

**Tabelle 3:** Zusammensetzung LB-Medium

Substanz	Einwaage für 1 l
NaCl	5 g
Trypton/Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
dH <sub>2</sub> O	Add. 1000 ml

Zur Kultivierung auf Agar-Platten wurde den Medien jeweils 2% Agar-Agar zugegeben.

Für die anaerobe Anzucht von Bakterien wurde M4 Medium (Tab. 4) verwendet.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung M4-Medium

Substanz	Konzentration
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,73 mM
HEPES	5 mM
NaCl	150 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9 mM
CoCl <sub>2</sub>	5 µM
CuSO <sub>4</sub>	0,2 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 µM
FeCl <sub>2</sub>	5,4 µM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
MnSO <sub>4</sub>	1,3 µM
Na <sub>2</sub> EDTA	67,2 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	3,9 µM
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	1,5 µM
NaHCO <sub>3</sub>	2 mM
NiCl <sub>2</sub>	5 µM
ZnSO <sub>4</sub>	1 µM

Als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator diente Na-*D,L*-Laktat (50 mM). Als Elektronenakzeptor wurden die in Tabelle 5 angegebenen Substanzen verwendet.

**Tabelle 5:** Verwendete Elektronenakzeptoren.

Substanz	Konzentration
Eisencitrat	50 mM
DMSO	25 mM
AQDS	10 mM
NaNO <sub>3</sub>	2 mM
TMAO	25 mM
Na-Fumarat	50 mM
NaS <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	25 mM

Zur anaeroben Anzucht wurden die Kulturflaschen mit Gummistopfen verschlossen. Durch cyclisches Begasen mit N<sub>2</sub> und anschließendem Entgasen (20x) für jeweils 2 min wurde Sauerstoff weitestgehend entfernt.

### **3.3 Bestimmung der Fe<sup>2+</sup>-Konzentration**

Die Bestimmung der Fe<sup>2+</sup>-Konzentration erfolgte über den quantitativen Nachweis der Fe<sup>2+</sup>-Ionen durch Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat). Ferrozin bildet mit dem gelösten Fe<sup>2+</sup> einen purpurnen bis tief dunkelblauen Komplex, über den die Konzentration anhand einer Eichgerade ermittelt werden kann. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 550 – 600 nm, die Messungen erfolgten bei 595 nm. Um die Sauerstoff-basierte Oxidation der Fe<sup>2+</sup>-Ionen während der Probenvorbereitung zu verhindern, wurden die Proben sofort nach Entnahme mit 1 M HCl angesäuert. (100 µl Probe + 900 µl 1M HCl). Alle weiteren Verdünnungen und Standards wurden ebenfalls in 1 M HCl angesetzt. Zur Messung wurden 20 µl der jeweiligen Probe mit 180 µl Ferrozin-Lösung (0,1% Ferrozin in 50% Ammoniumacetat) gemischt und die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### **Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)**

Zur präparativen PCR wurde die Phusion® High Fidelity Polymerase (NEB) verwendet. Sie verfügt über eine 3' → 5' Exonucleaseaktivität und zeichnet sich durch eine sehr geringe Fehlerrate aus. Die Reaktionen wurden im 50 µl Maßstab nach Herstellerangaben durchgeführt. Tabelle 6 zeigt ein Standardprotokoll.

**Tabelle 6:** PCR-Programm der Phusion® Polymerase.

Temperatur	Zeit	Schritt
98°C	120 s	Initiale Denaturierung
98°C	30 s	Denaturierung
55°C	30 s	Primer Annealing
72°C	30 s/kb Amplifikat	Elongation
72°C	300 s	Finale Elongation
4°C	∞	Ende

30x {

Die Temperatur des Primer-Annealings wurde je nach verwendetem Primer-Paar angepasst und reichte insgesamt von 50 bis 70°C. Ein Standard Pipettierschema für eine 50 µl Reaktion ist in Tabelle 7 gezeigt.

**Tabelle 7:** Pipettierschema für eine 50 µl PCR-Reaktion

Substanz (Stock-Konzentration)	Menge
Primer for (2 µM)	12,5 µl
Primer rev (2 µM)	12,5 µl
dH <sub>2</sub> O	11,5 µl
Puffer GC (5x)	10 µl
DMSO	1,5 µl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1 µl
Template	1 µl oder 1 Kolonie
Phusion-Polymerase (2.000 u/ml)	1 µl

Für analytische PCR-Reaktionen zum Nachweis von Mutationen auf genetischer Ebene wurde der MangoMix® (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Dies ist ein 2-fach „ready-to-use“ Mix, dem nur noch Primer und Template zugesetzt werden müssen. Die enthaltene Polymerase ist eine modifizierte Taq-Polymerase. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### Isolierung chromosomaler DNA aus *S. oneidensis* MR-1

Als Grundlage für PCR-basierte Amplifikation aus dem Genom von *S. oneidensis* diente chromosomale DNA. Die Isolierung erfolgte durch ein nach Johnson modifiziertes Protokoll der Marmur Methode (Marmur, 1961). Die verwendeten Lösungen und Substanzen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA.

<b>Resuspensionspuffer</b>	Tris-HCl (pH 8), 10 mM
	EDTA, 1 mM
	Sucrose, 0,35 M
<b>Lyselösung (2x)</b>	Tris-HCl (pH 8), 100 mM
	NaCl, 0,3 M
	EDTA, 20 mM
	SDS, 2%
ProteinaseK	ProteinaseK in TE-Puffer (pH 8), 20 mg/ml
TE- Puffer	Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 1 mM
Na <sub>2</sub> ClO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> ClO <sub>4</sub> , 5 M in dH <sub>2</sub> O
Na-Acetat	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> , 3 M in dH <sub>2</sub> O (pH 6)
Chloroform/Isoamylalkohol	CHCl <sub>3</sub> :C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O (25:1, v/v)
Phenol/Chloroform	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O:CHCl <sub>3</sub> (v/v)
Ethanol	76% und 95% CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH in dH <sub>2</sub> O



Ca. 3 g Zellen wurden in 25 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Zu der Suspension wurde eine Spatelspitze Lysozym gegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Derweil wurden 12,5 ml 5 M Na<sub>2</sub>ClO<sub>4</sub>, 2 ml β-Mercaptoethanol und 125 µl Proteinase K zu 25 ml Lyselösung gegeben und der entstandene Niederschlag bei 50°C gelöst. Lyselösung und Zellsuspension wurden vereinigt und bei 55°C inkubiert (1-3 h). Die Lyse der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Zu der Suspension wurden 15 ml Phenol:Chloroform (v/v) gegeben und 30 min bei RT vorsichtig geschwenkt. Die Suspension wurde für 10 min bei 4°C und 25.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein DNase-freies GSA Röhrchen überführt. Der Suspension wurden 12 ml Phenol:Chloroform (v/v) zugesetzt und 20 min bei 37°C bei leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 25.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Weithals-Erlenmeyerkolben überführt. Der Lösung wurde das 0,6-fache Gewicht an Isopropanol zugesetzt. Die nun sichtbaren Nukleinsäuren (Schlieren) wurden mit einer zu einem Haken geformten Pasteurpipette aufgespult und in einen weiteren Erlenmeyerkolben überführt. Die Nukleinsäuren wurden zweimal mit 76% Ethanol gewaschen und kurz (~10 min) getrocknet. Danach wurden die Nukleinsäuren in 20 ml TE-Puffer gelöst und der Lösung wurden 25 µl einer DNase-freien RNase Lösung (10 mg/ml) zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Chloroform:Isoamylalkohol zugegeben und der Niederschlag bei 9.000 g und 4°C für 10 min pelletiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung versetzt und die DNA durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol (95%) gefällt. Die DNA wurde auf eine Pasteurpipette gespult, 2x für 10 min in Ethanol (76%) gewaschen, anschließend kurz getrocknet und in 1 ml TE-Puffer resuspendiert.

### **Isolierung von Plasmiden**

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien wurde das PureYield™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Abweichend vom Standardprotokoll wurden die isolierten Plasmide in 40 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen, um die Konzentration zu erhöhen.

### Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit der Firma Promega verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

### Restriktionsverdau

Zur Linearisierung wurden Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten. Tabelle 9 zeigt einen Standard-Restriktionsansatz.

**Tabelle 9:** Standard-Reaktionsansatz für Plasmid-Restriktion.

Komponente	Menge
Plasmid	20 – 40 µl (je nach Konzentration)
Puffer (10x)	5 µl
Restriktionsenzym	Je 2 µl
dH <sub>2</sub> O	Add. 50 µl

Die Restriktionsansätze wurden je nach Enzym nach Herstellerangaben inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der linearisierten Vektoren durch eine Agarose-Gelelektrophorese (s.u.).

### In vitro Ligation

Zur molekularbiologischen Klonierung von DNA Fragmenten wurde die isothermale in vitro Rekombination nach Gibson verwendet (Gibson *et al.*, 2009). Bei dieser Methode werden die zu ligierenden Elemente mit überlappenden Sequenzen per PCR synthetisiert und in einem einzigen Reaktionsansatz ligiert. Der Reaktionsansatz enthält eine Taq-Ligase (NEB), eine Phusion®-Polymerase und eine T5 5'-3'-Exonuclease. Die Exonuclease bildet an den überlappenden Sequenzbereichen des linearisierten Vektors und des bzw. der PCR-Produkte Einzelstränge, die dann miteinander komplementär binden. Die Phusion®-Polymerase synthetisiert die entstanden Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen und die Taq-Ligase verknüpft die neu-synthetisierten Stränge mit dem Vektor-Rückgrat. Tabelle 10 zeigt den 5x Reaktionpuffer, Tabelle 11 den Reaktionsmastermix.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des 5x Reaktionspuffers der in vitro Ligation.

Substanz	Menge
Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
dNTPs	1 mM
DTT	50 mM
NAD	5 mM
PEG-8000	25% (w/v)
dH <sub>2</sub> O	Add. 250 µl

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Reaktionsmastermixes. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf insgesamt 25 Reaktionsansätze.

Substanz	Menge
5x Reaktionspuffer	80 µl
Phusion® Polymerase (2 U/µl)	5 µl
NEB Taq DNA-Ligase (40 U/µl)	40 µl
Epicentre T5 Exonuclease (0,1 U/µl)	16 µl
dH <sub>2</sub> O	239 µl

Für die Reaktion wurden 5 µl DNA zu 15 µl Reaktionsmastermix pipettiert und der Ansatz 1,5 h bei 50°C im Thermocycler (Biorad) inkubiert. Die DNA wurde in äquimolaren Mengen von Vektor und Insert(s) zugegeben. Die Gesamt-DNA Konzentration betrug 100 ng pro Reaktionsansatz.

### Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Kontrolle und präparativen Aufbereitung von PCR-Produkten und linearisierten Vektoren wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Hierfür wurde Agarose (1%, w/v) in TAE-Puffer (Tabelle 12) aufgekocht und mit 0.5 µg/ml Midori Green (Nippon Genetics, Düren) versetzt. Midori Green ersetzt das früher häufig verwendete Ethidiumbromid, gilt als weit weniger toxisch bei höherer Sensibilität gegenüber DNA und

dient zur Anfärbung der DNA unter UV-Licht (312 nm). Die Proben wurden vor dem Laden mit 6x DNA-Lade-Puffer (Tabelle 13) versetzt. Als Größenmarker wurde der „1 kb ladder“ (Thermo Scientific) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Substanz	Konzentration
Tris-HCl (pH = 8)	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers.

Substanz	Menge
Xylene cyanol	0,05 g
Orange G	0,05 g
Glycerin	12 ml
50x TAE	1,5 ml
dH <sub>2</sub> O	Add 15 ml

### Transformation

Um DNA in Bakterien einzubringen, wurden zwei verschiedene Methoden der Transformation verwendet.

#### Transformation in chemisch kompetente Zellen:

Für diese Art der Transformation wurden  $\alpha$ -Select Gold Efficiency DH5 $\alpha$ -Zellen (Bioline) verwendet. Die Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 50  $\mu$ l Zellen werden 1-2  $\mu$ l Plasmid gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 30-45 s. Anschließend werden die Zellen wieder für 2 min auf Eis

inkubiert. Nach Zugabe von 950 µl SOC Medium (Tabelle 14) werden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektiv-Agar ausplattiert.

### Elektroporation

Durch Anlegen einer Hochspannung (1,8 kV, 5 ms) wird das Membranpotential kurzfristig depolarisiert, wodurch die DNA in die Zellen aufgenommen wird.

Für die Elektroporation wurden 100 µl elektrokompente Zellen (s.u.) mit 1 - 5 µl Plasmid gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biorad) pipettiert. Diese wurde in die Elektroporationsapparatur (MicroPulser, Biorad) eingesetzt und im Programm Ec1 gepulst. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in SOC Medium (Tabelle 14) aufgenommen und bei 30°C (*Shewanella*) bzw. 37°C (*E. coli*) für 1 h inkubiert und anschließend auf Selektiv-Agar ausplattiert.

### Herstellung elektrokompenter Zellen

Die zu transformierenden Zellen wurden über Nacht in LB-Medium gezogen und anschließend in SOB-Medium (Tabelle 14) überimpft. Nach 3-4 h Wachstum wurden die Zellen für 20 min auf Eis gekühlt, pelletiert und 3x in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Transformation wurden die Zellen in einer geringen Menge ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und zusammen mit der zu transformierenden DNA in eine Elektroporationsküvette pipettiert.

**Tabelle 14:** Zusammensetzung der für die Elektroporation benötigten Medien SOB und SOC.

	Substanz	Menge
<b>SOB</b>	Trypton	20 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,19 g
	dH <sub>2</sub> O	Add. 1000 ml
<b>SOC</b>	Glucose	3,6 g
	MgCl <sub>2</sub>	1,9 g
	SOB	Add. 1000 ml

### **3.5 Konjugation und Rekombination**

Da *S. oneidensis* eine relativ niedrige Transformationseffizienz aufweist, wurde Konjugation zur Einbringung von v.a. größeren (>6 kb) Plasmiden (z.B. pMQ150 und darauf basierende Konstrukte) verwendet. Hierzu wurden die zu konjugierenden Vektoren durch Elektroporation (s.o.) in *E. coli* S-17  $\lambda$ -pir eingebracht. Das durch diesen Stamm exprimierte  $\pi$ -Protein stabilisiert den R6K-Replikationsursprung des pMQ150 Plasmids und kann es daher stabil replizieren. Zur Konjugation wurden die benötigten *S. oneidensis* Stämme und der das jeweilige Plasmid enthaltene *E. coli* Stamm über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen. Je 1 ml der Kulturen wurde pelletiert und 2x mit frischem LB-Medium gewaschen. Der *E. coli* Stamm wurde daraufhin in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Mit dieser Suspension wurden die *S. oneidensis* Zellen resuspendiert und die Mischung der Zellen auf eine LB-Platte pipettiert, so dass sich ein großer Tropfen Zellsuspension in der Mitte der Platte befand. Die Platte wurde für 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml frischem LB-Medium von der Platte gewaschen. Es wurden 1:5, 1:25 und 1:125 Verdünnungen in LB-Medium hergestellt und jeweils 100  $\mu$ l der Verdünnungen wurden auf Selektivagar ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Die *S. oneidensis* Stämme, die das Plasmid stabil ins Genom integriert haben – *S. oneidensis* exprimiert kein  $\pi$ -Protein und kann die Antibiotikaresistenz nur exprimieren, wenn es das Plasmid ins Genom integriert – wachsen als kleine rote Kolonien auf einem Rasen aus *E. coli*. Diese Kolonien wurden vorsichtig auf neue Selektivagar-Platten überführt und es wurden Verdünnungsausstriche hergestellt. Einzelkolonien von *S. oneidensis* wurden per „pick and patch“ auf Vorhandensein des vollständigen Plasmids überprüft.

Dafür wurden die Zellen jeweils identisch auf Selektivagar-Platten (z.B. Kanamycin) und LB-Sucrose (10%) ausgestrichen und deren Wachstum untersucht. Bei einer positiven Integration wachsen die Zellen auf LB-Kanamycin, aber nicht auf LB-Sucrose, da pMQ150 ein *sacB*-Gen trägt, dessen Protein zu einer Polymerisierung von Sucrose führt, wodurch der Stoffaustausch der Zellen mit ihrer Umgebung massiv behindert wird. Zellen mit positivem Befund auf stabile Integration wurden für den sog. „second cross“ ausgewählt. Hierzu wurden die Zellen über Nacht in LB-Medium ohne Selektionsmarker gezogen und anschließend 1:10 verdünnt und für weitere 4 h inkubiert. Von dieser Suspension wurden 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen hergestellt und jeweils 50  $\mu$ l auf LB-Sucrose-Platten ausplattiert. Nach 36-48 h Inkubation wurden die Kolonien wieder durch „pick and patch“

auf positive Rekombination getestet, wobei nach dem „second cross“ das korrekte Ergebnis genau umgekehrt zum „first cross“ ist. Nach erfolgter Rekombination ist keine Antibiotikaresistenz mehr in den Zellen vorhanden, weshalb sie auf z.B. Kanamycin kein Wachstum mehr zeigen dürfen. Im Gegensatz dazu erlaubt der Verlust des auf dem pMQ150 codierten *sacB*-Gens ein Wachstum auf LB-Sucrose. Zellen, die dieses Wachstumsmuster zeigten, wurden zur weiteren Analyse per PCR ausgewählt. Bei der zweiten Rekombination (second cross) sind zwei Varianten möglich:

- i) Die Rekombination findet entweder an A und A' statt, wodurch wieder der wildtypische genetische Status entsteht.
- ii) Die Rekombination findet an B und B' statt, wodurch sich eine Mutation ergibt, die den Verlust des wildtypischen genetischen Elements zur Folge hat.

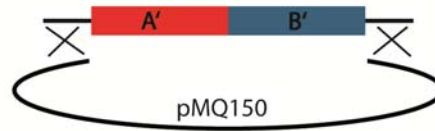
Die Ereignisse der Hefe-basierten Rekombination zur Erzeugung markerloser Mutanten in *S. oneidensis* ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Der genetische Status (WT oder Mutation) wurde per PCR überprüft und die Mutanten durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 15 aufgeführt.

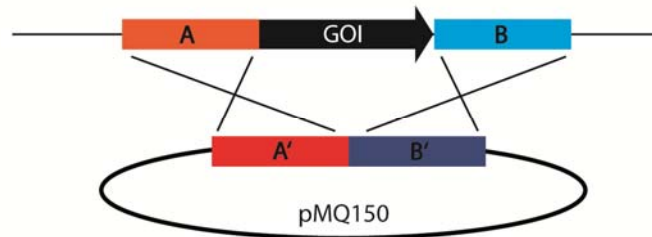
1. Amplifikation  
500 up und 500 down



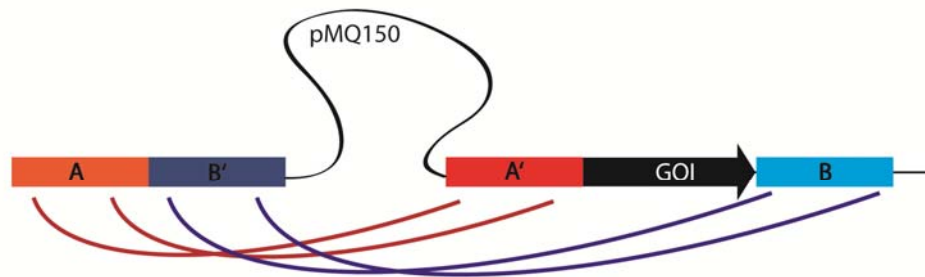
2. in vitro-Ligation der Fragmente



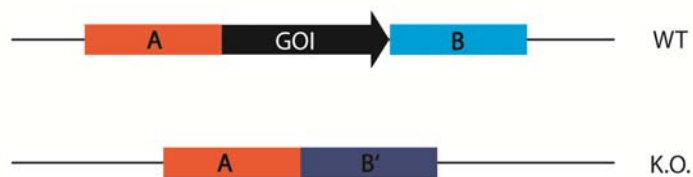
3. Transformation und Rekombination in Rezipientenzelle



4. Rekombinationsmöglichkeiten beim „second cross“



5. Mögliche Ergebnisse der Rekombination nach dem „second cross“



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Hefe-basierten Rekombination zur Erzeugung der Knock-out Mutanten in *S. oneidensis*. Detaillierte Erklärung siehe Text. 1: Primer upstream forward mit Überlapp zum pMQ150 Vektor, 2: Primer upstream reverse mit Überlapp zu Primer 3, 3: Primer downstream forward, 4: Primer downstream reverse mit Überlapp zum pMQ150 Vektor.



### **Sequenzierung**

Die Sequenzierung der genetischen Elemente wurde von der Fa. GATC Biotech (Konstanz) nach der Applied Biosystems 3730xl™ Methode (Sanger-Sequenzierung) durchgeführt.

### **3.7 Primer**

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 15:** In dieser Arbeit verwendete Primer.

Primer Nummer	Sequenz 5' → 3'	Primernamen
1	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGTTTTAATCAAATCTGCGGC	3420 up_for
2	CTGCAGTAATCGCAGGCCGTATTCTCACAATTAGCG	3420 up_rev
3	GCCTGCGATTACTGCAG	3420 down_for
4	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGCCTATTTGAAAGATGTGCG	3420 down_rev
5	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAAAATTCAAGATAATCTAATG	1421 up_for
6	GCGTGACTTGATAGAATTAGCCTCTCTAGTGTTTTAATTC	1421 up_rev
7	CTAATTCTATCAAGTCACGC	1421 down_for
8	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGCAATATAAGTGGGATAAGTG	1421 down_rev
9	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGCCACAGATTGAAGGAGTC	4485 up_for
10	GCGAGACAGCTTGGGCTGCTTAATTTTTTACTAAAATGGC	4485 up_rev
11	CAGCCCAAGCTGTCTCGC	4485 down_for
12	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGCGGGCGGTAAGGATAAG	4485 down_rev
13	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGCGGGCAAGAATAAGATG	2727 up_for
14	CTTAATCTAAATAGACTTGGCAATTGTATCCTCCAATGGTG	2727 up_rev
15	GCCAAGTCTATTTAGATTAAG	2727 down_for
16	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGCTGAAGTTGCCGCGG	2727 down_rev
17	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGCTCTTGGAGGGGTGTAG	3980 up_for

18	GTCATCTTCAAGGATGCTCCGCGTTGCATTTTTG	3980 up_rev
19	CATCCTTGAAGATGAGC	3980 down_for
20	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGCTTTTCTGCCGCGTTATC	3980 down_rev
21	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGCGTAGAGCCACTTG	4047 up_for
22	GTGAATCAGAGCTGCTCGGCTCCTTATTTTATATTCG	4047 up_rev
23	GAGCAGCTCTGATTCAC	4047 down_for
24	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGCGTTGGAATAAATTGCG	4047_down_rev
25	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGCTACATAAATTATTGAATAGC	4048 up_for
26	GATTTTCATGGCCGGCTCCCTTGAACAAACCTTGAG	4048 up_rev
27	GAGCCGGCCATGAAATC	4048 down_for
28	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGGACCATCAAGATTAGCC	4048 down_rev
29	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGCTTTTGCAAATACTCTGC	4666 up_for
30	CCACTTTTTACGTTTTTAAGCGGGCTTCCAACCTTCTGG	4666 up_rev
31	GCTTAAACGTAAAAAGTGG	4666 down_for
32	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGAACCCTGCCACTAAAAG	4666 down_rev
33	GGCATACTGGAATCATTTCCTC	1421 Test for
34	CGGTTACCTATGGTGATAAGTTC	1421 Test rev
35	CTCTTCTCTGCCTTAGCC	3420 Test for
36	GGTTTTCGGCTGTTATGGG	3420 Test rev
37	CAGCAGCCTGTTGCACAAAG	4485 Test for

38	CTGGCAAGTAACTCTTCAACATG	4485 Test rev
39	GGGCTAACACTGGGATTTTC	4666 Test for
40	CAGTTTATCTCTTCTGTGATTTAAC	4666 Test rev
41	GCCTACATGGCTGTGGTG	<i>cctA</i> Test for
42	CTGCACGTCTTGATTGGCTATG	<i>cctA</i> Test rev
43	CCAAAGGCATCGCGCTC	4047 Test for
44	GAAGAATGAAGATAAGATGGGAC	4047 Test rev
45	CCTTAGGCATTTTGTGGCC	4048 Test for
46	CGGGCAGATTCGCGCG	4048 Test rev
47	CCTTGAGCGAGGCGGC	<i>nrfA</i> Test for
48	CTGTTTTATTAGGGCGTGTTGAC	<i>nrfA</i> Test rev
49	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGTTGAATACCAAATTATTACC	pBAD_1421 for
50	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGTTTAATAGAATTAG CTACTTGTTTC	pBAD_1421_his rev
51	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGACAAAACCTCACCGCTATC	pBAD_1421_his rev
52	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGTTTTGCTCCTGTCTCG CAAAAG	pBAD_1421_his rev
53	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAAAAAATACTCCTAACTC	pBAD_3420 for
54	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGGTCTTTTTTGTA CGTCATG	pBAD_3420_his rev

55	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAAATCTTCTGCAATCTTAT	pBAD_4047 for
56	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGGGACTTTTTTCGGA AACACCG	pBAD_4047_his rev
57	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAATAATAAAATTAACACATTAGC	pBAD_4048 for
58	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGTTTTATATTCGCAA AGTAATTCG	pBAD_4048_his rev
59	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGACTAAACCAACCCACAC	pBAD_4485 for
60	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGATCATCCCAACGAC CAACG	pBAD_4485_his rev
61	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGATAAGACTGCTCACCGA	pBAD_4666 for
62	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATGCCTCAGAGATACC ATTTTGAC	pBAD_4666_his rev
63	CAACATCGACCCTAACGC	<i>napA</i> Mitte for
64	GACTTAGCACCTTCAGGC	<i>napA</i> Mitte rev
65	GATTAGCGGATCCTACCTGAC	pBAD Test for
66	CTCTCATCCGCCAAAACAGC	pBAD Test rev
67	CTGGCGAAAGGGGGATGTG	pMQ150 for
68	CATTAGGCACCCCAGGCTTTAC	pMQ150 rev
69	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGATGAAGAAGATGACAGG	pBAD_ <i>nrfA</i> for
70	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATG	pBAD_his_ <i>nrfA</i> rev

	CTTGTAAGTCGCTTCGCGTT	
71	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAGCATTAGCCGCCGC	pBAD_ <i>napA</i> for
72	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATG GGCCTTCATCACTTTTACGG	pBAD_ his_ <i>napA</i> rev
73	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAAAAAATACTCACCTTAG	pBAD_ <i>napB</i> for
74	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATG TTGAGTTGAGAATTTATTTT	pBAD_ his_ <i>napB</i> rev
75	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAGCAAAAACTATTAAGTG	pBAD_ <i>cctA</i> for
76	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAATGGTGATGGTGATGATG CTTCTTCAGAACAGACGCAG	pBAD_ his_ <i>cctA</i> rev

### 3.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid Name	Relevanter Genotyp	Quelle
pMQ150	Amp <sup>R</sup> , r6k, <i>ura3</i> , <i>sacB</i>	(Shanks <i>et al.</i> , 2006)
pBAD202	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub>	Invitrogen, Darmstadt
pBAD_fccA	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>fccA</i>	Diese Arbeit
pBAD_fccA_his	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>fccA</i> <sub>his</sub>	(Schuetz <i>et al.</i> , 2009)
pBAD_cctA	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>cctA</i>	Diese Arbeit
pBAD_cctA_his	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>cctA</i> <sub>his</sub>	Diese Arbeit
pBAD_napA_his	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>napA</i> <sub>his</sub>	Diese Arbeit
pBAD_napB_his	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>napB</i> <sub>his</sub>	Diese Arbeit
pBAD_nrfA_his	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>nrfA</i> <sub>his</sub>	Diese Arbeit
pBAD_crp	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>crp</i>	Diese Arbeit
pBAD_mtrA	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>mtrA</i>	Diese Arbeit
pBAD_cymA	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>cymA</i>	Diese Arbeit
pBAD_scyA	Kan <sup>R</sup> , P <sub>Ara</sub> , <i>scyA</i>	Diese Arbeit

## **3.8 Protein-biochemische Methoden**

### **3.8.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Elektrophoresen (SDS-PAGE) nach Laemmli durchgeführt (Coligan *et al.*, 1995). Initialer Schritt ist die Hitze-Denaturierung der Proben. Dazu wird die Probe mit 6x SDS-Ladepuffer (Tabelle 17) versetzt und 3 min bei 99°C gekocht. Dabei reduziert das im Ladepuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken, wodurch sich die Tertiär- bzw. Sekundärstruktur der Proteine auflöst. Das im Ladepuffer enthaltene SDS (Natrium-Dodecylsulfat) bindet an die Proteine und überdeckt deren Eigenladung, so dass es zu einer negativen Nettoladung des Proteins kommt. Durch diesen Umstand ist es möglich, Proteine unabhängig ihrer Eigenladung nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Ein diskontinuierliches SDS-Gel besteht aus:

einem Sammelgel (4% Acrylamid, pH 6,8) und

einem Trenngel (8-20% Acrylamid, pH 8,8)

(Zusammensetzung siehe Tabelle 18). Die Proteine werden im Sammelgel zwischen einem Ladungsgradienten aus Chlorid-Ionen und Glycin-Zwitterionen auf Grund ihrer Nettoladung der Größe nach in einem relativ kleinen Bereich konzentriert (Isotachophorese). Durch die beim Übergang in das Trenngel stattfindende pH-Verschiebung (6,8  $\rightarrow$  8,8) liegen die Glycin-Ionen nun ausschließlich als Anionen vor, wodurch der Spannungsgradient aus dem Sammelgel aufgehoben ist. Die Proteine werden nun in dem engmaschigen Polyacrylamid-Gel relativ langsam nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele wurden in der Multi Casting Chamber (Biorad, München) gegossen (Tabelle 18). Als Laufkammer diente eine Mini-PROTEAN® TetraCell (Biorad), die Spannung betrug 120 V. Die Zusammensetzung des Laufpuffers zeigt Tabelle 19.



**Tabelle 17:** Zusammensetzung des 6x SDS-Ladepuffers.

Substanz	Menge
Glycerin	6,5 ml
2 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	3 ml
0,5% (w/v) Bromphenolblau	3 ml
20% (w/v) SDS	6 ml

**Tabelle 18:** Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels. Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf die Menge für 10 kleine Gele (Mini-Protean, Biorad).

	Substanz	Menge
<b>Sammelgel (4%)</b>	2 M Tris-HCl (pH 6,8)	4,5 ml
	30% (w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) Bisacrylamid	4,95 ml
	10% (w/v) SDS	360 $\mu$ l
	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	45 $\mu$ l
	Ammoniumpersulfat (APS)	180 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	26,1 ml
<b>Trenngel (10%)</b>	2 M Tris-HCl (pH 8,8)	15,75
	30% (w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) Bisacrylamid	21 ml
	10% (w/v) SDS	630 $\mu$ l
	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	63 $\mu$ l
	Ammoniumpersulfat (APS)	315 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	25,62 ml

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Elektrodenlaufpuffers.

Substanz	Menge
Tris-HCl (pH 8,8)	3 g/l
SDS	1 g/l
Glycin	14,4 g/l

### 3.8.2 Häm-Färbung

Die Häm-Färbung wird benutzt, um Proteine in einem SDS-Gel anzufärben, die eine Hämgruppe als Cofaktor besitzen (Thomas *et al.*, 1976). Man nutzt dazu die Peroxidase-Aktivität des Häm-Cofaktors.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird durch Hämgruppen zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert. In Anwesenheit eines Farbstoffs (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB) werden die Elektronen zur Reduktion des  $\text{H}_2\text{O}_2$  vom TMB übertragen, wodurch der Farbstoff von seiner farblosen Leukoform in seine blaue Form übergeht. Durch diese Reaktion entstehen an den Positionen, an denen Häm-tragende Proteine liegen, blaue Banden. Im Unterschied zur Coomassie-Färbung, bei der unspezifisch alle Proteine angefärbt werden, werden bei dieser Methode nur Proteine angefärbt, die Peroxidase-Aktivität besitzen. Für die Färbung werden SDS-Gele nach dem Lauf 30 min in 12,5% Trichloressigsäure fixiert. Nach einem Waschschrift (3x 10 min in  $\text{dH}_2\text{O}$ ) werden die Gele in der Reaktionslösung (Tabelle 20) so lange inkubiert, bis die Banden gut sichtbar sind. Die Inkubationsdauer hängt von der Konzentration der im Gel geladenen Proteine und deren Aktivität ab und variiert von 3 min bis zu mehreren Stunden.

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der Reaktionslösung für die Häm-Färbung.

Substanz	Menge
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin	10 mg
$\text{dH}_2\text{O}$	9 ml
0,5 M Zitronensäure (pH 6,4)	1 ml
35% $\text{H}_2\text{O}_2$	40 $\mu\text{l}$

### 3.8.3 Coomassie-Färbung

Proteine in einem SDS Gel werden mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau® angefärbt (Zehr *et al.*, 1989). Dieser lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren und färbt so unspezifisch Proteine in einem SDS-Gel. Die Gele werden in Fixier- und Färbelösung (Tabelle 21) für 30 min inkubiert. Anschließend wird das Gel mit Entfärber I (Tabelle 21) so lange behandelt, bis (dunkelblaue) Banden vor einem helleren Hintergrund sichtbar sind. Zur weiteren Kontraststeigerung wird der Hintergrund des Gels mit Entfärber II (Tabelle 21) entfärbt, bis die Banden klar sichtbar sind.

**Tabelle 21:** Zusammensetzung der benötigten Lösung zur Coomassie-Färbung.

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

### 3.8.4 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau unspezifisch an die basischen Seitenketten der Aminosäuren bindet. Anhand einer Eichkurve lassen sich die Absorptionen relativ genau einer Proteinkonzentration zuordnen. Für den Test wird eine BSA-Eichkurve (bovines Serumalbumin, BSA) mit den Konzentrationen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml erstellt. Die zu messenden Proben werden in unterschiedlichen Verdünnungen (je nach Proteinkonzentration) so verdünnt, bis ihre Konzentration innerhalb der Eichgerade liegt. Die (verdünnten) Proben und die Standards werden dann 1:10 mit Bradfordreagenz (Tabelle 22) versetzt und mindestens 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeit ist die Absorption für ca. 30 min stabil. 200 µl der Proben wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 595 nm gemessen.

**Tabelle 22:** Zusammensetzung der Bradfordreagenz. Die einzelnen Bestandteile müssen in der angegebenen Reihenfolge (von oben nach unten) gemischt werden.

Substanz	Menge
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	100 mg
Konzentrierte Phosphorsäure	100 ml
96% Ethanol	50 ml
dH <sub>2</sub> O	Add. 1000 ml

### 3.8.5 Affinitätschromatografie

Zur spezifischen Reinigung eines Proteins wurde die Affinitätschromatografie verwendet. Dazu wird das zu reinigende Protein auf genetischer Ebene mit einem Affinitäts-Tag versehen. Dieser Tag besteht aus sechs Histidin-Resten (His<sub>6</sub>) und kann sowohl N- als auch C-terminal an das Protein angefügt werden. Der His<sub>6</sub>-Tag hat die Eigenschaft, Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu binden. Diesen Umstand macht sich die sog. immobilisierte Metal-Ionen Affinitätschromatografie (IMAC) zu nutze. Bei dieser werden die Ni<sup>2+</sup>-Ionen an eine Matrix gebunden und das Proteingemisch darüber geleitet. Das getaggte Protein bindet an die immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen, während alle anderen Proteine ungebunden durchfließen. Die Bindung zwischen den Ni<sup>2+</sup>-Ionen und dem His<sub>6</sub>-tag wird über Kompetition mit einem Strukturanalog zum Histidin (Imidazol) gelöst und von der Matrix gewaschen. In dieser Arbeit wurden für die IMAC HisTrap HP-Säulen (GE, Freiburg) verwendet. Die Säulen wurden an eine BioLogic DuoFlow (Biorad, München) angeschlossen um eine konstante Flussrate und einen konstanten Druck zu gewährleisten. Die Säule wurde nach folgendem Protokoll mit den in Tabelle 23 angegebenen Puffern behandelt:

<b>Equilibrierung</b>	10 – 15 Säulenvolumina mit Waschpuffer
<b>Laden</b>	Laden der Probe
<b>Waschen</b>	10 – 15 Säulenvolumina mit Waschpuffer, bis keine Proteinabsorption mehr zu beobachten ist
<b>Elution</b>	Elution des gebundenen Proteins durch Elutionspuffer (1-2 Säulenvolumina)
<b>Waschen</b>	10 Säulenvolumina Waschpuffer gefolgt von 5 Säulenvolumina 20% Ethanol

**Tabelle 23:** Zusammensetzung der für die IMAC benötigten Lösungen.

	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Waschpuffer</b>	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
<b>Elutionspuffer</b>	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM

### 3.8.6 Protein-Konzentration

Im Gegensatz zur Reinigung eines speziellen Proteins wurde die IMAC in dieser Arbeit auch dazu benutzt, ein spezifisches Protein aus einer Proteinfraction zu entfernen. Da durch diese Methode die ursprüngliche Probe stark verdünnt wird, erfolgte eine Ankonzentrierung der Fraktion durch ein Membranfilterverfahren. Dafür wurden Amicon® Ultra Zentrifugen-Röhrchen (Merck-Millipore, Darmstadt) mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa verwendet. Zur Ankonzentrierung wurden die Proben in die Röhrchen geladen und bei 3.000 g im „swing-bucket“-Rotor so lange zentrifugiert, bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht wurde.

### 3.8.7 Hämgruppen-Bestimmung

Zur Bestimmung der Hämgruppen macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass Hämgruppen enthaltene Proteine (z.B. c-Typ Cytochrome) je nach Redoxzustand unterschiedliche Absorptionsspektren aufweisen. Während sie in reduziertem Zustand eine starke Absorption bei 552 nm aufweisen, zeigen die Proteine diesen Peak nicht in oxidiertem Zustand. Zusätzlich findet ein Shift der  $\alpha$ -Bande vom Maximum bei 420 nm (reduziert) zu 408 nm (oxidiert) statt. Anhand der Differenz zwischen oxidiertem und reduziertem Spektrum ist es möglich, die Menge an Häm in der Probe zu bestimmen. Die quantitative Bestimmung der Häm-Gruppen wurde nach der Methode von Berry und Trumpower durchgeführt (Berry & Trumpower, 1987). Dazu wurde zunächst eine Lösung aus 40% Pyridin in 200 mM NaOH

hergestellt. Anschließend wurden 250 µl dieser Lösung mit 250 µl Probe und 1,5 µl einer 0,1 M  $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung gemischt, was zu einer vollständigen Oxidation der in der Probe enthaltenen Hämgruppen führte. Von dieser Lösung wurde im Cary50 UV/vis Spektrophotometer (Varian, Darmstadt) ein Spektrum von 400 – 600 nm aufgenommen. Anschließend wurde sukzessive Na-Dithionit ( $Na_2S_2O_4$ ) zur Probe gegeben, bis der Peak bei 552 nm (Indikator für den Redox-Zustand der Häm) keine weitere Absorptionssteigerung zeigte. Das erste komplett reduzierte Spektrum wurde zur Quantifizierung benutzt. Gleichung 2 zeigt die der Berechnung der Gesamtabsorption ( $A_{ges}$ ) zu Grunde liegende Gleichung:

$$\text{Gleichung 2:} \quad A_{ges} = [A_{550}(red) - A_{550}(ox)] - [A_{535}(red) - A_{535}(ox)]$$

A, Absorption; (red), reduziert; (ox), oxidiert.

Nachdem die Gesamtabsorption der Probe bestimmt war, konnte durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 3) die Konzentration berechnet werden. Der millimolare Absorptionskoeffizient für c-Typ Cytochrom-gebundene Häm beträgt  $\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1}$ .

$$\text{Gleichung 3:} \quad A = \epsilon * c * d$$

A = Absorption,  $\epsilon$  = Molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Schichtdicke

### **3.9 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer improved Zählkammer mit Spezialtiefe (0,01 mm) verwendet. Zellen wurden 1:1 mit 37% Formaldehyd gemischt und für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in  $dH_2O$  verdünnt und in die Zählkammer eingebracht. Es wurden jeweils 5 Gruppenquadrate zu je 16 Kleinstquadraten auf beiden Seiten der Kammer ausgezählt. Das Volumen eines Gruppenquadrates betrug  $0,0004 \text{ mm}^3$ , entsprechend 0,4 nl. Für die Berechnung der Zellzahlen pro ml wurde der Mittelwert aus 10 ausgezählten Gruppenquadraten verwendet.

### **3.10 Netzwerk-Assay**

Um zu bestimmen, auf welche terminalen Elektronenakzeptoren *S. oneidensis* respiratorische Elektronen übertragen kann, wurde ein Zellsuspensionsassay durchgeführt. Dafür wurden *S. oneidensis* Zellen über Nacht in M4-Medium mit O<sub>2</sub>, Eisencitrat bzw. NaNO<sub>3</sub> angezogen. Die Zellen wurden geerntet und 3x mit anaerobem M4-Medium ohne Elektronenakzeptor gewaschen. Das Medium der Waschschriffe enthielt 50 mM Na-D,L-Laktat als Elektronen-Donor. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei RT in M4-Medium mit Laktat inkubiert, um eine vollständige Reduktion der Zellen herbeizuführen. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen 5x in M4-Medium ohne TEA und Laktat gewaschen, um sicherzustellen, dass die Zellen weder einen Elektronenakzeptor noch –donor zur Verfügung hatten. Der zelluläre Redoxstatus der c-Typ Cytochrome wurde analog zur Hämgruppenbestimmung (3.8.7) durch spektrophotometrische Analyse dokumentiert. Der Reduktionsgrad der Zellen wurde mit durch Dithionit-Zugabe maximal reduzierten Zellen verglichen. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> = 1 resuspendiert und 750 µl der Zellsuspension wurden in einer Küvette gemessen. Es wurde ein Spektrum von 400 – 600 nm aufgenommen. Anschließend wurden der Küvette 250 µl des jeweiligen Elektronenaktzeptors (10 mM in M4-Medium ohne Lactat) zugesetzt und sofort ein Spektrum aufgenommen. Als Elektronenakzeptoren wurden folgende Stoffe verwendet: Na-Fumarat, DMSO, TMAO, AQDS, NaNO<sub>3</sub>, Eisen-Citrat und NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Parallel zu allen Ansätzen mit Elektronenakzeptor wurde jeweils eine Puffer-Kontrolle (250 µl M4-Medium ohne Akzeptor) angesetzt und für die Dauer des Versuches inkubiert, um abschließend eine Akzeptor-unabhängige Oxidation der Zellen auszuschließen. Alle Messungen wurden anaerob in einer anoxischen Atmosphäre (N<sub>2</sub>, 4% H<sub>2</sub>) durchgeführt, alle Spektren wurden mit dem infinite M200 pro Spektrophotometer (Tecan, Crailsheim) aufgenommen.

### **3.11 Präparation der periplasmatischen Fraktion von *S. oneidensis***

Zur spezifischeren Präparation der periplasmatischen Fraktion wurde die Methode nach Pitts und Cerny angewendet (Cerny & Teuber, 1971; Pitts *et al.*, 2003). Dazu wurden die Zellen in 20 mM HEPES (pH 7,4) gewaschen und resuspendiert (1 ml Puffer / 1,5 g Zellen). Dieser Suspension wurde Polymyxin-B-sulfat in einer finalen Konzentration von 1 mg/ml zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Polymyxin-B komplexiert mit den Lipopolysacchariden der äußeren Membran und führt so zu deren Destabilisierung. Nach der Inkubation wurden die

Zellen für 1 h bei 23.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand stellt die periplasmatische Fraktion der Zellen dar.

### **3.12 Zellaufschluss**

Um Zellen aufzuschließen wurde die French-Press Methode verwendet. Diese Methode ist sehr schonend für die zellulären Proteine, da keine thermischen oder chemischen Einflüsse auf die Probe wirken. Für den Aufschluss wurden Zellsuspensionen mit 0,1 mg/ml DNaseI versetzt und in die French-Press-Zelle gegeben. Der Aufschluss erfolgte bei einem Druck von 62 bar (MiniCell) bzw. 88 bar (Standard Cell), was einem Druck im inneren der Zellen durch den geringeren Durchmesser des Stempels von 1379 bar bzw. 2758 bar entspricht. Der Zellaufschluss erfolgte immer auf Eis.

### **3.13 Präparation von Membran- und Cytoplasmafraktionen**

Nach dem Zellaufschluss durch die FrenchPress wurden letzte, nicht aufgeschlossene Zellen durch eine Zentrifugation bei 9.000 g pelletiert und der Überstand abgenommen. Die zellfreie Suspension wurde anschließend für 1,5 h bei 4°C und 205.000 g in der Ultrazentrifuge (Beckmann, Krefeld) zentrifugiert. Der Überstand (Cytoplasma) wurde abgenommen und das Pellet (Membran) in Puffer (20 mM Hepes, pH 7,4) im Homogenisator auf Eis resuspendiert.

### **3.14 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)**

Environmental scanning electron microscopy wurde benutzt, um die Größe der Zellen von *S. oneidensis* zu bestimmen. Dafür wurden *S. oneidensis* Zellen auf M4-Medium mit Eisencitrat als TEA gezogen und geerntet. Die erhaltenen Zellen wurden direkt auf den Silizium-Probenhalter aufgebracht. Bei einer konstanten Temperatur von 3°C wurde der Druck langsam auf 513 Pa (5,13 mbar) reduziert. An diesem Punkt zeigten sich die ersten Umriss der Zellen. Eine weitere Druckreduktion sorgte für eine detaillierte Auflösung. Detail- und kontrastreiche Bilder entstanden bei 3°C und einem Druck von 400 – 515 Pa (4 – 5,13 mbar).



### **3.15 Berechnung des periplasmatischen Volumens von *S. oneidensis***

Um das periplasmatische Volumen zu bestimmen, wurde die zelluläre Form als ein Zylinder definiert, der von zwei Halbkugeln bedeckt ist. Die Berechnung erfolgte nach der in Gleichung 4 angegebenen Formel.

$$\text{Gleichung 4: } V = \left( \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 + \pi \left( \frac{d}{2} \right)^2 (l - d) \right) - \left( \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} - w \right)^3 + \pi \left( \frac{d}{2} - w \right)^2 (l - d) \right)$$

V, Volumen; d, Gesamtzellbreite; l, Gesamzelllänge; w, Breite des Periplasmas

### **3.16 In silico Analyse der c-Typ Cytochrom-Verteilung**

Für die Analyse der c-Typ Cytochromverteilung innerhalb der Proteobacteria wurden alle bis Juni 2011 auf NCBI publizierten 483 proteobakteriellen Proteome einer in silico Analyse unterzogen. Als erstes erfolgte eine Analyse der Proteinsequenzen auf Vorhandensein des c-Typ Cytochrom Bindemotivs -CxxCH- (2.2.3). Dies diente zur initialen Identifizierung potentieller c-Typ Cytochrome. Proteinsequenzen, die ein oder mehrere dieser Sequenzmotive aufwiesen wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt. Der nächste Schritt war eine durch das Programm SignalP 3.0 gestützte Prädiktion auf Vorhandensein einer Sec-Transport abhängigen Signalsequenz der Proteine. Das Ergebnis dieser Analyse wurde als positiv für den Protein-Export betrachtet, sofern 5 von 5 möglichen Identifizierungsmerkmalen positiv im Sinne einer Export-Signalsequenz bewertet wurden. Proteinsequenzen, die diesen Charakteristika entsprachen, wurden als definitive c-Typ Cytochrome bewertet und für die Auswertung des Organismus-spezifischen Cytochromgehalts gezählt. Für die Analyse wurden alle relevanten Proteome von der NCBI Homepage heruntergeladen und die Datensätze für die weitere Verarbeitung aufbereitet. Detaillierte Informationen zur Verfahrensweise des Programms SignalP 3.0 finden sich bei Nielsen und Bendtsen (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004).

Nachfolgend ist die Programm-Sequenz aufgeführt, durch die die Aufbereitung erfolgte und mit der diese Analysen durchgeführt wurden.

```
#!/bin/bash
DATEI=$(cat "$1");

$(tr '\n' ' ' < "$1" > "$1".tmp.0); # remove returns
$(sed -e 's/>\n>/g' "$1".tmp.0 > "$1".tmp.1); # find begin of description-line and insert returns
$(sed 's/SV=[0-9]\n/g' "$1".tmp.1 > "$1".tmp.2); # find end of description-line and insert return
$(sed -e 's/^\n/g' "$1".tmp.2 > "$1".tmp.3);
$(grep -B 1 -E '^[A-Z].*C..CH' "$1".tmp.3 > "$1".tmp.4); # find sequence
$(sed -e 's/^\n/g' "$1".tmp.4 > "$1".tmp.5);
$(signalp-3.0/signalp -t gram- -m nn -f short "$1".tmp.5 > "$1".result_signalp);

rm "$1".tmp.*

head -n 2 "$1".result_signalp > "$1".result;
$(awk '{if ($4 == "Y" && $7 == "Y" && $10 == "Y" && $12 == "Y" && $14 == "Y") print }'
"$1".result_signalp >> "$1".result);
echo "";
cat "$1".result;
echo "";
```

### **3.17 MudPIT Analyse**

Tryptischer Verdau: 30 µg der Membranfraktion wurden 1:2 mit 8 M Urea in 100 mM Tris-HCl (pH 8,7) verdünnt, mit 5 mM DTT für 20 Minuten bei 55°C reduziert und mit 25 mM Iodacetamid für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln carboxyamidomethyliert. Anschließend erfolgte ein Verdau mit 0,5 µg Lysyl-Endopeptidase (Wako Chemicals, Neuss) für 3 Stunden bei 37°C. Dann wurde der Verdau mit 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,7) auf eine Urea-Konzentration von 1 M verdünnt und mit 0,5 µg Trypsin (Wako Chemicals, Neuss) für 5 Stunden bei 37°C verdaut. Der pH-Wert der entstandenen Peptid-Mischung wurde mit Ameisensäure auf ungefähr pH 3 eingestellt und die Peptide mit einer C18 Umkehrphase-Säule extrahiert. Anschließend wurden die Peptide lyophilisiert, in 10 µl 5%igem Acetonitril aufgenommen, mit 0,5 µl Ameisensäure angesäuert und auf eine MudPIT Säule gegeben.

LC-MS/MS: Es erfolgte eine automatisierte, 34-stündige MudPIT Analyse in 17 Schritten (Washburn et al., 2001; Wolters et al., 2001). Hierzu wurde eine quaternäre HPLC Pumpe an ein lineares Ionenfallen-Massenspektrometer (LTQ-FT-ICR, Thermo Scientific) mit einer Nanelektrospray-Quelle gekoppelt. Eine Silica-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit 8 cm Umkehrphase-Säulenmaterial (5 µm Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, Waldbronn) und 8 cm Kationen-Austauschharz (5 µm Partisphere (SCX), Phenomenex, Aschaffenburg) gepackt und die Proben auf die Säulen appliziert. In der MS Analyse wurde ein Survey Scan (400-1800  $m/z$ ), gefolgt von einem FT-SIM-Scan und einer CID Fragmentierung mit 35% normalisierter Kollisionsenergie kontinuierlich wiederholt. Einfach geladene Vorläufer-Ionen wurden verworfen. Die Peak Liste wurde mit extract\_msn (BioWorks-Package, Thermo Scientific, Schwerte) erstellt und MS/MS Spektren mit Hilfe von Open Mass Spectrometry Search Algorithm [OMSSA, version 2.1] gegen die *S. oneidensis* MR-1 protein database (Juli 2007) durchsucht. Peptid Treffer wurden als signifikant angesehen, wenn Vorläufer- und Produkt-Ionenmasse jeweils innerhalb von 5 ppm und 0,5 kDa und der E-Wert unter 0,01 lagen.

### **3.18 Transkriptomanalyse**

Die Gesamt-RNA-Extraktion Eisen-gewachsener Zellen von *S. oneidensis* erfolgte durch das RNeasy Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers. DNA-Verunreinigungen der Präparation wurden mit Hilfe des Ambion DNA-free Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers entfernt. Zur Anreicherung der mRNA wurde das Ambion MICROBExpress bacterial mRNA enrichment Kit (Life Technologies) verwendet. Ausgehend von 50 ng DNA- und rRNA-freier mRNA wurden cDNA Datenbanken anhand des TruSeq RNA Protokolls (Illumina, ohne Reinigung) mit den von Parkhomchuk et al. beschriebenen Modifikationen erstellt (Parkhomchuk *et al.*, 2009). Für die Generierung der Datenbank wurden Multiplex-Primer verwendet, um die simultane Sequenzierung innerhalb einer Spur zu ermöglichen. Die Sequenzierung erfolgte durch einen HiSeq1000 unter der Verwendung von SBS v3 Kits (Illumina). Dabei wurden paired-end reads von 2 x 50 Nukleotiden generiert. Von den erhaltenen 17,7 – 53,2 Millionen read-Paaren entsprachen 96,6% der Basen einem Qualitätswert von Q30 oder besser.

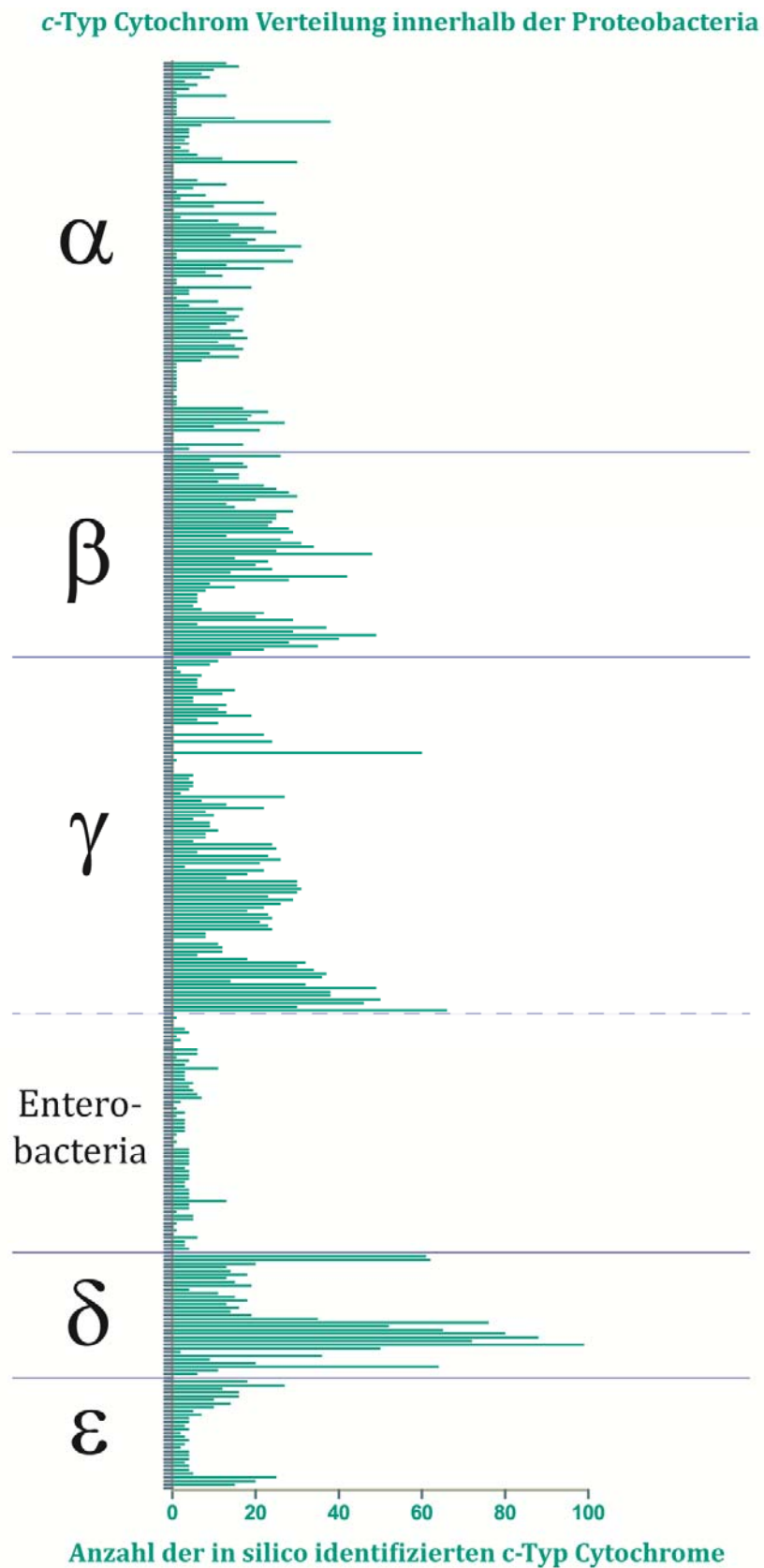
Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe von Bowtie2 gegen das Genom von *Shewanella oneidensis* MR-1 (NCBI accession number NC-004347.2) und das Mega-Plasmid (NC-004349.1) geblasted (Langmead & Salzberg, 2012). Die Berechnung der Expression erfolgte durch die Anzahl der einzelnen reads, die mit einem annotierten Gen überlappenden (Dötsch *et al.*, 2012). Die Normalisierung der Genexpression und statistische Test (negative binomial Verteilung) erfolgten durch die Benutzung des R package 'DESeq' (Anders & Huber, 2010).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Verteilung der c-Typ Cytochrome

Die Modellorganismen der dissimilatorischen Eisenreduktion (DIR) aus den Genera *Geobacter* und *Shewanella* weisen eine hohe Zahl an c-Typ Cytochromen auf. Darüber hinaus bilden in diesen Organismen c-Typ Cytochrome die Grundlage für extrazellulären Elektronentransport. Interessanterweise tragen Organismen aus den Genera *Shewanella* und *Geobacter* aber viel mehr Gene für c-Typ Cytochrome, als für ihre Elektronentransportketten benötigt werden. Durch eine Analyse aller bekannten proteobakteriellen Genome sollte verglichen werden, ob sich ein hoher c-Typ Cytochromgehalt mit der Fähigkeit zu DIR korrelieren lässt und in welchem Verhältnis der Gehalt von Genen für c-Typ Cytochrome in den Modellorganismen zum durchschnittlichen Gehalt von Proteobakterien steht. Dafür wurden alle im Juli 2011 publizierten Proteome von Proteobakterien einer in silico Analyse unterzogen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

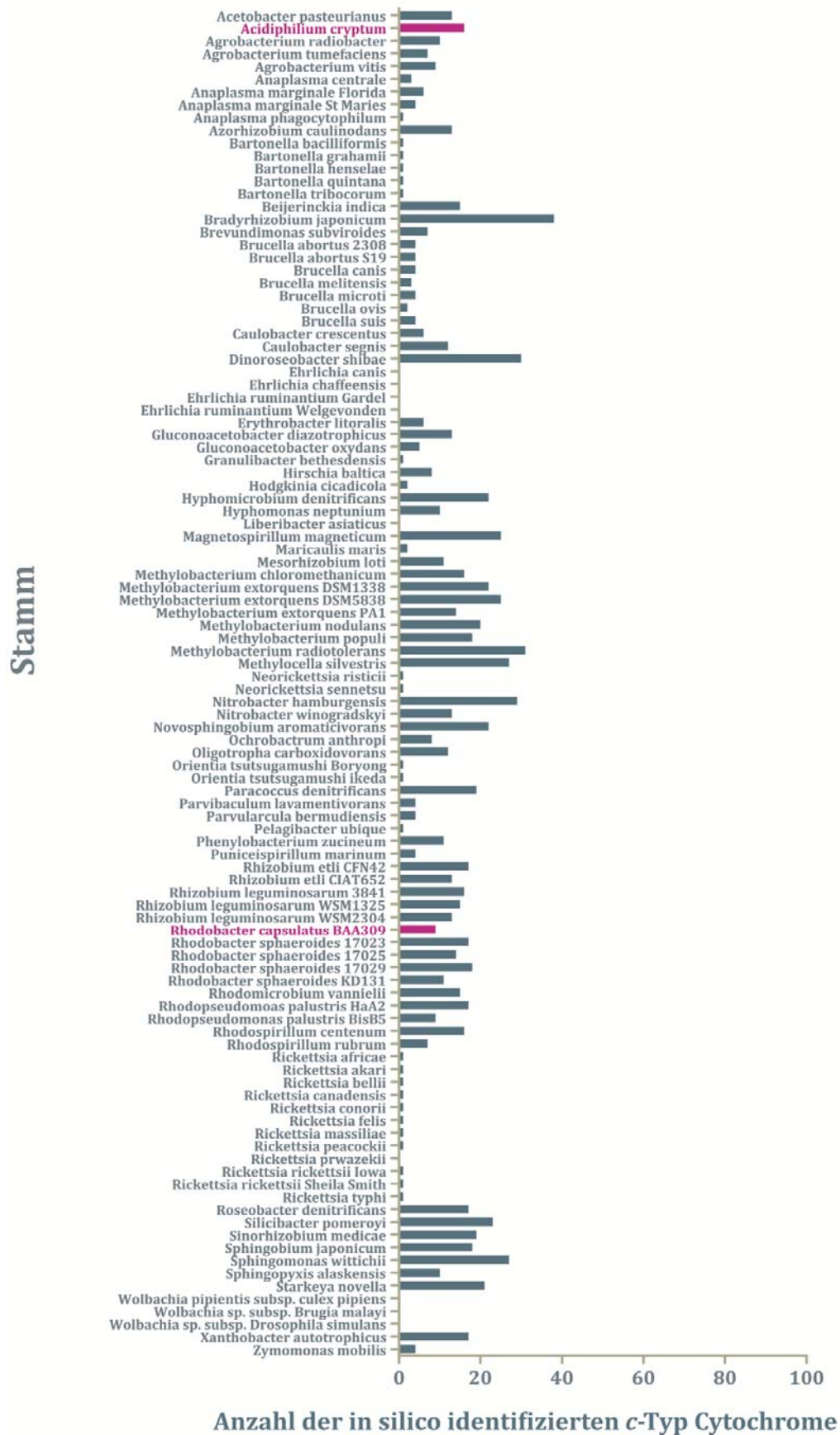
A



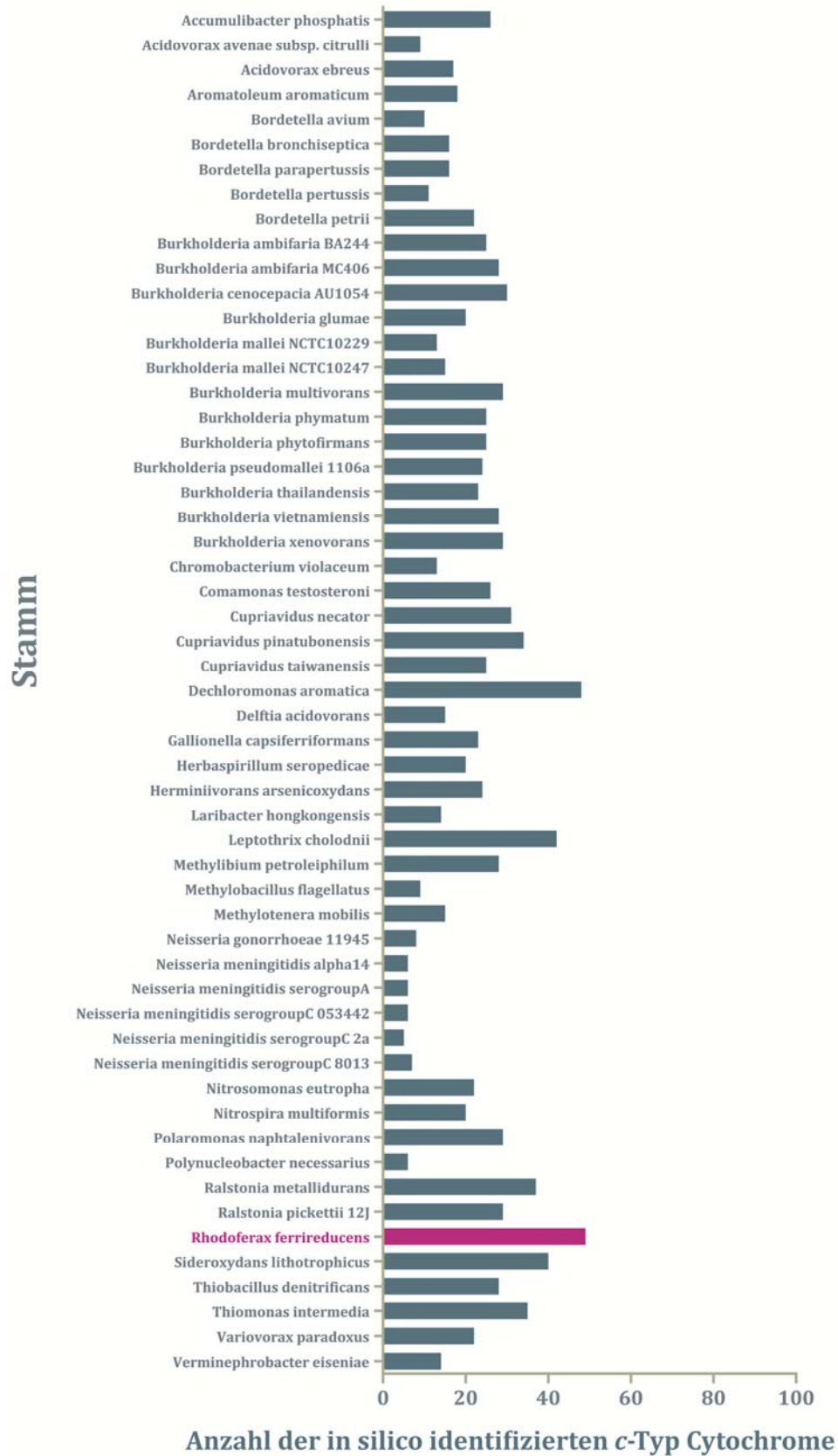
**Abbildung 6:** Verteilung der *c*-Typ Cytochrome innerhalb der Proteobacteria. A: Übersicht über die Verteilung innerhalb der gesamten Abteilung der Proteobacteria. B – G (folgende Seiten): detaillierte Auflistung der Verteilung innerhalb der einzelnen Klassen. Bekannte Eisen-Reduzierer sind rot markiert.

B

## α-Proteobacteria



C

 $\beta$ -Proteobacteria



D

## γ-Proteobacteria

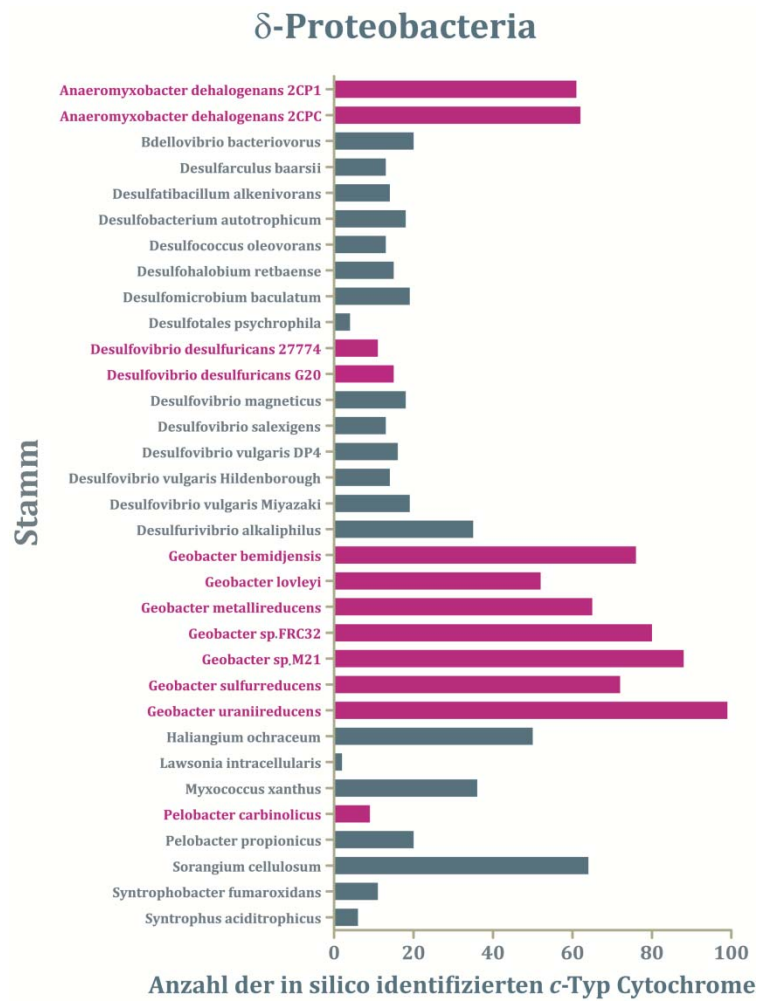


E

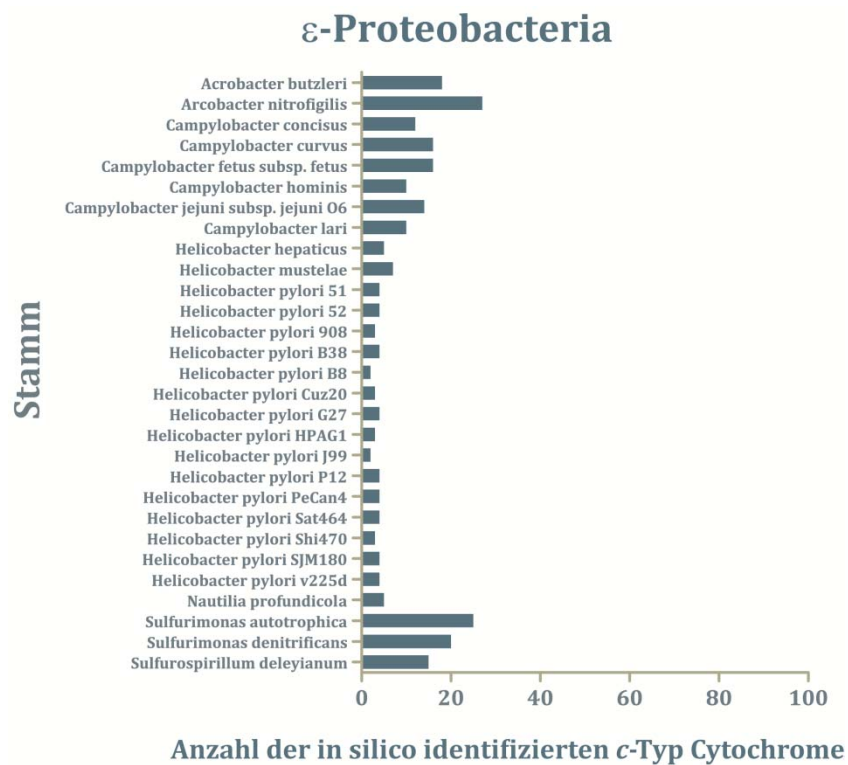
# Enterobacteria



F



G

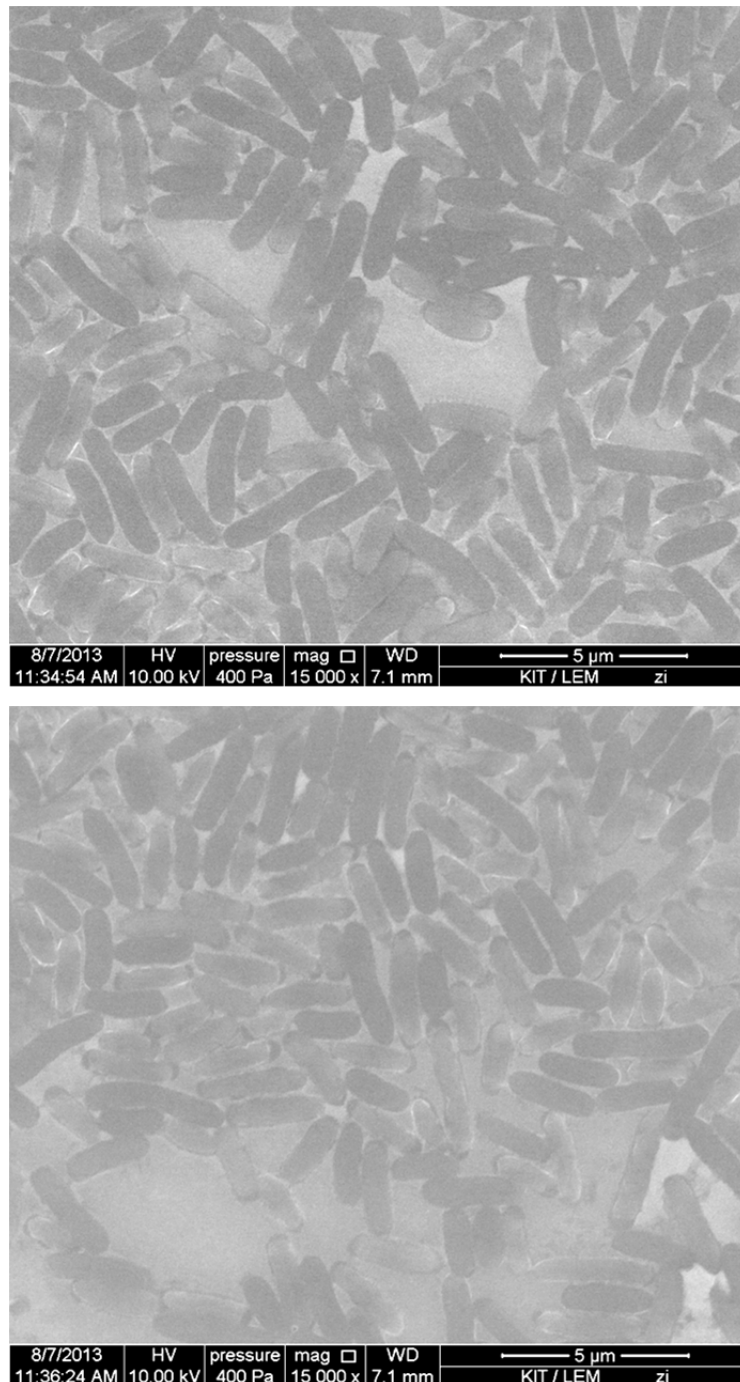


Wie aus Abbildung 6 zu entnehmen ist, finden sich in allen Gruppen der Proteobacteria Organismen mit Genen für c-Typ Cytochrome. Die über alle verfügbaren Proteome gemittelte Anzahl an c-Typ Cytochromen pro Organismus beträgt 13. Die Verteilung unter den Enterobacteria zeigt eine sehr niedrige durchschnittliche Anzahl im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen. In allen anderen Gruppen finden sich Vertreter, deren c-Typ Cytochromgehalt teilweise weit über dem Durchschnitt liegt. Die bekannten Modellorganismen der dissimilatorischen Metall-Reduktion *Geobacter* und *Shewanella* z.B. besitzen ein Vielfaches der durchschnittlichen Anzahl an c-Typ Cytochromen. Im Gegensatz dazu weisen weitere DMR-fähige Organismen wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidiphilium cryptum* einen relativ geringen c-Typ Cytochrom-Gehalt auf.

#### **4.2 Berechnung des periplasmatischen Volumens**

Ein hoher Gehalt an c-Typ Cytochromen scheint also zumindest ein Indiz für die Fähigkeit zur Eisenreduktion zu sein. Für *S. oneidensis* konnte in vorhergehenden Untersuchungen auch gezeigt werden, dass eine Vielzahl an Cytochromen parallel produziert wird, wenn die Zellen auf Eisen wachsen. Die meisten dieser Cytochrome liegen löslich im Periplasma vor. Um das Periplasma als Reaktionsraum für Elektronentransferreaktionen genauer zu definieren, sollte dessen Volumen bestimmt werden. Für Untersuchungen in dieser Größenordnung sind elektronenmikroskopische Analysen zielführend. Da Präparationen für „Standard“-Verfahren wie Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) durch die Methode der Präparation selbst häufig Artefakt-beladen sind (Dehydrierungs-Artefakte, Kontrastierungs-Artefakte), wurde eine schonendere Technik gewählt. Das „Environmental Scanning Electron Microscope“ (ESEM) bietet die Möglichkeit, Proben ohne vorhergehende Präparation in die Probenkammer einzubringen und im Mikroskop selbst unter ständiger Kontrolle des Druckes und der Temperatur langsam auf den Punkt zuzusteuern, an dem die Probe gerade noch hydriert ist. Diese Art der Bildgebung erlaubt im Gegensatz zur TEM eine relativ genaue Wiedergabe der Strukturen in ihrem in vivo Status. Zellen von *S. oneidensis* MR-1 wurden anaerob in M4-Medium mit Eisen-Citrat als TEA kultiviert, in der log-Phase geerntet, gewaschen und direkt in den Probenhalter eingebracht. Abbildung 7 zeigt die Zellen im ESEM bei 400 Pa und 3°C. Die anschließende Vermessung der Zellen ergab

die in Tabelle 24 angegebenen Werte für die Länge und Breite von Eisen-gewachsenen *S. oneidensis* Zellen.



**Abbildung 7:** ESEM-Bilder von *S. oneidensis*. Eisen-gewachsene Zellen von *S. oneidensis* im ESEM bei 3°C und 400 Pa. Vergrößerung: 15.000x, WD: working distance, Spannung: 10 kV.

**Tabelle 24:** Ergebnisse der ESEM-basierten Zellvermessung. Die Zellen weisen eine mittlere Länge von 2,989 ( $\pm 0,723$ )  $\mu\text{m}$  und eine mittlere Breite von 0,723 ( $\pm 0,065$ )  $\mu\text{m}$  auf.

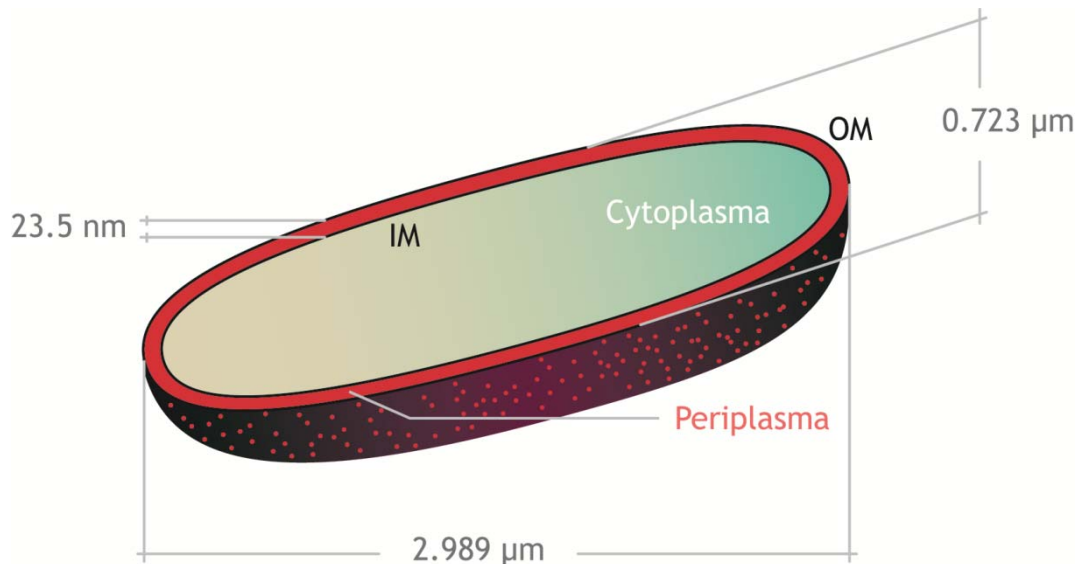
Anzahl Zellen	Mittlere Länge	Standardabweichung (SD)
n = 147	2,989 $\mu\text{m}$	0,723 $\mu\text{m}$
	Mittlere Breite	
n = 117	0,723 $\mu\text{m}$	0,065 $\mu\text{m}$

#### 4.2.1 Berechnung des periplasmatischen Volumens in *S. oneidensis*

Die Ergebnisse der Arbeiten von Dohnalkova et al. dienen als Quelle für die Breite des Periplasmas (Dohnalkova *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der ebenfalls sehr schonenden Methode des Cryo-TEM erzielt, welche es ermöglicht, nahezu komplett hydrierte Strukturen darzustellen. Die aus dieser Arbeit erhaltenen Daten für die Breite des Periplasmas dienen als Referenz für die Berechnung des periplasmatischen Volumens in *S. oneidensis*. Unter Einbeziehung der von Dohnalkova et al. ermittelten Daten für die Breite des Periplasmas mit  $23,5 \pm 3,7$  nm wurde das Volumen des Periplasmas von *S. oneidensis* durch die in Gleichung 4 angegebene Formel bestimmt. Es beträgt **0,153  $\pm$  0,0046 fl.** Abbildung 8 zeigt einen schematischen Überblick der zellulären Dimensionen.

$$\text{Gleichung 4: } V = \left( \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 + \pi \left( \frac{d}{2} \right)^2 (l - d) \right) - \left( \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} - w \right)^3 + \pi \left( \frac{d}{2} - w \right)^2 (l - d) \right)$$

V, Volumen; d, Gesamtzellbreite; l, Gesamtzelllänge; w, Breite des Periplasmas



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der zellulären Dimensionen von *S. oneidensis*. IM, innere Membran; OM, äußere Membran.

#### 4.2.2 Bestimmung des Häm-Gehalts in *S. oneidensis*

Zur Bestimmung des Häm-Gehalts von *S. oneidensis* wurden Zellen auf M4-Medium mit Eisencitrat als TEA gezogen. Die Zellen wurden pelletiert und restliches Eisen durch Waschen der Zellen mit M4-Medium ohne TEA entfernt. Nach Entnahme einer Probe für die Zellzählung wurden die Zellen resuspendiert und mittels dreier Passagen durch die FrenchPress® aufgeschlossen. Die Separation der Membranen von der löslichen Fraktion erfolgte durch Ultrazentrifugation (3.1.3). Die Bestimmung des Hämgehalts beider Fraktionen erfolgte nach der Methode von Berry & Trumpower (3.8.7). Da *c*-Typ Cytochrome immer im Periplasma gebildet werden, wurde der Hämgehalt der gesamten löslichen Fraktion als dem Periplasma zugehörig betrachtet. Ausgehend davon ergaben sich für den Hämgehalt der Fraktionen die in Tabelle 25 dargestellten Werte:

**Tabelle 25:** Hämgehalt der einzelnen Fraktionen.

Probe	Fraktion	Hämgehalt (SD) [nmol]
I	Lösliche Fraktion	181,07 (± 6,62)
II	Lösliche Fraktion	173,91 (± 7,28)
III	Lösliche Fraktion	174,37 (± 5,02)
I	Membran	160,12 (± 3,48)
II	Membran	171,17 (± 1,89)
III	Membran	178,21 (± 16,3)

In der Summe ergeben sich daraus folgende Werte:

- I        341,19 nmol  $\equiv$  2,055 x 10<sup>17</sup> Häm-Gruppen
- II       345,08 nmol  $\equiv$  2,078 x 10<sup>17</sup> Häm-Gruppen
- III      352,58 nmol  $\equiv$  2,123 x 10<sup>17</sup> Häm-Gruppen

Die Zellzahl der jeweiligen Proben wurde durch Zählung in einer Neubauer® improved Zählkammer mit Spezialtiefe (0,01mm) bestimmt. Die Zellzahlen der unterschiedlichen Proben sind nachfolgend aufgeführt:

- I        3,388 x 10<sup>11</sup> Zellen
- II       2,981 x 10<sup>11</sup> Zellen
- III      2,875 x 10<sup>11</sup> Zellen

Die Korrelation der Werte für die Zellzahl der Fraktionen und deren Gesamt-Häm-Gehalt ergibt die Anzahl Hämgruppen pro Zelle. Diese Werte sind ebenso wie der daraus resultierende Mittelwert in Tabelle 26 angegeben.



**Tabelle 26:** Anzahl Hämgruppen je einzelner Zelle *S. oneidensis*.

Probe	Hämgehalt / Zelle
I	606 597
II	697 023
III	738 499
<b>Gesamt-Mittel</b>	<b>680 706 (<math>\pm</math> 67 447)</b>

Eine einzelne Zelle *Shewanella oneidensis* MR-1 besitzt also im Mittel **680 706 ( $\pm$  67 447)** Hämgruppen.

#### **4.2.3 Berechnung der periplasmatischen Häm-Konzentration**

Auf Grund der erhaltenen Daten für Zell-Volumen und Anzahl an Hämgruppen pro Zelle war es möglich, die Konzentration an Hämgruppen im Periplasma zu bestimmen.

Aus den Konzentrationen der löslichen Fraktionen ergeben sich im Mittel 176,45 ( $\pm$  3,27) nmol Häm. Dies entspricht einer Anzahl von 346 142 Hämgruppen pro Zelle.

Ausgehend von errechneten 0,153 fl periplasmatischen Volumens und einer Anzahl von 346 142 Hämgruppen im Periplasma ergibt sich eine Konzentration von **3,76 mM** periplasmatischer Hämgruppen pro Zelle.

#### **4.3 Expression der c-Typ Cytochrome in *S. oneidensis***

Das Genom von *S. oneidensis* MR-1 codiert für 41 c-Typ Cytochrome, von denen 27 der Vorhersage nach im Periplasma und 14 in äußerer oder Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Durch eine Analyse einer Doktorandin der Arbeitsgruppe konnten 12 periplasmatische c-Typ Cytochrome identifiziert werden, die während des Wachstums unter Eisen-reduzierenden Bedingungen exprimiert werden (Richter, 2014). Einige der identifizierten Cytochrome stellen terminale Reduktasen für respiratorische Wege dar, die zunächst nicht in die DIR involviert sind, z.B. die Nitrit-Reduktase NrfA und die Fumarat-Reduktase FccA (Tabelle 27). Eine darauf folgende MudPIT Analyse der Membranen dieser Zellen sollte einen Einblick in die unter diesen Bedingungen exprimierten Membran-gebundenen terminalen Reduktasen erbringen. Tabelle 27 zeigt die von Richter et al. identifizierten periplasmatischen c-Typ

Cytochrome unter Eisen-reduzierenden Bedingungen, in Tabelle 28 ist die Zusammenfassung aller unter diesen Bedingungen exprimierten terminalen Reduktasen aufgeführt.

**Tabelle 27:** Ergebnis der MudPIT-Analyse der periplasmatischen Fraktion von Eisen-gewachsenen *S. oneidensis* MR-1 Zellen. In der Tabelle sind die durch Hämfärbung im Gel und darauffolgende MudPIT-Analyse identifizierten *c*-Typ Cytochrome angegeben (Richter, 2014).

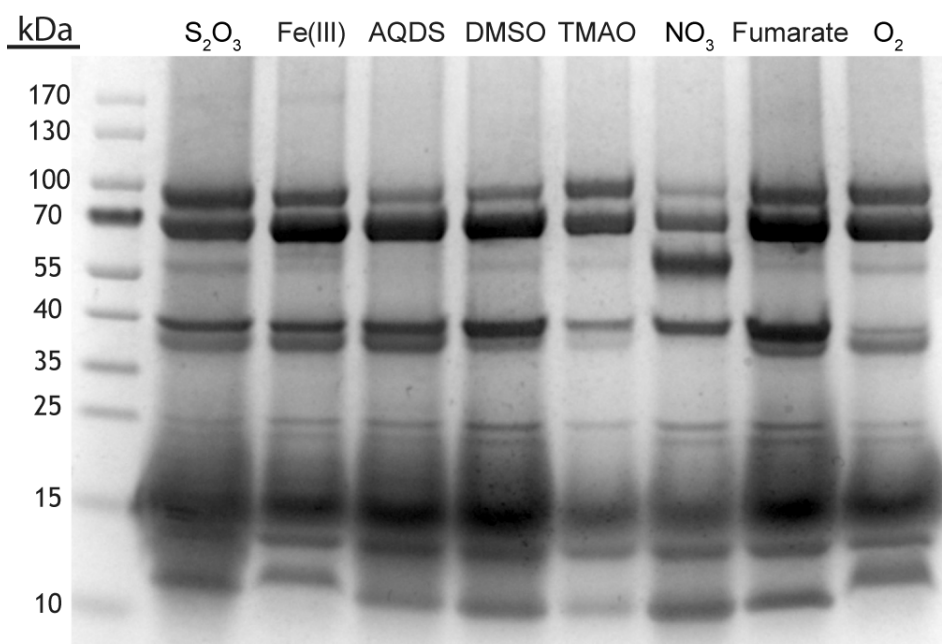
<b>c-Typ Cytochrom</b>	<b>kDa</b>	<b>Score</b>
SO1421 IfcA	60,6	533
SO0970 FccA	59,8	755
SO3980 NrfA	49,7	21
SO4047 SoxA	36,2	102
SO2178 CcpA	34,0	383
SO1777 MtrA	32,4	38
SO4666	19,9	17
SO4048	19,3	21
SO4485	16,5	30
SO3420	14,3	148
SO2727 STC	9,7	137
SO0264 ScyA	8,9	26

**Tabelle 28:** Durch MudPIT identifizierte terminale Reduktasen sowohl der periplasmatischen als auch der Membran-Fraktion.

	<b>UniProt</b>	<b>SO Nummer</b>	<b>Name</b>	<b>Score</b>	<b>Peptide</b>	<b>Hits</b>
Periplasma	P83223	970	FccA	442.83	25	497
	Q8EF24	2178	CcpA	194.74	15	61
	Q8EIJ1	848	NapA	8.76	1	1
	Q8EAC7	3980	NrfA	10.9	1	1
Membran	Q8EG34	1777	MtrC	32.28	3	3
	Q8EH03	1429	DmsA	70.81	7	9
	Q8EH02	1430	DmsB	33.79	2	5
	Q8E8S0	4591	CymA	28.31	2	6

Es wird deutlich, dass *S. oneidensis* Zellen unter Eisen-reduzierenden Bedingungen viele Cytochrome und auch terminale Reduktasen produzieren, die auf den ersten Blick nicht benötigt werden. Wozu exprimiert eine Zelle diese Proteine, wenn sie diese doch auf den

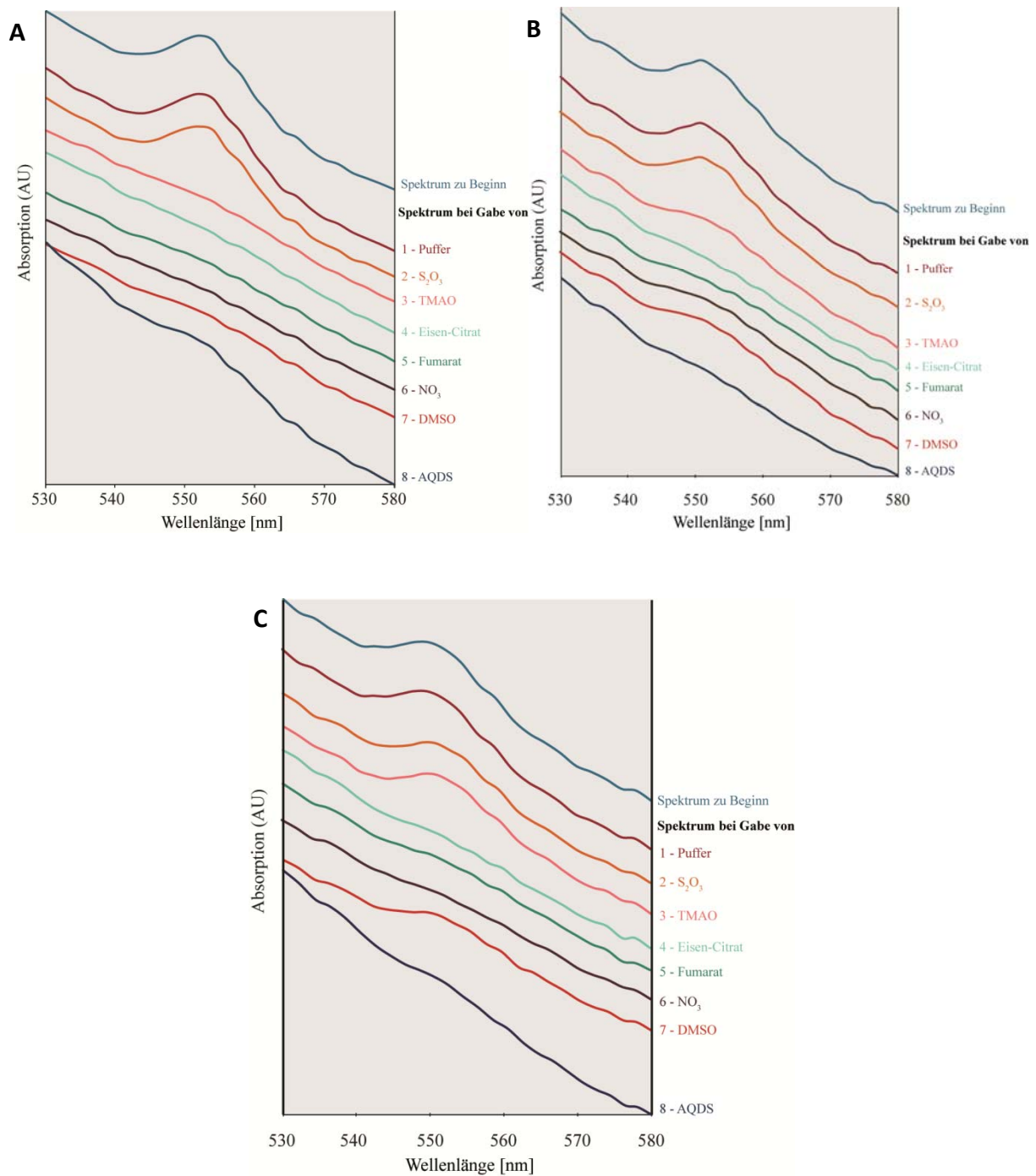
ersten Blick nicht alle nutzen kann? Und erfolgt die Expression dieser Proteine darüber hinaus eventuell auch unter anderen respiratorischen Bedingungen? Um die Expressionsmuster periplasmatischer *c*-Typ Cytochrome in *S. oneidensis* zu vergleichen, wurden Kulturen auf unterschiedlichen terminalen Elektronenakzeptoren gezogen und deren periplasmatische Fraktionen isoliert. Abbildung 9 zeigt die Expression periplasmatischer *c*-Typ Cytochrome unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bezüglich des terminalen Elektronenakzeptors. Das Expressionsmuster der periplasmatischen Cytochrome von Zellen, welche mit verschiedenen TEAs kultiviert wurden, unterscheidet sich nicht signifikant voneinander und die jeweiligen Bandenmuster einer Häm-Färbung ähneln sich stark. Lediglich bei Nitrat als TEA zeigt sich auf Höhe von etwa 55 kDa ein deutlich verstärkt exprimiertes Cytochrom, die Nitrit-Reduktase NrfA .



**Abbildung 9:** Häm-Färbung periplasmatischer Fraktionen von *S. oneidensis* MR-1. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen TEA gezogen. Die Zellen zeigen unter allen getesteten Bedingungen das gleiche *c*-Typ Cytochrom Expressionsmuster. Einzig unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen zeigt sich eine Akzeptor-abhängige verstärkte Expression von NrfA auf der Höhe der 55 kDa Bande des Markers.

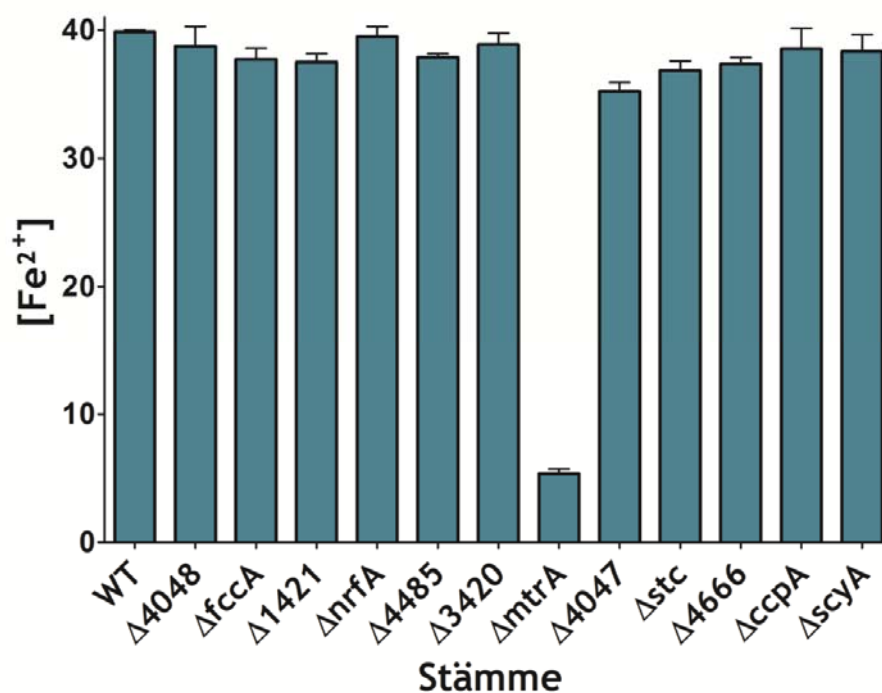
#### **4.4 Elektronentransfer-Netzwerk**

Da das vorangegangene Experiment gezeigt hatte, dass das grundsätzliche Expressionsmuster der periplasmatischen Cytochrome offensichtlich unabhängig vom TEA zu sein scheint, stellte sich die Frage nach dem Grund für dieses energetisch sehr aufwendige Verhalten der Zellen. Es war unter Labor-Bedingungen nicht möglich, periplasmatische Fraktionen von *S. oneidensis* auf die zuvor bestimmte Konzentration von 3,76 mM Häm anzukonzentrieren, da Proteinpräzipitation auftrat, bevor die physiologische Konzentration erreicht wurde. Durch die hohe Konzentration an Cytochromen ist es vorstellbar, dass das Periplasma einer leitfähigen, hoch-viskosen, Gel-artigen Matrix gleicht, die eine Verbindung zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran darstellt. Darüber hinaus ist es denkbar, dass die einzelnen respiratorischen Wege über die exprimierten Cytochrome miteinander in Verbindung stehen und so eine Art „respiratorisches Netzwerk“ bilden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Zellsuspensions-Assays (Netzwerk-Assays, 3.10) durchgeführt. Dazu wurden *S. oneidensis* Zellen mit Lactat und ohne Elektronenakzeptor inkubiert, so dass sie in metabolisch reduziertem Zustand vorlagen. Den reduzierten Zellen wurden dann verschiedene alternative Elektronenakzeptoren zugegeben und der Redox-Status des *c*-Typ Cytochrompools spektrophotometrisch bestimmt. Untersucht wurden Zellen, die initial anaerob auf Eisen-Citrat und Nitrat kultiviert wurden. Darüber hinaus wurde das Verhalten von aerob gewachsenen Zellen untersucht, denen 3 h vor Versuchsbeginn der Sauerstoff entzogen wurde. Dadurch wurde versucht, den Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen zu simulieren und so ein wahrscheinliches Szenario der Lebensbedingungen von *S. oneidensis* darzustellen. Zellen, welche mit Eisen als TEA kultiviert worden waren, konnten TMAO, Eisen, Fumarat, DMSO, Nitrat und AQDS reduzieren und dies an eine Oxidation des gesamten *c*-Typ Cytochrompools koppeln. Thiosulfat konnte jedoch nicht reduziert werden. Auch die Zugabe von Puffer führte zu keiner Änderung des Absorptionsspektrums der Zellen. Die Inkubation von Zellen mit Sauerstoff zeigte das gleiche Elektronenübertragungsmuster wie bei Eisen-gewachsenen Zellen. Hingegen unterschied sich die Fähigkeit zur Reduktion verschiedener TEAs, wenn die Zellen zuvor mit Nitrat kultiviert worden waren. Nitrat-gewachsene Zellen waren nicht in der Lage, die Elektronen des *c*-Typ Cytochrompools vollständig auf DMSO und TMAO zu übertragen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 10 grafisch dargestellt.



**Abbildung 10:** Elektronentransfer-Netzwerk. Übertragung der Elektronen aus dem periplasmatischen c-Typ Cytochrom Netzwerk auf unterschiedliche Elektronenakzeptoren. Reduzierte Zellen weisen ein Absorptionsmaximum bei 552 nm auf. A: Eisen-gewachsene Zellen übertragen die Elektronen aus dem Cytochrompool auf alle angebotenen Akzeptoren bis auf Thiosulfat. B: Aerob gewachsene Zellen zeigen das gleiche Verhalten wie Eisen-gewachsene. C: Zellen, die initial mit Nitrat gewachsen sind, sind nicht in der Lage, ihre Elektronen auf TMAO und DMSO zu übertragen.

Auf Grund des - bis auf die Expression von NrfA unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen - identischen Expressionsmusters der periplasmatischen c-Typ Cytochrome und der offensichtlichen Verbindung verschiedener respiratorischer Wege wurde untersucht, ob zentrale Schlüsselproteine existieren, die für die Funktion dieses Netzwerks elementar sind. Für diese Analyse wurden 12 Einzel knock-out Mutanten hergestellt. Diesen Mutanten fehlte jeweils eines der durch die MudPIT Analyse (4.3) identifizierten periplasmatischen c-Typ Cytochrome. Die Mutanten wurden in einer Endpunktbestimmung auf ihre Fähigkeit Eisen zu reduzieren überprüft. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

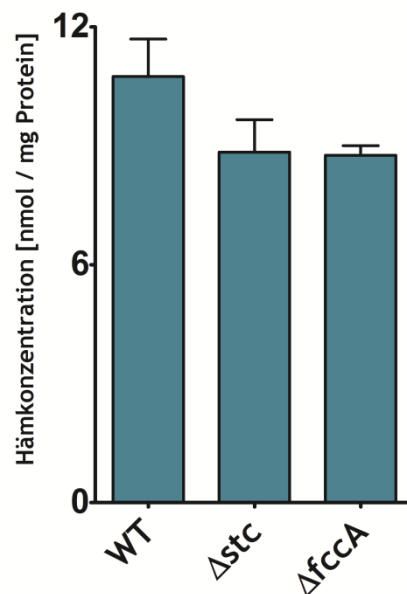


**Abbildung 11:** Eisenreduktion durch *S. oneidensis* Einzelmutanten. Bis auf den Verlust des für den Aufbau des MtrABC Komplexes elementaren MtrA zeigt keine der c-Typ Cytochrom Einzelmutanten von *S. oneidensis* einen Phänotyp in Bezug auf Eisenreduktion. Die Endpunktbestimmung erfolgte nach 6 h. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen.

Eine einzelne Mutation, bzw. der Verlust eines einzigen periplasmatischen Cytochroms hat (mit Ausnahme von MtrA) keine funktionelle Einschränkung in Bezug auf die Eisenreduktion zur Folge. Der hohe Cytochromgehalt und die überlappenden Redoxpotentiale der einzelnen Cytochrome könnten einen Phänotyp überdecken, indem ein Cytochrom die Funktion eines anderen übernimmt.

Die spezifische Funktion von MtrA in Bezug auf die funktionelle Etablierung der Fähigkeit zur Eisenreduktion ist vermutlich nicht auf seine Rolle beim Elektronentransfer durch das Periplasma zurückzuführen, sondern gründet auf der Tatsache, dass MtrA zum einen wichtig für die Übertragung respiratorischer Elektronen über die äußere Membran ist und daneben eine Schutzfunktion vor proteolytischer Degradation von MtrB bietet.

In einer Hämgruppenfärbung der periplasmatischen Fraktion ist zu sehen, dass sowohl FccA als auch STC im Periplasma in großer Häufigkeit auftreten; daher wurde untersucht, inwiefern sich deren Deletion auf den Gesamt-Cytochromgehalt des Periplasmas auswirkt. Dafür wurden periplasmatische Fraktionen von Eisen-gewachsenen Zellen der jeweiligen Einzel-Deletionsmutanten präpariert und deren Cytochromgehalt mit dem des Wildtyps verglichen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 12 dargestellt.



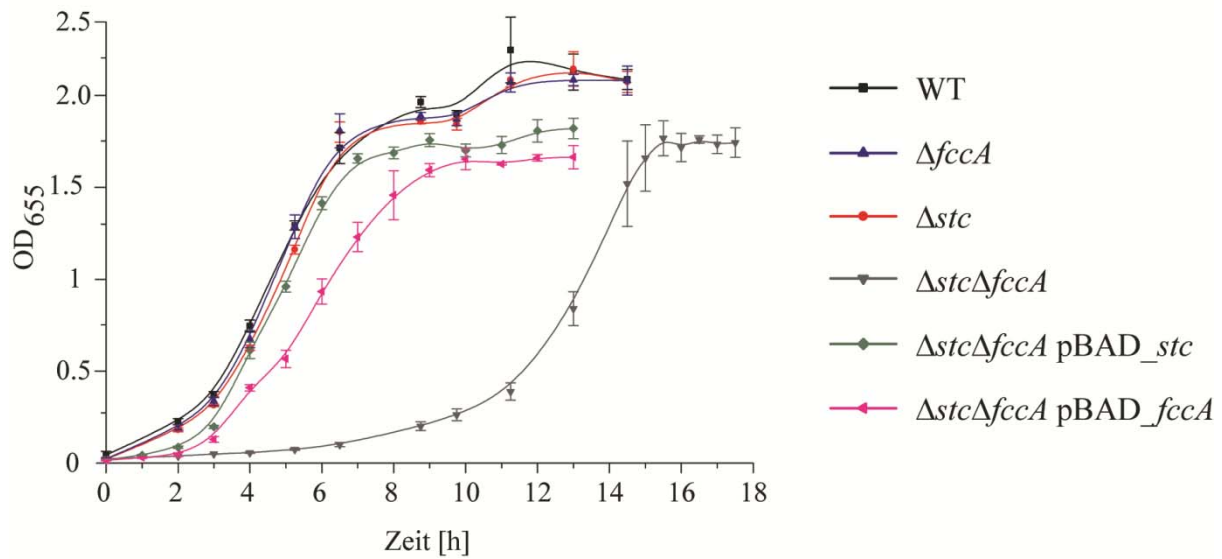
**Abbildung 12:** Hämkonzentration ausgewählter Deletionsmutanten. Fraktionen von *S. oneidensis* Wildtyp,  $\Delta stc$  und  $\Delta fccA$  wurden auf ihren Hämgehalt hin überprüft. Das Diagramm zeigt die Hämkonzentration in nmol normalisiert auf Gesamt-Protein der periplasmatischen Fraktion. Die Ergebnisse stellen das Mittel aus mindestens 3 unabhängigen Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. WT, Wildtyp.

Abbildung 12 zeigt, dass Deletionsmutanten in den Cytochromen *STC* und *FccA* einen geringeren periplasmatischen Gesamtcytochromgehalt aufweisen, als der Wildtyp. Die Konzentrationen der Mutanten liegen im Mittel bei 82,2% ( $\Delta stc$ ) und 81,5% ( $\Delta fccA$ ) verglichen mit der wildtypischen Konzentration. Zusammen genommen stellen also die in *FccA* und *STC* gebundenen Hämgruppen ca. 40% des periplasmatischen Hämgehalts dar. Diese Annahme ist natürlich nur dann gültig, wenn die Deletion nicht zu einer Über- oder Unterproduktion anderer Cytochrome führt, die aber durch eine Häm-Färbung nicht festgestellt werden konnte.

#### **4.5 Wachstum der Doppelmutante $\Delta stc\Delta fccA$**

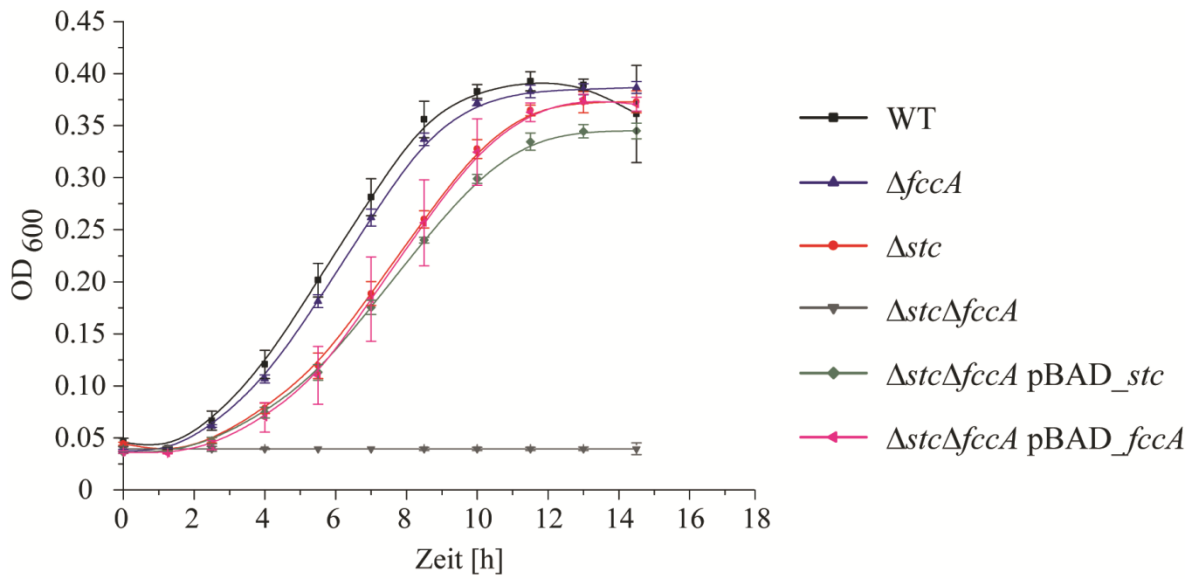
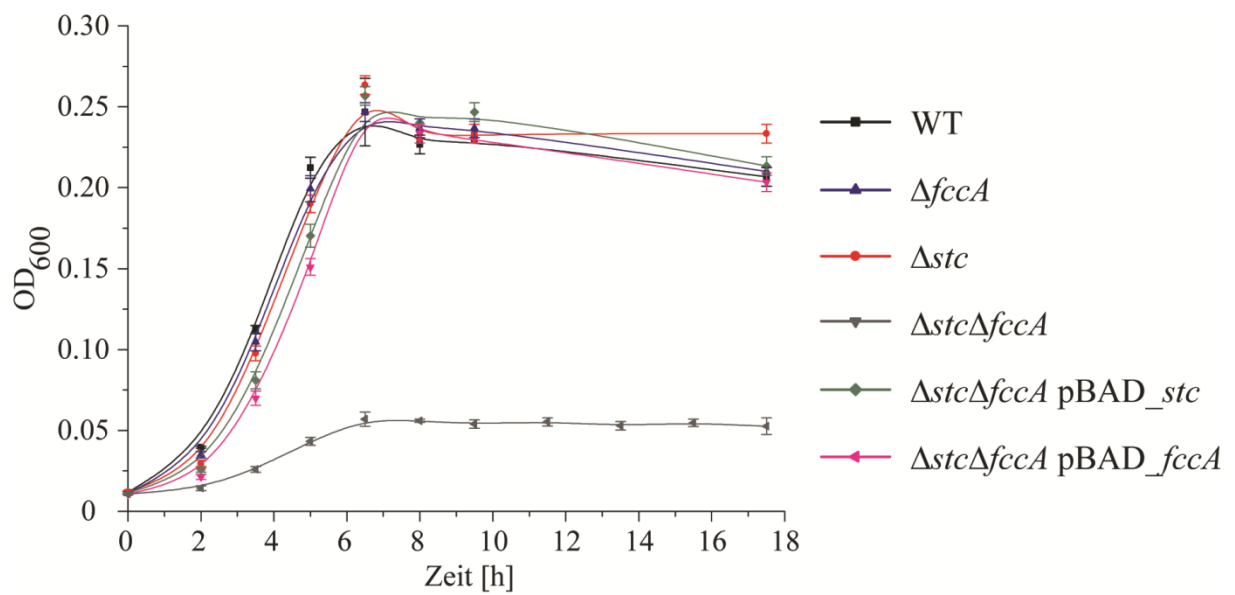
Sowohl aus den Untersuchungen zum Expressionsmuster (4.3) als auch aus denen zum spezifischen Cytochromgehalt (4.4) wird deutlich, dass der Verlust von *FccA* und *STC* einen großen Einfluss auf den periplasmatischen Hämgehalt bedeutet. Um diesen Einfluss zu charakterisieren wurde eine Doppelmutante in diesen beiden Cytochromen hergestellt und diese hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Eisenreduktion untersucht. Abbildung 13 zeigt das Wachstum dieser Doppelmutante im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten und dem Wildtyp-Stamm.

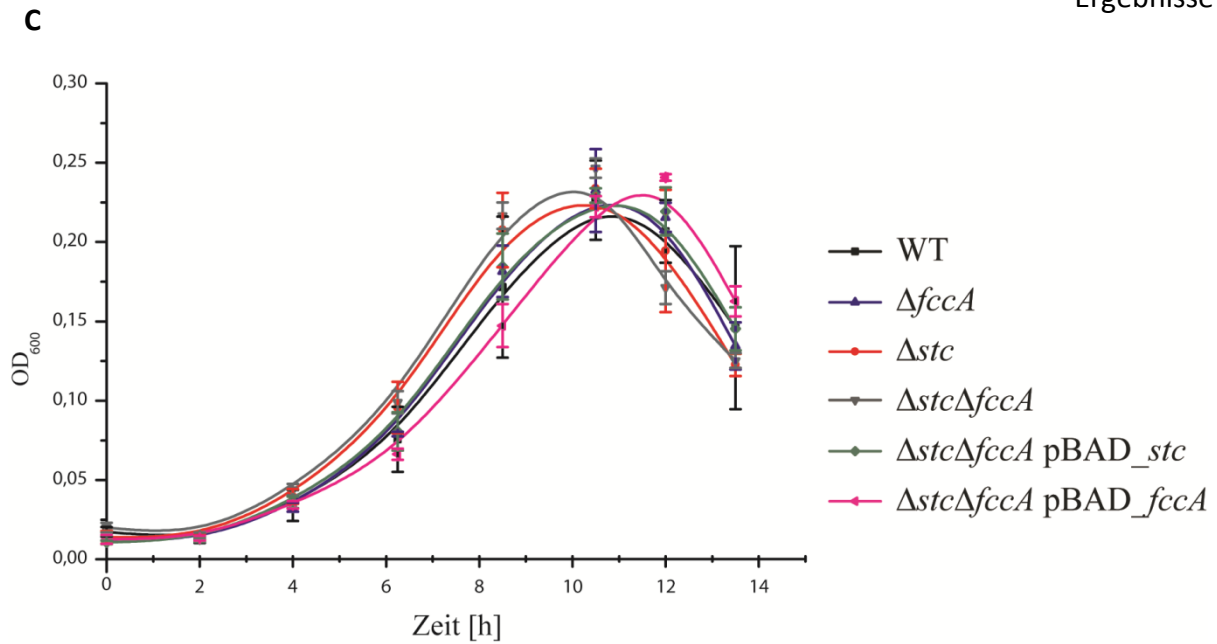




**Abbildung 13:** Wachstumskurve von *S. oneidensis* WT und Mutanten auf Eisen-Citrat. Die Einzelmutanten  $\Delta fccA$  und  $\Delta stc$  zeigen keinen Unterschied im Wachstum zum Wildtyp (WT). Die Doppelmutante  $\Delta stc\Delta fccA$  ist zu Beginn des Wachstums massiv in der Fähigkeit der Eisenreduktion eingeschränkt und kann diesen Effekt erst nach einer extrem verlängerten lag-Phase kompensieren, ehe sie das wildtypische Niveau erreicht. Die in trans Expression jeweils eines der beiden deletierten Gene versetzt die Doppelmutante wieder in den wildtypischen Status. Die Induktion erfolgte mit 50  $\mu$ M Arabinose. Die Ergebnisse repräsentieren das Mittel aus drei unabhängigen Wachstumsversuchen. Protokolliert ist die optische Dichte bei 655 nm.

Die Deletion von STC und FccA als periplasmatischen Cytochromen zeigt eine massive Beeinträchtigung bezüglich des Wachstums auf Eisen und führt zu einer extrem verlängerten lag-Phase der Zellen von ca. 8-10 Stunden. Nach dieser Verzögerungsphase wachsen die Zellen mit einer Wachstumsrate und bis zu einer optischen Dichte, welche der des Wildtyps entspricht. Um den Einfluss dieser Doppel-Deletion in Bezug auf die gesamte respiratorische Diversität von *S. oneidensis* zu untersuchen, wurden weitere Wachstumsexperimente mit alternativen Elektronenakzeptoren der anaeroben Atmung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 14 gezeigt.

**A****B**



**Abbildung 14:** Wachstum von *S. oneidensis* WT und Mutanten auf alternativen Elektronenakzeptoren. A: Wachstum auf DMSO als TEA. Im Vergleich zu den Einzelmutanten und den komplementierten Doppelmutanten zeigt die Doppelmutante einen vollständigen Verlust der Fähigkeit zum Wachstum mit DMSO als TEA. B: Wachstum auf Nitrat als TEA. Im Gegensatz zum Wachstum auf DMSO zeigt die Mutante ein initiales Wachstum mit Nitrat als TEA, stoppt allerdings bei ca. 20% der finalen OD des Wildtyps. C: Wachstum auf TMAO als TEA. Im Gegensatz zu Wachstum auf Eisen-Citrat, DMSO und Nitrat scheint der Verlust von FccA und STC keinen Einfluss auf das Wachstum mit TMAO als TEA zu haben. Das Wachstumsmuster von Einzel- und Doppelmutanten sowie der komplementierten Mutanten unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps.

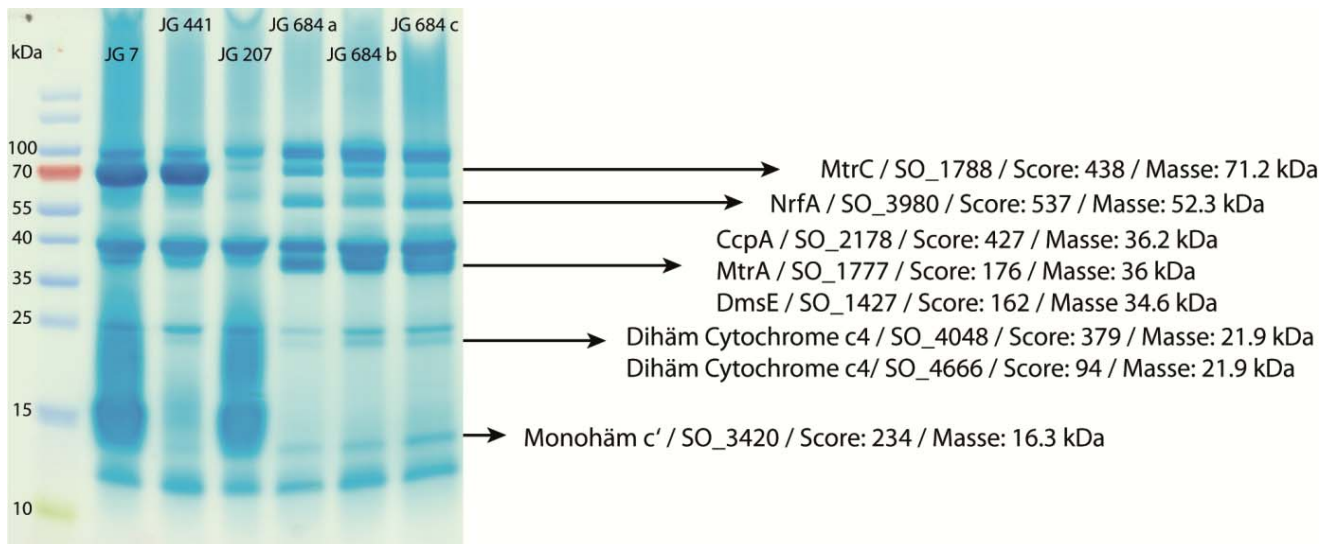
Hierbei zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten der Doppelmutante beim Wachstum mit verschiedenen TEAs. Unter DMSO-reduzierenden Bedingungen führt die Deletion von FccA und STC in der Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten und den komplementierten Doppelmutanten zum vollständigen Verlust der Fähigkeit zum Wachstum. Im Gegensatz dazu resultiert die zweifache Deletion bei Nitrat als TEA in einem initialen Wachstum der Mutante, jedoch nur bis zu etwa 20% der finalen OD des Wildtyps. Im Gegensatz zu Eisen-Citrat, DMSO und Nitrat als TEA scheint der Verlust von FccA und STC keinen Einfluss auf die Reduktion von TMAO zu haben. Einzel- und Doppelmutanten verhalten sich ebenso wie die komplementierten Mutanten und sind in ihrem Wachstum nicht von dem wildtypischen Verhalten zu unterscheiden.

#### **4.6 Charakterisierung des Suppressor-Phänotyps**

Die Wachstumsversuche zeigen eine deutliche Beeinträchtigung der Fähigkeit zum Wachstum auf alternativen Elektronenakzeptoren der anaeroben Atmung. Überraschenderweise zeigt die Doppel-Deletionsmutante  $\Delta stc\Delta fccA$  im Falle der Eisenreduktion nach einer gewissen Zeit (ca. 11 h) ein Wachstum, das gegenüber dem des Wildtyps hinsichtlich der Wachstumsrate nur geringfügig verlangsamt ist ( $\mu = 0,436 \text{ h}^{-1}$  (WT) gegen  $\mu = 0,363 \text{ h}^{-1}$  (Doppelmutante)).

##### **4.6.1 c-Typ Cytochrom Expressionsmuster**

Der Doppelmutante ist es also möglich, den initialen Verlust der Fähigkeit zur Eisenreduktion nach einer gewissen Zeit zu kompensieren. Um die Hintergründe dieser Kompensation durch einen Suppressions-Phänotyp zu ergründen, wurden Wildtyp-Zellen und Zellen der Einzel- sowie der Doppelmutanten in der exponentiellen Phase, also nach 5 bzw. 14 Stunden geerntet und das Periplasma auf eine Veränderung der Cytochrom-Expression hin untersucht. Abbildung 15 zeigt das Expressionsmuster der Doppelmutante nach Wachstum auf Eisen-Citrat im Vergleich zu denen des Wildtyps und der Einzelmutanten. Der Vergleich zeigt eine verstärkte Expression verschiedener c-Typ Cytochrome in der Phase der Suppression der Wachstumsdefizienz durch die Doppelmutante. Hierbei sind in der Doppelmutante Banden auf der Höhe von ca. 70, 50, 35, 22 und 15 kDa im Vergleich zum Wildtyp bzw. den Einzelmutanten hochreguliert oder werden in der Doppelmutante zusätzlich exprimiert. Die beschriebenen Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die Proteine extrahiert und durch Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 15).

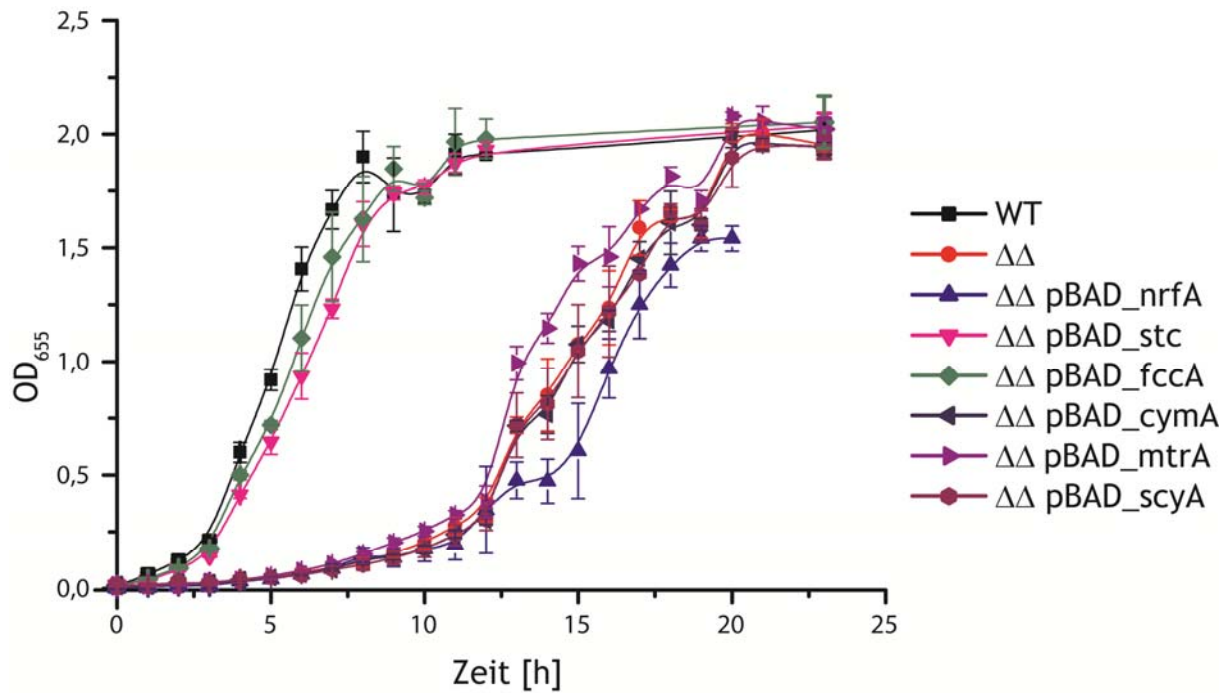


**Abbildung 15:** *c*-Typ Cytochrom Expressionsmuster von *S. oneidensis* Zellen auf Eisen-Citrat. Die *c*-Typ Cytochrom Expressionsmuster des Wildtyps (JG7) im Vergleich zu denen der Mutanten  $\Delta stc$  (JG441),  $\Delta fccA$  (JG207) und den Suppressor-Phänotypen der Doppelmutante (JG684). a, b und c repräsentieren die periplasmatischen Fraktionen von drei unabhängigen JG684 Suppressor-Phänotypen. Die nach der Suppression verstärkt auftretenden Banden wurden per Massenspektrometrie analysiert. Das Ergebnis der Analyse ist rechts im Bild zu sehen.

Unter den hochregulierten Cytochromen finden sich mit NrfA, CcpA, MtrA, DmsE, SO\_4048, SO\_4666 und SO\_3420 dieselben Cytochrome, die ebenfalls in der MudPIT-Analyse der periplasmatischen Fraktion von *S. oneidensis* Wildtyp-Zellen identifiziert wurden (Richter, 2014).

#### 4.6.2 Überexpression der identifizierten Cytochrome

Es erscheint also möglich, dass *S. oneidensis* den Verlust eines bedeutenden Teils der Elektronen-tragenden Hämgruppen in der Doppelmutante durch die gesteigerte Expression anderer *c*-Typ Cytochrome kompensiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden verschiedene *c*-Typ Cytochrome in trans in der Doppelmutante exprimiert. Der Einfluss dieser Expression ist in Abbildung 16 dargestellt.



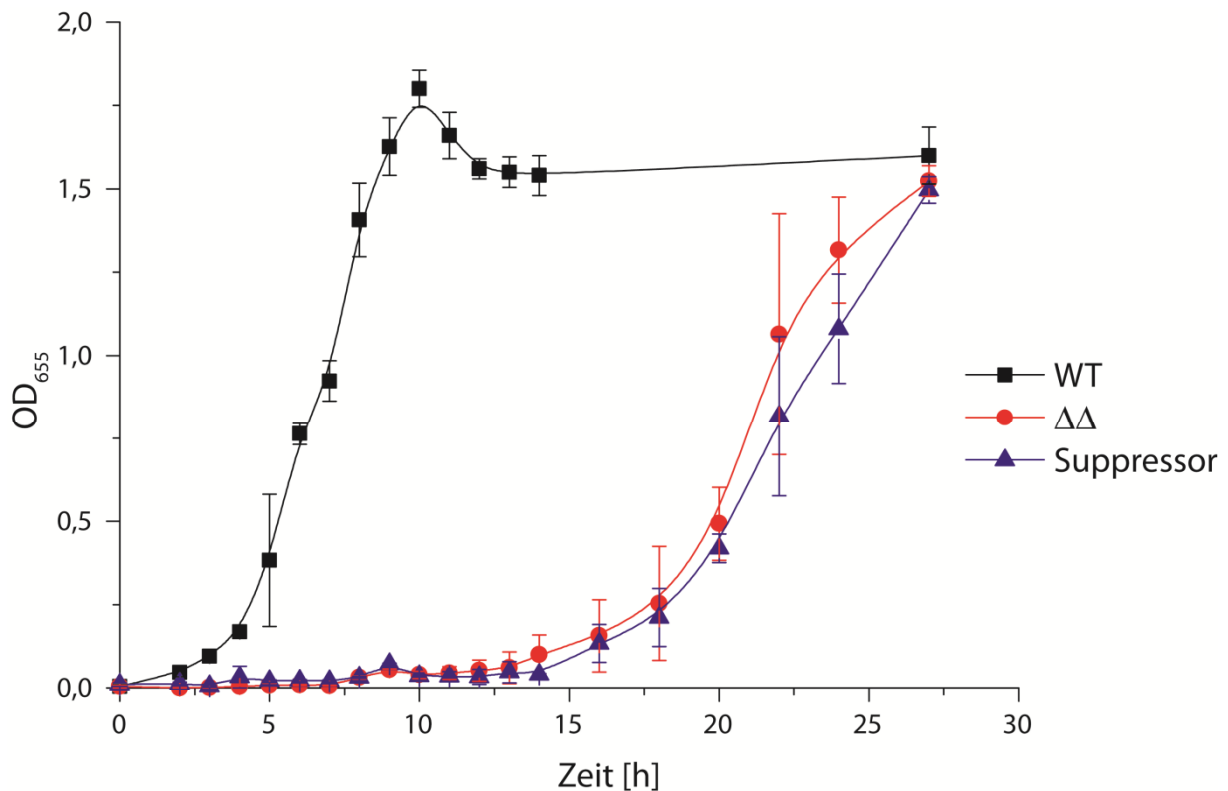
**Abbildung 16:** in trans Expression verschiedener *c*-Typ Cytochrome in *S. oneidensis* JG684 ( $\Delta stc\Delta fccA$  Doppelmutante). Die jeweiligen Cytochrome (NrfA, STC, FccA, CymA, MtrA und ScyA) wurden von einem pBAD Plasmid aus exprimiert. Die Induktion erfolgte durch Gabe von 50  $\mu\text{M}$  Arabinose. Nur die Expression von STC und FccA versetzt die Doppelmutante wieder in den wildtypischen Status bezüglich der Eisenreduktion. WT, *S. oneidensis* Wildtyp;  $\Delta\Delta$ , JG684 ( $\Delta stc\Delta fccA$ ).

Eine zusätzliche Expression verschiedener Cytochrome, darunter Multihäme wie MtrA (10 Decahäm) und NrfA (5 Pentahäm), Monohäme (ScyA) und membrangebundene (CymA), ermöglicht der Doppelmutante keinen Wachstumsvorteil in Bezug auf Eisenreduktion. Einzig die Expression von STC bzw. FccA erlaubt der Mutante Wachstum, das dem des Wildtyps vergleichbar ist.

#### 4.6.3 Untersuchungen zum Suppressor-Phänotyp

Die Tatsache, dass in drei unabhängigen Experimenten dasselbe Expressionsmuster durch die Doppelmutante generiert wird, könnte durch eine Modifikation der Regulation begründet sein. Die Hypothese, dass sich diese Modifikation auch auf genetischer Ebene manifestiert, wurde durch Wachstumsversuche untersucht, für welche Zellen der Doppelmutante verwendet wurden, die bereits einmal einen Suppressor-Phänotyp auf

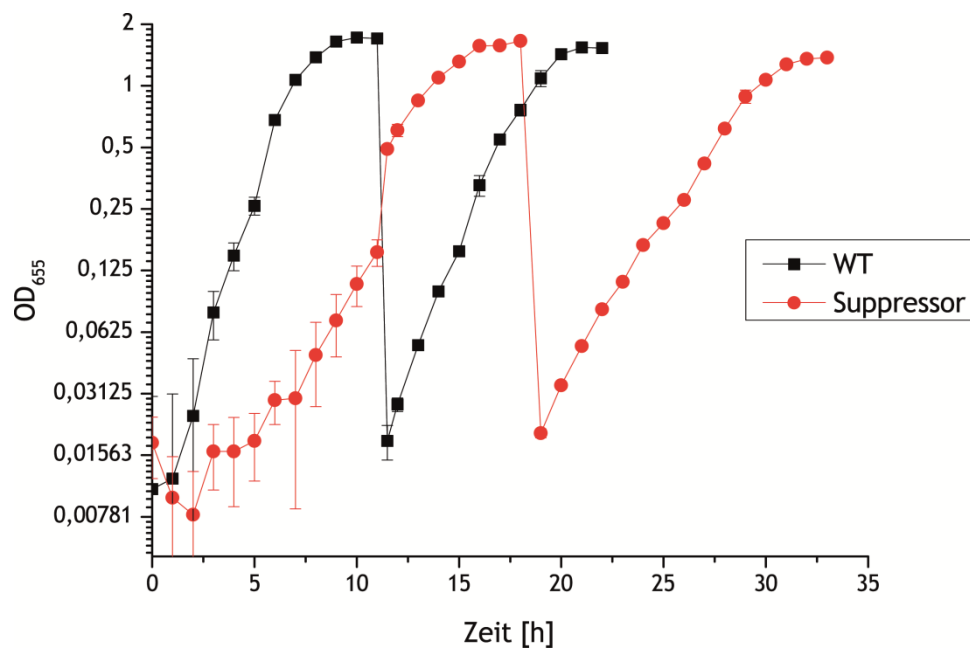
Eisen-Citrat gezeigt hatten. Diese wurden in der log-Phase geerntet und über Nacht auf LB-Platten inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie für den zweiten Wachstumsversuch in frischem M4 mit Eisen-Citrat kultiviert und ihr Wachstum im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm verglichen. Dabei zeigte sich, dass Zellen mit einem Suppressor-Phänotyp dasselbe Wachstumsmuster aufweisen wie die Doppelmutante, welche keinen Suppressor-Phänotyp ausbilden konnte. Das Ergebnis dieser Wachstumskurven ist in Abbildung 17 gezeigt.



**Abbildung 17:** Wiederholtes Wachstum von *S. oneidensis* JG684 auf Eisen-Citrat. Die Doppelmutante wurde nach erfolgtem Suppressor-Phänotyp in der log-Phase geerntet und für 12 h auf ein alternatives Medium überimpft. Bei einem erneuten Wachstum auf Eisen-Citrat zeigen diese Zellen die gleiche verlängerte lag-Phase einer Doppelmutante, die noch keinen Suppressor-Phänotyp ausbilden konnte. WT, *S. oneidensis* Wildtyp;  $\Delta\Delta$ , JG684 ( $\Delta stc\Delta fccA$ ); Suppressor, JG684-Zellen nach bereits erfolgtem Suppressor-Phänotyp.

Aus den vorangegangenen Wachstumsexperimenten ist kein Vorteil für die Zellen zu erkennen, die bereits einmal einen Suppressor-Phänotyp auf Eisen-Citrat gezeigt haben. Eine genetische Veränderung scheint also keine Ursache für die veränderte Regulation zu sein.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Expression des alternativen Cytochrom-Setups durch nicht genetische Veränderungen der Zelle reguliert ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden weitere Wachstumsexperimente durchgeführt. Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Experiment wurden die Zellen für diesen Versuch nicht erst auf ein anderes Medium überführt sondern direkt aus der exponentiellen Phase der Suppression in frisches Eisen-Citrat Medium überimpft und das Wachstum protokolliert. Diese Zellen zeigen im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen Experiment keine verlängerte lag-Phase auf sondern waren sofort nach der Rückverdünnung in der Lage, wie der Wildtyp mit exponentiellem Wachstum fortzufahren. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 18 dargestellt.



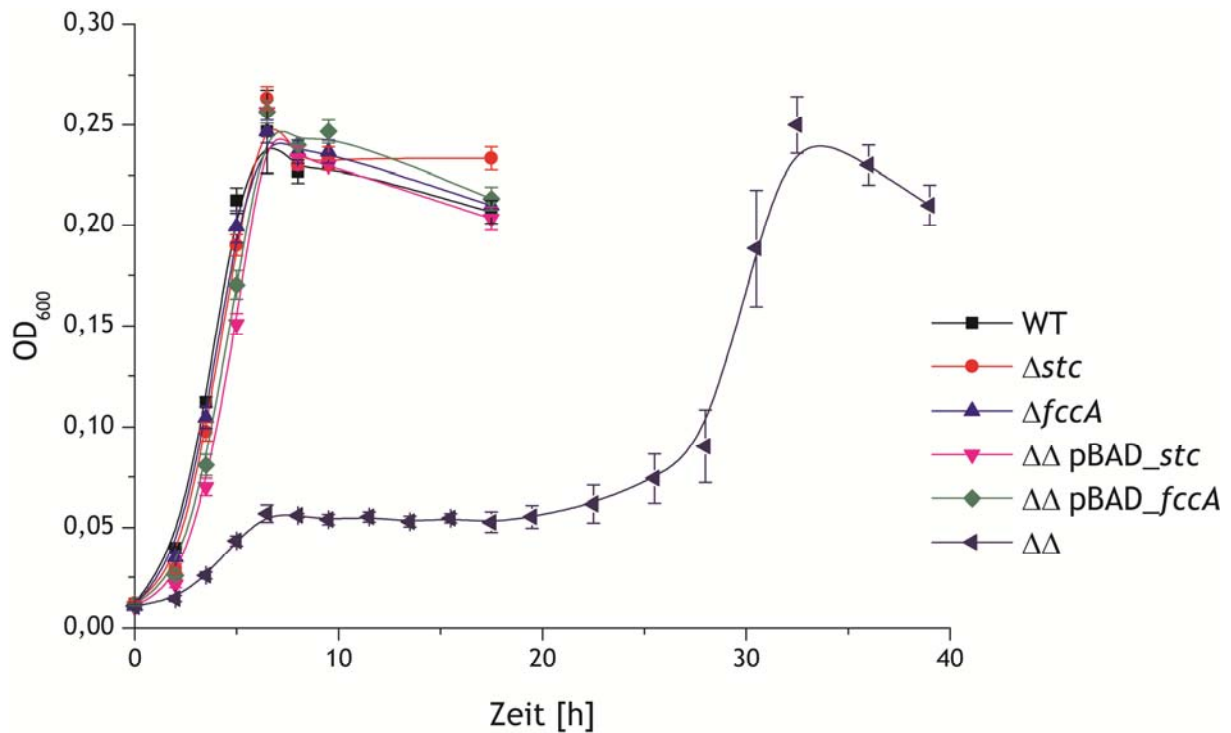
**Abbildung 18:** Wachstum der rickverdünneten Suppressor-Mutante. Zellen der Doppelmutante, die in einem vorausgegangenem Experiment bereits einen Suppressor-Phänotyp zeigten, wurden direkt dieser Kultur entnommen und in frisches Medium überimpft. Diese Zellen zeigen im Gegensatz zur ursprünglichen Doppelmutante keine verlängerte lag-Phase sondern zeigen unmittelbar exponentielles Wachstum. Aufgetragen ist die optische Dichte bei 655 nm. WT, *S. oneidensis* Wildtyp; Suppressor, *S. oneidensis*  $\Delta stc\Delta fccA$  mit aus einem vorangegangenen Experiment bereits ausgebildetem Suppressor-Phänotyp.



Die vorangegangenen Experimente legen nahe, dass der Effekt, der den Zellen nach einer verlängerten lag-Phase doch noch Wachstum und Eisenreduktion ermöglicht, nicht genetisch veranlagt ist. Darüber hinaus bleibt diese Fähigkeit den Zellen erhalten, sobald sie in eine Umgebung überführt werden, die mit der des initialen Wachstums identisch ist und benötigen keine erneute Anlaufzeit, um den Suppressor-Effekt erneut auszubilden.

#### **4.7 Suppressor-Phänotyp der Nitrat-Reduktion**

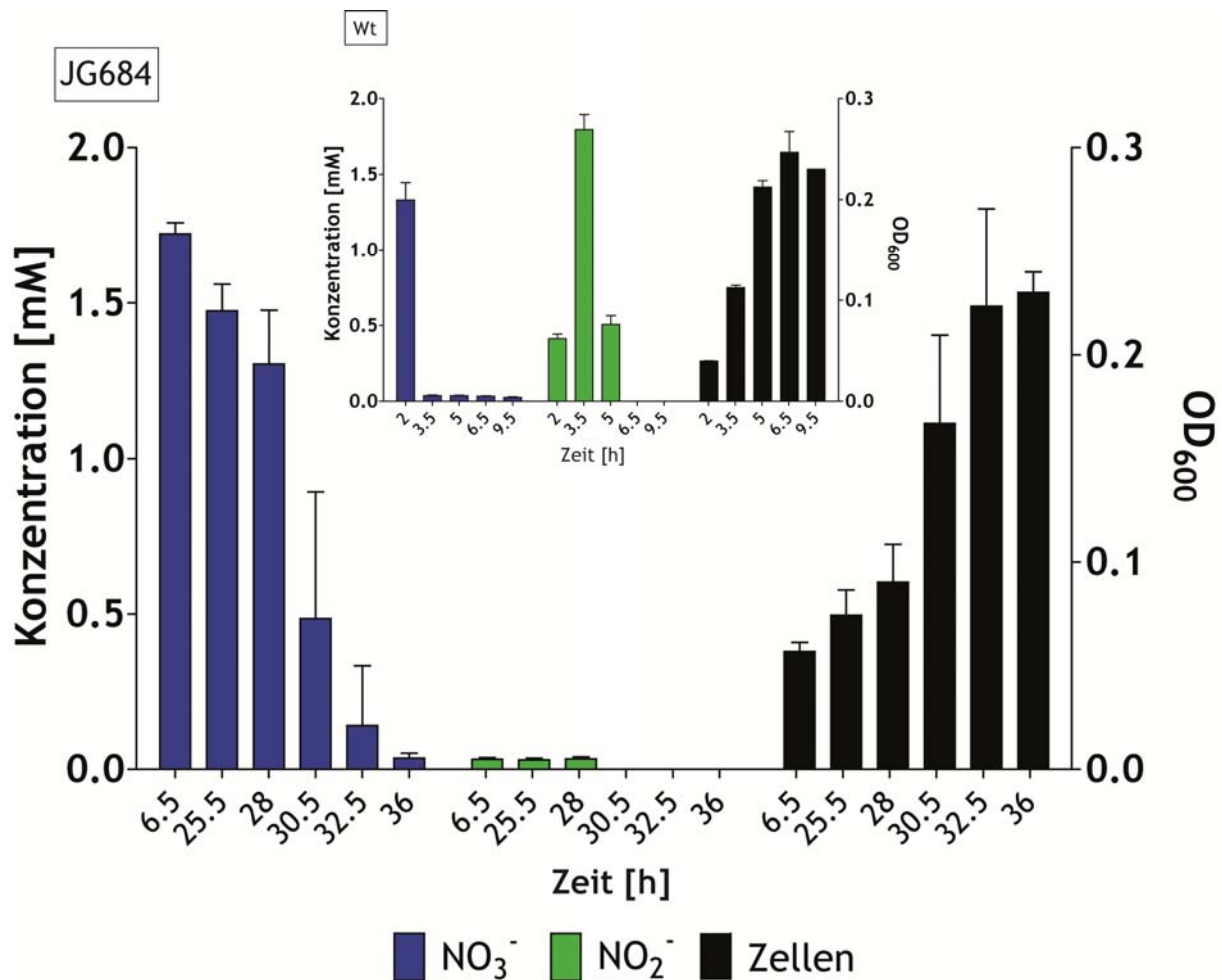
Der Effekt des Suppressor-Phänotyps, der auf Eisen-Citrat zu beobachten ist, tritt nach ca. 8-10 h auf. Bei Nitrat-gewachsenen Zellen zeigt die Doppelmutante zu Beginn ein leichtes Wachstum. Daher wurden weiterführende Wachstumsexperimente durchgeführt, um potentiell ähnliche Suppressor-Phänotypen auf DMSO und Nitrat zu identifizieren. Die Doppelmutante zeigte auch nach 48 h kein Wachstum mit DMSO als terminalem Elektronenakzeptor. Im Gegensatz dazu entwickelten die Zellen mit Nitrat als TEA nach ca. 25 h ebenfalls einen Suppressor-Phänotyp. Der Verlauf dieser Wachstumskurve ist in Abbildung 19 gezeigt.



**Abbildung 19:** Langzeit-Wachstumskurve mit Nitrat als TEA. Die Doppelmutante zeigt nach initialem Wachstum eine längere lag-Phase. Nach ca. 25 h erlangt die Doppelmutante allerdings einen Suppressor-Phänotyp, der Wachstum bis zu optischen Dichten von der des Wildtyps ermöglicht. WT, Wildtyp;  $\Delta stc$ , JG441;  $\Delta fccA$ , JG207;  $\Delta\Delta$  pBAD\_ *stc*, JG700;  $\Delta\Delta$  pBAD\_ *fccA*, JG837;  $\Delta\Delta$ , JG684.

#### 4.7.1 Untersuchungen der Nitrat-Reduktion

Um die Ursachen dieser Suppression zu ergründen, wurden die Konzentrationen an Nitrat und Nitrit während des Wachstums des Suppressor-Phänotyps mit denen des Wildtyps verglichen. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Horn vom Engler-Bunte Institut durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Nitrat- bzw. Nitritreduktion der Doppelmutante (JG684) und von *S. oneidensis* Wildtyp. Für Stamm JG684 ist eine kontinuierliche Nitratreduktion erkennbar. Während des Messzeitraumes konnten nur geringe Mengen an entstehendem Nitrit gemessen werden. Die Zellzunahme verläuft reziprok zur Nitratabnahme. Im Gegensatz dazu zeigt der Wildtyp (kleiner Einschub) eine rasche Abnahme der Nitrat-Konzentration und eine temporäre Akkumulation von Nitrit.

Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt der Suppressor-Phänotyp während der Nitrat-Reduktion keine temporäre Akkumulation von Nitrit. Zudem erfolgt die Reduktion des Nitrates im Gegensatz zum Wildtyp (3,5 h) kontinuierlich über einen langen Zeitraum (36 h).

#### **4.8 Transkriptom-Analyse**

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass der Verlust der beiden Cytochrome STC und FccA in der Doppelmutante zu Veränderungen der zellulären Physiologie in Bezug auf den Elektronentransfer führt. Diese negative Veränderung kann jedoch unter Umständen (Eisen-Citrat und Nitrat als TEAs) durch die Zelle kompensiert werden. Diesbezüglich sind prinzipiell zwei Szenarien denkbar. Zum einen erscheint es möglich, dass durch den Verlust von knapp 40% periplasmatischem Häm als Elektronen-übertragendem Co-Faktor der Elektronentransport an sich massiv beeinträchtigt ist und somit eine effektive anaerobe Atmung nicht mehr gewährleistet ist. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass FccA und STC in die Regulation des anaeroben Stoffwechsels involviert sind und ihr Fehlen eher regulatorische Effekte denn Elektronentransfer-Prozesse beeinflusst. Diese Annahme wird gestützt durch Arbeiten, in denen eine  $\Delta crp$  Mutante von *S. oneidensis* einen ähnlichen Phänotyp in Bezug auf anaerobe Atmung zeigte (Saffarini *et al.*, 2003). Um einen eventuell vorhandenen regulatorischen Effekt zu identifizieren, wurden die Transkriptome von WT und Doppelmutante zu Beginn ihres Wachstums miteinander verglichen. Die Transkriptom-Studien der auf Eisen gewachsenen Doppelmutante zeigen eine leichte Herunterregulation verschiedener zentraler Enzyme des anaeroben Stoffwechsels wie z.B. der Phosphatacetyltransferase Pta, der Acetatkinase AckA und der Pyruvat-Formiat-Lyase Pfl. Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse sind in Tabelle 29 gezeigt.

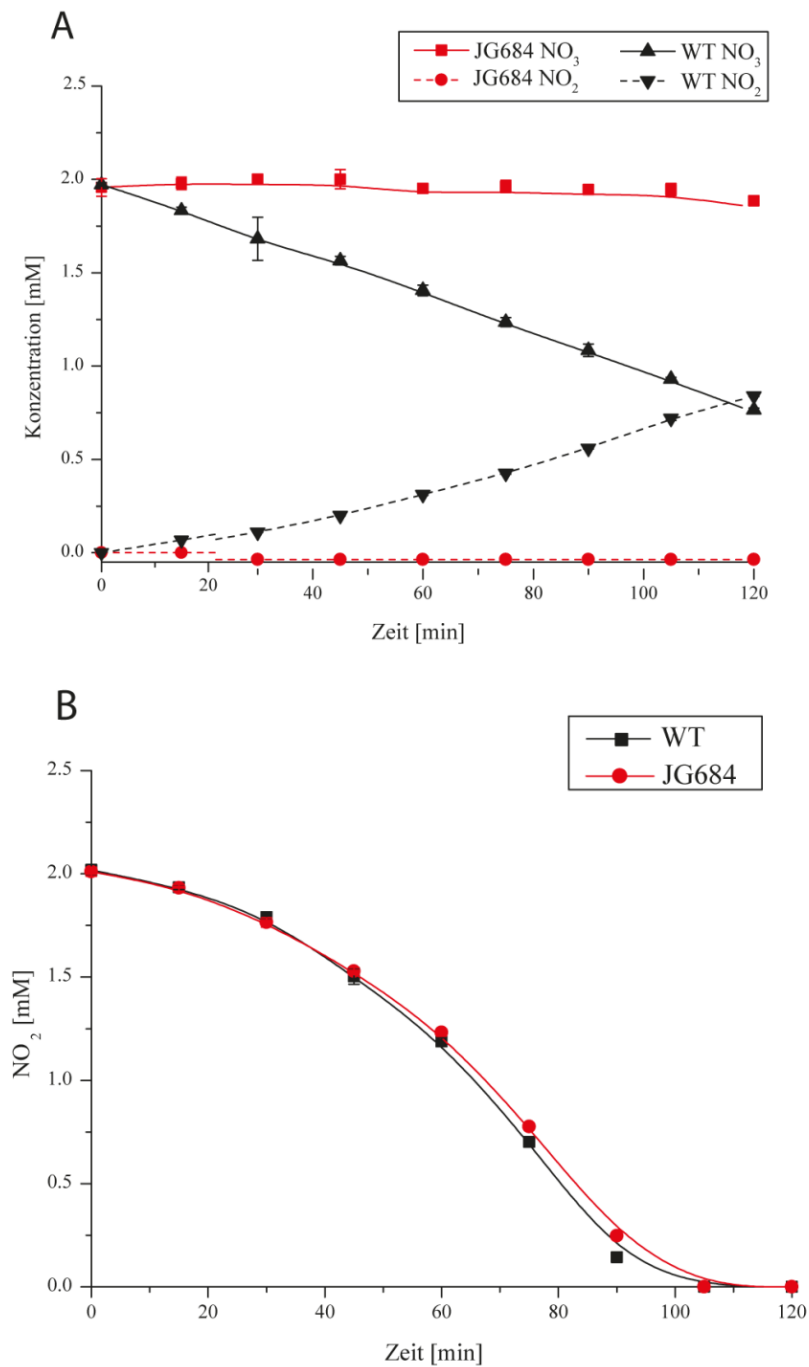
**Tabelle 29:** Transkriptom-Analyse. Die Tabelle zeigt die wichtigsten signifikant regulierten Gene des Vergleiches der Doppelmutante mit dem Wildtyp. Die Regulation ist in fold change ( -fach) angegeben. Eine fold change von 2 bedeutet ein Verdopplung der Expression im Vergleich zum Wildtyp. Darüber hinaus zeigt die Tabelle Vergleiche der Regulation zu Einzel-Deletionsmutanten in wichtigen Komponenten des anaeroben Stoffwechsels, Crp als cAMP Rezeptor Protein und CyaC als Adenylat Cyclase, die für die Synthese des Crp-Effektormoleküls verantwortlich ist. Der Pfeil indiziert die in diesen Mutanten identifizierte Herunterregulation der jeweiligen Gene (Saffarini *et al.*, 2003).

	SO_Nummer	Gen Name	fold change	$\Delta crp$	$\Delta cyaC$
<b>Lactat Metabolismus</b>	SO_1518	<i>lldG</i>	2.7		
	SO_1519	<i>lldF</i>	2.6		
	SO_1520	<i>lldE</i>	2.4		
	SO_2912	<i>pflB</i>	-3.0	↓	↓
	SO_2913	<i>pflA</i>	-3.0	↓	↓
	SO_2915	<i>ackA</i>	-3.8	↓	↓
	SO_2916	<i>pta</i>	-3.6	↓	↓
<b>Häm Biosynthese</b>	SO_0027	<i>hemG-2</i>	2.2	↓	
	SO_3720	<i>hemG-3</i>	2.3	↓	
<b>Atmungsketten</b>	SO_0845	<i>napB</i>	6.4	↓	
	SO_0848	<i>napA</i>	10.3	↓	
	SO_1428	<i>dmsF</i>	5.8	↓	↓
	SO_1429	<i>dmsA</i>	6.0	↓	↓
	SO_1430	<i>dmsB</i>	6.2	↓	↓

Darüber hinaus wurde eine leichte Herunterregulation der Nitritreduktase NrfA festgestellt (Sturm *et al.*, submitted to ISME). Um zu untersuchen, ob diese Herunterregulationen einen Effekt auf den allgemeinen Stoffwechsel der Doppelmutante haben – ein verringerter Elektronenfluss zu CymA und dadurch als Folge eine geringere Reduktionsrate – wurden Zellsuspensions-Assays durchgeführt.

#### **4.9 Elektronentransfer während der Nitrat-/Nitrit-Reduktion**

Bei diesen Assays wurde die Herunterregulation der *nrfA*-Transkription durch in trans Expression von einem induzierbaren Plasmid kompensiert. Da eine direkte Elektronenübertragung zwischen CymA und NrfA möglich ist, sollte ein Vergleich der Nitrat- bzw. Nitrit-Reduktion Aufschluss über eine Beeinträchtigung des Zentralstoffwechsels geben. Die Ergebnisse dieser Assays sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21:** Nitrat- und Nitrit-Reduktion durch *S. oneidensis* Wildtyp und Doppelmutante. A: Nitrat-Reduktion und Nitrit-Akkumulation durch den Wildtyp. Die Doppelmutante ist nicht in der Lage, Nitrat zu reduzieren. B: Die Nitrit-Reduktion verläuft in beiden Stämmen mit einer vergleichbaren Kinetik. WT, Wildtyp; JG684, Doppelmutante.

Die Doppelmutante ist im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage, innerhalb des Testzeitraumes Nitrat zu reduzieren. Sie besitzt aber die Fähigkeit, Nitrit mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Wildtyp zu reduzieren. Da eine direkte Verbindung zwischen CymA

und NrfA besteht, kommt eine verminderte Elektronenflussrate von CymA nicht als Erklärung für die beobachteten Phänotypen in Frage. Der Elektronenfluss von CymA auf die Nitrat-Reduktase NapAB ist allerdings durch periplasmatischen Elektronentransfer vermittelt. Da im Falle der Doppelmutante keine Reduktion von Nitrat beobachtet werden kann, lässt dies auf die Beeinträchtigung der Fähigkeit zu periplasmatischem Elektronentransfer schließen.



## 5 Diskussion

*Shewanella oneidensis* ist ein neutrophiles  $\gamma$ -Proteobakterium. Die respiratorische Vielfalt von *S. oneidensis* ist das herausragende Merkmal dieses Organismus'. Unter den durch dieses Bakterium reduzierbaren Elektronenakzeptoren finden sich neben Sauerstoff viele verschiedene anaerobe Akzeptoren, darunter sowohl lösliche und Membran-gängige wie Nitrat, Nitrit und Fumarat, als auch nicht Membran-gängige wie Eisen- und Mangan-Spezies (Myers & Nealson, 1988; Myers & Nealson, 1990; Lovley, 1991; Nealson & Saffarini, 1994; Beliaev *et al.*, 2005). Unter Umweltbedingungen, die denen eines neutrophilen Bakteriums wie *S. oneidensis* entsprechen (neutraler pH-Wert), liegen die meisten Eisenspezies in unlöslicher Form vor, bevorzugt als Eisen-(oxyhydr-)oxide. Diese Minerale können von den Zellen nicht ins Zellinnere aufgenommen werden. Für Gram-negative Bakterien wie *S. oneidensis* ergibt sich daraus das Problem, die durch die Substrat-Oxidation an der Cytoplasmamembran freigesetzten Elektronen auf den Akzeptor zu übertragen. Bevor diese Übertragung stattfinden kann, müssen zuerst das Periplasma und anschließend die äußere Membran überwunden werden. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass dieser Transfer in *S. oneidensis* und anderen Bakterien durch *c*-Typ Cytochrome ermöglicht wird (Schuetz *et al.*, 2009; Coursolle *et al.*, 2010; Bücking *et al.*, 2013). Knock-out Studien konnten bereits einige notwendige Cytochrome in *S. oneidensis* identifizieren, deren Verlust deutliche Defizite in der Eisen-Reduktion zur Folge hat (CymA, MtrA, MtrC,) (Myers & Myers, 1997; Myers & Myers, 2002; Schwalb *et al.*, 2003; Bretschger *et al.*, 2007). Des Weiteren war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass das Genom von *S. oneidensis* MR-1 für eine Vielzahl an *c*-Typ Cytochromen codiert, von denen 27 im Periplasma lokalisieren (Meyer *et al.*, 2004; Romine *et al.*, 2008). Die Funktion dieser Cytochrome ist größtenteils unbekannt oder unverstanden. Ziel dieser Arbeit war es, die periplasmatischen Elektronentransfer-Reaktionen in *S. oneidensis* MR-1 zu beschreiben und detailliertere Einblicke in die einzelnen anaeroben respiratorischen Prozesse zu erlangen.

### **5.1 Verteilung der c-Typ Cytochrome**

Modellorganismen der dissimilatorischen Eisenreduktion gehören den Genera *Shewanella* und *Geobacter* an. Die Anzahl der im Genom dieser Spezies codierten c-Typ Cytochrome ist auffällig hoch. Die Analyse weiterer Organismen bezüglich ihres c-Typ Cytochromgehaltes sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die Anzahl der in einem Genom vorliegenden Gene für c-Typ Cytochrome mit der Fähigkeit zur Eisenreduktion bzw. zu extrazellulärer Atmung korrelieren lässt. Anhand der bis 2011 auf NCBI publizierten Proteome wurde eine in silico Analyse der c-Typ Cytochrom Verteilung innerhalb der Abteilung der Proteobacteria durchgeführt (Sturm *et al.*, 2013). Die Anzahl der durch die einzelnen Organismen codierten Cytochrome variiert stark (Abbildung 6 A). Auch innerhalb der einzelnen Klassen finden sich deutliche Unterschiede. In der Klasse der  $\gamma$ -Proteobacteria reicht diese Spanne z.B. von 0 (*Carsonella ruddii*) bis zu 64 c-Typ Cytochromen (*Shewanella sediminis*) (Abbildung 6 D). In der Klasse der  $\delta$ -Proteobacteria finden sich sogar Vertreter mit 99 c-Typ Cytochromen (*Geobacter uranireducens*) (Abbildung 6 F).

Die durchschnittliche Anzahl an exprimierten c-Typ Cytochromen eines Proteobakteriums über alle untersuchten Organismen gemittelt beträgt 13. Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, dass der größte Teil der zur Eisen-Reduktion befähigten Proteobakterien den Klassen der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakterien zuzuordnen ist. Vereinzelt finden sich auch Vertreter in den Klassen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobacteria. Einzig in der Klasse der  $\epsilon$ -Proteobacteria und in der Unterklasse der Enterobacteria finden sich in dieser Analyse keine Eisen-Reduzierer.

Bekannte Eisen-Reduzierer wie *Shewanella spec.* und *Geobacter spec.* weisen die genetische Information für eine weitaus höhere Anzahl an c-Typ Cytochromen auf als der durchschnittliche, in dieser Analyse ermittelte Wert. Ebenso weisen die zur Eisenreduktion fähigen untersuchten Stämme *Rhodoferrax ferrireducens* ( $\beta$ -Klasse), *Ferrimonas balearica* ( $\gamma$ -Klasse) und *Anaeromyxobacter dehalogenans* ( $\delta$ -Klasse) einen hohen Gehalt an c-Typ Cytochromen auf (Chaudhuri & Lovley, 2003; Thomas *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2010). Diese Tatsache legt eine Korrelation zwischen Cytochrom-Gehalt und Fähigkeit zur Eisenreduktion nahe.

Auf der anderen Seite finden sich in dieser Analyse Vertreter verschiedener Klassen, die zu Eisen-Reduktion befähigt sind, jedoch unterhalb des durchschnittlichen Cytochromgehaltes liegen, wie z.B. *Rhodobacter capsulatus* ( $\alpha$ -Klasse), *Acidithiobacillus ferrooxidans* ( $\gamma$ -Klasse) und *Pelobacter carbinolicus* ( $\delta$ -Klasse) (Pronk *et al.*, 1992; Lovley *et al.*, 1995; Dobbin *et al.*,

1996). Eine eindeutige Korrelation zwischen dem theoretischen *c*-Typ Cytochromgehalt eines Proteobakteriums und seiner Fähigkeit, Eisen zu reduzieren ist damit nicht nachzuweisen. In Einzelfällen erklärt sich die Fähigkeit zur trotzdem etablierten Eisen-Reduktion durch die ökologischen Nischen der jeweiligen Organismen. Der saure Lebensraum von z.B. *Acidiphilium cryptum* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* erlaubt die Bildung löslicher Eisenspezies, die anders als die bei neutralem pH auftretenden Eisen-(oxyhydr-)oxide nicht zur Präzipitation neigen und unter Umständen die äußere Membran überwinden können, wodurch eine *c*-Typ Cytochrom-basierte Überbrückung des Periplasmas und der äußeren Membran überflüssig würde.

Nichtsdestotrotz bietet diese Analyse eine gute Möglichkeit, ein initiales Screening von Organismen auf ihre Fähigkeit zur Eisen-Reduktion durchzuführen. Dies zeigt sich u. a. in der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobacteria. Beispielsweise ist *Shewanella denitrificans* der einzige Vertreter der untersuchten *Shewanella* Spezies, der nicht zur Eisen-Reduktion fähig ist (Brettar *et al.*, 2002). Die *in silico* Analyse erbrachte für diesen Stamm ein Ergebnis von 14 putativen *c*-Typ Cytochromen, was deutlich unter dem Schnitt aller anderen *Shewanella* Spezies mit 40 Cytochromen liegt. Somit kann die *in silico* Analyse des Cytochromgehalts von Organismen durchaus Rückschlüsse auf deren respiratorische Aktivität bezüglich Eisen erlauben.

Die strikte Wahl der Parameter dieser Analyse erfasst sicher nicht alle tatsächlich exprimierten *c*-Typ Cytochrome, reduziert allerdings auch die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse. So ergibt diese automatisierte Analyse für *S. oneidensis* MR-1 einen Wert von 38 *c*-Typ Cytochromen, wohingegen eine händisch ausgeführte Untersuchung diesbezüglich eine Anzahl von 41 erbrachte (Meyer *et al.*, 2004; Romine *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit etablierte *in silico* Untersuchung bietet allerdings eine gute Möglichkeit, um mit wenig Aufwand z.B. aus Metagenomdatensätzen die Anwesenheit von Eisen-Reduzierern vorherzusagen.

## 5.2 Das Periplasma als c-Typ Cytochrom-basierter Elektronentransfer-Raum

### 5.2.1 Bestimmung des periplasmatischen Volumens

Die ESEM-basierte Vermessung Eisen-gewachsener *S. oneidensis* Zellen ergab eine durchschnittliche Größe der Zellen von 2,99  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,72 \mu\text{m}$ ) Länge und 0,72  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,07 \mu\text{m}$ ) Breite. Durch die Verrechnung dieser Daten mit der von Dohnalkova et al. erhobenen Dicke des Periplasmas ergab sich ein periplasmatisches Volumen von **0,15 fl ( $\pm 0,005 \text{ fl}$ )** (4.2.1) (Dohnalkova et al., 2011).

Die verwendete Technik der ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy) ermöglicht im Vergleich zu anderen elektronenmikroskopischen Techniken, besonders den Transmissions-basierenden Präparationen, die Darstellung nahezu vollständig hydrierter Strukturen der Zellen und ist darüber hinaus frei von Sektionsartefakten, die besonders bei der TEM-Bildgebung durch die auftretende Deformation bei der Herstellung der Präparate ein großes Problem darstellen (Matias et al., 2003). Auf Grund dieser Präparation sind die Werte für die gemessene Länge und Breite der auf Eisen gewachsenen *S. oneidensis* MR-1 Zelle durchaus vertrauenswürdig. Die Präparationstechniken, die dem Ergebnis der Bildgebung zur Bestimmung des Abstandes zwischen cytoplasmatischer und äußerer Membran zu Grunde lagen (high pressure freezing (HPF), und automatic freeze substitution (AFS)), ergaben ebenfalls hoch hydratisierte Strukturen (durch die nicht-vorhandene Elektronendichte der extrazellulären Matrix indiziert), so dass auch dieser Wert als sinnvoll erachtet werden kann (Dohnalkova et al., 2011). Basierend auf der Annahme, dass die zelluläre Stäbchen-Form mathematisch in der Form eines Zylinders und zweier Halbkugeln ausgedrückt werden kann, erscheint der bestimmte Wert für das periplasmatische Volumen authentisch. Darüber hinaus soll betont werden, dass dieser Wert sich auf Eisen-reduzierende *S. oneidensis* MR-1 Zellen bezieht. Die Dimensionen der Zellen unter alternativen Wachstumsbedingungen (Elektronenakzeptor, C-Quelle, Salzgehalt des Mediums, pH-Wert usw.) können von den hier errechneten abweichen. Dennoch stellt die Berechnung des Volumens des Periplasmas mittels der verwendeten ESEM- Technik eine gute initiale Anwendungsmöglichkeit dar, um detailliertere Einblicke in die Morphologie und Physiologie von Mikroorganismen zu erlangen. Der Vergleich mit anderen Volumina von  $\gamma$ -Proteobacteria fällt an dieser Schwelle schwer, da die bisher ermittelten Werte für die Dimensionen des Periplasmas stark schwanken. Für die Breite des Periplasmas findet man frühe Werte zwischen 7 – 71 nm. Durch die mittlerweile verbesserte Technik der Cryo-

Fixierung via HPF und AFS (s.o.) konnten die Dimensionen auf einen prinzipiellen Bereich von 10,6 – 25,3 nm für Gram-negative Bakterien eingegrenzt werden (Graham *et al.*, 1991). Darüber hinaus ist die Berechnung des tatsächlichen periplasmatischen Volumens an die Zellgröße gebunden, die je nach Wachstumsbedingungen (C-Quelle, Salzgehalt des Mediums, Elektronenakzeptor usw.) stark variiert.

### 5.2.2 Expressionsanalyse respiratorischer Reduktasen

Den ersten Hinweis auf den hohen zellulären Häm-Gehalt gibt die Farbe der Zellen. Diese erscheinen in einem satten Rotton, der bereits in dünn gewachsenen Kulturen zu erkennen ist und v.a. durch die Expression verschiedener Multi-Häm-Proteine verursacht wird. Genom-basierte Vorhersagen über den c-Typ Cytochrom-Gehalt von *S. oneidensis* ergaben unter Berücksichtigung verschiedener Signalsequenzen der einzelnen Proteine folgende hypothetische zelluläre Lokalisation:

Cytoplasmamembran:	9
Periplasma:	27
Äußere Membran:	5

(Meyer *et al.*, 2004; Romine *et al.*, 2008)

Ergebnissen von Expressionsanalysen der periplasmatischen Cytochrome Eisen-gewachsener Zellen zeigen die Expression von 12 verschiedenen Cytochromen unterschiedlicher Konzentration (Richter, 2014). Darüber hinaus variieren die durch die MudPIT-Analyse identifizierten Cytochrome stark bezüglich ihres Hämgehalts und stellen eine diverse Mischung aus zu einem großen Teil Multi-Häm-Cytochromen mit Häm-Gehalten von 2 bis zu 10 Häm-Gruppen je Protein dar (Richter, 2014). Analog zu den Daten von Richter *et al.* wurden weiterführende MudPIT Analysen der Membranfraktionen durchgeführt, um ein vollständigeres Bild der unter Eisen-reduzierenden Bedingungen exprimierten terminalen Reduktasen zu erhalten (4.3). Wie aus Tabelle 28 zu entnehmen ist, werden unter Eisen-reduzierenden Bedingungen auch solche Enzyme exprimiert, deren physiologische Funktion auf den ersten Blick nicht mit der Eisenreduktion in Verbindung stehen. Die Expression von FccA (Fumarat-Reduktase), NapA (Nitrat-Reduktase), NrfA (Nitrit-Reduktase) und DmsAB (DMSO-Reduktase) ist auf Grund der vielen enthaltenen Co-Faktoren (Multi-Häme, Eisen-Schwefel-Cluster, Flavine) energetisch sehr aufwendig für die Zelle. Weshalb zeigt *S. oneidensis* dieses ungewöhnliche Verhalten?

Weiterführende biochemische Untersuchungen zum *c*-Typ Cytochrom Expressionsmuster von *S. oneidensis* Zellen, die auf verschiedenen alternativen Elektronenakzeptoren gezogen wurden, erbrachten dasselbe Ergebnis einer heterogenen Mischung verschiedener Cytochrome (Abbildung 9). Einzig bei Wachstum mit Nitrat als TEA zeigte sich eine veränderte Expression eines Cytochroms auf der Höhe von 55 kDa. Spätere massenspektrometrische Analysen identifizierten dieses Cytochrom als NrfA (Abbildung 15). Die Hochregulation speziell dieser Nitrit-Reduktase ist vermutlich eine zelluläre Maßnahme zur Detoxifikation, da im Zuge der Nitrat-Reduktion durch *S. oneidensis* eine temporäre Akkumulation von Nitrit auftritt (Abbildung 20). Abgesehen von dieser Ausnahme zeigt *S. oneidensis* auf allen getesteten Elektronenakzeptoren das gleiche energetisch aufwendige Expressionsmuster von *c*-Typ Cytochromen. Sogar unter aeroben Bedingungen erhalten die Zellen dieses Expressionsmuster aufrecht. Ausgehend von diesen Beobachtungen dienten die folgenden Untersuchungen dazu, einen tieferen Einblick und darüber ein besseres Verständnis der respiratorischen Prozesse und der daran beteiligten Cytochrome im Periplasma von *S. oneidensis* zu erlangen.

### 5.2.3 Bestimmung des zellulären Häm-Gehaltes

Im Zuge dieser Arbeit sollte ein besseres Verständnis der periplasmatischen Elektronentransferprozesse in *S. oneidensis* erzielt werden. Eine Berechnung der theoretischen Elektronenaufnahme-Kapazität einer Zelle und des Periplasmas diente dabei als erster Schritt dem Verständnis dieser Prozesse. Jede Häm-Gruppe eines Proteins kann ein Elektron aufnehmen, Multi-Häm-Proteine dadurch der Anzahl ihrer Häm-Co-Faktoren entsprechend. Die Berechnungen mittels Bestimmung des Cytochromgehalts und der Zellzahl ergaben einen Wert von knapp **700 000 Häm-Gruppen** je einzelner Zelle. Diese Häm-Gruppen verteilen sich ungefähr je zur Hälfte auf die Membranen (äußere und Cytoplasmamembran) und das Periplasma (4.2.2). Aus den Werten des periplasmatischen Volumens und der Anzahl der Häm-Gruppen ergibt sich eine **Konzentration von 3,46 mM Häm** (4.2.3) im Periplasma. Wie bereits erwähnt, war es nicht möglich, periplasmatische Präparationen von *S. oneidensis* durch Konzentrationsverfahren unter Laborbedingungen auf diese Häm-Konzentration einzustellen, da Protein-Präzipitation auftrat, bevor ähnliche Konzentrationsbereiche erreicht wurden.

Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei dem im periplasmatischen Raum befindlichen Gemisch verschiedener Proteine und weiterer Faktoren eher um eine hoch-viskose, Gel-artige Matrix handelt als um eine flüssige Phase. Den Begriff des „periplasmic gel“ verwendeten erstmals Hobot und Kollegen (Hobot *et al.*, 1984). Mittlerweile hat der Begriff Einzug in die Fachliteratur gehalten (Brass *et al.*, 1986; Graham *et al.*, 1991; Joly & Laird, 2007). Für die periplasmatischen Elektronentransferreaktionen in *S. oneidensis* bedeutet eine kompakte Anordnung der Proteine, im Speziellen der Cytochrome, einen häufigen Kontakt der unterschiedlichen Elektronen-tragenden Proteine. Auf Grund der überlappenden elektrochemischen Potentiale der verschiedenen Cytochrome ist prinzipiell ein ungerichteter Elektronentransfer zwischen den einzelnen Häm-Gruppen möglich. Viele der an der DIR beteiligten Cytochrome sind Multi-Häm-Proteine (CymA, MtrA, MtrC). Die jeweiligen Häm-Gruppen besitzen je nach Molekül und je nach der Art ihrer sterischen Anordnung innerhalb des jeweiligen Moleküls unterschiedliche Redox-Potentiale, aus denen sich ein sog. „mid-point“ Potential für das jeweilige Cytochrom errechnen lässt, quasi ein „Durchschnittspotential“ (Firer-Sherwood *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist es allerdings möglich, einem (Multihäm-)Cytochrom ein Potential-Fenster zuzuweisen, innerhalb dessen Elektronentransfer erfolgen kann und dessen Grenzen aus dem jeweils höchsten und niedrigsten Potential einzelner Häm-Gruppen des Cytochroms determiniert sind. Die einzelnen Potential-Fenster wichtiger an der DIR beteiligter Proteine wurden in Arbeiten von Firer-Sherwood *et al.* bestimmt und zeigen, dass sich diese zwischen CymA als integralem Membranprotein und Quelle Menaquinon-basierter Elektronen, MtrA als periplasmatischem Shuttle und MtrC als terminaler Reduktase in allen physiologischen pH-Bereichen überlappen und somit ein – in Bezug auf die Cytochrome – Barriere-freier Elektronentransfer möglich ist (Firer-Sherwood *et al.*, 2008).

### **5.3 Elektronentransfer-Netzwerk und Elektronen-Speicher im Periplasma**

Es ist also plausibel, sich das Periplasma von *S. oneidensis* als ein mit *c*-Typ Cytochromen durchsetztes und dadurch leitendes Gel vorzustellen, in dem eine Vielzahl an respiratorischen Wegen parallel existieren. Die nahezu identischen Expressionsmuster aus den Analysen zur *c*-Typ Cytochrom Expression (Abbildung 9) legen den Verdacht nahe, dass diese einzelnen Wege miteinander in Verbindung stehen könnten und eine Art Elektronentransfer-Netzwerk bilden. Aus diesem Grunde wurden „Netzwerkassays“ mit

Zellsuspensionen von *S. oneidensis* durchgeführt, die diese Hypothese stützen sollten. Aus den Ergebnissen dieser Versuche (4.4) ist zu erkennen, dass im Falle von Eisen-Citrat als initialem Elektronenakzeptor die Zellen in der Lage sind, ihre Elektronen auf alle angebotenen Elektronenakzeptoren (Eisen-Citrat, Fumarat, Nitrat, DMSO, TMAO) mit der Ausnahme von Thiosulfat zu übertragen. Thiosulfat diente in diesen Experimenten als Negativ-Kontrolle, da es sich dabei um eine Cytochrom-unabhängige Reduktion durch PsrA (ein Molybdoprotein) und PsrB (Eisen-Schwefel-Protein) handelt (Burns & DiChristina, 2009). Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen die bereits beschriebene simultane Expression unterschiedlicher funktioneller respiratorischer Ketten. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis eine Verbindung dieser unterschiedlichen Ketten. Mit anderen Worten ist es der Zelle möglich, die Elektronen aus ihrem Cytochrompool ohne weitere Konditionierung auf alternative Elektronenakzeptoren zu übertragen, also spontan und ohne Zeitverlust auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren. *S. oneidensis* wurde häufig an Standorten isoliert, die einer kontinuierlichen Fluktuation von Elektronenakzeptoren unterliegen bzw. an denen eine Mischung verschiedener Akzeptoren die Regel ist. Ebenso scheint ein relativ häufiger Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen wahrscheinlich (Fredrickson *et al.*, 2008). Um diese Bedingungen zu simulieren, wurden aerob gewachsene Zellen demselben Zellsuspensionsassay unterzogen. Dafür wurden die Zellen drei Stunden in einer anoxischen Atmosphäre inkubiert, durch Lactat-Gabe reduziert und ebenfalls mit verschiedenen Elektronenakzeptoren behandelt. Diese Zellen zeigen das gleiche Verhalten wie Zellen, die anaerob mit Eisen als TEA gewachsen sind. Eine simultane Expression verschiedener funktioneller anaerober respiratorischer Ketten ist also auch unter aeroben Wachstumsbedingungen der Fall. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung aus Abbildung 9, in dem die periplasmatische Fraktion aerober Zellen dasselbe c-Typ Cytochrom-Expressionmuster zeigt, wie anaerob gewachsenen Zellen.

Zellen, die initial mit Nitrat als Elektronenakzeptor gewachsen sind, zeigen eine Elektronenübertragung auf Eisen-Citrat, Fumarat und Nitrat, allerdings keine oder nur geringe Übertragung auf DMSO und TMAO. Weshalb genau in diesem Fall eine Diskriminierung zwischen den einzelnen Ketten innerhalb dieses Netzwerkes auftritt, ist eine spannende Frage, deren Beantwortung Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein wird.

Die funktionelle Verbindung der verschiedenen respiratorischen Ketten erlaubt also im Falle von Eisen und Sauerstoff als initialen TEAs die unmittelbare Nutzung verschiedener



alternativer Elektronenakzeptoren. Darüber hinaus ist aus diesen Experimenten noch eine weitere Schlussfolgerung abzuleiten. Die Zellen wurden durch Lactat-Gabe reduziert, d.h. in dem Moment der Inkubation lagen keine Elektronenakzeptoren vor. Trotzdem war es den Zellen möglich, das Lactat zu verstoffwechseln und die anfallenden Elektronen in den periplasmatischen Cytochrompool zu übertragen. Das bedeutet, dass den Zellen eine Elektronenakzeptor-unabhängige Oxidation von vorhandenen Kohlenstoffquellen möglich ist. In Konkurrenz mit anderen Organismen ist es denkbar, dass sich *S. oneidensis* durch diese Fähigkeit einen Vorteil im Kampf um Ressourcen verschafft. In diesem Zuge kann man sich das c-Typ Cytochrom durchsetzte Periplasma als eine Art Kondensator vorstellen, der den Zellen eine Speicherung der Ladungen ermöglicht. Die Idee eines Kondensators (engl.: capacitor) wurde für den Organismus *Geobacter sulfurreducens*, ebenfalls ein Modellorganismus für die Erforschung der DIR, bereits formuliert (Esteve-Nunez *et al.*, 2008). Im Unterschied zu *G. sulfurreducens* ist es *S. oneidensis* allerdings möglich, die in diesem „Kondensator“ gespeicherten Elektronen auf verschiedenen Wegen und auf unterschiedliche Akzeptoren zu übertragen, eine Eigenschaft, über die *G. sulfurreducens* nicht verfügt. Eisen gewachsene Zellen von *G. sulfurreducens* waren in Experimenten von Esteve-Nunez *et al.* nicht in der Lage, die Elektronen aus ihrem Cytochrompool auf Fumarat zu übertragen, was im Falle von *S. oneidensis* bei allen getesteten initialen Wachstumsbedingungen möglich war. Fumarat als Membran-permeabler Elektronenakzeptor erscheint als ein sinnvoller Indikator für die Vernetzung der Ketten, da die Reduktion periplasmatisch verläuft und nicht durch weitere Faktoren wie z.B. den Transport über die äußere Membran beeinflusst wird.

Im Zuge dieser Ergebnisse scheint es wahrscheinlich, dass *S. oneidensis* die Strategie eines Generalisten verfolgt. Der Vorteil dieser Art Strategie besteht darin, praktisch ohne Verzögerung auf Veränderungen in der Umwelt reagieren zu können und somit in Konkurrenz um Ressourcen schon fortzuschreiten, während Spezialisten erst die entsprechenden Systeme für die jeweiligen Faktoren exprimieren müssen.

#### **5.4 Funktionelle Redundanz der periplasmatischen Cytochrome**

Nach den bisherigen Erkenntnissen besteht das *c*-Typ Cytochrom-basierte Elektronentransfernetzwerk im Periplasma aus 12 unterschiedlichen Cytochromen (Richter, 2014). Gibt es innerhalb dieses Netzwerkes irgendwelche Hierarchien? Gibt es also für die Funktionalität des Netzwerkes elementare Proteine, deren Verlust sich nicht ohne weiteres kompensieren lässt? Um diese Fragen zu klären, wurden Marker-lose Einzeldelensionsmutanten von *S. oneidensis* hergestellt. Diesen Mutanten fehlte jeweils eines der durch die MudPIT-Analysen identifizierten 12 periplasmatischen *c*-Typ Cytochrome (Richter, 2014). In einer Endpunkt-Bestimmung wurde die Fähigkeit dieser Zellen zur Eisenreduktion überprüft. Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen ist, zeigt nur der Verlust von MtrA einen Phänotyp in Bezug zur Eisenreduktion. Dies wurde bereits in vorangegangenen Studien gezeigt und basiert auf der vielschichtigen und essentiellen Rolle dieses Proteins in der Eisenreduktion. MtrA ist zum einen Teil des äußeren Membran-Komplexes aus MtrCBA und bildet hier die periplasmatische, Elektronen-liefernde Komponente (Abbildung 3). Darüber hinaus wurde eine bidirektionale Elektronenübertragung zwischen MtrA und FccA nachgewiesen (Schuetz *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2013). Eine weitere Funktion dieses Proteins wurde durch Schicklberger *et al.* aufgeklärt. Die Autoren konnten zeigen, dass MtrA eine elementare Rolle bei der Etablierung des MtrCAB-Komplexes einnimmt, wobei MtrA das  $\beta$ -barrel Protein MtrB vor proteolytischen Abbau durch die Protease DegP auf einem bisher ungeklärten Weg zu schützen scheint (Schicklberger *et al.*, 2011). Da durch den Verlust von MtrA eine korrekte Etablierung des für die Eisen-Reduktion notwendigen äußeren Membrankomplexes nicht mehr möglich ist, ist es schwierig, darüber die Funktion von MtrA in Bezug auf das periplasmatische *c*-Typ Cytochrom Netzwerk zu beurteilen.

Alle anderen Deletionsmutanten zeigen in dieser Analyse keinen Phänotyp, was eine hohe funktionelle Redundanz der einzelnen Cytochrome in Bezug auf die Funktionalität des gesamten Netzwerkes nahelegt. Die überlappenden Potentialfenster und der insgesamt sehr hohe Cytochromgehalt könnten einen eventuellen Phänotyp kompensieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen erzielt und bestätigen die funktionelle Redundanz (fast) aller periplasmatischen Cytochrome in *S. oneidensis* (Bretschger *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010).

### **5.5 Die zentrale Rolle von STC und FccA**

Aus Abbildung 9 ist zu erkennen, dass FccA und STC die am stärksten exprimierten Cytochrome im Periplasma von *S. oneidensis* darstellen. Da der Nachweis in diesen Fällen (Häm-Färbung) allerdings auf der enzymatischen Peroxidase-Aktivität der Cytochrome beruht, wäre eine höhere spezifische Aktivität der beiden Proteine in Bezug auf die Nachweisttechnik eine denkbare Möglichkeit und würde in diesem Fall zu einer falschen Schlussfolgerung über die tatsächlich gebildete Menge der Proteine verleiten. Um diesen Effekt auszuschließen wurden Häm-Quantifizierungen von periplasmatischen Fraktionen Eisen-gewachsener Zellen dieser Einzelmutanten durchgeführt (Abbildung 12). Hieraus ist deutlich zu erkennen, dass sowohl der Verlust von FccA, als auch der von STC einen um knapp 20% verminderten Gesamt-Cytochromgehalt des Periplasmas zur Folge hat (82,2%  $\Delta stc$ , 81,5%  $\Delta fccA$ ). Aus diesen Ergebnissen ist zu schlussfolgern, dass der Verlust von sowohl FccA als auch STC zusammen einen Verlust von ca. 40% des Gesamt-periplasmatischen Häm-Gehalts bedeutet, obwohl beide Cytochrome „nur“ Tetra-Häm-Cytochrome darstellen. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Verlust einer solchen Menge für die Zellen bedeutet, wurde eine Doppeldeletionsmutante in diesen beiden Cytochromen hergestellt und charakterisiert.

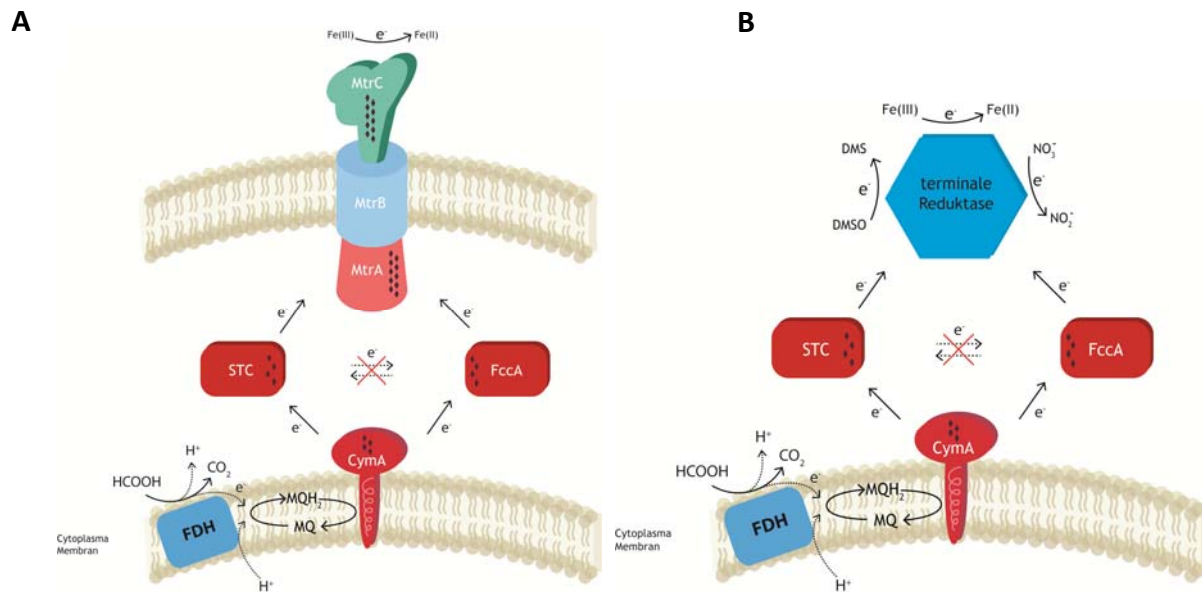
Der erste Schritt der Charakterisierung war eine Untersuchung der Fähigkeit zur Eisenreduktion. Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, führt die parallele Deletion von FccA und STC zu einem Verlust der Fähigkeit, Eisen zu reduzieren. Ebenso wie im Falle der „Rettung“ einer wachstumsdefizienten Deletionsmutante von MtrB durch Ausbildung einer „Suppressor-Mutation“ (Schicklberger *et al.*, 2013), scheint es den Zellen, welche die Doppeldeletion für FccA und STC tragen möglich, einen Suppressor-Phänotyp zu etablieren, der den initialen Verlust der Eisen-Reduktion egalisiert. Die Zellen zeigen unter Laborbedingungen eine um ca. 8 h verzögerte lag-Phase, bevor Wachstum möglich ist und die Wachstumsrate fast das Niveau des Wildtyps erreicht (Abbildung 13).

Die Untersuchungen der physiologischen Bedeutung des Verlustes dieser beiden Cytochrome in Bezug auf die respiratorische Diversität wurden durch Wachstumsexperimente mit verschiedenen Elektronenakzeptoren genauer charakterisiert. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Verlust von FccA und STC, ebenso wie bei Eisen, im Falle von DMSO und Nitrat als Elektronenakzeptoren eine Wachstumsdefizienz zur Folge hat. Im Vergleich zu den

jeweiligen Einzelmutanten ( $\Delta stc$  bzw.  $\Delta fccA$ ), zeigt die Doppelmutante ( $\Delta fccA\Delta stc$ ) auf DMSO überhaupt kein Wachstum; ebenso verliert die Doppelmutante nach einem kurzen initialen Wachstum auch auf Nitrat die Fähigkeit zu weiterem Wachstum. Die beiden Cytochrome scheinen also nicht nur unter Eisen-reduzierenden Bedingungen sondern auch mit anderen TEAs eine zentrale Rolle zu spielen. Auf mögliche Gründe hierfür wird im Verlauf der folgenden Abschnitte genauer eingegangen.

Die in trans Expression von entweder *fccA* oder *stc* von einem induzierbaren Plasmid ist bei allen untersuchten Akzeptoren ausreichend, um Wachstumsraten zu erreichen, die denen des Wildtyps entsprechen. Im Einklang mit diesem Ergebnis zeigen die jeweiligen Einzelmutanten keine oder nur eine minimale Defizienz in Bezug auf das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle von STC und FccA in Bezug auf das c-Typ Cytochrom-basierte respiratorische periplasmatische Netzwerk von *S. oneidensis*. Die beiden Proteine weisen bezüglich ihrer Elektronenübertragung eine funktionelle Homologie auf. Aus Arbeiten von Fonseca et al. ist bekannt, dass sowohl FccA, als auch STC Elektronen von CymA akzeptieren und auf MtrA abgeben können, jedoch auf Grund ihrer negativen Oberflächenladung kein direkter Austausch von Elektronen zwischen diesen beiden Proteinen möglich ist (Fonseca *et al.*, 2013). Die diesbezügliche physiologische Situation im Periplasma von *S. oneidensis* ist in Abbildung 22 gezeigt.



**Abbildung 22:** Elektronentransfer von CymA ins Periplasma. A: Elektronen werden aus dem Menaquinon-Pool über CymA ins Periplasma übertragen. Dort werden sie von STC und FccA aufgenommen bevor sie an MtrA und damit an den für die Eisenreduktion verantwortlichen Membrankomplex aus MtrCAB weiter übertragen werden. B: Die in A gezeigte Elektronentransfer-Situation erstreckt sich auch auf die Transportwege zu den terminalen Reduktasen der DMSO- und Nitrat-Reduktion, innerhalb derer STC und FccA als Vermittler agieren.

Wieso zeigt der Verlust von sowohl FccA als auch von STC dann keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen mit TMAO als Elektronenakzeptor?

Aus Abbildung 22 ist ersichtlich, dass die Elektronen, die für die Reduktion von Eisen, DMSO und Nitrat benötigt werden, alle denselben Eintrittspunkt ins Periplasma gemein haben – CymA. Das für die Reduktion von TMAO benötigte Protein-Setup besteht aus den Komponenten TorA als terminaler TMAO-Reduktase und TorC, einem periplasmatischen, in der Cytoplasmamembran verankerten Penta-Häm *c*-Typ Cytochrom (Dos Santos *et al.*, 1998). TorC ist der unmittelbare Elektronendonator für TorA und übernimmt als solcher innerhalb der TMAO-Reduktion die Funktion von CymA als Eintrittspunkt der Elektronen ins Periplasma, wodurch der Elektronenfluss der Zellen in diesem Falle unabhängig von CymA erfolgen kann. Es erscheint also möglich, dass sowohl STC als auch FccA CymA-Oxidasen darstellen, die die Elektronen zur weiteren Verteilung im periplasmatischen Netzwerk von CymA aufnehmen und an die jeweiligen respiratorischen Ketten bzw. terminalen Reduktasen verteilen. Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte ein Elektronentransfer von CymA auf FccA bzw. STC bereits gezeigt werden (Schuetz *et al.*, 2009; Richter, 2014).

## 5.6 Strategien des Suppressor-Phänotyps

Auf Grund der Tatsache, dass die Zellen der Doppelmutante nach einer gewissen Zeit doch Wachstum aufweisen, scheint es den Zellen möglich zu sein, den Verlust der Übertragung CymA-basierter Elektronen zu kompensieren. Da der Phänotyp der Wachstumsdefizienz vermutlich durch den Verlust einer großen Menge (40%) des zellulären Häm-Gehaltes hervorgerufen wurde, war eine Untersuchung des Häm-Gehaltes der Zellen des Suppressor-Phänotyps der erste Schritt. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, exprimieren die Suppressor-Zellen nach ca. 14 h ein alternatives *c*-Typ Cytochrom Setup. Dieses Setup ist offensichtlich in der Lage, den Verlust von STC und FccA auszugleichen. Die Tatsache, dass in drei unabhängigen Experimenten ein identisches Proteinmuster erkennbar ist, legt die Annahme nahe, dass es sich bei diesen Cytochromen um eine Kombination handelt, deren Expression die Kompensation des funktionellen Verlustes besonders effizient ermöglicht. Die massenspektrometrische Analyse dieser Proteine ergab eine Zusammensetzung aus den in Abbildung 15 angegebenen Proteinen. Auffällig dabei ist, dass alle identifizierten Cytochrome bereits zum grundsätzlichen Expressionsmuster Eisen-gewachsener *S. oneidensis* Zellen zählen (MtrA, MtrC, NrfA, CcpA, SO\_4048, SO\_4666 und SO\_3420) (Richter, 2014). Anhand dieser Daten erscheint es naheliegend, dass die Zellen den Verlust knapp der Hälfte der periplasmatischen Häme durch eine Hochregulation anderer Häm-tragender Proteine ausgleichen. Die in trans Expression verschiedener *c*-Typ Cytochrome sollte Aufschluss darüber geben, ob die Überexpression eines Cytochroms tatsächlich den Wachstumsdefekt durch einfachen Ausgleich der fehlenden Hämgruppen ermöglichen kann (4.6.2). Für diese Experimente wurden verschiedene Cytochrome zur Expression ausgewählt: **NrfA** und **MtrA** als Multi-Häm-Cytochrome, die in den Suppressor-Zellen identifiziert wurden,

**CymA** als Elektronen-liefernde Komponente des Netzwerks,

**ScyA** als Negativ-Kontrolle, da von ScyA nur eine Elektronen-Übertragung auf BccP möglich ist (Schutz *et al.*, 2011) und

**STC** und **FccA** als Positiv-Kontrolle der Expressionsbedingungen.

Außer FccA und STC ist keines der getesteten, überexprimierten Cytochrome in der Lage, den Effekt der Wachstumsdefizienz zu kompensieren. Die Zellen verhalten sich in Wachstumsexperimenten nahezu identisch zur Doppelmutante und zeigen ebenfalls zum

selben Zeitpunkt einen Suppressor-Phänotyp. Eine einfache Steigerung des periplasmatischen Cytochrom- bzw. Häm-Gehaltes scheint also nicht die ultimative Strategie der Suppression zu sein.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Komposition der hochregulierten Cytochrome in den Zellen die Suppression ermöglicht, wofür die identische Expression eines definierten Cytochrom-Satzes in drei unabhängigen Experimenten spricht. Dieses Expressionsmuster könnte das Ergebnis einer Regulation sein, die sich durchaus auch auf genetischer Ebene im Organismus manifestieren könnte. In diesem Falle sollten Zellen, die einmal einen Suppressor-Phänotyp ausgebildet haben, in der Lage sein, diesen erneut aufzuzeigen. Diese Zellen sollten sich in ihrem Wachstum signifikant von solchen unterscheiden, die das erste Mal unter Eisen-reduzierenden Bedingungen wachsen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Zellen, die einen Suppressor-Phänotyp in Bezug auf Eisen-Reduktion ausgebildet hatten, für eine Nacht aerob auf LB-Agar Platten inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen abermals unter Eisen-reduzierenden Bedingungen gezogen und ihr Wachstum mit dem des Wildtyps und dem der Doppelmutante (ohne Suppressor-Phänotyp) verglichen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Suppressor-Zellen zeigen bezüglich des Wachstums das gleiche Verhalten wie Zellen, die zum ersten Mal unter Eisen-reduzierenden Bedingungen wachsen. Eine genetische Manifestation der alternativen Regulation zur Expression des periplasmatischen Cytochrompools scheint also ausgeschlossen.

Diese alternative Regulation der Cytochrom-Expression muss allerdings auch nicht zwangsläufig genetisch manifestiert sein. Beispiele für Transkriptionsaktivierung, die unabhängig vom genetischen Status der Zellen erfolgen finden sich häufig in Systemen, deren Transkription über Quorum sensing-abhängige Mechanismen reguliert sind. Die Untersuchungen aus 4.6.3 wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die erworbene Fähigkeit zur Eisen-Reduktion auf eben solche Quorum sensing-basierte Mechanismen zurückzuführen sind. Dafür wurden Zellen, die in einem ersten Wachstumsversuch bereits einen Suppressor-Phänotyp ausgebildet hatten am Ende ihres exponentiellen Wachstums direkt in frisches Medium überimpft und ihr Wachstum protokolliert. Aus Abbildung 18 ist deutlich zu erkennen, dass diese Zellen sofort mit exponentiellem Wachstum beginnen. Läge der Regulation ein Quorum sensing-basierter Mechanismus zu Grunde, so würde man

dieselbe Verzögerung im Wachstum erwarten, wie sie bei Zellen auftritt, die zum ersten Mal auf Eisen-Citrat wachsen.

Bei dem oder den Faktoren, die der Doppelmutante in *stc* und *fccA* nach einer verlängerten lag-Phase doch Wachstum mit Eisen als terminalem Elektronenakzeptor ermöglicht/en, handelt es sich also weder um einen durch sekundäre Botenstoffe induzierten Prozess wie beim Quorum sensing, noch um genetische Veränderungen, wie sie in anderen Mutanten von *S. oneidensis* auftreten können. Ein Beispiel für eine solche genetische Regulation ist das Auftreten einer Suppressor-Mutante von  $\Delta mtrB$ -Zellen. In diesen Zellen wurde das integrale  $\beta$ -barrel Protein MtrB deletiert, wodurch eine funktionelle Etablierung des für die Eisen-Reduktion elementaren Protein-Komplexes aus MtrA, MtrB und MtrC verhindert wird. In dem untersuchten Fall erfolgte durch mobile genetische Elemente (ISSod1) die Insertion eines Hybrid-Promotors, der die Transkription von Genen ermöglichte (SO\_4359 und SO\_4360), deren Gen-Produkte eine Eisen-Reduktion und damit Wachstum ermöglichen (Schicklberger *et al.*, 2013). Ein vergleichbarer Fall ist für das integrale Membranprotein CymA bekannt, dessen Deletion auf einem ähnlichen Wege partiell ausgeglichen werden kann (Cordova *et al.*, 2011). Darüber hinaus sind auch Mechanismen bekannt, die durch single nucleotide polymorphism (SNP), also den Austausch nur einer einzigen Base eines Gens, eine Deletion aller äußeren Membran-Cytochrome in *S. oneidensis* wieder in die Lage versetzen, Eisen zu reduzieren (Bücking *et al.*, 2012).

Diese Veränderungen sind alle auf eine genetische Basis zurückzuführen. Im Gegensatz dazu scheint die durch die Doppelmutante in *STC* und *FccA* ausgebildete Suppression keinen genetischen Hintergrund zu haben. Ebenfalls scheint ein Quorum sensing-basierter Mechanismus als Erklärung nicht in Frage zu kommen, da die Zellen die Suppression unabhängig von vorher sekretierten Faktoren auch in frischem Medium aufrechterhalten, in denen diese Faktoren noch nicht gebildet worden sind.

Die beobachtete Suppression der Wachstumsdefizienz beschränkt sich nicht ausschließlich auf Eisen als Elektronenakzeptor der anaeroben Atmung. Zellen der Doppelmutante zeigen mit Nitrat als TEA ein initiales Wachstum, verlieren diese Fähigkeit allerdings wieder. In Langzeit-Experimenten war überraschenderweise nach 25 h eine Wiederaufnahme des Wachstums dieser Zellen zu beobachten. Wie im Falle von Eisen gelingt es den Zellen, zwar mit einer etwas geringeren Wachstumsrate, aber bis zu optischen Dichten zu wachsen, die

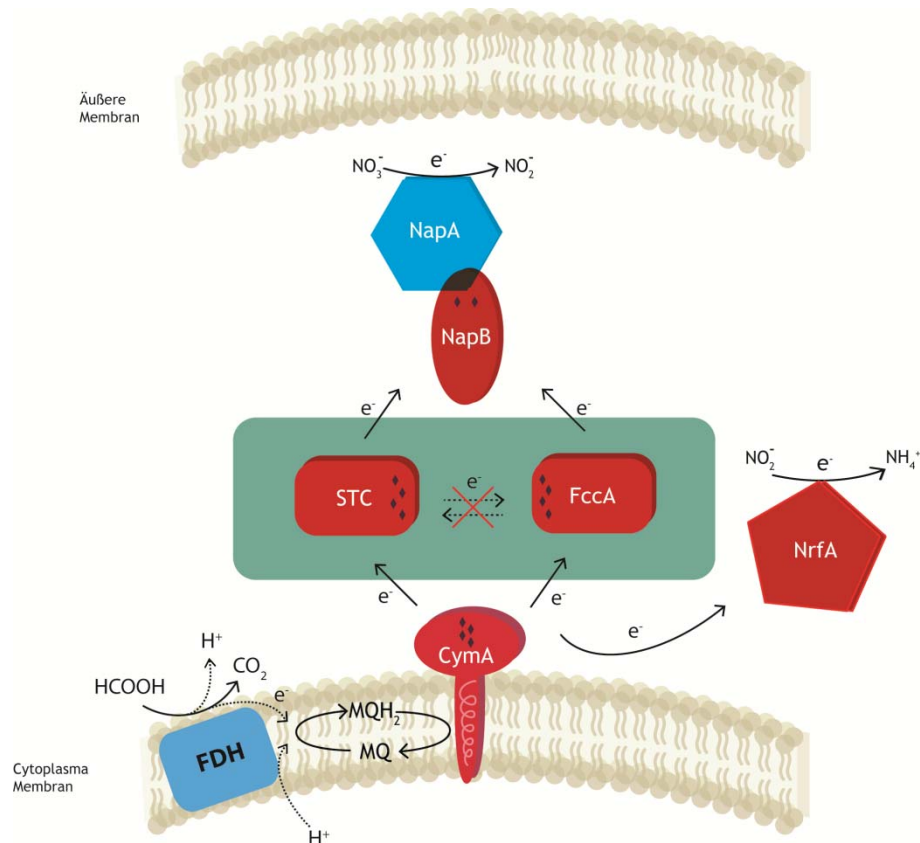


denen des Wildtyps entsprechen (Abbildung 19). Um das Wachstum des Suppressors genauer zu charakterisieren, wurden die Konzentrationen von Nitrat und Nitrit im Verlauf des Wachstums analysiert. Wie aus Abbildung 26 zu entnehmen ist, gibt es in dieser Hinsicht deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Suppressor. Der Wildtyp zeigt initial eine rapide Reduktion des Nitrats. Im Zuge dieser Reduktion erfolgt eine temporäre Akkumulation von Nitrit, die nach 3,5 h ihren Höhepunkt erreicht, bevor die darauffolgende Nitrit-Reduktion zur kompletten Reduktion des Nitrats zu Ammonium führt. Diese Akkumulation von Nitrit während der Nitrat-Reduktion ist typisch für *S. oneidensis* (Gao *et al.*, 2009). Abgesehen von der wesentlich geringeren Geschwindigkeit der Nitrat-Reduktion im Suppressor fällt auf, dass diese typische Akkumulation von Nitrit nicht auftritt. Es ist zwar zu Beginn des Experimentes eine geringe Menge Nitrit nachweisbar, diese ist jedoch nicht mit dem Wildtyp zu vergleichen, bei dem für einen kurzen Zeitraum praktisch die gesamte zu Beginn vorhandene Menge an Nitrat zu Nitrit reduziert wird und erst in einem darauffolgenden Schritt das Nitrit reduziert wird. Im Gegensatz dazu scheint im Suppressor eine konzertierte Reduktion abzulaufen, so dass das durch die Nitrat-Reduktion gebildete Nitrit direkt in einer Folgereaktion zu Ammonium umgesetzt wird. Dieses Verhalten der Suppressor-Zellen spricht für eine Veränderung der Elektronentransfer-Situation im Vergleich zum Wildtyp.

Experimente von Gao *et al.* führten zu der Hypothese, dass die Übertragung von Elektronen von CymA auf die terminale Nitrit-Reduktase NrfA direkt geschieht, wohingegen die Nitrat-Reduktase NapA die für die Reduktion benötigten Elektronen bevorzugt über NapB bezieht (Gao *et al.*, 2009). In ihrer Studie stellen die Autoren darüber hinaus die Hypothese auf, dass die Akkumulation von Nitrit während der Nitrat-Reduktion an das Vorhandensein von NapB gekoppelt ist.

Abbildung 20 zeigt deutlich, dass bei Verlust von STC und FccA während der Nitrat-Reduktion ebenfalls keine Nitrit-Akkumulation zu beobachten ist, obwohl die Zellen über funktionelle Gene von *napA* und *napB* verfügen. Die Daten, die in den Studien von Gao *et al.* zu dieser These führten, erfolgten anhand von Wachstumsversuchen mit Einzelmutanten, die jeweils in einem der Gene für *napA* oder *napB* eine Deletion trugen, aber über funktionelle Gene von *stc* und *fccA* verfügen. Die Deletion von *napB* zeigt also genauso wie die Doppeldeletion von *stc* und *fccA* keine Nitrit-Akkumulation. Dieser interessante Phänotyp zweier

unterschiedlicher Deletions-Mutanten deutet darauf hin, dass die durch die deletierten Gene codierten Proteine in Verbindung stehen. Gao et al. gehen davon aus, dass NapB während der Nitrat-Reduktion für einen nahezu exklusiven Elektronentransport von CymA auf NapA verantwortlich ist. Erst ab dem Moment, indem Nitrat vollständig zu Nitrit reduziert wurde, können die Elektronen von NapA und somit auch von NapB nicht mehr in diese Richtung fließen, wodurch die NapB vermittelte Oxidation von CymA nicht weiter stattfindet. Von diesem Moment an können die Elektronen auf die Nitrit-Reduktase NrfA fließen, wodurch die Nitrit-Reduktion beginnt. Die Tatsache, dass eine *stc/fccA* Doppelmutante, die über funktionelle Gene von *napA* und *napB* verfügt, denselben Phänotyp zeigt, legt die Vermutung nahe, dass weitere Proteine (STC / FccA) an dem Elektronentransportweg von CymA zu NapA beteiligt sind. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl FccA als auch STC dem von Gao et al. beschriebenen Weg der Elektronen von CymA zu NapA vorangestellt sind. Die Elektronen fließen in diesem Fall nicht direkt, sondern vermittelt über entweder STC oder FccA auf NapB, um letztendlich der NapA vermittelten Reduktion von Nitrat zu dienen. Diese Hypothese ist in Abbildung 23 veranschaulicht.



**Abbildung 23:** Nitrat-Reduktion in *S. oneidensis*. Die schematische Darstellung zeigt den Elektronenfluss von CymA zur terminalen Nitrat-Reduktase NapA. Der NapB-vermittelte Elektronenfluss zu NapA kann nur über entweder STC oder FccA geschehen (grün hervorgehoben). Im Gegensatz dazu ist ein unvermittelter Elektronentransfer von CymA zu NrfA möglich.

### 5.7 Transkriptom-Analyse

Die Untersuchungen zur transkriptionellen Veränderung in der Doppelmutante bei Wachstum mit Eisen als TEA zeigte, dass Gene, die für Proteine der unterschiedlichen Atmungsketten codieren, in ihrer Transkription nicht negativ beeinträchtigt zu sein scheinen. So zeigen *mtrC*, *cymA* und *nrfA* keine signifikanten Veränderungen in ihrer Transkription. Darüber hinaus ist die Transkription der Gene für die terminalen Reduktasen der DMSO- und Nitrat-Reduktion signifikant erhöht (Tabelle 29).

Wie aus Tabelle 29 zu entnehmen ist, zeigt die Doppelmutante jedoch die verminderte Transkription zentraler Proteine des anaeroben Stoffwechsels, darunter die Pyruvat-Formiat-Lyase Pfl, die Acetat-Kinase AckA und die Phosphataceytransferase Pta. Alle drei Enzyme

sind essentiell für den Lactat-Metabolismus in *S. oneidensis* MR-1 (Hunt *et al.*, 2010; Flynn *et al.*, 2012). Obwohl eine leicht erhöhte Transkription des Gens der Lactat-Dehydrogenase *ldh* festgestellt werden konnte, erscheint es möglich, dass der anaerobe Energiestoffwechsel durch das Fehlen von *AckA*, *Pfl* und *Pta* massiv beeinträchtigt ist, da Substratstufenphosphorylierung die Haupt-ATP-Quelle von *S. oneidensis* während des anaeroben Metabolismus darstellt (Hunt *et al.*, 2010; Pinchuk *et al.*, 2011). Es erscheint möglich, dass der unter anaeroben Bedingungen ausgebildete Phänotyp der Doppelmutante darin begründet liegt, dass durch unzureichende Substratoxidation nicht genügend Elektronen ins Periplasma geliefert werden, um ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum zu ermöglichen.

Die in 5.6 aufgestellte Hypothese zum Elektronenfluss während der Nitrat-Reduktion lässt sich zur Beantwortung dieser Frage heran ziehen. Sollte eine durch die Herunterregulation von *ackA*, *pfl* und *pta* hervorgerufene mangelnde Substratoxidation die Grundlage der Wachstumsdefizienz der Doppelmutante darstellen, sollten sowohl Nitrat- als auch Nitrit-Reduktion eine verminderte Aktivität aufweisen, da beide Wege gleichermaßen von CymA abhängen. Ist der Verlust von *STC* und *FccA* als periplasmatischen Elektronenträgern der Auslöser für die Wachstumsdefizienz, so sollte nur die Nitrat-Reduktion betroffen sein, während die Nitrit-Reduktion unbeeinflusst abläuft.

Die Ergebnisse aus 4.9 zeigen deutlich, dass sowohl der Wildtyp als auch die Doppelmutante Nitrit mit identischen Raten reduzieren. Im Gegensatz dazu zeigt die Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp keine Nitrat-Reduktion. Dieses Verhalten verifiziert zum einen die in Abbildung 23 aufgestellte Hypothese zum Elektronentransfer von CymA auf NapAB und zeigt darüber hinaus die zentrale Bedeutung von *STC* und *FccA* als periplasmatischen Elektronentransfer-Proteinen. Da keine Beeinflussung des zentralen Energiestoffwechsels festgestellt werden konnte, deutet vieles darauf hin, dass die Wachstumsdefizienz auch bezüglich der anderen getesteten terminalen Elektronenakzeptoren auf den Verlust der Fähigkeit zur Elektronenübertragung durch *STC* und *FccA* auf die jeweiligen terminalen Reduktasen zurückzuführen ist (Abbildung 22 B).

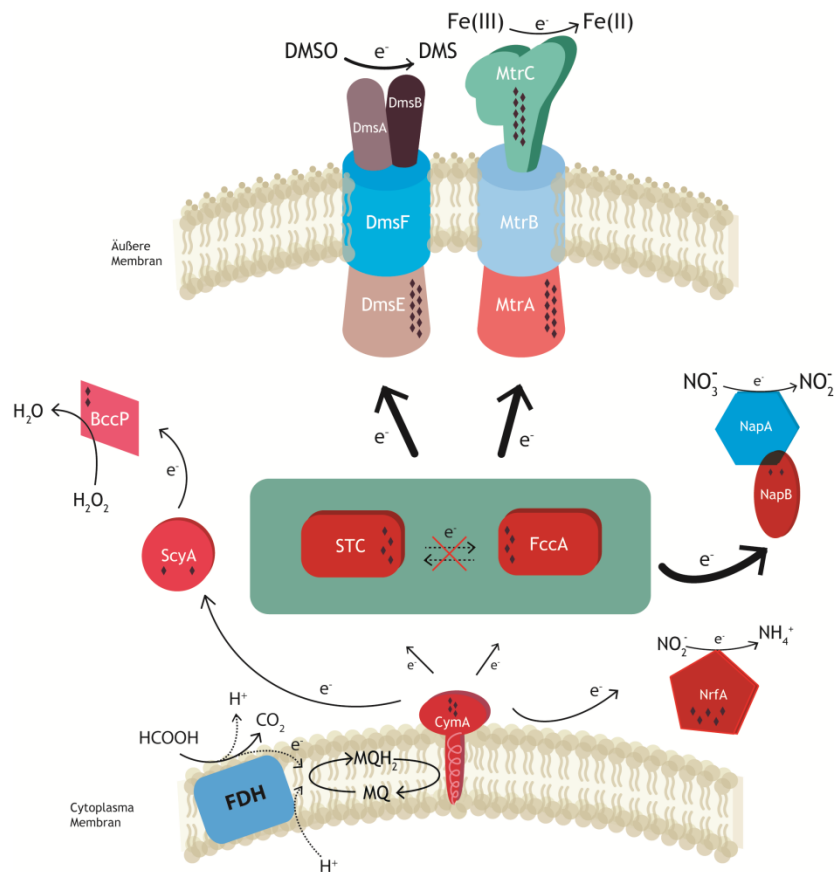
### **5.8 Fazit: STC und FccA als periplasmatische Elektronenverteiler**

Im Verlaufe dieser Arbeit konnte die elementare Funktion von STC und FccA für viele periplasmatische Elektronentransfer-Reaktionen in *S. oneidensis* aufgeklärt werden. So sind durch Verlust dieser Proteine die Elektronentransfer-Wege zu Eisen, DMSO und Nitrat unterbrochen bzw. massiv beeinträchtigt. Die Expression jeweils eines der beiden Proteine ist ausreichend, um den Zellen diese Wege wieder zu eröffnen. Hinsichtlich ihrer physiologischen Bedeutung in Bezug auf periplasmatischen Elektronentransfer sind diese beiden Proteine in ihrer Funktion redundant, was nicht heißt, dass es sich um homologe Proteine handelt – STC besitzt keinerlei Fumarat-Reduktase-Aktivität. Eine Erklärung für ihre funktionelle Redundanz bietet ihre jeweilige Struktur. STC ist ein relativ kleines Protein (12 kDa), das vier Häm-Gruppen trägt. FccA hingegen ist ein wesentlich größeres Protein (65 kDa), das ebenfalls vier Hämgruppen trägt. Darüber hinaus verfügt FccA zusätzlich noch über einen Flavin-Co-Faktor. Ein Vergleich der Kristallstrukturen dieser beiden Proteine zeigte, dass eine prinzipielle strukturelle Homologie der Häm-tragenden Domäne des FccA mit STC zu erkennen ist. Eine ideale Superposition aller Häm-Gruppen ist zwar nicht möglich, doch bei zwei von vier dieser Co-Faktoren deutlich zu erkennen. Des Weiteren ist die Ähnlichkeit der Positionen der anderen beiden Häm-Gruppen zu erkennen (Leys *et al.*, 2002). Leys *et al.* schlugen angesichts dieser Tatsache eine evolutionäre Verbindung zwischen FccA und STC vor, in dem sich ein Ur-FccA aus der Kombination eines STC als Häm-tragender Domäne und einem Protein-gebundenen Flavin zu einem Vorläufer des FccA entwickelte (Leys *et al.*, 2002). Im weiteren Verlauf der Evolution durchliefen die einzelnen Domänen, v.a. die Flavin-Domäne weitere strukturelle Veränderungen, die zur der gegenwärtigen Form des FccA führten und die Abweichungen in den Superpositionen der Häm-Gruppen von STC und FccA erklären könnten. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass die Häm-Gruppen von STC alle der äußeren Umgebung zugewandt sind und untereinander Elektronen austauschen können. Auf Grund dieser Tatsache postulierten sie eine „Elektronen-erntende“ Rolle für STC im Periplasma. Damit ist gemeint, dass ein Molekül STC Elektronen von jeder Seite aufnehmen kann und es keine definierten Eintritts- bzw. Austrittspunkte aufweist. Redox-Partner von STC (und FccA) haben so die Möglichkeit, mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit eine Kollision mit STC oder FccA einzugehen und dadurch Elektronentransfer zu etablieren. Dies spricht dafür, dass sowohl STC als auch FccA keine gerichteten Reaktionen katalysieren, sondern als unspezifische Elektronen-Verteiler im

Periplasma von *S. oneidensis* agieren. Diese Aussage scheint in Hinblick auf die in dieser Arbeit beobachteten Phänotypen der Doppelmutante in diesen Cytochromen auf mindestens drei unterschiedlichen anaeroben respiratorischen Wegen sehr plausibel.

Ein weit verbreitetes Modell zum Elektronentransfer auf extrazelluläre Eisenspezies besagt, dass Elektronen durch eine „stabile“ Verbindung zwischen CymA (als cytoplasmatischem Elektronen-Lieferanten) und dem MtrCAB-Komplex (als terminaler Reduktase) auf den terminalen Elektronenakzeptor Eisen fließen. Dabei bildet das periplasmatische Cytochrom MtrA eine Verbindung, die das gesamte Periplasma durchspannt, die Elektronen unvermittelt von CymA aufnimmt und durch MtrB auf die terminale Reduktase MtrC überträgt (Clarke *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2011; McMillan *et al.*, 2012). Auf Grund der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse bedarf dieses Modell einer Überarbeitung. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens eines der beiden periplasmatischen Cytochrome STC oder FccA für die Etablierung eines korrekten Elektronentransfers zu den äußeren Membrancytochromen notwendig ist (DMSO- und Eisen-Reduktion). Darüber hinaus wurde die Relevanz der Abundanz dieser Proteine auch für respiratorische Wege gezeigt, die vollständig im Periplasma ablaufen (Nitrat-Reduktion) und somit die zentrale Rolle der beiden Proteine auf den gesamten periplasmatischen Elektronentransfer untermauern (Abbildung 24).

Die Tatsache, dass sich im Falle der Nitrat- und Eisen-Reduktion nach einer gewissen Zeit Suppressor-Phänotypen ausbilden, zeigt, dass die Zellen eine Möglichkeit finden, die Funktion dieser Proteine durch einen bis hierher unbekanntem Mechanismus überwinden können. Im Falle der Eisen-Reduktion wurden weitere Analysen vorgenommen, die ein relativ definiertes alternatives *c*-Typ Cytochrom Expressionsmuster erkennen lassen. Die synthetisch gerichtete Expression der identifizierten Proteine konnte diesen Suppressor-Phänotyp allerdings nicht hervorrufen. Die Aufklärung dieses Mechanismus' ist eine spannende Frage, deren Aufklärung Gegenstand zukünftiger Arbeiten in der Arbeitsgruppe sein wird.



**Abbildung 24:** Zentrale Rolle von STC und FccA. Die *c*-Typ Cytochrome STC und FccA nehmen eine zentrale Rolle im periplasmatischen Elektronentransfer-Netzwerk von *S. oneidensis* ein. Der Elektronenfluss von Menaquinon-basierten Elektronen über CymA zu drei terminalen Reduktasen ist von ihnen abhängig (dicke Pfeile). Der Transfer von Elektronen auf NrfA und BccP scheint von diesen zentralen Proteinen unabhängig zu sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- Anders, S. & W. Huber, (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106.
- Beliaev, A.S., D.M. Klingeman, J.A. Klappenbach, L. Wu, M.F. Romine, J.M. Tiedje, K.H. Nealson, J.K. Fredrickson & J. Zhou, (2005) Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *J Bacteriol* 187: 7138-7145.
- Beliaev, A.S. & D.A. Saffarini, (1998) *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol* 180: 6292-6297.
- Beliaev, A.S., D.K. Thompson, T. Khare, H. Lim, C.C. Brandt, G. Li, A.E. Murray, J.F. Heidelberg, C.S. Giometti, J. Yates, 3rd, K.H. Nealson, J.M. Tiedje & J. Zhou, (2002) Gene and protein expression profiles of *Shewanella oneidensis* during anaerobic growth with different electron acceptors. *Omics : a journal of integrative biology* 6: 39-60.
- Bendtsen, J.D., H. Nielsen, G. von Heijne & S. Brunak, (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-795.
- Berry, E.A. & B.L. Trumpower, (1987) Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* 161: 1-15.
- Bouhenni, R., A. Gehrke & D. Saffarini, (2005) Identification of genes involved in cytochrome *c* biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon. *Appl Environ Microbiol* 71: 4935-4937.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brass, J.M., C.F. Higgins, M. Foley, P.A. Rugman, J. Birmingham & P.B. Garland, (1986) Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 165: 787-795.
- Bretschger, O., A. Obratzsova, C.A. Sturm, I.S. Chang, Y.A. Gorby, S.B. Reed, D.E. Culley, C.L. Reardon, S. Barua, M.F. Romine, J. Zhou, A.S. Beliaev, R. Bouhenni, D. Saffarini, F. Mansfeld, B.H. Kim, J.K. Fredrickson & K.H. Nealson, (2007) Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl Environ Microbiol* 73: 7003-7012.
- Brettar, I., R. Christen & M.G. Hofle, (2002) *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. *IJSEM* 52: 2211-2217.
- Bücking, C., A. Piepenbrock, A. Kappler & J. Gescher, (2012) Outer-membrane cytochrome-independent reduction of extracellular electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Microbiology* 158: 2144-2157.
- Bücking, C., F. Popp, S. Kerzenmacher & J. Gescher, (2010) Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS microbiology letters* 306: 144-151.
- Bücking, C., M. Schicklberger & J. Gescher, (2013) The biochemistry of dissimilatory ferric iron and manganese reduction in *Shewanella oneidensis*. In: Microbial Metal respiration. J. Gescher & A. Kappler (eds). New York: Springer, pp. 49-82.
- Burns, J.L. & T.J. DiChristina, (2009) Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *phsA* gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Appl Environ Microbiol* 75: 5209-5217.



- Cerny, G. & M. Teuber, (1971) Differential release of periplasmic versus cytoplasmic enzymes from *Escherichia coli* B by Polymyxin-B. *Arch Mikrobiol* 78: 166-&.
- Chaudhuri, S.K. & D.R. Lovley, (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* 21: 1229-1232.
- Clarke, T.A., M.J. Edwards, A.J. Gates, A. Hall, G.F. White, J. Bradley, C.L. Reardon, L. Shi, A.S. Beliaev, M.J. Marshall, Z. Wang, N.J. Watmough, J.K. Fredrickson, J.M. Zachara, J.N. Butt & D.J. Richardson, (2011) Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9384-9389.
- Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield, (1995) Current Protocols in Protein Science. John Wiley and Sons, New York.
- Cordova, C.D., M.F. Schicklberger, Y. Yu & A.M. Spormann, (2011) Partial functional replacement of CymA by SirCD in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* 193: 2312-2321.
- Coursolle, D., D.B. Baron, D.R. Bond & J.A. Gralnick, (2010) The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* 192: 467-474.
- Coursolle, D. & J.A. Gralnick, (2012) Reconstruction of extracellular respiratory pathways for Iron(III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Frontiers in microbiology* 3: 56.
- Dale, J.R., R. Wade & T.J. DiChristina, (2007) A conserved histidine in cytochrome c maturation permease CcmB of *Shewanella putrefaciens* is required for anaerobic growth below a threshold standard redox potential. *J Bacteriol* 189: 1036-1043.
- Dobbin, P.S., L.H. Warren, N.J. Cook, A.G. McEwan, A.K. Powell & D.J. Richardson, (1996) Dissimilatory iron(III) reduction by *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiol-UK* 142: 765-774.
- Dohnalkova, A.C., M.J. Marshall, B.W. Arey, K.H. Williams, E.C. Buck & J.K. Fredrickson, (2011) Imaging hydrated microbial extracellular polymers: comparative analysis by electron microscopy. *Appl Environ Microbiol* 77: 1254-1262.
- Dos Santos, J.P., C. Iobbi-Nivol, C. Couillault, G. Giordano & V. Mejean, (1998) Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *J Mol Biol* 284: 421-433.
- Dotsch, A., D. Eckweiler, M. Schniederjans, A. Zimmermann, V. Jensen, M. Scharfe, R. Geffers & S. Haussler, (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *Plos One* 7: e31092.
- Esteve-Nunez, A., J. Sosnik, P. Visconti & D.R. Lovley, (2008) Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Microbiol* 10: 497-505.
- Firer-Sherwood, M., G.S. Pulcu & S.J. Elliott, (2008) Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window. *JBIC* 13: 849-854.
- Flynn, C.M., K.A. Hunt, J.A. Gralnick & F. Sreenc, (2012) Construction and elementary mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bio Systems* 107: 120-128.
- Fonseca, B.M., C.M. Paquete, S.E. Neto, I. Pacheco, C.M. Soares & R.O. Louro, (2013) Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem J* 449: 101-108.
- Fredrickson, J.K., M.F. Romine, A.S. Beliaev, J.M. Auchtung, M.E. Driscoll, T.S. Gardner, K.H. Nealson, A.L. Osterman, G. Pinchuk, J.L. Reed, D.A. Rodionov, J.L.M. Rodrigues, D.A.

- Saffarini, M.H. Serres, A.M. Spormann, I.B. Zhulin & J.M. Tiedje, (2008) Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Microbiol* 6: 592-603.
- Fuchs, G., T. Eitinger, J. Heider, B. Kemper, E. Kothe, B. Schink, E. Schneider & G. Unden, (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Gao, H., S. Barua, Y. Liang, L. Wu, Y. Dong, S. Reed, J. Chen, D. Culley, D. Kennedy, Y. Yang, Z. He, K.H. Nealson, J.K. Fredrickson, J.M. Tiedje, M. Romine & J. Zhou, (2010) Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microb Biotechnol* 3: 455-466.
- Gao, H.C., Z.K. Yang, S. Barua, S.B. Reed, M.F. Romine, K.H. Nealson, J.K. Fredrickson, J.M. Tiedje & J.Z. Zhou, (2009) Reduction of nitrate in *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron transport protein from CymA to NapA. *J ISME* 3: 966-976.
- Gibson, D.G., L. Young, R.-Y. Chuang, J.C. Venter, C.A. Hutchison & H.O. Smith, (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Meth* 6: 343-345.
- Gordon, E.H.J., A.D. Pike, A.E. Hill, P.M. Cuthbertson, S.K. Chapman & G.A. Reid, (2000) Identification and characterization of a novel cytochrome c(3) from *Shewanella frigidimarina* that is involved in Fe(III) respiration. *Biochem J* 349: 153-158.
- Graham, L.L., T.J. Beveridge & N. Nanninga, (1991) Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends Biochem Sci* 16: 328-329.
- Gralnick, J.A., H. Vali, D.P. Lies & D.K. Newman, (2006) Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4669-4674.
- Hartshorne, R.S., C.L. Reardon, D. Ross, J. Nuester, T.A. Clarke, A.J. Gates, P.C. Mills, J.K. Fredrickson, J.M. Zachara, L. Shi, A.S. Beliaev, M.J. Marshall, M. Tien, S. Brantley, J.N. Butt & D.J. Richardson, (2009) Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22169-22174.
- Hobot, J.A., E. Carlemalm, W. Villiger & E. Kellenberger, (1984) Periplasmic gel - new concept resulting from the reinvestigation of bacterial-cell envelope ultrastructure by new methods. *J Bacteriol* 160: 143-152.
- Hunt, K.A., J.M. Flynn, B. Naranjo, I.D. Shikhare & J.A. Gralnick, (2010) Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *shewanella oneidensis* strain MR-1. *J Bacteriol* 192: 3345-3351.
- Joly, J.C. & M.W. Laird, (2007) Practical applications for periplasmic protein accumulation. In: *The Periplasm*. M. Ehrmann (ed). Washington: ASM Press, pp. 345-360.
- Langmead, B. & S.L. Salzberg, (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Met* 9: 357-359.
- Leys, D., T.E. Meyer, A.S. Tsapin, K.H. Nealson, M.A. Cusanovich & J.J. Van Beeumen, (2002) Crystal structures at atomic resolution reveal the novel concept of "electron-harvesting" as a role for the small tetraheme cytochrome c. *J Biol Chem* 277: 35703-35711.
- Lovley, D.R., (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev* 55: 259-287.
- Lovley, D.R., E.J. Phillips, D.J. Lonergan & P.K. Widman, (1995) Fe(III) and S<sup>0</sup> reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl Environ Microbiol* 61: 2132-2138.
- Lutz, R. & H. Bujard, (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucl Aci Res* 25: 1203-1210.

- Majzlan, J., (2013) Minerals and aqueous species of iron and manganese as reactants and products of microbial metal respiration. In: Microbial Metal Respiration. J. Gescher & A. Kappler (eds). Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1 - 28.
- Marmur, J., (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-221.
- Matias, V.R., A. Al-Amoudi, J. Dubochet & T.J. Beveridge, (2003) Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185: 6112-6118.
- McMillan, D.G.G., S.J. Marritt, J.N. Butt & L.J.C. Jeuken, (2012) Menaquinone-7 Is Specific Cofactor in Tetraheme Quinol Dehydrogenase CymA. *J Biol Chem* 287: 14215-14225.
- Meyer, T.E., A.I. Tsapin, I. Vandenberghe, L. de Smet, D. Frishman, K.H. Nealson, M.A. Cusanovich & J.J. van Beeumen, (2004) Identification of 42 possible cytochrome C genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *Omic* 8: 57-77.
- Murphy, J.N. & C.W. Saltikov, (2007) The *cymA* gene, encoding a tetraheme c-type cytochrome, is required for arsenate respiration in *Shewanella* species. *J Bacteriol* 189: 2283-2290.
- Myers, C.R. & J.M. Myers, (1997) Cloning and sequence of *cymA* a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* 179: 1143-1152.
- Myers, C.R. & K.H. Nealson, (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron-acceptor. *Science* 240: 1319-1321.
- Myers, C.R. & K.H. Nealson, (1990) Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* 172: 6232-6238.
- Myers, J.M. & C.R. Myers, (2000) Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J Bacteriol* 182: 67-75.
- Myers, J.M. & C.R. Myers, (2002) Genetic complementation of an outer membrane cytochrome *omcB* mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 requires *omcB* plus downstream DNA. *Appl Environ Microbiol* 68: 2781-2793.
- Nealson, K.H. & D. Saffarini, (1994) Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Ann Rev Microbiol* 48: 311-343.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak & G. von Heijne, (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot Eng* 10: 1-6.
- Nolan, M., J. Sikorski, K. Davenport, S. Lucas, T.G. Del Rio, H. Tice, J.F. Cheng, L. Goodwin, S. Pitluck, K. Liolios, N. Ivanova, K. Mavromatis, G. Ovchinnikova, A. Pati, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y.J. Chang, C.D. Jeffries, R. Tapia, T. Brettin, J.C. Detter, C. Han, M. Yasawong, M. Rohde, B.J. Tindall, M. Goker, T. Woyke, J. Bristow, J.A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N.C. Kyrpides, H.P. Klenk & A. Lapidus, (2010) Complete genome sequence of *Ferrimonas balearica* type strain (PAT). *Stand Genom Sci* 3: 174-182.
- Odom, J.M. & H.D. Peck, Jr., (1984) Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Ann Rev Microbiol* 38: 551-592.

- Parkhomchuk, D., T. Borodina, V. Amstislavskiy, M. Banaru, L. Hallen, S. Krobitsch, H. Lehrach & A. Soldatov, (2009) Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucl Aci Res* 37: e123.
- Pinchuk, G.E., O.V. Geydebekht, E.A. Hill, J.L. Reed, A.E. Konopka, A.S. Beliaev & J.K. Fredrickson, (2011) Pyruvate and lactate metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions. *Appl Environ Microbiol* 77: 8234-8240.
- Pitts, K.E., P.S. Dobbin, F. Reyes-Ramirez, A.J. Thomson, D.J. Richardson & H.E. Seward, (2003) Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *J Biol Chem* 278: 27758-27765.
- Potter, L.C. & J.A. Cole, (1999) Essential roles for the products of the *napABCD* genes, but not *napFGH*, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal* 344: 69-76.
- Pronk, J.T., J.C. de Bruyn, P. Bos & J.G. Kuenen, (1992) Anaerobic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 58: 2227-2230.
- Richter, K., (2014) Etablierung und Intensivierung von Mikroben-Anoden-Interaktionen in synthetischen und natürlichen exoelektrogenen Stämmen. PhD-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Richter, K., M. Schicklberger & J. Gescher, (2012) Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* 78: 913-921.
- Ringel, M., R. Gross, T. Krafft, A. Kroger & R. Schauder, (1996) Growth of *Wolinella succinogenes* with elemental sulfur in the absence of polysulfide. *Arch Microbiol* 165: 62-64.
- Romine, M.F., T.S. Carlson, A.D. Norbeck, L.A. McCue & M.S. Lipton, (2008) Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome. *Appl Environ Microbiol* 74: 3257-3265.
- Ross, D.E., J.M. Flynn, D.B. Baron, J.A. Gralnick & D.R. Bond, (2011) Towards electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism. *Plos One* 6: e16649.
- Ross, D.E., S.S. Ruebush, S.L. Brantley, R.S. Hartshorne, T.A. Clarke, D.J. Richardson & M. Tien, (2007) Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* 73: 5797-5808.
- Saffarini, D.A., R. Schultz & A. Beliaev, (2003) Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* 185: 3668-3671.
- Schicklberger, M., C. Bücking, B. Schuetz, H. Heide & J. Gescher, (2011) Involvement of the *Shewanella oneidensis* Decaheme Cytochrome MtrA in the Periplasmic Stability of the beta-Barrel Protein MtrB. *Appl Environ Microbiol* 77: 1520-1523.
- Schicklberger, M., G. Sturm & J. Gescher, (2013) Genomic plasticity enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol* 79: 1150-1159.
- Schreiber, K., R. Krieger, B. Benkert, M. Eschbach, H. Arai, M. Schobert & D. Jahn, (2007) The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol* 189: 4310-4314.
- Schuetz, B., M. Schicklberger, J. Kuermann, A.M. Spormann & J. Gescher, (2009) Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* 75: 7789-7796.

- Schütz, B., J. Seidel, G. Sturm, O. Einsle & J. Gescher, (2011) Investigation of the electron transport chain to and the catalytic activity of the diheme cytochrome *c* peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol* 77: 6172-6180.
- Schwalb, C., S.K. Chapman & G.A. Reid, (2002) The membrane-bound tetrahaem *c*-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*. *Biochem Soc Trans* 30: 658-662.
- Schwalb, C., S.K. Chapman & G.A. Reid, (2003) The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry-Us* 42: 9491-9497.
- Shanks, R.M., N.C. Caiazza, S.M. Hinsa, C.M. Toutain & G.A. O'Toole, (2006) *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72: 5027-5036.
- Simon, R., U. Priefer & A. Puhler, (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Biotech* 1: 784-791.
- Sturm, G., K. Richter, A. Doetsch, H. Heide, R.O. Louro & J. Gescher, (2014) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. Submitted to *J ISME*
- Sturm, G., K. Dolch, K. Richter, M. Rautenberg & J. Gescher, (2013) Metal reducers and reduction targets. A short survey about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of terminal electron acceptors. In: Microbial metal respiration. J. Gescher & A. Kappler (eds). New York: Springer, pp. 129-161.
- Tanaka, R., K. Kobayashi & T. Masuda, (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book* 9: e0145.
- Thauer, R.K., K. Jungermann & K. Decker, (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41: 100-180.
- Thomas, P.E., D. Ryan & W. Levin, (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 75: 168-176.
- Thomas, S.H., R.D. Wagner, A.K. Arakaki, J. Skolnick, J.R. Kirby, L.J. Shimkets, R.A. Sanford & F.E. Löffler, (2008) The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. *Plos One* 3: e2103.
- Tsapin, A.I., I. Vandenberghe, K.H. Nealson, J.H. Scott, T.E. Meyer, M.A. Cusanovich, E. Harada, T. Kaizu, H. Akutsu, D. Leys & J.J. Van Beeumen, (2001) Identification of a small tetraheme cytochrome *c* and a flavocytochrome *c* as two of the principal soluble cytochromes *c* in *Shewanella oneidensis* strain MR1. *Appl Environ Microbiol* 67: 3236-3244.
- Washburn, M. P., et al., 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 19, 242-7.
- Wolters, D. A., et al., 2001. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem.* 73, 5683-90.
- Zehr, B.D., T.J. Savin & R.E. Hall, (1989) A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 182: 157-159.

## 7 Anhang

### Lebenslauf

#### **Persönliche Daten**

Name: Gunnar Sturm  
 Geburtsdatum: 21.09.1982  
 Geburtsort: Kiel  
 Familienstand: verheiratet  
 Adresse: Reinhold-Frank-Straße 57  
 76133 Karlsruhe

#### **Schulbildung**

1989 – 1993 Theodor-Storm Schule, Hohn  
 1993 – 2002 Gymnasium Kronwerk, Rendsburg  
 2002 Abschluss: **Abitur**

#### **Hochschulbildung**

2003 – 2009 Studium Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität  
 Freiburg  
 Diplomarbeit: „Strategien mikrobieller Chromresistenz“  
 Abschluss: Diplom

#### **Beruflicher Werdegang**

12/2009 – 06/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Freiburg  
 Seit 07/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des KIT

**Manuskripte**

1 **Title: A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility**  
2 **beyond a thermodynamic regulatory regime**

3

4 **Short Title: The respiratory networks in *Shewanella oneidensis***

5

6 Gunnar Sturm<sup>a</sup>, Katrin Richter<sup>a</sup>, Andreas Doetsch<sup>b</sup>, Heinrich Heide<sup>c\*</sup>, Ricardo O. Louro<sup>d</sup> and  
7 Johannes Gescher<sup>a1</sup>

8

9 <sup>a</sup>Department of Applied Biology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of  
10 Technology (CS), 76131 Karlsruhe, Germany

11 <sup>b</sup>Department of Microbiology of Natural and Technical Interfaces, Institute of Functional  
12 Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology (CN), 76344 Eggenstein-Leopoldshafen,  
13 Germany

14 <sup>c</sup>Department of Biochemistry, Institute for Biology II, University of Freiburg, Schänzlestr. 1,  
15 79104 Freiburg, Germany

16 <sup>d</sup>Instituto de Tecnológica Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Av. Da  
17 República – EAN, 2780-157 Oeiras, Portugal

18

19 <sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: KIT – IAB, Fritz-Haber-Weg 2, Geb. 30.44,  
20 76131 Karlsruhe. Email: Johannes.gescher@kit.edu

21 \*present address: Thermo Fisher Scientific GmbH, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich,  
22 Germany

23 **Keywords:** Respiratory chain, Thermodynamic hierarchy, *c*-type cytochromes, *S. oneidensis*

24 **Subject category:** Geomicrobiology and microbial contributions to geochemical cycles



25 **Abstract**

26 Microorganisms show an astonishing versatility in energy metabolism. They can use a variety  
27 of different catabolic electron acceptors, but they use them according to a thermodynamic  
28 hierarchy that is determined by the redox potential of the available electron acceptors. This  
29 hierarchy is reflected by a regulatory machinery that leads to the production of respiratory  
30 chains in dependence of the availability of the corresponding electron acceptors. In this study,  
31 we showed that the  $\gamma$ -proteobacterium *Shewanella oneidensis* produces several functional  
32 electron transfer chains simultaneously. Furthermore, these chains are interconnected, most  
33 likely with the aid of *c*-type cytochromes. The cytochrome pool of a single *S. oneidensis* cell  
34 consists of ca. 700 000 hemes, which are reduced in the absence of an electron acceptor, but  
35 can be re-oxidized in the presence of a variety of electron acceptors, irrespective of prior  
36 growth conditions. The small tetraheme cytochrome STC and the soluble heme and flavin  
37 containing fumarate reductase FccA have overlapping activity and appear to be important for  
38 this electron transfer network. Double deletion mutants showed a severe phenotype during  
39 growth with ferric iron, nitrate, DMSO, and fumarate. We propose that *S. oneidensis* supports  
40 an ecological niche of a generalist by an electron transfer machinery that is produced  
41 irrespective of a thermodynamic hierarchy, but enables the organism to quickly release  
42 catabolic electrons to a variety of environmental electron acceptors.

43

44

45

46

47

48

## 49 **Introduction**

50 Bacteria and Archaea have colonized most of the environmental niches on the planet. To a  
51 large extent, their success is due to a physiological flexibility that enables them to thrive by  
52 choosing from a multitude of energy generating metabolic strategies. Evolution has selected  
53 for a regulatory pattern described as a thermodynamic hierarchy, meaning that an organism  
54 with a certain metabolic repertoire will not simply choose a form of energy metabolism that is  
55 possible under given environmental conditions, but that will release the highest amount of  
56 energy per mole of substrate consumed. In other words, organisms favor respiration over  
57 fermentation and respiratory electron acceptors with high rather than low redox potentials  
58 (Goh et al, 2005). *Escherichia coli* is an example of an organism with a very structured  
59 metabolism in which regulatory elements such as ArcAB or FNR direct metabolism according  
60 to the potential energy output of a reaction (Green and Guest, 1993; Spiro and Guest, 1990;  
61 Uden and Duchene, 1987).

62 Like *E. coli*, *Shewanella oneidensis* is a  $\gamma$ -proteobacterium, and it is the most versatile  
63 microbe known in terms of electron acceptors it can use. Thus far, it is the best understood  
64 model organism regarding the reduction of extracellular electron acceptors such as ferric iron  
65 or manganese oxides. The genome of *S. oneidensis* MR-1 contains the genetic information for  
66 41 *c*-type cytochrome encoding genes (Gao et al, 2010; Romine et al, 2008). A surprising  
67 number of them are expressed in high concentration immediately after conditions change  
68 from oxic to suboxic (Beliaev et al, 2005). Some function as terminal reductases, while others  
69 act as electron shuttles between different proteins. Four of the cytochromes expressed under  
70 anoxic conditions are well characterized and have been shown to be part of the electron  
71 transport chain to ferric iron and/or fumarate (Buecking et al, 2013; Hartshorne et al, 2009;  
72 Schuetz et al, 2009). The tetraheme cytochrome CymA is a menaquinol oxidase, which

73 catalyzes the transfer of electrons into the periplasm (Schwalb et al, 2003). CymA is the  
74 branching point for most of the respiratory chains of *S. oneidensis*. Unsurprisingly, a *cymA*  
75 deficient mutant shows growth deficiencies with several anoxic electron acceptors (Myers and  
76 Myers, 1997). CymA can transfer electrons directly to the soluble periplasmic tetraheme  
77 flavoprotein FccA, which is the organism's only respiratory fumarate reductase (Fonseca et  
78 al, 2013; Schuetz et al, 2009). Also well studied is an outer membrane complex consisting of  
79 one cytochrome each on the periplasmic (MtrA) and cell surface (MtrC) site of the outer  
80 membrane, with a membrane-associated  $\beta$ -barrel protein (MtrB) most likely acting as a  
81 connector between them (Hartshorne et al, 2009; Ross et al, 2007; Shi et al, 2007). MtrC is a  
82 terminal reductase for insoluble metals as well as shuttling compounds (Coursolle et al, 2010).  
83 Thus far, the periplasmic decaheme cytochrome MtrA is the only periplasmic cytochrome  
84 other than CymA that appears to be crucial for ferric iron and manganese oxide reduction  
85 (Bretschger et al, 2007), possibly due to its dual functions. Not only is MtrA crucial for  
86 transport of periplasmic electrons to the cell-surface localized MtrC, but it is also necessary  
87 for the stability of the  $\beta$ -barrel protein MtrB, which is degraded by the periplasmic protease  
88 DegP in its absence (Schicklberger et al, 2011). Besides MtrA and FccA, there are a variety of  
89 other periplasmic *c*-type cytochromes expressed under anoxic conditions without known  
90 functions. One of these is the small tetraheme cytochrome STC (*cctA*), which is abundant, but  
91 thus far without an assigned function.

92 Our experiments showed that *S. oneidensis* does not appear to behave according to a  
93 thermodynamic hierarchy. Different respiratory chains are co-expressed simultaneously and  
94 comprise a dynamic electron transfer network. The *c*-type cytochromes seem to function as a  
95 buffering system for catabolic electrons, which can release its electron cargo to different  
96 electron acceptors, mostly irrespective of prior growth conditions. Moreover, STC and FccA

97 seem to function as an electron transfer hub and share, in this regard, a functional redundancy.  
98 Single mutants of either of these two cytochromes show, if at all, only minor phenotypic  
99 changes. A double mutant is unable to grow with a variety of electron acceptors, but can be  
100 rescued with either of the two cytochromes.

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121 **Materials and Methods**

122 **Bacterial strains and culture conditions.** The strains used in this study are listed in table S1.  
123 Cultures of *S. oneidensis* were grown aerobically in LB or M4 minimal medium with lactate  
124 (50 mM) as described by Schicklberger et al. (Schicklberger et al, 2013). For anaerobic  
125 growth, M4 minimal medium was supplemented with lactate (50 mM) and either ferric citrate  
126 (50 mM), DMSO (25 mM), AQDS (10 mM), TMAO (25 mM), sodium nitrate (2 mM), or  
127 fumarate (50 mM) as terminal electron acceptor (TEA). Growth experiments were carried out  
128 in at least three independent replicates. Error bars represent standard deviation.

129 **Microscopic imaging.** ESEM imaging was performed by mounting *S. oneidensis* cells, grown  
130 in M4 with ferric citrate as the TEA, onto the specimen holder. At a constant temperature of  
131 3°C, a vacuum was slowly applied until the chamber pressure reached 519 Pa.

132 **Cell fractionation.** The preparation of periplasmic and membrane fractions was performed as  
133 described by Schuetz et al. (Schuetz et al, 2009). The expression of the *c*-type cytochromes  
134 was monitored via SDS-PAGE coupled with a heme-linked peroxidase stain as previously  
135 described (Thomas et al, 1976).

136 **Mass spectrometric analysis.** Periplasmic and membrane fractions of ferric iron-grown *S.*  
137 *oneidensis* cells were analyzed using MudPIT as described by Schicklberger et al.  
138 (Schicklberger et al, 2011). Excised protein bands were analyzed using mass spectrometry  
139 according to Schuetz et al. (Schuetz et al, 2009).

140 **Determination of hemes.** The heme content of the membrane and periplasmic fractions was  
141 determined using the method described by Berry and Trumpower (Berry and Trumpower,  
142 1987). A step-wise addition of sodium dithionite resulted in the successive reduction of  
143 hemes. Photometrical scans (400–600 nm) were recorded, and the first completely reduced

144 spectrum was used for quantification. The absorption coefficient of 24 mM<sup>-1</sup> (Berry and  
145 Trumpower, 1987) was applied using absorption values calculated according to equation 1:

$$146 \quad A = (A550(\text{red}) - A550(\text{ox})) - A(535(\text{red}) - A535(\text{ox})) \quad (1)$$

147 **Calculation of the periplasmic space.** It was possible to estimate the periplasmic volume by  
148 approximating the cellular shape as a cylinder covered by hemispheres. Based on this shape,  
149 the mathematical calculation of the periplasmic space was achieved using equation 2:

$$150 \quad V = \left( \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 + \pi \left( \frac{d}{2} \right)^2 (l - d) \right) - \left( \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} - w \right)^3 + \pi \left( \frac{d}{2} - w \right)^2 (l - d) \right) \quad (2)$$

151 where  $V$  is the periplasmic volume,  $l$  is the overall cell length,  $d$  is the overall cell width, and  
152  $w$  is the periplasmic width. All values calculated are given with standard deviation.

153 **Cell counting.** Cell numbers were determined using a Neubauer improved counting chamber  
154 with a 0.01 mm depth. Prior to counting, the cells were fixed by the addition of 1 volume of  
155 37% formaldehyde and incubated at 4°C for 1 h.

156 **Determination of the cellular redox state.** Cells were anaerobically grown in M4 medium  
157 with ferric citrate as TEA. The cells were harvested anoxically during the logarithmic growth  
158 phase and washed twice with M4 medium supplemented with anoxic lactate (50 mM) and  
159 lacking a TEA. The cells were then resuspended in the same buffer and incubated at room  
160 temperature to allow for the complete reduction of the cells. Lactate was removed by washing  
161 the cells 5 times in M4 medium without lactate and a TEA, after which the cells were  
162 resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1.0 in the same medium. The reduced cells (750 μL) were mixed  
163 with 250 μL of the respective TEAs (10 mM in M4), resulting in a final concentration of 2.5  
164 mM TEA. Photometrical spectra (400–600 nm) were recorded immediately, and the cellular  
165 redox state was compared to a negative control to which TEA-free buffer had been added.

166 **Construction of markerless *S. oneidensis* deletion mutants.** Markerless deletion mutants  
167 were constructed as previously described (Schuetz et al, 2009). The pMQ150-based suicide  
168 vectors were assembled using the isothermal in vitro recombination method described by  
169 Gibson et al (Gibson et al, 2009). Primers 1–4 (Table S2) were used to construct a pMQ150-  
170 based *cctA* deletion vector, which was utilized as previously described (Shanks et al, 2006).

171 **Cloning and expression of *cctA* and *fccA*.** Primers 5 + 6 and 7 + 8 were used to amplify *cctA*  
172 and *nrfA*, respectively with regions overlapping the pBAD202 plasmid. The fusion constructs  
173 were also cloned using isothermal in vitro recombination (Gibson et al, 2009). The resulting  
174 plasmids and the already available *fccA* expression vector (Schuetz et al, 2009) were  
175 transformed into JG684 (Table S1) by electroporation. Expression of was induced by the  
176 addition of 50  $\mu$ M arabinose. Arabinose was added to all cultures to provide similar growth  
177 conditions throughout the experiments.

178 **Determination of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reduction.** Cells were grown aerobically in M4 medium to  
179 an  $\text{OD}_{600}$  of 0.35, harvested, and washed twice anoxically with M4 medium. Cell suspensions  
180 were made with an  $\text{OD}_{600}$  of 0.2, and anaerobic  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  reduction was initiated by the  
181 addition of the respective TEAs. Thus, 2 mM  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  was added to the cell suspension,  
182 and samples were collected every 15 min. Further reduction was stopped by the addition of  
183 formic acid. The  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations were measured using  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  cuvette  
184 tests supplied by Hach-Lange (Germany) as described by the manufacturer.

185 **Single nucleotide resolution RNA sequencing.** Total RNA was prepared using an RNeasy  
186 kit provided by Qiagen (Germany), and residual DNA was removed with the Ambion DNA-  
187 free kit (Life Technologies, USA). An Ambion MICROBExpress bacterial mRNA enrichment  
188 kit (Life Technologies) was used for rRNA depletion. Strand specific cDNA libraries were  
189 prepared from 50 ng of rRNA-depleted RNA following the TruSeq RNA protocol (Illumina,

190 without purification) with modification of the 2<sup>nd</sup> strand cDNA synthesis as previously  
191 described (Parkhomchuk et al, 2009). The libraries were prepared using multiplex primers to  
192 allow simultaneous sequencing in a single lane. Sequencing was performed on a HiSeq1000  
193 using SBS v3 kits (Illumina) to generate paired-end reads of 2 × 50 nucleotides. Cluster  
194 detection and base calling were performed using RTA v1.13 (Illumina), and the quality of the  
195 reads was assessed with CASAVA v1.8.1 (Illumina). Sequencing yielded between 17.7 and  
196 53.2 million read pairs for each library with an average of 96.6% of the bases having a quality  
197 of Q30 or better.

198 **RNA-sequence data analysis.** The sequence data were mapped against the genome  
199 sequences of *Shewanella oneidensis* MR-1 (NCBI accession number NC\_004347.2) and its  
200 megaplasmid (NC\_004349.1) using Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Gene  
201 expression was calculated as reads per gene by determining the number of reads that  
202 overlapped with the annotated gene loci as previously described (Doetsch et al, 2012). The  
203 normalization of gene expression and statistical testing using a negative binomial distribution  
204 were performed using the R package ‘DESeq’ (Anders and Huber, 2010). Heatmaps of gene  
205 expression were generated with the ‘heatmap.2’ function of the R package ‘gplots’ (Warnes et  
206 al, 2013).

207

208

209

210

211

212

213



214 **Results**

215 **Characterization of the periplasm as a cytochrome based electron transfer environment.**

216 This study aimed to elucidate the principles of periplasmic electron transfer. Therefore, the  
217 volume of the periplasm of a single cell was calculated to later estimate the average  
218 concentration of *c*-type cytochromes. The average length and width of *S. oneidensis* cells  
219 were measured using environmental scanning electron microscopy (ESEM) images of  
220 logarithmically growing ferric iron-reducing cells, and the width of the periplasm was  
221 obtained from the work of Dohnalkova et al. (Dohnalkova et al, 2011). Using equation 2,  
222 these values led to an average periplasmic volume of 0.153 fl per cell (Figure S1).  
223 Furthermore, the concentration of heme cofactors in soluble and membrane fractions was  
224 quantified using absorption spectroscopy. Since the heme cofactor is connected to the  
225 apoprotein in the periplasm, it was possible to directly calculate a concentration of heme in  
226 the periplasm using the 0.153 fl volume and the average number of total soluble heme sites  
227 per cell, which was quantified as 346 142. Accordingly, the concentration of soluble heme in  
228 the periplasm was 3.76 mM.

229 Interestingly, *S. oneidensis* produces a core pattern of different *c*-type cytochromes  
230 irrespective of the anoxic electron acceptor. As depicted in Fig. 1, this held true even under  
231 conditions where the electron transport chain to the terminal electron acceptor was *c*-type-  
232 cytochrome independent, since thiosulfate reduction is catalyzed by the *psrABC* gene product.  
233 PsrA is a molybdoprotein; PsrB is an iron-sulfur-protein, and PsrC is the membrane anchor.  
234 The only cytochrome protein that was strongly upregulated under one specific condition was  
235 the nitrite reductase NrfA, whose production appeared to depend primarily on the conditions  
236 of nitrate ammonification. NrfA identification was performed by mass spectrometric analysis.  
237 Nevertheless, a corresponding, but less apparent, heme-containing protein band was also

238 visible under all other conditions tested. Also present under all conditions, but in major  
239 quantities, were the fumarate reductase FccA and the small tetraheme cytochrome STC.

240 ***S. oneidensis* contains an electron transfer network and storage compartment.** It is not  
241 possible to concentrate periplasmic fractions under laboratory conditions to a heme content of  
242 3.76 mM, due to protein precipitation. Hence, it can be assumed that the periplasm is a  
243 conductive, highly viscous matrix that bridges the gap between the inner and outer membrane.  
244 Furthermore, the heme-containing components seem to be produced following an electron  
245 acceptor-independent regulatory mechanism. Nevertheless, it has been assumed from  
246 knockout studies that only a limited number of specific cytochromes is necessary for  
247 establishing the individual electron transport chains. Therefore, the relevance of a surplus  
248 production of *c*-type cytochromes for the ecological fitness of the organism remains  
249 enigmatic.

250 One hypothesis is that these cytochromes comprise an electron capacitor that allows for  
251 oxidation of a carbon source, irrespective of the presence of an electron acceptor (Esteve-  
252 Núñez et al, 2008). A corresponding hypothesis would be that *S. oneidensis* follows the  
253 ecological strategy of a generalist, using existing resources faster than competing organisms.  
254 The simultaneous expression of a multitude of electron transport chains would be one possible  
255 way to enable such a metabolic program. The following experiments were conducted to  
256 analyze whether the expressed *c*-type cytochromes are indeed part of functional electron  
257 transport chains to various electron acceptors and to determine whether electrons stored  
258 within the cytochrome pool can be released to these electron acceptors irrespective of  
259 preceding growth conditions. *S. oneidensis* cells were grown on ferric iron, harvested during  
260 logarithmic growth, and washed in an electron acceptor-free medium containing lactate. This  
261 led to a complete reduction of the cytochrome pool as detected using a comparison of spectra

262 from the cell suspensions to further dithionite-reduced samples. The cells were then washed in  
263 medium without a donor or acceptor, and different anoxic electron acceptors were added to  
264 the cell suspensions. As indicated in Fig. 2A, the cells were re-oxidized after addition of all of  
265 the electron acceptors tested with the exception of thiosulfate, which like the addition of  
266 buffer, did not change the redox status of the cytochrome pool. Nevertheless, electron  
267 acceptors spanning a redox potential window between -184 mV (anthraquinone-2,6-  
268 disulfonate; AQDS) and +433 mV ( $\text{NO}_3^-$ ) led to complete oxidation, indicating not only the  
269 presence of functional electron transport chains, but furthermore, their interconnection.

270 Interestingly, the same behavior of complete re-oxidation (with the same exception of  
271 thiosulfate) could be observed if aerobically grown cells were washed and prior to the  
272 experiment placed for 3 hours in an anoxic environment with lactate but without any terminal  
273 electron acceptor (data not shown). From the multitude of electron acceptors that *S.*  
274 *oneidensis* can use, environmental ferric iron forms probably have the lowest redox potential.

275 If the parallel expression of interconnected electron transport chains under anoxic conditions  
276 is a general strategy of the organism, one would predict that the same behavior should also be  
277 detectable under nitrate reducing conditions. In agreement with this hypothesis, reduced  
278 nitrate-grown cells could be re-oxidized by the addition of nitrate, fumarate, AQDS, and ferric  
279 citrate (data not shown). Nevertheless, the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) or  
280 trimethylamine *N*-oxide (TMAO) only led to a, if at all, slight re-oxidation of the cytochrome  
281 pool.

282 Multidimensional protein identification technology (MudPIT) was utilized to confirm the  
283 presence of multiple terminal reductases in the ferric iron-grown cells. Enzymes for the  
284 reduction of nitrate, nitrite, DMSO, fumarate, ferric iron, and hydrogen peroxide were  
285 detectable (Fig. 2B). Interestingly, although a TMAO-dependent re-oxidation was observed in

286 the ferric iron-grown cells, peptides corresponding to the TMAO reductase TorA were not  
287 identified. Nevertheless, several DMSO reductases can also reduce TMAO (Dos Santos et al,  
288 1998). Hence, TMAO dependent re-oxidation might be due to an unspecificity of the DMSO  
289 reductase.

290 **FccA and STC as prominent and important cytochromes with overlapping activity.** The  
291 two periplasmic cytochromes FccA and STC were highly transcribed under all anaerobic  
292 growth conditions tested, and they were thus identified as potential electron-transfer hubs,  
293 interconnecting the individual electron transport chains. Hence, a markerless double-deletion  
294 mutant for the corresponding genes was constructed and tested for possible growth  
295 deficiencies under anoxic conditions.

296 The double mutant showed a strong phenotype when tested under the conditions of ferric iron,  
297 DMSO, and nitrate reduction. It had an extremely elongated, but reproducible, lag-phase  
298 under ferric iron-reducing conditions, after which it grew to densities similar to those of wild-  
299 type (Fig. 3A). After this lag-phase, it produced a different pattern of periplasmic  
300 cytochromes (Fig. S2), suggesting the mutant was functioning under a different regulatory  
301 protocol. It is not yet clear how this new mixture of heme-containing proteins rescued the  
302 mutant phenotype. Nevertheless, the *cctA/fccA* deletion mutant was unable to grow on DMSO  
303 and initially showed minor growth on nitrate, but stopped after reaching 20% of the wild-type  
304 yield (Fig. 3B and C). In contrast, no phenotype was detectable for anoxic growth with  
305 TMAO as well as under oxic growth conditions. All growth deficiencies could be rescued via  
306 expression of either *cctA* or *fccA* from an inducible plasmid, indicating the overlapping  
307 activity of the two cytochromes (Fig. 3).

308 **Transcriptomic analysis of the *cctA/fccA* double mutant.** The surprising severity of the  
309 *cctA* and *fccA* double deletion could be either the result of an inability to transport electrons

310 through the periplasm or to regulate the metabolism according to anoxic conditions. For  
311 instance, the latter results from a deletion of the *crp* gene, as the corresponding protein is  
312 central for cyclic AMP-coordinated regulation of the shift from an aerobic to anaerobic  
313 metabolism (Saffarini et al, 2003). The *crp* mutant cannot grow anaerobically with DMSO,  
314 ferric iron, or fumarate as electron acceptors, which is similar to the observed phenotype of  
315 the *cctA/fccA* mutant.

316 Due to the similarity of the *crp* and *cctA/fccA* mutant phenotypes, it was hypothesized that in  
317 addition to their role in electron transport, the two cytochromes might have an additional  
318 function in the regulation of anaerobic metabolism. Therefore, the transcriptomes of the  
319 double-deletion mutant and wild-type were compared during the shift from aerobic to  
320 anaerobic growth with ferric iron and evaluated in relation to a *crp* or *cyaC* deletion mutation  
321 (Table 1). CyaC is the major cAMP adenylate cyclase and therefore involved in the synthesis  
322 of the effector molecule (Charania et al, 2009). Surprisingly, the *cctA/fccA* deletion mutant  
323 was not affected in its transcription of essential *c*-type cytochromes such as *mtrC*, *nrfA*, or  
324 *cymA*. The corresponding genes for DMSO and nitrate reductase were significantly  
325 upregulated. Expression of known components of heme and menaquinone biosynthesis was  
326 not negatively affected. Concerning the central carbon metabolism, a slight upregulation of  
327 lactate dehydrogenase genes was detected. An obvious similarity to *crp* and *cyaC* mutants  
328 was the downregulation of the pyruvate formate lyase. Moreover, the mutation led to a  
329 downregulation of the *pta* and *ackA* genes, which catalyze the ATP-yielding conversion of  
330 acetyl-CoA to acetate. A complete summary of the results from transcriptomic analysis can be  
331 found in S1.

332 **Nitrate and nitrite reduction in cell suspensions.** It is possible that STC and FccA play a  
333 central role as an electron transfer hub providing the electron transfer chains to DMSO, ferric

334 citrate and nitrate with CymA-based electrons and/or have a regulatory function that causes a  
335 decrease in lactate metabolism via downregulation of *pfl*, *ackA*, and *pta*. Both functions could  
336 explain the phenotype under anoxic conditions.

337 The last set of experiments was conducted to estimate the impact of the *pfl*, *ackA*, and *pta*  
338 down-regulation on the mutant phenotype. It is known that NrfA directly interacts with CymA  
339 (Gao et al, 2009). Therefore, *S. oneidensis* wild-type and double-mutant strains were grown  
340 under oxic conditions, then washed and incubated under anoxic conditions to induce the  
341 expression of genes involved in anaerobic electron transfer. The gene for the nitrite reductase  
342 NrfA was additionally expressed from an inducible plasmid in both cell types. The resulting  
343 cell suspensions were tested for their ability to reduce either nitrate or nitrite. A decrease in  
344 nitrite and nitrate reduction should be detectable if central metabolic conversion rates, and  
345 hence electron supply, are limiting. In contrast, if the central metabolism is not limiting  
346 electron transfer, then the two cell types should reduce nitrite at similar rates (NrfA is directly  
347 reduced by CymA), and nitrate reduction should be severely inhibited.

348 As indicated in Fig. 4, both the wild-type and double-deletion mutant strains reduced nitrite at  
349 equal rates. The mutant was unable to transport electrons to nitrate, even though expression of  
350 the nitrate reductase NapA was upregulated. Therefore, electron transport was not limited by  
351 the conversion of lactate, but by a loss of the important and necessary periplasmic electron  
352 transferring proteins STC and FccA.

353

354

355

356

357

358 **Discussion**

359 The periplasm of *Shewanella oneidensis* is a reaction room that is filled with a high  
360 concentration of *c*-type cytochromes. These proteins have a central function in anoxic electron  
361 transfer to a multitude of different electron acceptors. Several researchers already showed a  
362 co-expression of several *c*-type cytochromes at the level of the transcriptome (Beliaev et al,  
363 2005; Gralnick et al, 2005). Nevertheless, nobody showed what this co-expression really  
364 infers regarding the physiology of the organism and the biochemistry of electron transfer to  
365 the arsenal of electron acceptors that *S. oneidensis* is able to reduce. A single cell contains  
366 almost 700 000 heme sites that could be used as an electron storage, which to some extent  
367 enables the electron acceptor-independent oxidation of an available carbon source. For  
368 instance, because *S. oneidensis* releases 4 electrons during the oxidation of lactate to acetate  
369 and CO<sub>2</sub>, 175 000 lactate molecules could be oxidized by a *c*-type cytochrome pool of 700 000  
370 hemes. Consequently, at least 175 000 ATP molecules would be produced during the  
371 substrate level phosphorylation reaction from acetyl-CoA to acetate. The heme sites within  
372 the cytochrome pool are interconnected and therefore, addition of an electron acceptor to cells  
373 where electron storage sites are fully occupied leads to a complete reoxidation of the *c*-type  
374 cytochrome pool. Of note, a variety of different electron acceptors leads to a similar total re-  
375 oxidation of the pool. A clear hierarchical expression dependent on the redox potential of the  
376 terminal electron acceptor is lacking. For instance, the cells produce the components of the  
377 extended respiratory chain to the cell surface, even when they are pre-grown with nitrate.  
378 This regulatory mechanism, which is independent of the redox potential, is also mirrored in  
379 the strategy of respiratory periplasmic branching initiated by the cytoplasmic membrane  
380 protein CymA. The electron transfer chains to DMSO (DMSO/DMS: +160 mV), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
381 /NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: +433 mV), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: +340 mV), ferric iron (+372 – (-177 mV)), manganese

382 oxide ( $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{2+}$ : +269 - 612 mV), and fumarate (fumarate/succinate: +33 mV) all rely on  
383 this menaquinol oxidase. This might be an adaptation to environments such as sediments in  
384 which rapid redox cycling occurs. Interestingly, this indeed seems to be the niche of the genus  
385 *Shewanella*, since most of the isolates cultivated thus far originate from sediment samples or  
386 redox stratified environments (Fredrickson et al, 2008). Of note, experiments conducted by  
387 Esteve-Núñez et al. showed that *G. sulfurreducens*, another model organisms for extracellular  
388 respiration, growing on ferric iron was unable to release the electrons of the cytochrome pool  
389 to fumarate (Esteve- Núñez et al, 2008). This observation is in keeping with the characteristics  
390 of *G. sulfurreducens* cells, a specialist for anoxic growth.

391 The concept of transient electron storage is to some extent corroborated by results from Harris  
392 et al. (Harris et al, 2012). The authors observed a distinct response called electrokinesis when  
393 *S. oneidensis* cells were in the vicinity of an insoluble electron acceptor in the absence of  
394 oxygen. Cells that made an initial contact with the electron acceptor showed an increased  
395 swimming speed with a high rate of flagella reversal that kept the cells in close proximity to  
396 the electron acceptor. Upon following collisions with the electron acceptor, the cells either  
397 attached to the material or began the same program again. In other words, the periodic  
398 discharge of catabolic electrons seems to sustain the energy metabolism of the cell. Transient  
399 electron storage could provide a tool to maintain a constant metabolic flux, and thus ATP  
400 yield, even if the cells are disconnected from the respiratory electron acceptor. Of note, it is  
401 not clear yet whether *c*-type cytochromes are the only electron storage entity in *S. oneidensis*  
402 or whether other redox-active compounds also contribute.

403 Interestingly, although the electron transport pathways to several electron acceptors seem to  
404 be overlapping and co-expressed at least to some extent, it could be shown that *S. oneidensis*  
405 has a specific chemotactic behavior (Nealson et al, 1995). For instance nitrate grown cells



406 move along a nitrate gradient even in the presence of fumarate. Nevertheless, addition of  
407 DMSO blocks this chemotactic behavior. It will be part of future studies to analyze  
408 interconnection between electron transfer kinetics and chemotactic behavior.

409 **STC and FccA are the major constituents of the periplasmic c-type cytochrome pool.** So  
410 far several models were postulated regarding periplasmic electron transfer in *S. oneidensis*.  
411 For instance, in this journal Gao et al assumed that electron transfer between CymA and  
412 NapAB is direct and does not involve a further electron shuttling protein (Gao et al, 2009).  
413 Other researchers raised the hypothesis that CymA would form electron transfer complexes  
414 with the outer membrane anchored terminal reductases MtrABC or DmsABEF (Ross et al,  
415 2011; McMillan et al, 2012). Nevertheless, this study reveals the necessity of at least one  
416 connecting protein, either FccA or STC for coupling respiratory oxidation of CymA to  
417 effective electron transfer to at least ferric citrate, DMSO and nitrate. Our results are  
418 consistent with previous work from Fonseca et al. (Fonseca et al, 2013). The authors  
419 elucidated a number of interactions for STC and FccA with other periplasmic cytochromes,  
420 including MtrA and CymA. Interestingly, the two proteins cannot interact with each other,  
421 which might be a consequence of their negative surface charge. The binding constants  
422 reported by the authors favor weak transient interactions for FccA and STC with CymA or  
423 MtrA, which is typical for transient electron-transfer interactions. The high concentrations of  
424 these proteins in the periplasm would probably allow for stochastic, but highly frequent,  
425 interactions with other parts of the individual electron transfer chains. As these are  
426 interconnected, it seems likely that only the presence of a certain electron acceptor triggers the  
427 electron flow into one particular reaction. Still, the question of whether periplasmic electron  
428 transfer follows weak interactions or the formation of static protein complexes is still under  
429 debate, because McMillan et al (McMillan et al, 2013) observed CymA-triggered absorption

430 of FccA onto lipid vesicles in an in vitro system. Thus far, what this experimental result infers  
431 for the in vivo situation remains unresolved.

432 In conclusion, we introduced a novel microbial metabolic strategy, which potentially results  
433 in a fitness benefit under conditions of rapid redox cycling. The simultaneous production of  
434 different functional respiratory chains is sustained by the production of the central electron  
435 transfer hubs, STC and FccA. The high concentration of these proteins in the periplasm could  
436 result in the formation of an electron capacitor, but it also ensures an equal distribution of  
437 respiratory electrons throughout the periplasm and onto different electron transfer chains. This  
438 function as a distributor cannot be adopted only by CymA, because its membrane anchor does  
439 not allow for rapid interactions with the total available pool of soluble terminal reductases.

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449 **Acknowledgements:** Thanks to Nico Bursac and André Dittrich for help in modelling the  
450 periplasmic space. We are grateful for financial support from the German Research  
451 Foundation (DFG).

452

453 **Conflict of interest statement:** The authors declare that there are no conflicts of interest.

454 **References**

455 Anders S, Huber W (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**.

456

457 Beliaev AS, Klingeman DM, Klappenbach JA, Wu L, Romine MF, Tiedje JM *et al* (2005). Global  
458 transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron  
459 acceptors. *J Bacteriol* **187**: 7138-7145.

460

461 Berry EA, Trumpower BL (1987). Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine  
462 hemochrome spectra. *Analytical biochemistry* **161**: 1-15.

463

464 Bretschger O, Obraztsova A, Sturm CA, Chang IS, Gorby YA, Reed SB *et al* (2007). Current  
465 production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Applied*  
466 *and environmental microbiology* **73**: 7003-7012.

467

468 Buecking C, Schicklberger M, Gescher J (2013). The Biochemistry of Dissimilatory Ferric Iron and  
469 Manganese Reduction in *Shewanella oneidensis*. In: Gescher J, Kappler A (eds). *Microbial Metal*  
470 *respiration*. Springer: New York. pp 49-82.

471

472 Charania MA, Brockman KL, Zhang Y, Banerjee A, Pinchuk GE, Fredrickson JK *et al* (2009).  
473 Involvement of a membrane-bound class III adenylate cyclase in regulation of anaerobic respiration in  
474 *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **191**: 4298-4306.

475

476 Coursolle D, Baron DB, Bond DR, Gralnick JA (2010). The Mtr Respiratory Pathway Is Essential for  
477 Reducing Flavins and Electrodes in *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* **192**: 467-474.

478

479 Dohnalkova AC, Marshall MJ, Arey BW, Williams KH, Buck EC, Fredrickson JK (2011). Imaging  
480 Hydrated Microbial Extracellular Polymers: Comparative Analysis by Electron Microscopy. *Applied*  
481 *and environmental microbiology* **77**: 1254-1262.

482

483 Dos Santos JP, Iobbi-Nivol C, Couillault C, Giordano G, Mejean V (1998). Molecular analysis of the  
484 trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *Journal of*  
485 *molecular biology* **284**: 421-433.

486

487 Doetsch A, Eckweiler D, Schniederjans M, Zimmermann A, Jensen V, Scharfe M *et al* (2012). The  
488 *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA  
489 Sequencing. *Plos One* **7**.

490

491 Esteve-Núñez A, Sosnik J, Visconti P, Lovley DR (2008). Fluorescent properties of *c*-type  
492 cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter*  
493 *sulfurreducens*. *Environmental microbiology* **10**: 497-505.

494

495 Fonseca BM, Paquete CM, Neto SE, Pacheco I, Soares CM, Louro RO (2013). Mind the gap:  
496 cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-  
497 1. *The Biochemical journal* **449**: 101-108.

498

499 Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS *et al* (2008).  
500 Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Microbiol* **6**: 592-603.

501

502 Gao H, Barua S, Liang Y, Wu L, Dong Y, Reed S *et al* (2010). Impacts of *Shewanella oneidensis c*-  
503 type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microbial biotechnology* **3**: 455-466.

504

505 Gao HC, Yang ZK, Barua S, Reed SB, Romine MF, Nealson KH *et al* (2009). Reduction of nitrate in  
506 *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron  
507 transport protein from CymA to NapA. *Isme J* **3**: 966-976.

508

509 Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO (2009). Enzymatic  
510 assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Meth* **6**: 343-345.

511

512 Goh EB, Bledsoe PJ, Chen LL, Gyaneshwar P, Stewart V, Igo MM (2005). Hierarchical control of  
513 anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory  
514 system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *J Bacteriol* **187**:  
515 4890-4899.

516

517 Galnick JA, Brown CT, Newman DK (2005). Anaerobic regulation by an atypical Arc system in  
518 *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **56**: 1347-1357.

519

520 Green J, Guest JR (1993). A role for iron in transcriptional activation by FNR. *FEBS letters* **329**: 55-  
521 58.

522

523 Harris HW, El-Naggar MY, Nealson KH (2012). *Shewanella oneidensis* MR-1 chemotaxis proteins  
524 and electron-transport chain components essential for congregation near insoluble electron acceptors.  
525 *Biochemical Society transactions* **40**: 1167-1177.

526

527 Hartshorne RS, Reardon CL, Ross D, Nuester J, Clarke TA, Gates AJ *et al* (2009). Characterization of  
528 an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:  
529 22169-22174.

530

531 Langmead B, Salzberg SL (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* **9**: 357-  
532 359.

533

534 McMillan DG, Marritt SJ, Firer-Sherwood MA, Shi L, Richardson DJ, Evans SD *et al* (2013). Protein-  
535 protein interaction regulates the direction of catalysis and electron transfer in a redox enzyme  
536 complex. *Journal of the American Chemical Society* **135**: 10550-10556.

537

538 McMillan DGG, Marritt SJ, Butt JN, Jeuken LJC (2012). Menaquinone-7 Is Specific Cofactor in  
539 Tetraheme Quinol Dehydrogenase CymA. *J Biol Chem* **287**: 14215-14225.

540

541 Myers CR, Myers JM (1997). Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme  
542 cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-  
543 1. *J Bacteriol* **179**: 1143-1152.

544

545 Neilson KH, Moser DP, Saffarini DA (1995). Anaerobic electron acceptor chemotaxis in *Shewanella*  
546 *putrefaciens*. *Applied and environmental microbiology* **61**: 1551-1554.

547

548 Parkhomchuk D, Borodina T, Amstislavskiy V, Banaru M, Hallen L, Krobitch S *et al* (2009).  
549 Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids*  
550 *Research* **37**: e123.

551

552 Romine MF, Carlson TS, Norbeck AD, McCue LA, Lipton MS (2008). Identification of mobile  
553 elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome. *Applied and environmental*  
554 *microbiology* **74**: 3257-3265.

555

556 Ross DE, Ruebush SS, Brantley SL, Hartshorne RS, Clarke TA, Richardson DJ *et al* (2007).  
557 Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis*  
558 MR-1. *Applied and environmental microbiology* **73**: 5797-5808.

559

560 Ross DE, Flynn JM, Baron DB, Gralnick JA, Bond DR (2011). Towards Electrosynthesis in  
561 *Shewanella*: Energetics of Reversing the Mtr Pathway for Reductive Metabolism. *Plos One* **6**: e16649.

562

563 Saffarini DA, Schultz R, Beliaev A (2003). Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor  
564 protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* **185**: 3668-3671.

565

566 Schicklberger M, Buecking C, Schuetz B, Heide H, Gescher J (2011). Involvement of the *Shewanella*  
567 *oneidensis* Decaheme Cytochrome MtrA in the Periplasmic Stability of the beta-Barrel Protein MtrB.  
568 *Applied and environmental microbiology* **77**: 1520-1523.

569

570 Schicklberger M, Sturm G, Gescher J (2013). Genomic plasticity enables a secondary electron  
571 transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Applied and environmental microbiology* **79**: 1150-1159.

572

573 Schuetz B, Schicklberger M, Kuermann J, Spormann AM, Gescher J (2009). Periplasmic electron  
574 transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and*  
575 *environmental microbiology* **75**: 7789-7796.

576

577 Schwalb C, Chapman SK, Reid GA (2003). The tetraheme cytochrome CymA is required for  
578 anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry-US*  
579 **42**: 9491-9497.

580

581 Shanks RM, Caiazza NC, Hinsa SM, Toutain CM, O'Toole GA (2006). *Saccharomyces cerevisiae*-  
582 based molecular tool kit for manipulation of genes from Gram-negative bacteria. *Applied and*  
583 *environmental microbiology* **72**: 5027-5036.

584

585 Shi L, Squier TC, Zachara JM, Fredrickson JK (2007). Respiration of metal (hydr)oxides by  
586 *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem *c*-type cytochromes. *Mol Microbiol* **65**: 12-20.

587

588 Spiro S, Guest JR (1990). FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*.  
589 *FEMS microbiology reviews* **6**: 399-428.

590

591 Thomas PE, Ryan D, Levin W (1976). An improved staining procedure for the detection of the  
592 peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical*  
593 *biochemistry* **75**: 168-176.

594

595 Unden G, Duchene A (1987). On the role of cyclic AMP and the Fnr protein in *Escherichia coli*  
596 growing anaerobically. *Archives of microbiology* **147**: 195-200.

597

598 Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A *et al* (2013). gplots: Various R  
599 programming tools for plotting data.

600

601



602 **Figure Legends:**

603 **Fig. 1: Heme Stain of periplasmic fractions of *S. oneidensis* MR-1.** *S. oneidensis* was  
604 grown in M4 media with different anaerobic terminal electron acceptors as well as oxygen.  
605 With the exception of  $\text{NO}_3^-$ , a constant pattern of expressed *c*-type cytochromes was detected  
606 under all tested conditions. Even aerobically grown cells in late logarithmic phase seem to  
607 produce the same set of *c*-type cytochromes. Corresponding bands to the  $\text{NO}_2^-$  reductase  
608 NrfA, the fumarate reductase FccA and STC can be found at 60 kDa, 70 kDa and 15 kDa,  
609 respectively.

610

611 **Fig 2: Electron transferring network. A:** Ferric iron grown cells were lactate reduced and  
612 subjected to different terminal electron acceptors. Their redox state was monitored via  
613 absorption spectroscopy. A reduced state is indicated by an absorption peak at 552 nm,  
614 whereas the peak is missing in the oxidized state. As depicted, the cells were able to discharge  
615 their electron cargo onto all electron acceptors applied excepting  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . **B:** Summary of  
616 terminal reductases identified via MudPIT analysis of periplasmic and membrane fractions of  
617 ferric iron grown *S. oneidensis* cells.

618

619 **Fig. 3: Growth of *S. oneidensis* wild-type and mutants on different terminal electron**  
620 **acceptors.** The panels show growth monitored by optical density on **A:** ferric citrate; **B:**  
621 DMSO; **C:**  $\text{NaNO}_3$ . JG7, wild-type; JG441,  $\Delta cctA$ ; JG207,  $\Delta fccA$ ; JG684,  $\Delta cctA\Delta fccA$ ; JG700,  
622  $\Delta cctA\Delta fccA$  pBAD\_*cctA*; JG837,  $\Delta cctA\Delta fccA$  pBAD\_*fccA*. JG684 shows severe growth  
623 deficiencies on ferric iron, DMSO and  $\text{NaNO}_3$ . Growth curves represent at least three  
624 independent replicates, error bars indicate standard deviation.

625

626 **Fig. 4: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reduction.** *S. oneidensis* wild-type (WT) and  $\Delta cctA\Delta fccA$  mutant  
627 (JG684) cell suspensions were tested for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reduction, respectively. Nitrate  
628 consumption by wild- type cells is indicated by a black solid line. Cell suspensions of  
629  $\Delta cctA\Delta fccA$  show no nitrate reducing activity (red solid line). Cell suspensions of both, wild-  
630 type (black striped line) and  $\Delta cctA\Delta fccA$  mutant (red striped line) show nitrite reduction with  
631 highly similar rates, indicating that the central metabolism is not affected by the deletion of  
632 *cctA* and *fccA*, since the nitrite reductase NrfA is directly coupled to CymA. Error bars  
633 represent standard deviation of three independent replicates.

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

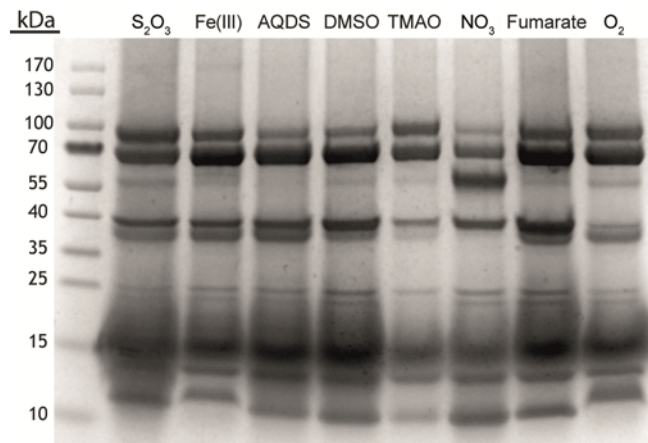
646

647

648

649

650 **Figure 1**



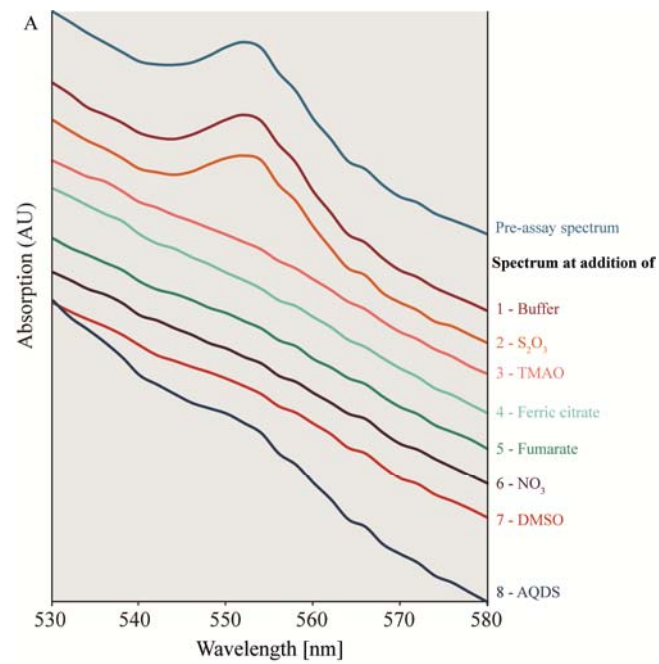
651

652

653

654

655 **Figure 2**

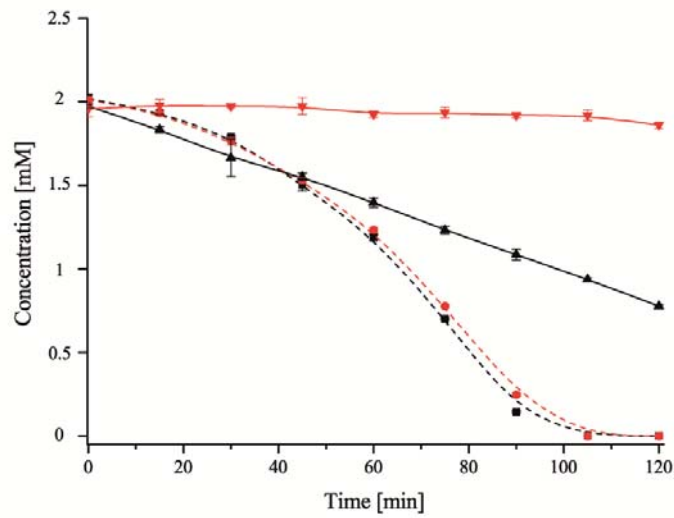
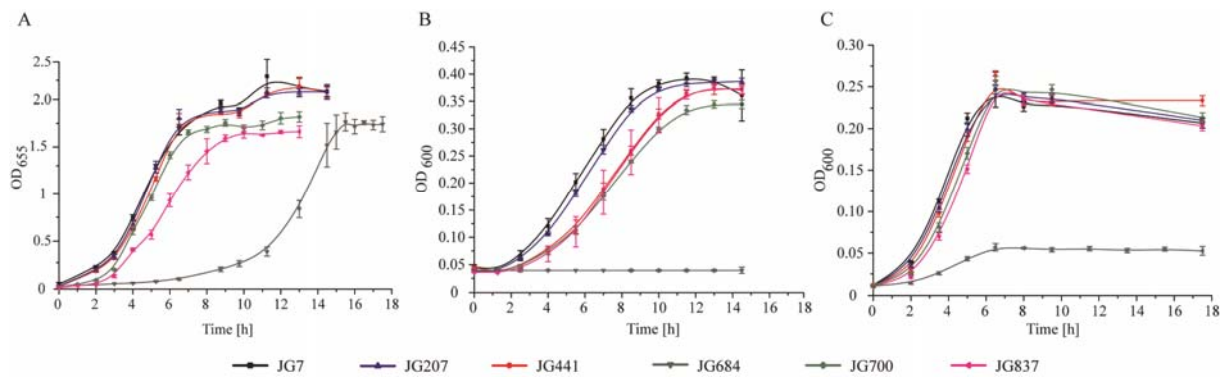


B

	UniProt	SO number	Name	Score	Peptides	Hits
Periplasm	P83223	970	FccA	442.83	25	497
	Q8EF24	2178	CcpA	194.74	15	61
	Q8EJ1	848	NapA	8.76	1	1
	Q8EAC7	3980	NrfA	10.9	1	1
Membrane	Q8EG34	1777	MtrC	32.28	3	3
	Q8EH03	1429	DmsA	70.81	7	9
	Q8EH02	1430	DmsB	33.79	2	5
	Q8E8S0	4591	CymA	28.31	2	6

656

657 **Figure 3**



669 **Table 1**

670 **Table 1:** Transcriptomic response of  $\Delta cctA/fccA$  compared to the wildtype during the initial transition from  
671 oxic to anoxic growth with ferric iron as electron acceptor. Indicated are the significant fold changes in  
672 expression of genes corresponding to proteins involved in oxic/anoxic regulation, heme and menaquinone  
673 biosynthesis, lactate metabolism as well as anaerobic respiratory chains. Variations in expression were regarded  
674 as not significantly altered (n.s.) if the fold change was below 2 or the padj value was above 0.05. The  
675 expression data is compared to a study conducted by Charania et al. that described the impact of *crp* or *cyaC*  
676 deletion on gene expression under oxygen limiting conditions compared to the wild type (Charania et al, 2009).  
677 Arrows indicate up (↑) or down (↓) regulation of the corresponding genes in the respective mutant strains.

678

	<b>SO_number</b>	<b>Gene name</b>	<b>fold change</b>	<b><math>\Delta crp</math></b>	<b><math>\Delta cyaC</math></b>
lactate metabolism	SO_1518	<i>lldG</i>	2.7		
	SO_1519	<i>lldF</i>	2.6		
	SO_1520	<i>lldE</i>	2.4		
	SO_2912	<i>pflB</i>	-3.0	↓	↓
	SO_2913	<i>pflA</i>	-3.0	↓	↓
	SO_2915	<i>ackA</i>	-3.8	↓	↓
	SO_2916	<i>pta</i>	-3.6	↓	↓
heme biosynthesis	SO_0027	<i>hemG-2</i>	2.2	↓	
	SO_3720	<i>hemG-3</i>	2.3	↓	
respiratory chains	SO_0845	<i>napB</i>	6.4	↓	
	SO_0848	<i>napA</i>	10.3	↓	
	SO_1428	<i>dmsF</i>	5.8	↓	↓
	SO_1429	<i>dmsA</i>	6.0	↓	↓
	SO_1430	<i>dmsB</i>	6.2	↓	↓

679

680

681

682

683

684

685

686 **Supplemental Figure legends**

687 **Fig. S1: Characteristics of the *Shewanella oneidensis* MR-1 cell.** **A:** ESEM images based  
688 calculation of the periplasmic volume. *S. oneidensis* cells have an average length of 2.989 ( $\pm$  0.723)  
689  $\mu\text{m}$  and width of 0.723 ( $\pm$  0.065)  $\mu\text{m}$ . Using the by Dohnalkova and colleagues provided periplasmic  
690 width of 23.5 ( $\pm$  3.7) nm, the volume of the periplasmic space was estimated as 0.153 ( $\pm$  0.0046) fl. **B:**  
691 Summary of heme quantification experiments. A single *S. oneidensis* cell contains about 680 375 ( $\pm$   
692 50 407) heme groups.

693

694

695 **Fig. S2: Heme stain of periplasmic fractions of wild-type and different mutant strains of *S.***  
696 ***oneidensis*.** Strain JG7 represents *S. oneidensis* wild-type. The absence of either STC (15 kDa) in  
697 JG441 ( $\Delta\text{cctA}$ ) or FccA (70 kDa) in JG207 ( $\Delta\text{fccA}$ ) can be recognized by the absence of the  
698 corresponding major heme containing protein bands. The double mutant JG684 was harvested after a  
699 prolonged lag phase of 14 h (Fig. 3). The mutant produced in three independent experiments the same  
700 set of *c*-type cytochromes that differs from the pattern of proteins produced by the wild-type. The new  
701 *c*-type cytochromes produced by the mutant were excised from the gel and subjected to nanoLC-ESI-  
702 MS/MS for identification. The results of this analysis are depicted on right side of the figure.

703

704

705

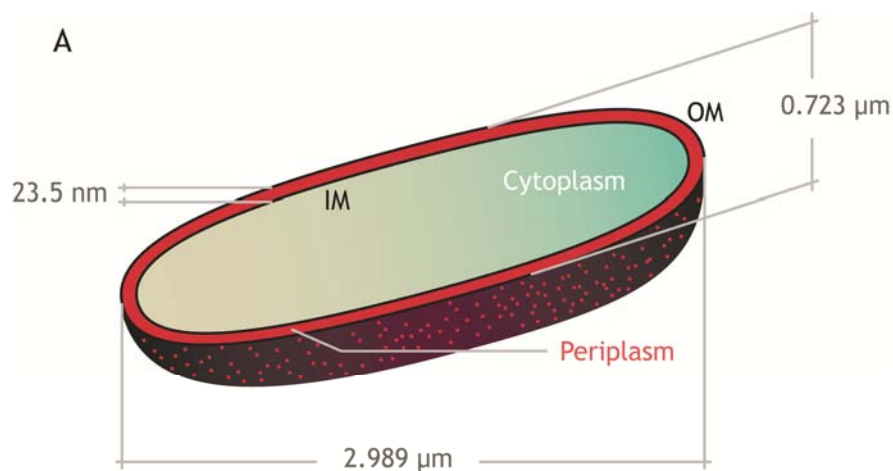
706

707

708

709

710 **Figure S1**



Periplasmic volume per cell :  $0.153 \pm 0.0046$  fl

**B**

	Membrane	Periplasm	Total
Number of heme sites	<b>334232.6</b>	<b>346142.1</b>	<b>680374.7</b>
SD	45277.1	22154.4	50406.7

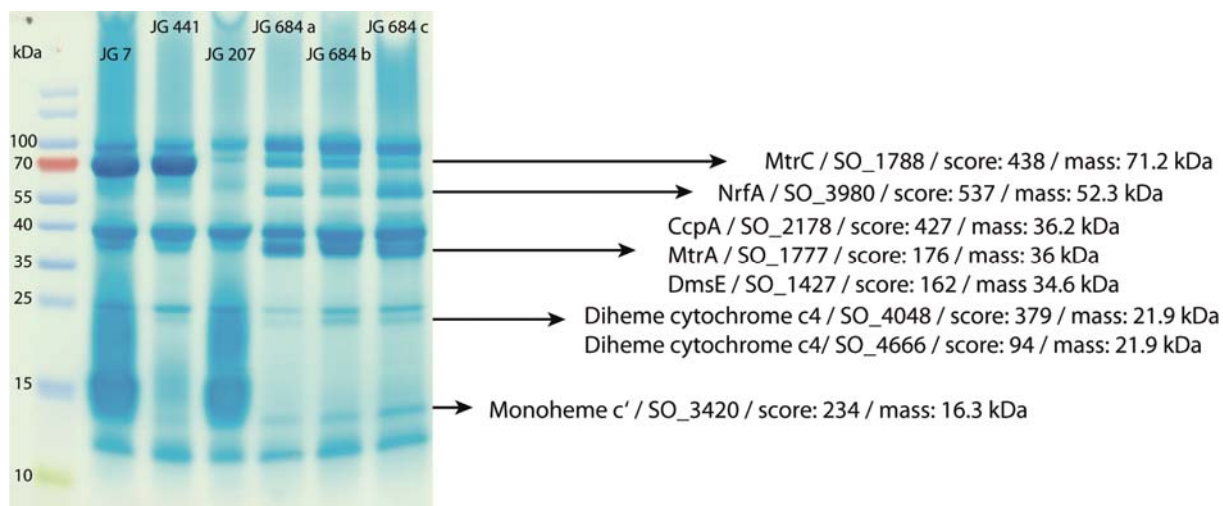
711

712

713

714

715 **Figure S2**



716

717

718

719 **Table S1**

720 Table S1: Strains used in this study.

Bacterial strain	Feature	Source reference or
JG7	<i>S. oneidensis</i> MR-1, wild-type strain	DSMZ
JG207	<i>S. oneidensis</i> $\Delta fccA$	(8)
JG441	<i>S. oneidensis</i> $\Delta cctA$	This study
JG684	<i>S. oneidensis</i> $\Delta fccA\Delta cctA$	This study
JG700	JG684 pBAD_ <i>cctA</i>	This study
JG837	JG684 pBAD_ <i>fccA</i>	This study

721

722 **Table S2**

723 Table S2: Primers used in this study.

1	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGCGGGCAAGAATAAGATG
2	CTTAATCTAAATAGACTTGGCAATTGTATCCTCCAATGGTG
3	GCCAAGTCTATTTAGATTAAG
4	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGCTGAAGTTGCCGCGG
5	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAGCAAAA AACTATTAAG
6	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTACTTCTTCAGA ACAGACG
7	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGATGAAGAAG ATGACAGG
8	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTACTTGTAAGT CGCTTCGC

724



1 Unbalanced fermentation in *Escherichia coli* via heterologous production  
2 of an electron transport chain and connection to anodes in microbial fuel  
3 cells

4 Katrin Sturm-Richter<sup>1</sup>, Frederik Golitsch<sup>1</sup>, Gunnar Sturm<sup>1</sup>, Elena Kipf <sup>2</sup>, André  
5 Dittrich<sup>3</sup>, Sven Kerzenmacher<sup>2</sup> and Johannes Gescher<sup>1\*</sup>

6

7 <sup>1</sup> Institute for Applied Biosciences, Department of Applied Biology, Karlsruhe Institute of Technology,  
8 Fritz-Haber-Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany

9 <sup>2</sup> Laboratory for MEMS Applications, IMTEK – Department of Microsystems Engineering, University of  
10 Freiburg, Georges-Koehler-Allee 103, D-79110 Freiburg, Germany

11 <sup>3</sup> Institute of Photogrammetry and Remote Sensing, Englerstraße 7, D-76131 Karlsruhe, Germany.

12

13

14

15

16 \*Corresponding author:

17 Phone:+49-721-608-41940. Fax:+49-721-608-41941.

18 E-mail: [johannes.gescher@kit.edu](mailto:johannes.gescher@kit.edu)

19

20

21

22

23

24

25

26 **Highlights**

- 27 - Mass spectrometric screen for periplasmic cytochromes in *S. oneidensis*
- 28 - Functional screen for cytochromes with respiratory activity in *Escherichia coli*
- 29 - Development of a methylene blue-assisted anode respiration system in *E. coli*
- 30 - New electron transport chain contains the cytochromes CymA, MtrA and STC
- 31 - Respiratory chain leads to anode-assisted anaerobic glycerol respiration

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52 **Abstract**

53 Microbial fuel cells are an emerging technology for achieving unbalanced  
54 fermentations. However, organisms that can serve as potential biocatalysts for this  
55 application are limited by their narrow substrate spectrum. This study describes the  
56 reprogramming of *Escherichia coli* for the efficient use of anodes as electron  
57 acceptors. Electron transfer into the periplasm was accelerated by 89% via  
58 heterologous expression of the c-type cytochromes CymA, MtrA and STC from  
59 *Shewanella oneidensis*. STC was identified as a target for heterologous expression  
60 via a two-stage screening approach. First, mass spectroscopic analysis revealed  
61 natively expressed cytochromes in *S. oneidensis*. Thereafter, the corresponding  
62 genes were cloned and expressed in *E. coli* to quantify periplasmic electron transfer  
63 activity using methylene blue. This redox dye was further used to expand electron  
64 transfer to an anode surface. The results demonstrate that *E. coli* can be  
65 reprogrammed from glycerol fermentation to respiration upon production of the new  
66 electron transport chain.

67

68

69

70

71

72 **Keywords**

73 c-type cytochrome, unbalanced fermentation, *E. coli*, microbial fuel cell, methylene  
74 blue, *Shewanella oneidensis*

75

76

77

## 78 **1 Introduction**

79

80 In microbial fuel cells (MFCs) microbes use anodes as electron acceptors. In contrast  
81 to all other respiratory electron sinks that can be utilized by microorganisms, anodes  
82 cannot be depleted. Thus, anodes offer the biotechnological possibility of developing  
83 anaerobic pathways that do not need to be stoichiometrically balanced with respect  
84 to the oxidation states of substrates and products (Flynn et al., 2010). Hence, the  
85 benefit of the increased catabolism that prevails under anoxic conditions can be  
86 exploited without continuously feeding anaerobic respiratory electron acceptors that  
87 would subsequently accumulate in a reduced form in the fermentation broth. Anode  
88 respiration is dependent on extended respiratory chains that connect intracellular  
89 oxidation processes to cell surface-localized terminal electron transfer reactions.  
90 Certainly, evolution did not select for anode-reducing organisms, but the electrode  
91 mimics the surface of insoluble electron acceptors, such as ferric oxide and  
92 manganese oxide (Logan and Regan, 2006a; Logan and Regan, 2006b; Logan,  
93 2009; Rabaey et al., 2007; Richter et al., 2012).

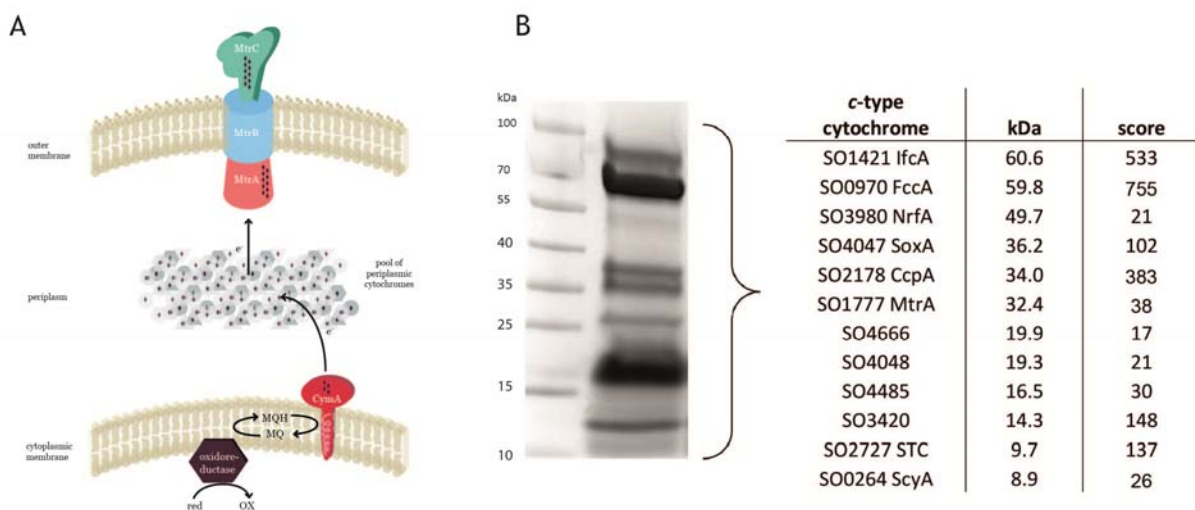
94

95 The number of isolated species that can conduct extracellular respiration is steadily  
96 rising (Sturm et al., 2012). Nevertheless, the proteobacteria *Shewanella oneidensis*  
97 and *Geobacter sulfurreducens* remain the model organisms for studying (i) the  
98 biochemistry that enables extracellular respiration and (ii) the physiology of microbes  
99 with extended respiratory chains. For both organisms, multiple lines of evidence  
100 suggest that *c*-type cytochromes play a major role as electron transfer proteins  
101 (Mehta et al., 2005; Shi et al., 2007). Consequently, mutants of *S. oneidensis* that  
102 harbor an inactive *c*-type cytochrome maturation machinery, which is encoded by the  
103 *ccm* genes, are unable to respire on insoluble electron acceptors (Bouhenni et al.,

104 2005; Carpentier et al., 2005). Interestingly, the minimal set of proteins required for  
 105 transporting electrons to the cell surface has not yet been determined. This lack of  
 106 knowledge is likely due to (i) the enigmatic co-expression of multiple c-type  
 107 cytochromes under anoxic conditions, (ii) the apparent interconnection of multiple  
 108 electron transfer pathways and (iii) the redundant activity of some of the expressed  
 109 cytochromes. However, some proteins are indispensable for ferric iron and anode  
 110 reduction in *S. oneidensis* (fig. 1A) (Bretschger et al., 2007; Gao et al., 2010; Myers  
 111 and Myers, 2003).

112

Fig. 1



113

114 **Fig. 1: Periplasmic c-type cytochromes expressed under iron reducing conditions in *S. oneidensis* MR-1.** **A** Overview of  
 115 components involved in the dissimilatory reduction of iron in *S. oneidensis*. The menaquinol oxidase CymA transports  
 116 respiratory electrons into the periplasm. Here, a pool of different c-type cytochromes exists that can be reduced by CymA. So far  
 117 it is unknown whether a specific electron transport pathway through the periplasm exists or it is a rather stochastic process in  
 118 which a multitude of c-type cytochromes are involved. Electrons are transported through the outer membrane via a three protein  
 119 complex, consisting out of the two cytochromes MtrA and MtrC and the connecting  $\beta$ -barrel protein MtrB. MtrC is the terminal  
 120 reductase of the electron transport chain to ferric iron or an anode. **B** Heme stain of a periplasmic protein fraction derived from  
 121 *S. oneidensis* cells grown under ferric iron reducing conditions. The periplasmic fraction was either used for MudPIT or MS  
 122 analysis. Heme-staining positive bands were furthermore excised from the gel and directly analyzed by mass spectrometry. All  
 123 identified cytochromes and their corresponding sizes and scores are listed in the table.

124

125 The tetraheme *c*-type cytochrome CymA directs electrons from the menaquinol pool  
126 to several reductases in the periplasm. Hence, *cymA*<sup>-</sup> mutants are unable to use a  
127 multitude of anoxic electron acceptors, including ferric iron and anodes (Myers and  
128 Myers, 1997; Schwalb et al., 2003). Beyond CymA, MtrA is the only other periplasmic  
129 cytochrome that is required for iron and anode respiration (Bretschger et al., 2007;  
130 Hartshorne et al., 2007; Schickberger et al., 2013). This requirement might be due to  
131 a dual function of this protein. MtrA is part of an outer membrane-spanning complex  
132 that is necessary for electron transfer across the outer membrane. In this complex,  
133 the  $\beta$ -barrel protein MtrB appears to connect the outer membrane cytochrome and  
134 terminal reductase MtrC to MtrA, enabling outer membrane-spanning electron  
135 transfer. Further, MtrA prevents the degradation of MtrB by the periplasmic protease  
136 DegP (Schicklberger et al., 2011). Among the array of expressed periplasmic *c*-type  
137 cytochromes, two proteins are produced in larger amounts (Fonseca et al., 2013;  
138 Meyer et al., 2004, Tsapin et al., 2001). Surprisingly, one of these proteins is the  
139 respiratory fumarate reductase of *S. oneidensis* (FccA), which in contrast to the  
140 fumarate reductases of other organisms, is a soluble periplasmic heme-flavoprotein.  
141 The small tetraheme cytochrome STC (SO2727) is the second highly expressed  
142 periplasmic *c*-type cytochrome. The exact role of this protein in iron or anode  
143 reduction remains uncertain, although detailed studies regarding the structure and  
144 electrochemical properties of this protein have been published (Fonseca et al., 2009;  
145 Paquete et al., 2010; Qian et al., 2011).

146

147 The restricted substrate spectrum of *S. oneidensis* is a major limitation in the context  
148 of MFC applications. This organism uses only typical fermentation end products as  
149 electron donors under anoxic conditions (Scott and Nealson, 1994; Yang et al.,  
150 2006). This behavior excludes the utilization of cheap and industrially important

151 carbon sources, such as pentose and hexose sugars. In fact, a restricted carbon  
152 spectrum is a typical characteristic of most exoelectrogenic species. This  
153 disadvantage could be obviated by connecting a metabolically versatile and  
154 genetically tractable bacterium, such as *Escherichia coli*, to anodes. This study  
155 describes the acceleration of periplasmic electron transfer in *E. coli* via the  
156 expression of *c*-type cytochromes and demonstrates that this periplasmic electron  
157 transfer can be expanded to an anode surface if a suitable electron shuttle is used to  
158 bridge the insulating outer membrane. Screening of naturally expressed cytochromes  
159 from *S. oneidensis* that were previously detected using a mass spectrometry  
160 approach identified candidate cytochromes for expression in *E. coli*. In addition to  
161 enabling anode respiration in *E. coli*, co-cultivation with a methanogenic species is  
162 demonstrated to promote substrate conversion, even under anode-reducing  
163 conditions.

164

## 165 **2 Materials and Methods**

166

### 167 **2.1 Bacterial strains and culture conditions**

168 All strains used in this study are listed in table S1. *E. coli* strains were routinely pre-  
169 cultured in LB medium at 37°C. Anaerobic growth experiments were conducted in M4  
170 minimal medium (Schuetz et al., 2001) or bicarbonate-buffered medium (Dolch et al.,  
171 2014) supplemented with trace elements (100 µM CaCl<sub>2</sub>, 5 µM CoCl<sub>2</sub>, 0.2 µM  
172 CuSO<sub>4</sub>, 57 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5.4 µM FeCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 µM MnSO<sub>4</sub>, 67.2 µM  
173 Na<sub>2</sub>EDTA, 3.9 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1.5 µM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 µM NiCl<sub>2</sub>, and 1 µM  
174 ZnSO<sub>4</sub>), 0.1% yeast extract, 14.8 µM thiamin hydrochloride as well as 20 mM glucose  
175 or 40 mM glycerol as electron donor and 50 mM DMSO as electron acceptor. pH was  
176 adjusted to 7.4 in all media. Anaerobic cultures were grown in bottles sealed with

177 rubber stoppers. A total of 15 cycles of flushing the head-space with N<sub>2</sub> gas and  
178 removing the gas phase via the application of a vacuum were routinely used to  
179 remove oxygen from the M4 medium. The bicarbonate-buffered medium was boiled  
180 for 10 minutes to achieve anoxic conditions and subsequently flushed with N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>  
181 gas (80:20) for 30 minutes. In the bicarbonate-buffered medium, pH was adjusted  
182 after autoclaving. If necessary, media were supplemented with 30 µg/ml of  
183 chloramphenicol and/or 100 µg/ml of ampicillin. Increased production of c-type  
184 cytochromes in *E. coli* was achieved via transformation with plasmid pEC86, which  
185 carries a copy of the endogenous *ccm* genes (Thony-Meyer et al., 1995).

186

187 *Methanobacterium formicicum* was grown at 37°C in bicarbonate-buffered medium  
188 supplemented with 2 g/l sodium formate. The medium was further supplemented with  
189 trace elements (see above) and vitamins (2 mg/l biotin, 2 mg/l folic acid, 10 mg/l  
190 pyridoxine-HCl, 5 mg/l thiamin, 5 mg/l riboflavin, 5 mg/l nicotinic acid, 5 mg/l DL-Ca-  
191 pantothenat, 0.1 mg/l vitamin B12, 5 mg/l P-aminobenzoic acid, 5 mg/l liponic acid).  
192 In addition, 1 mM cysteine, 0.2 mM sodium ascorbate and 2.1 mM Na<sub>2</sub>S were added  
193 to the medium after autoclaving to provide reduced conditions.

194

195 *Shewanella oneidensis* was cultivated aerobically at 30°C aerobically in LB medium  
196 or anoxically in M4 mineral medium (see above), with 50 mM lactate as electron  
197 donor and 50 mM fumarate or ferric citrate, respectively, as electron acceptor. If  
198 necessary, the media were supplemented with 50 µg/ml kanamycin.

199

## 200 **2.2 Plasmid cloning and strain development**

201 Standard methods were used for DNA amplification, purification, cloning, and  
202 transformation. All cloning products were verified by sequencing (GATC, Germany).



203 Plasmids with different periplasmic c-type cytochromes were constructed using the  
204 isothermal ligation method described by Gibson et al. (2009). Briefly, vector  
205 pMALp2e was digested with the restriction enzymes *NdeI* and *XbaI* and the  
206 cytochrome genes were amplified using primers containing regions homologous to  
207 the digested plasmid (table S2, P5-P30). Whenever a gene started with GTG as start  
208 codon, the first nucleotide of the gene was changed from G to A to improve  
209 expression. It is important to note that this change does not change the amino acid  
210 sequence of the expressed protein, as the first amino acid is part of the leader  
211 peptide that is cleaved from the protein after sec-dependent transport into the  
212 periplasm. Equimolar concentrations of plasmid and insert DNA were used in the  
213 ligation reaction. Strain JG146 (Schuetz et al., 2009), which carries an operon that  
214 encodes *cymA* and *mtrA* under the control of the tetracycline promoter, was  
215 transformed with the different plasmids. For further characterization, STC was  
216 subsequently integrated into the genome of strain JG146 using CRIM plasmid-based  
217 integration, as described previously (Haldimann and Wanner, 2001). Plasmid pAH95  
218 was digested with *PstI* and *SmaI*. *Stc* and an arabinose promoter were amplified  
219 using primers P1-P4 (table S2). All three fragments were ligated according to the  
220 aforementioned ligation method (Gibson et al., 2009).

221

222 Plasmid pBAD\_STC<sub>his</sub> was constructed using the isothermal ligation method, as  
223 described above. The plasmid was digested with *NcoI* and *PmeI*. *Stc* was amplified  
224 using primers P31 and P32. Primer P32 was designed to introduce an N-terminal  
225 His-tag (table S2).

226

227

228

## 229 **2.3 Cell suspension assay with shuttling components**

230 Cells were grown anaerobically in M4 medium with 0.5% glycerol and 50 mM DMSO.  
231 At an OD<sub>600</sub> of 0.3, cells were harvested and washed twice under anoxic conditions in  
232 medium without electron acceptor. The OD was adjusted to 1 and 100 µl of cells  
233 were transferred to a 96 well plate. The cell suspension assay was carried out in a  
234 plate reader (Infinite Pro M200, Tecan, Austria). The reader's dispenser tool was  
235 used to add 100 µl of a 100 µM solution of the shuttling component. Reduction was  
236 recorded for 10 minutes immediately after the addition of the electron acceptor.  
237 Methylene blue and "new methylene blue" reduction were measured at 660 nm,  
238 resorufin reduction was measured at 572 nm, safranin O reduction was measured at  
239 512 nm and benzyl viologen reduction was measured at 399 nm (Roller, 1984).

240

## 241 **2.4 Electrochemical experiments**

### 242 **2.4.1 Single strain experiments**

243 The electrochemical setup used in this study was previously described by Kloke et al.  
244 (2010). The dual chamber microbial fuel cell was separated using a semi-permeable  
245 Fumion F950 proton exchange membrane (Quintech, Germany). 2.25 cm<sup>2</sup> graphite  
246 felt material (SGL Carbon SE, Germany) were used as working electrode (anode)  
247 and counter electrode (cathode). A saturated calomel electrode (Sensortechnik  
248 Meinsberg, Germany), which served as reference electrode was separated by a  
249 second Fumion membrane. In all experiments the anode chamber contained 25 ml of  
250 bicarbonate-buffered medium with appropriate carbon sources and inductors,  
251 whereas the cathode and reference electrode chambers contained 25 ml and 5 ml of  
252 bicarbonate-buffered medium without a carbon source, respectively.

253 Cells were pregrown anaerobically in bicarbonate-buffered medium with 20 mM  
254 glucose or 40 mM glycerol as carbon source and 50 mM DMSO as electron acceptor.

255 They were harvested at an OD<sub>600</sub> of 0.4 and washed twice with electron acceptor free  
256 medium. Thereafter, the OD was adjusted to 0.4 in medium containing carbon source  
257 and 10 µM methylene blue as well as the appropriate supplements and inductors.  
258 Cells were transferred into the working electrode chamber and the 3 electrode setup  
259 was connected to a potentiostat (Pine Instruments, USA), which applied a constant  
260 potential of -44 mV versus a saturated calomel electrode (SCE, Sensortechnik  
261 Meinsberg, Germany). The applied potential was converted to normal hydrogen  
262 electrode (NHE)-potential by the addition of 244 mV. The anode chamber was  
263 continuously flushed with N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas (80:20) to provide anoxic conditions. Samples  
264 were collected at different time points throughout the experiment. These samples  
265 were centrifuged and the supernatants were filtered through a 0.2 µm filter.

266 Polarization curves were run in the above-described electrochemical setup and at a  
267 scan rate of 5.5\*10<sup>-5</sup> V/s with 40 mM glycerol as electron donor and 50 µM methylene  
268 blue as electron shuttle.

269

#### 270 **2.4.2 Co-cultivation experiment.**

271 The co-cultivation experiment was performed using a newly designed reactor setup  
272 containing a 2 l anode chamber, as depicted in Fig. S1. A 16 cm<sup>2</sup> graphite felt (SGL  
273 Carbon SE, Germany) was used as working electrode (anode) material and a  
274 platinum gauze (0.5 x 5 cm, 1024 mesh / cm<sup>2</sup>; wire 0.06 mm diameter) inside a  
275 porous glass tubus served as counter electrode (cathode). A saturated calomel  
276 electrode (Sensortechnik Meinsberg, Germany) was used as reference electrode (fig.  
277 S1). *M. formicicum* was grown to a protein concentration of 0.1 mg/ml in bicarbonate-  
278 buffered medium containing 2 g/l sodium formate. *E. coli* was pre-cultured in  
279 bicarbonate-buffered medium containing 0.5% glycerol and 50 mM DMSO. Cells  
280 were harvested, washed in medium without electron acceptor and added to the

281 culture of *M. formicicum* to a final OD<sub>600</sub> of 0.1. The cell suspension was  
282 supplemented with anhydrotetracycline, arabinose, 10 µM methylene blue and 30  
283 mM glycerol and transferred into the reactor. The setup was connected to a  
284 potentiostat (Pine Instruments, USA) that applied a constant potential of -44 mV vs.  
285 SCE which was converted to NHE-potential like described previously. The cell  
286 suspension was stirred at 150 rpm. Gas volume and composition (CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>)  
287 were recorded using an online detection system (BACCom; Bluesens, Germany).  
288 Samples were collected at different time points, centrifuged and the supernatants  
289 were filtered through a 0.2 µm filter.

290

## 291 **2.5 Quantification of substrate conversion and end product formation**

292 Acetate was detected using a Hitachi LaCrom Elite HPLC system equipped with a  
293 300 x 7.8 mm Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Germany); 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used  
294 as a solvent, with a flow rate of 0.6 ml/min. The analysis was performed at 60°C. A  
295 total of 100 µl of each sample was mixed with 10 µl of 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 90 µl of this  
296 mixture were loaded onto the column. The signal was detected at 210 nm using a  
297 Hitachi L-2455 diode array detector.

298 Concentrations of ethanol, formate and glucose were determined via enzyme assays  
299 according to Gescher et al. (2008). Glycerol concentrations were monitored using the  
300 free glycerol determination kit according to the manufacturers' instructions (Sigma-  
301 Aldrich, Germany).

302

## 303 **2.6 Multidimensional protein identification technology (MudPIT) and mass 304 spectrometry (MS) analysis of periplasmic protein fractions from *S. oneidensis*.**

305 Periplasmic c-type cytochromes expressed under ferric iron reducing conditions were  
306 identified via multidimensional protein identification technology (MudPIT) according to

307 Schicklberger et al. (2011), or directly by mass spectrometry (MS) analysis of isolated  
308 heme-positive bands, as described previously (Schuetz et al., 2009).

309

## 310 **2.7 Cell fractionation and protein determination**

311 The periplasmic fractions of anaerobically grown *S. oneidensis* and *E. coli* cells were  
312 prepared using polymyxin B, as described by Pitts et al. (2003). To prepare  
313 membrane fractions, *E. coli* cells were grown anaerobically in M9 minimal medium  
314 (47.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.2 mM NaCl, 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl) supplemented  
315 with 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, trace elements (see above), 0.1% casein  
316 hydrolysate, and 14.8 μM thiamin hydrochloride. In addition, 0.5% glycerol was used  
317 as electron donor and 50 mM DMSO as electron acceptor. Cells were harvested at  
318 an OD<sub>600</sub> of 0.4 and all subsequent steps were performed under anoxic conditions.  
319 The pellet was re-suspended in 1 volume of 0.1 M HEPES (pH 7.5) containing 0.1  
320 mg/ml DNase I and passed through a French pressure cell at 137 MPa. Unbroken  
321 cells were removed by two consecutive centrifugations for 10 min at 3,000 x *g* and  
322 4°C. The supernatant was centrifuged at 208,000 x *g* and 4°C for 90 min. The pellet  
323 containing the cell membranes was re-suspended in 0.1 M HEPES (pH 7.5). Protein  
324 concentration was determined via the Bradford method, using bovine serum albumin  
325 as a standard (Bradford, 1976).

326

## 327 **2.8 Protein purification**

328 *S. oneidensis* carrying the pBAD\_STC<sub>his</sub> plasmid was grown in LB medium, and the  
329 expression of STC<sub>his</sub> was induced with 0.1 mM L-arabinose. Cells were harvested at  
330 an OD<sub>600</sub> of 0.6 and the periplasmic fraction was isolated as described above. The  
331 periplasmic fraction was loaded onto a His Trap affinity column (GE Healthcare,  
332 Germany) and the column was washed with 20 column volumes of washing buffer

333 (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4).  $STC_{his}$  was  
334 eluted using 10 column volumes of elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M  
335 NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4). The protein was subsequently concentrated using  
336 centrifugal filter units (Amicon Ultracel 3-K, Merk Millipore, Ireland).

337

## 338 **2.9 Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis**

339 Gel electrophoresis was performed using Ready Gel<sup>®</sup> Tris-HCl Precast Gels  
340 according to the manufacturers' instructions (Biorad, Germany). Proteins were  
341 visualized via heme-linked peroxidase staining as described previously (Thomas et  
342 al., 1976).

343

## 344 **2.10 Enzyme assay with CymA and STC**

345 The enzyme assay was conducted as described previously (Schuetz et al., 2009).  
346 Strain JG11 was grown anaerobically in M9 minimal medium (see above). The *cymA*-  
347 containing operon was induced with 0.43  $\mu$ M anhydrotetracycline. As a control, JG11  
348 was grown under the same conditions without the addition of anhydrotetracycline.  
349 Membrane fractions and purified protein were prepared as described above. The  
350 membrane fraction was added to an anoxic cuvette with 0.1 M HEPES and 10 mM  
351 glycerol-3-phosphate. The reaction was started via the addition of 1.5 nmol STC, and  
352 cytochrome reduction was observed at 552 nm using a Cary 50 spectrophotometer  
353 (Varian, Germany). The determined rates varied within a range of less than 10%.  
354 Membrane integrity was confirmed using NADH dehydrogenase activity (Osborn et  
355 al., 1972). Briefly, 0.15 mg of membrane protein was added to 0.1 mM NADH in 100  
356 mM HEPES buffer (pH 7.5) and the oxidation of NADH was monitored at 365 nm  
357 using a Cary 50 spectrophotometer.

358

## 359 **2.11 Statistical analysis**

360 Statistical analysis was conducted using "R" (<http://www.r-project.org/>). All data sets  
361 were normally distributed. Welch Two Sample t-test was used to determine  
362 significance of the data. The level of significance was set to 5%.

363

364

365

## 366 **3 Results and Discussion**

367

### 368 **3.1 Periplasmic c-type cytochromes of *S. oneidensis***

369 This study aimed to develop an *E. coli* strain that exhibits an enhanced capacity to  
370 conduct electron shuttle mediated electron transfer onto anode surfaces. Thereby,  
371 the resulting strain should be able to conduct an unbalanced fermentation. We aimed  
372 to achieve this goal via reconstruction of elements of the *S. oneidensis* extracellular  
373 electron transport machinery in *E. coli*. Hence, the periplasmic c-type cytochromes  
374 expressed under ferric iron reducing conditions were first inventoried using a mass  
375 spectrometry approach. A multitude of available evidence demonstrates that the  
376 electron transport chains to ferric iron and an anode surface are highly similar  
377 (Golitsch et al., 2013; Richter et al., 2012). *S. oneidensis* cells were grown  
378 anaerobically with ferric citrate as an electron acceptor, and the periplasmic fraction  
379 was isolated. Using MudPIT analysis of the total periplasmic fractions and MS  
380 analysis of the heme-positive bands extracted from an SDS gel, 12 soluble c-type  
381 cytochromes were identified in the periplasm. The detected cytochromes and the  
382 accompanying scores are listed in Figure 1B. Several of these cytochromes are  
383 involved in anaerobic respiration. MtrA (SO1777) is the only periplasmic cytochrome  
384 that was demonstrated to be involved in electron transfer to the cell surface.

385 Consequently, deletion mutants in the corresponding gene exhibit a severe iron  
386 reduction phenotype (Bretschger et al., 2007). FccA (SO0970) is a tetraheme  
387 flavocytochrome and the respiratory periplasmic fumarate reductase of *S. oneidensis*  
388 (Gordon et al., 1998; Schuetz et al., 2009). NrfA (SO3980), which is a pentaheme  
389 cytochrome, catalyzes the conversion of nitrite to ammonium (Gao et al., 2010) and  
390 appears to be reduced directly by CymA. ScyA (SO0264) catalyzes electron transfer  
391 between CymA and the periplasmic peroxidase CcpA (SO2178; Schuetz et al.,  
392 2011). The physiological roles of the other detected cytochromes are currently  
393 unknown.

394

### 395 **3.2 Construction of an advanced methylene blue reducing strain**

396 The strain development described here builds upon an *E. coli* strain that carries an  
397 operon encoding *cymA* and *mtrA* in its genome (Schuetz et al., 2009). The strain was  
398 further modified by the deletion of gene clusters encoding fumarate and periplasmic  
399 nitrate dehydrogenase (*frdA-D* and *napC-F*, respectively). CymA expression converts  
400 *E. coli* into a dissimilatory reducer of NTA-chelated ferric iron (Gescher et al., 2008).  
401 The rate of ferric iron reduction can be further increased by co-expression of MtrA  
402 (Schuetz et al., 2009). Because iron reduction experiments are time consuming, a  
403 novel assay was developed to study and compare periplasmic electron transfer  
404 reactions in *E. coli*. This assay can be conducted continuously and in parallel if a  
405 plate reader containing a dispenser tool is available. In the assay, the reduction of a  
406 redox mediator is quantified. Therefore, five mediators with different redox potentials  
407 (Roller et al., 1984) were analyzed for their application in the assay and only  
408 methylene blue was reduced efficiently by *E. coli* (data not shown). Methylene blue is  
409 a membrane-permeable redox shuttle and can be reduced by a variety of cellular  
410 proteins with suitable redox potentials, including c-type cytochromes (fig. 2A). We

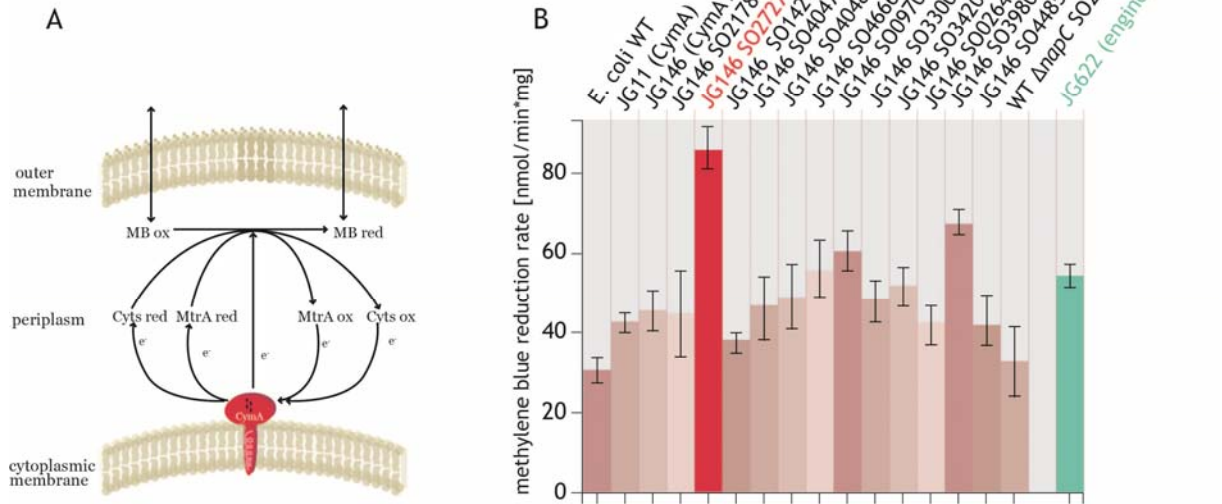


411 measured a nearly 40% increase in the methylene blue reduction rate of the *cymA*-  
412 expressing *E. coli* strain (strain JG11) compared to the wild type. Further co-  
413 expression of MtrA resulted in a comparably minor increase of 13% (fig. 2B). This  
414 demonstrates that the expression of one or more *c*-type cytochromes strongly  
415 enhances the capacity of *E. coli* to transfer electrons to methylene blue. Thereafter, it  
416 was searched for other potential target genes whose expression could further  
417 increase the rate of methylene blue reduction. Apart from MtrA, all *c*-type  
418 cytochromes detected under ferric iron reducing conditions were cloned into an  
419 inducible plasmid. In addition, gene SO3300 was also cloned because its  
420 transcription was shown to be highly up-regulated under iron reducing conditions  
421 (Beliaev et al., 2005). Co-expression of most of the additional cytochromes either  
422 exerted a small positive effect on the methylene blue reduction rate or reduced the  
423 capacity of the strain to conduct electron transfer onto this redox shuttle.  
424 Nevertheless, expression of the small tetraheme cytochrome STC resulted in an  
425 183% increase in the methylene blue reduction rate compared to the wildtype (Fig.  
426 2B).

427

428

Fig. 2



429

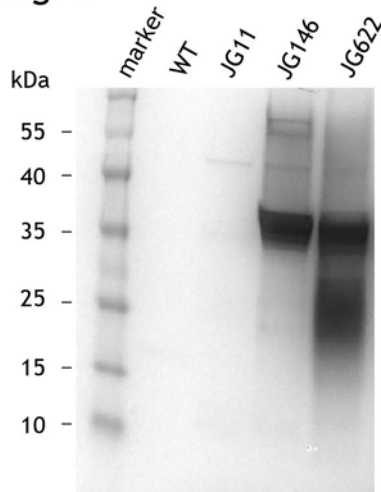
430 **Fig. 2: Methylene blue reduction in various *E. coli* strains.** **A** Overview of potential electron transfer reactions in the  
431 periplasm. Methylene blue is membrane permeable and is able to diffuse into the periplasm, where it can be reduced by the  
432 heterologously expressed *c*-type cytochromes. The abbreviation *Cyts* refers to different periplasmic *c*-type cytochromes  
433 belonging to the pool of previously identified proteins from *S. oneidensis*. **B** Methylene blue reduction rates of different *E. coli*  
434 strains in nmol per minute and mg of cell protein. Bars represent the means and error bars the standard deviation of samples  
435 taken in independent triplicates.

436

437 As depicted in figure 3, STC is highly expressed in *E. coli*. Nevertheless, this protein  
438 does not resolve well on an SDS gel; instead, the protein is detected as a rather  
439 broad band between 15 and 25 kDa. It is worth noting that the same behavior is  
440 observed in the natural host organism *S. oneidensis*. Therefore, this behavior is not  
441 an artifact of heterologous expression (fig. S2). STC is also highly transcribed in *S.*  
442 *oneidensis* under iron- or anode-reducing conditions, suggesting that this protein  
443 plays a crucial role in periplasmic electron transfer (Firer-Sherwood et al., 2008;  
444 Fonseca et al., 2012). This proposed role is corroborated by the STC-dependent  
445 acceleration of methylene blue reduction described in this study.

446

Fig. 3



447

448 **Fig. 3: Heme stain of periplasmic protein fractions derived from different *E. coli* strains.** 40 µg of the periplasmic fraction  
449 of *E. coli* wild type (WT), *E. coli* expressing *cymA* (JG11), *cymA* and *mtrA* (JG146) as well as *cymA*, *mtrA* and *stc* (JG622),  
450 respectively, were loaded on an SDS-polyacrylamide gradient gel (8-16%) and stained for heme-linked peroxidase activity.  
451 Bands at ~35 kDa show MtrA and the broad band between 15 and 25 kDa indicates STC. Please note that CymA cannot be  
452 detected since it is a membrane-bound protein.

453

### 454 3.3 CymA dependence of in vivo and in vitro STC reduction in *E. coli*

455 The next series of experiments was conducted to verify that the electrons being  
456 transferred from STC to methylene blue are of respiratory origin and are transported  
457 into the periplasm via CymA. Therefore, the above-described methylene blue  
458 reduction cell suspension assay was repeated with an *E. coli* strain that produces  
459 neither CymA nor the homologous protein NapC. A *napC* deletion strain was chosen  
460 because previous experiments revealed overlapping activity of these quinol oxidases  
461 (Gescher et al., 2008). STC expression in this *cymA*<sup>-</sup> and *napC*<sup>-</sup> strain resulted in  
462 minor differences in methylene blue reduction compared to *E. coli* wild type (fig. 2B).  
463 In other words, the positive effect of STC expression on methylene blue reduction is  
464 dependent on CymA-based electron transfer into the periplasm. Nevertheless, it  
465 remained unknown whether STC can be reduced directly by CymA or whether its  
466 reduction has to be mediated via MtrA. Previous studies demonstrated that *E. coli*  
467 membrane fractions containing CymA can be reduced in vitro using glycerol-3-

468 phosphate as electron donor (Gescher et al., 2008) and that membrane-bound CymA  
469 can transfer electrons to purified periplasmic cytochromes, such as MtrA and FccA  
470 (Schuetz et al., 2009). In this assay, trace amounts of *E. coli* membrane fractions  
471 catalyze the reduction of higher concentrations of purified cytochromes. The  
472 reduction of hemes can be monitored at a wavelength of 552 nm. Membrane  
473 fractions of *E. coli* JG11 cells in which CymA production was previously either  
474 induced or not induced were prepared anoxically and different amounts of protein  
475 were added to an anoxic cuvette containing glycerol-3-phosphate as electron donor.  
476 After the addition of 1.5 nmol purified STC<sub>his</sub>, a reduction rate of 47 nmol/min\*mg  
477 membrane protein was recorded for the CymA-expressing membrane. No reduction  
478 of STC<sub>his</sub> could be detected when un-induced membranes were tested. Membrane  
479 integrity was verified via the quantification of the NADH oxidation rate; both  
480 membranes oxidized NADH with comparable rates (554 nmol/min\*mg for membranes  
481 from induced cells versus 673 nmol/min\*mg for membranes from uninduced cells),  
482 confirming the integrity and electron transfer properties of the membranes.

483

#### 484 **3.4 Genome integration of an STC expression module**

485 Due to the promising results obtained with STC, the corresponding gene was  
486 integrated into the genome of *E. coli* JG146. Thereby, the permanent addition of an  
487 antibiotic to maintain the plasmid was avoided in subsequent electrochemical  
488 experiments. The addition of the *stc* gene to the genome of *E. coli* resulted in an  
489 engineered strain (JG622) that exhibited an increase of 78% in the methylene blue  
490 reduction rate compared to the wild type and an increase of 20% compared to JG146  
491 expressing CymA and MtrA (fig. 2B). A lower reduction rate compared to the strain  
492 that expresses STC from a plasmid was expected due to the difference in copy  
493 number. Nevertheless, the results demonstrate that electron transfer from CymA into

494 the periplasm is not limiting and that a further increase in methylene blue reduction  
495 can be expected if higher expression levels are achieved.

496

### 497 **3.5 Electrochemical experiments: Current generation from glucose and** 498 **glycerol**

499 The previous experiments clearly demonstrated that respiratory electrons can be  
500 transported into the periplasm of the engineered *E. coli* strain via the heterologously  
501 expressed CymA-MtrA-STC module. To use this ability to achieve unbalanced  
502 fermentation, we aimed for constant anode-supported re-oxidation of methylene blue  
503 in microbial fuel cells. The electrochemical performance during glucose and glycerol  
504 oxidation catalyzed by the engineered strain JG622 and wild type *E. coli* were  
505 compared. Anodes were poised to a constant potential of 200 mV versus NHE and  
506 the anode chamber was constantly flushed with N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gas to limit the possibility of  
507 oxygen intrusions into this compartment. A 10 μM concentration of methylene blue  
508 was added to the medium to serve as electron shuttle.

509

510 With glucose as an electron donor, the current production reached a maximum of  $9 \pm$   
511  $3.4 \mu\text{A per cm}^2$  of anode surface for the wild-type strain and  $20 \pm 3.6 \mu\text{A per cm}^2$  for  
512 the engineered strain after a short lag phase before declining due to glucose  
513 depletion (Fig. 4A). This finding implies a 2.2-fold accelerated current production  
514 when the selected *c*-type cytochromes are heterologously expressed in *E. coli*. In  
515 addition, this is consistent with the results from the cell suspension experiment, which  
516 revealed a corresponding 1.8-fold increase in methylene blue reduction. Interestingly,  
517 when the anode was not poised to a potential, the maximum specific consumption  
518 rate of glucose was as fast as that observed when a potential was applied (Fig. 4C).  
519 This observation suggests that most of the glucose is oxidized fermentatively and

520 that the anode is not essential as an electron acceptor. However, the expression of  
521 cytochromes strongly enhances the electron transfer rate to the anode, indicating that  
522 the synthetic respiratory electron outlet is active, even under conditions that support  
523 fermentative growth of *E. coli*.

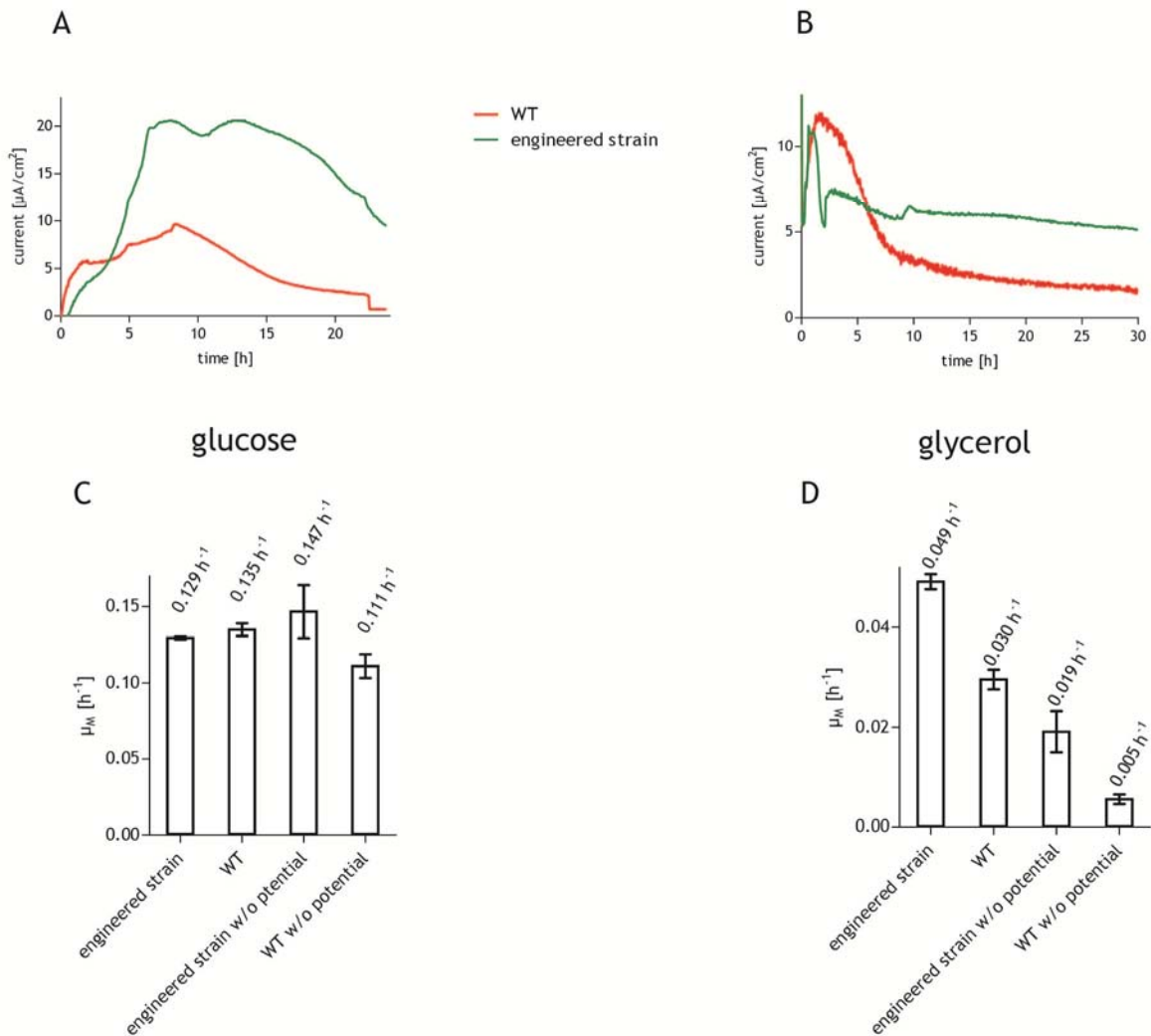
524

525 As depicted in Fig 4B, the progression of current production over time is different  
526 when glycerol is used as electron donor instead of glucose. For the wild-type and  
527 engineered strains, current production immediately increased to a maximum current  
528 of approximately  $12.0 \pm 1.3 \mu\text{A per cm}^2$  for the wild-type strain and  $11.6 \pm 1.1 \mu\text{A per}$   
529  $\text{cm}^2$  for the mutant and subsequently dropped and leveled off to a constant current  
530 production between 12 and 30 hours. Over 30 hours, the engineered strain produced  
531 an average current of  $5.9 \pm 1.1 \mu\text{A per cm}^2$ , which is 1.5-fold higher than the wild-type  
532 strain, which produced  $3.9 \pm 0.7 \mu\text{A per cm}^2$ . Within this period, the engineered strain  
533 consumed 80% of the substrate ( $0.8 \pm 0.06 \text{ mmol glycerol}$ ) with a maximum specific  
534 consumption rate ( $\mu_M$ ) of  $0.049 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ . When no potential was applied to the  
535 anode, less than 40% ( $0.36 \pm 0.04 \text{ mmol}$ ) of the added glycerol was consumed, with  
536 a  $\mu_M$  of only  $0.019 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$  (fig. 4D). This indicates that respiratory electron  
537 transfer assisted in glycerol consumption. MFCs with wild type cells metabolized  $0.68$   
538  $\pm 0.04 \text{ mmol glycerol in 30 h}$ , with a  $\mu_M$  of  $0.030 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ , but only 17% of the  
539 substrate was consumed if the anode was not connected to the potentiostat ( $0.17 \pm$   
540  $0.05 \text{ mmol glycerol}$ ). Of note, the differences of the maximum specific consumption  
541 rates within the four described experiments are of statistical relevance ( $p\text{-value} <$   
542  $0.05$ ). In summary, the insertion of a periplasmic electron pathway resulted in glycerol  
543 consumption rates that were 1.6-fold faster than the wild type if the anode was poised  
544 to a potential of +200 mV versus NHE. Moreover, the addition of methylene blue and  
545 an anode as electron acceptor was necessary for complete substrate consumption.

546 The anode potential of +200 mV was chosen since it is sufficiently more positive than  
547 the midpoint redox potential of methylene blue and because it is an often-used value  
548 in microbial fuel cell research. Nevertheless, half cell polarization curves were  
549 conducted between 0 and +400 mV versus NHE (Fig. S3). The engineered strain  
550 was superior in current production over the whole range of applied potentials. The  
551 maximum current was achieved at +300 mV and current densities leveled off or  
552 decreased slowly with more positive anode potentials. It seems as if faster methylene  
553 blue oxidation at the anode, which is a consequence of higher redox potentials, was  
554 sustained by the microbial reduction of the redox shuttle up to this value of +300 mV.  
555 At higher potentials, the metabolic activity of the cells seems to be rate limiting.

556

Fig. 4



557

558 **Fig. 4: Current generation and substrate consumption in MFCs.** Cells of wild type *E. coli* and engineered strain (JG622)  
559 were compared regarding their electrochemical performance with different carbon sources. A constant potential of + 200 mV vs.  
560 NHE was applied and 10 μM of methylene blue served as electron shuttle. Current production with glucose (A) and glycerol (B)  
561 was measured for both strains in independent triplicates and the mean is depicted in the figures. The determined current varied  
562 in a range of less than 10%. The maximum specific consumption rates per hour (μ<sub>M</sub>) of glucose (C) and glycerol (D) were  
563 measured for wild type and engineered strain; with or without (w/o) a potential applied in the MFCs. Bars represent the means  
564 and error bars the standard deviation for samples taken in independent triplicates. Mean values of μ<sub>M</sub> are depicted above the  
565 bars.

566

### 567 3.6 End product spectrum of anode-assisted glycerol consumption

568 All of the electrochemical experiments described above were conducted in  
569 polycarbonate reactors that were constantly flushed with a carbon dioxide-nitrogen



570 mixture to maintain anoxic or suboxic conditions. In these experiments, we observed  
571 that volatile products, such as formate and ethanol, were removed from the medium  
572 due to this constant gas flow. Nevertheless, the quantification and analysis of the  
573 formation of end products are required for conclusions concerning the presence of a  
574 respiratory metabolism in the engineered *E. coli* strain under anode-reducing  
575 conditions. Glycerol was chosen as a carbon source in these experiments because  
576 an anode-dependent acceleration of glycerol consumption was observed previously.  
577 A new glass reactor was designed; this setup is gas tight and allows the  
578 quantification of the above-mentioned volatile products. Moreover, this setup allows  
579 to measure exhaust gas formation and composition (fig. 5A, fig. S1). Previous  
580 experiments revealed that an accumulation of formate limits glycerol consumption  
581 and that this limitation can be avoided by using a co-culture with the methanogen *M.*  
582 *formicicum* (Richter and Gescher, 2014).

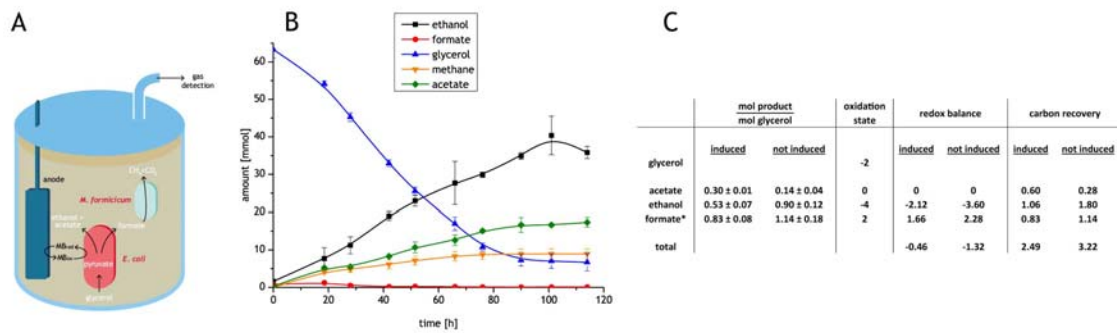
583

584 A total of  $56.6 \pm 2.7$  mmol of glycerol was consumed by the engineered strain within  
585 114 h. The production of ethanol, acetate and methane was simultaneously observed  
586 and quantified (Fig. 5B). Methane production likely resulted from formate oxidation  
587 catalyzed by the methanogen. Consequently, formate was not detectable. Moreover,  
588 we failed to observe the production of lactate or succinate. The latter product was not  
589 detectable due to the  $\Delta frd$  mutation of the engineered *E. coli* strain. Other studies  
590 also reported that lactate was not observed as an end product of anaerobic glycerol  
591 metabolism in *E. coli* (Dharmadi et al., 2006). Interestingly, Emde et al. (1989)  
592 studied glycerol oxidation under conditions of facilitated fermentation with ferricyanide  
593 as redox mediator. The authors observed that lactate was one of the three major  
594 carbon containing end products, indicating that the addition of ferricyanide leads to  
595 alterations in the carbon flux that cannot be observed under circumstances that either

596 enable glycerol consumption without addition of an electron acceptor/mediator or  
597 under anode reducing conditions with methylene blue. As depicted in figure 5C,  
598 under anode-assisted conditions, we observed the formation of  $0.30 \pm 0.01$  mol of  
599 acetate and  $0.53 \pm 0.07$  mol of ethanol per mol of glycerol consumed. Consequently,  
600 the theoretical formation of  $0.83 \pm 0.08$  mol of formate per mol of glycerol must be  
601 assumed. The oxidation of glycerol to pyruvate leads to the release of 4 electrons.  
602 Neither the pyruvate-formate lyase-catalyzed reaction that converts pyruvate to  
603 acetyl-CoA and formate nor the ATP-producing conversion of acetyl-CoA to acetate  
604 recycles any of the released electrons. In contrast, the reduction of acetyl-CoA to  
605 ethanol consumes 4 electrons. Therefore, the non-respiratory consumption of  
606 glycerol should theoretically lead to the production of 1 mol of ethanol and formate  
607 per mol of glycerol consumed, because these values would ensure a completely  
608 (100%) balanced fermentation. However, under anode-assisted conditions, the redox  
609 balance is 23% and this value increases to 66% if the induction of the heterologously  
610 expressed electron transport chain is omitted (Fig. 5C). This finding clearly indicates  
611 that under the latter conditions, non-respiratory glycerol consumption dominates over  
612 respiratory metabolism. In addition, methylene blue-assisted anode reduction is a  
613 new respiratory program that can be activated upon inductor addition. It is worth  
614 noting that under conditions without any terminal electron acceptor, the redox  
615 balance is 95% (Murarka et al., 2008). Hence, we must assume that in the absence  
616 of the respiratory electron transport chain, facilitated fermentation occurs. Because  
617 methylene blue is membrane-permeable, nonspecific cytoplasmic reductases are  
618 likely to participate in the transfer of electrons to the shuttle. This feature was  
619 indicated by the previously described electrochemical performance of wild-type *E.*  
620 *coli* cells.

621

Fig. 5



623

624 **Fig. 5: End product spectrum of anode-assisted glycerol consumption.** The engineered strain JG622 was co-cultured with  
 625 the methanogen *M. formicicum* for 114 h with 60 mmols of glycerol in a single chamber electrochemical setup. **A** Illustration of  
 626 the reactor setup for the co-cultivation experiment. The working electrode was poised at +200 mV vs. NHE and served as an  
 627 anode. Metabolic flux from glycerol to acetate, ethanol and formate and from formate to methane and carbon dioxide is  
 628 depicted. The red organism represents the engineered *E. coli* strain, while the blue organism illustrates *M. formicicum*.  
 629 Methylene blue (MB) is reduced by *E. coli* and re-oxidized at the anode. For simplicity, reference and counter electrode are not  
 630 shown. **B** Glycerol consumption and end product spectrum were quantified and redox balance was calculated (**C**). The carbon  
 631 recovery was calculated in (mol product/mol glycerol) x number of carbon atoms in the molecule. The redox balance was  
 632 calculated in (mol product/mol glycerol) x oxidation state of the molecule. \*No formate was detectable in the electrochemical  
 633 setup, since it was completely oxidized by *M. formicicum*. Therefore, the amount of formate was theoretically calculated based  
 634 on the amount of produced acetate and ethanol.

635

636 The total number of electrons transported to the anode was  $4.5 \cdot 10^{21} \pm 0.37 \cdot 10^{21}$ ,  
 637 which is equivalent to  $7.5 \pm 0.62$  mmol. Thus, a coulombic efficiency of 12% was  
 638 attained because the production of 16 mmol of acetate during this time period led to  
 639 a theoretical release of 64 mmol of electrons. This value is slightly below the range of  
 640 coulombic efficiencies of 15-35% that was reported by Watson and Logan for  
 641 different reactor configurations including *S. oneidensis* MR-1 (Watson and Logan,  
 642 2010). However, the reactor used in this study was not optimized to attain high  
 643 coulombic efficiencies because the counter electrode was separated from the anode

644 chamber by only porous glass. Without the induction of the cytochrome module, the  
645 number of electrons is reduced by nearly 4-fold ( $1.13 \cdot 10^{21} \pm 0.51$  or  $1.9 \pm 0.86$   
646 mmol); this finding again indicates a partially nonspecific reduction of methylene blue.  
647 If the number of electrons transported to the anode is normalized to glycerol  
648 consumed, a 2.6-fold increase was detected in the induced strain (induced: 0.13 mol  
649 of electrons/mol of glycerol; un-induced: 0.05 mol of electrons/mol of glycerol).

650

#### 651 **4 Conclusions**

652 Unbalanced fermentation represents a biotechnological tool for broadening the  
653 spectrum of efficiently producible platform chemicals. Butanediol, itaconic acid, and  
654 terpenes are examples of industrially important compounds that are more oxidized  
655 than glucose or glycerol and therefore cannot be produced as the only end product  
656 under non-respiratory conditions. Aerobic production routines could be an option for  
657 the production of these compounds, but these routines are accompanied by losses  
658 due to the high anabolic substrate consumption that accompanies catabolic reactions  
659 with high energy gain. A carbon anode is currently the only inexhaustible microbial  
660 electron acceptor. Further, the use of such anodes is connected to the beneficial  
661 production of electric energy. A number of organisms conduct this kind of respiration  
662 naturally, but these organisms have not been developed for production processes. In  
663 this study, we show that expression of a module consisting of *c*-type cytochromes  
664 from *S. oneidensis* enables *E. coli* to thrive using an anode as respiratory electron  
665 acceptor. These *c*-type cytochromes build a short respiratory chain into the  
666 periplasm, which is connected to methylene blue as electron acceptor or mediator  
667 between periplasmic electron transfer reactions and an anode surface. The new  
668 respiratory chain accelerates glycerol consumption by *E. coli* and its production leads  
669 to formation of more oxidized end products. The cytochrome module described in this

670 study can be easily transplanted into a variety of production strains. Of note, several  
671 other research groups reported about the reduction of electron mediators by *E. coli*  
672 (Ojima et al. 2014, Park and Zeikus, 2000, Pasco et al., 2000, Roller et al., 1984).  
673 Nevertheless, here we show for the first time the development of a new electron  
674 transport chain in *E. coli* that specifically interacts with the added redox mediator.  
675 Consequently, product formation is to a major extent dependent on the expression of  
676 the new electron transport chain and not only on the presence or absence of a  
677 soluble redox mediator. It is known, that *E. coli* can unspecifically reduce ferricyanide  
678 and that this reduction can sustain anaerobic growth with glycerol, but this process is  
679 metabolically not understood with respect to the cellular redox reactions that are the  
680 basis for this kind of metabolism (Emde et al., 1989). Some researchers were trying  
681 to omit the addition of redox mediators that connect cellular electron flow to insoluble  
682 electron acceptors either by addition of oligoelectrolytes like DSSN<sup>+</sup> that intercalate  
683 in the membrane or by the heterologous expression of the trimeric MtrABC complex  
684 from *S. oneidensis* in *E. coli* (Hou et al., 2013). Recently, it was shown that  
685 membrane integrity was affected by the addition of DSSN<sup>+</sup> and that the interaction of  
686 electroactive cytosolic components with electrodes rather than DSSN<sup>+</sup> directed  
687 electron transfer were the reason for the observed current production (Wang et al.,  
688 2014). Similar to DSSN<sup>+</sup>, expression of higher levels of MtrC is toxic to *E. coli*  
689 (Golitsch et al., 2013). It could be possible that MtrC affects membrane integrity in a  
690 similar way as DSSN<sup>+</sup>. Hence, the low ferric iron reduction activities obtained by  
691 Jensen et al. (2010) with *E. coli* strains that express the MtrABC complex might build  
692 at least in part on a similar interaction of cytosolic compounds with an insoluble  
693 electron acceptor. Moreover, neither the experiments conducted with DSSN<sup>+</sup> nor the  
694 expression of MtrABC in *E. coli* could provide detailed evidence for the way of  
695 respiratory electrons from the electron donor to the electron acceptor.

696 Currently, the here described respiratory chain is dependent on the addition of  
697 methylene blue as an electron shuttle, which might limit the application of this  
698 respiratory strategy for unbalanced fermentations. However, methylene blue is a  
699 relatively cheap and non-hazardous chemical. Of note, the prize for anti-foam, which  
700 is a necessary supplement for most aerobic fermentations, is similar to the costs  
701 accompanied by the usage of methylene blue. Furthermore, the value of the  
702 produced end product can potentially allow for higher fermentation costs (Holtmann  
703 et al., 2013).

704

705 Nevertheless, we admit that the development of a strain that can directly interact with  
706 insoluble electron acceptors would be a desirable tool in the future. Further strain  
707 development can now be initiated on the basis of the here-described results that  
708 show a functional electron transport chain that leads from the cytoplasmic membrane  
709 into the periplasm.

710

## 711 **5 Acknowledgements**

712 We are grateful for financial support from the German Ministry of Education and  
713 Research (BMBF) under the program “BioEnergie 2021” (Grant No. 03SF0382). The  
714 authors thank Dr. Heinrich Heide for his tremendous help with the analysis of mass  
715 spectroscopic data.

716

717

718

719

720

721 **6 References**

- 722 1. Beliaev, A. S., et al., 2005. Global transcriptome analysis of *Shewanella*  
723 *oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. J Bacteriol.  
724 187, 7138-45.
- 725 2. Bouhenni, R., et al., 2005. Identification of genes involved in cytochrome *c*  
726 biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon.  
727 Appl Environ Microbiol. 71, 4935-7.
- 728 3. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of  
729 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
730 Anal Biochem. 72, 248-54.
- 731 4. Bretschger, O., et al., 2007. Current production and metal oxide reduction by  
732 *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. Appl Environ Microbiol.  
733 73, 7003-12.
- 734 5. Carpentier, W., et al., 2005. Respiration and growth of *Shewanella oneidensis*  
735 MR-1 using vanadate as the sole electron acceptor. J Bacteriol. 187, 3293-  
736 301.
- 737 6. Dharmadi, Y., et al., 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia*  
738 *coli*: a new platform for metabolic engineering. Biotechnol Bioengin. 94, 821-9.
- 739 7. Dolch, K., et al., 2014. Characterization of microbial current production as a  
740 function of microbe-electrode-interaction. Biores Technol. 157C, 284-292.
- 741 8. Emde, R., Swain, A., Schink, B., 1989. Anaerobic oxidation of glycerol by  
742 *Escherichia coli* in an amperometric poised-potential culture system. Appl  
743 Microbiol Biotech. 32, 170-175.
- 744 9. Ferry, J. G., Wolfe, R. S., 1976. Anaerobic degradation of benzoate to  
745 methane by a microbial consortium. Arch Microbiol. 107, 33-40.

- 746 10. Firer-Sherwood, M., et al., 2008. Electrochemical interrogations of the Mtr  
747 cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window. JBIC. 13, 849-54.
- 748 11. Flynn, J. M., et al., 2010. Enabling unbalanced fermentations by using  
749 engineered electrode-interfaced bacteria. mBio. 1, 1-8.
- 750 12. Fonseca, B. M., et al., 2009. The tetraheme cytochrome from *Shewanella*  
751 *oneidensis* MR-1 shows thermodynamic bias for functional specificity of the  
752 hemes. JBIC. 14, 375-85.
- 753 13. Fonseca, B. M., et al., 2013. Mind the gap: cytochrome interactions reveal  
754 electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1.  
755 Biochem J. 449, 101-8.
- 756 14. Gao, H., et al., 2010. Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes  
757 on aerobic and anaerobic respiration. Microb Biotechnol. 3, 455-66.
- 758 15. Gescher, J. S., et al., 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*:  
759 identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric  
760 reductases. Mol Microbiol. 68, 706-19.
- 761 16. Gibson, D. G., et al., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to  
762 several hundred kilobases. Nat Met. 6, 343-5.
- 763 17. Golitsch, F., et al., 2013. Proof of principle for an engineered microbial  
764 biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein  
765 complexes. Biosens Bioelectron. 47, 285-91.
- 766 18. Gordon, E. H., et al., 1998. Physiological function and regulation of  
767 flavocytochrome c<sub>3</sub>, the soluble fumarate reductase from *Shewanella*  
768 *putrefaciens* NCIMB 400. Microbiol. 144 ( Pt 4), 937-45.
- 769 19. Haldimann, A., Wanner, B. L., 2001. Conditional-replication, integration,  
770 excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function  
771 studies of bacteria. J Bacteriol. 183, 6384-93.



- 772 20. Hartshorne, R. S., et al., 2007. Characterization of *Shewanella oneidensis*  
773 MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron  
774 transport to extracellular electron acceptors. *J Biol Inorg Chem.* 12, 1083-94.
- 775 21. Holtmann D., Schrader J., Hannappel A.: Microbial Electrosynthesis. In:  
776 Savinell R., Ota K., Kreysa G. (Ed.) *Encyclopedia of Applied Electrochemistry:*  
777 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
- 778 22. Hou, H. J., et al. 2013. Conjugated oligoelectrolytes increase power  
779 generation in *E. coli* microbial fuel cells. *Adv Mater.* 25, 1593-1597.
- 780 23. Jensen, H. M., et al., 2010. Engineering of a synthetic electron conduit in living  
781 cells. *P Natl Acad Sci USA.* 107, 19213-19218.
- 782 24. Kloke, A., et al., 2010. A versatile miniature bioreactor and its application to  
783 bioelectrochemistry studies. *Biosens bioelectron.* 25, 2559-65.
- 784 25. Logan, B. E., Regan, J. M., 2006a. Electricity-producing bacterial communities  
785 in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512-8.
- 786 26. Logan, B. E., Regan, J. M., 2006b. Microbial fuel cells - challenges and  
787 applications. *Environ Sci Technol.* 40, 5172-80.
- 788 27. Logan, B. E., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells.  
789 *Nat Rev Microbiol.* 7, 375-81.
- 790 28. Lutz, R., Bujard, H., 1997. Independent and tight regulation of transcriptional  
791 units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory  
792 elements. *Nucleic Acids Res.* 25, 1203-10.
- 793 29. Mehta, T., et al., 2005. Outer membrane *c*-type cytochromes required for  
794 Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ*  
795 *Microbiol.* 71, 8634-41.

- 796 30. Meyer, T. E., et al., 2004. Identification of 42 possible cytochrome *c* genes in  
797 the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble  
798 cytochromes. *Omics : J integrat biol.* 8, 57-77.
- 799 31. Murarka, A., et al., 2008. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia*  
800 *coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl Environ*  
801 *Microbiol.* 74, 1124-35.
- 802 32. Myers, C. R., Myers, J. M., 1997. Cloning and sequence of *cymA*, a gene  
803 encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III),  
804 fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol.* 179,  
805 1143-52.
- 806 33. Myers, C. R., Myers, J. M., 2003. Cell surface exposure of the outer  
807 membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Lett Appl Microbiol.*  
808 37, 254-8.
- 809 34. Ojima, Y., et al., 2014. Recovery of electric energy from formate by using a  
810 recombinant strain of *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 1-4.
- 811 35. Osborn, M. J., et al., 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of  
812 *Salmonella typhimurium*. Site of synthesis of lipopolysaccharide. *J Biol Chem.*  
813 247, 3973-86.
- 814 36. Pasco, N., et al., 2000. Biochemical mediator demand - a novel rapid  
815 alternative for measuring biochemical oxygen demand. *Appl Microbiol Biot.* 53,  
816 613-618.
- 817 37. Paquete, C. M., et al., 2010. Molecular basis for directional electron transfer. *J Biol*  
818 *Chem.* 285, 10370-5.

- 819 38. Park, D. H., Zeikus, J. G., 2000. Electricity generation in microbial fuel cells  
820 using neutral red as an electronophore. *Appl Environ Microbiol.* 66, 1292-  
821 1297.
- 822 39. Pitts, K. E., et al., 2003. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1  
823 decaheme cytochrome MtrA: expression in *Escherichia coli* confers the ability  
824 to reduce soluble Fe(III) chelates. *J Biol Chem.* 278, 27758-65.
- 825 40. Qian, Y., et al., 2011. Mapping the iron binding site(s) on the small tetraheme  
826 cytochrome of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem.* 50, 6217-24.
- 827 41. Rabaey, K., et al., 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-  
828 driven and driving communities. *ISME J.* 1, 9-18.
- 829 42. Richter, K., et al., 2012. Dissimilatory reduction of extracellular electron  
830 acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol.* 78, 913-21.
- 831 43. Richter, K., Gescher, J., 2014. Accelerated glycerol fermentation in  
832 *Escherichia coli* using methanogenic formate consumption. *Biores Tech.* 162,  
833 389-391.
- 834 44. Roller, S. D. B., et al., 1984. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells:  
835 1. Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of  
836 bacteria. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B, 3-12.
- 837 45. Schicklberger, M., et al., 2011. Involvement of the *Shewanella oneidensis*  
838 decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the beta-barrel  
839 protein MtrB. *Appl Environ Microbiol.* 77, 1520-3.
- 840 46. Schicklberger, M., et al., 2013. Genomic plasticity enables a secondary  
841 electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol.*  
842 79, 1150-9.

- 843 47. Schuetz, B., et al., 2009. Periplasmic electron transfer via the c-type  
844 cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ*  
845 *Microbiol.* 75, 7789-96.
- 846 48. Schuetz, B., et al., 2011. Investigation of the electron transport chain to and  
847 the catalytic activity of the diheme cytochrome c peroxidase CcpA of  
848 *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol.* 77, 6172-80.
- 849 49. Schwalb, C., et al., 2003. The tetraheme cytochrome CymA is required for  
850 anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella*  
851 *oneidensis*. *Biochem.* 42, 9491-7.
- 852 50. Scott, J. H., Nealson, K. H., 1994. A biochemical study of the intermediary  
853 carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol.* 176, 3408-11.
- 854 51. Shi, L., et al., 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and  
855 *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. *Mol Microbiol.* 65,  
856 12-20.
- 857 52. Sturm, G., et al., 2012. Metal reducers and reduction targets. A short survey  
858 about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of  
859 terminal electron acceptors. *Microb Met Resp.* 49-82.
- 860 53. Thomas, P. E., et al., 1976. An improved staining procedure for the detection  
861 of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate  
862 polyacrylamide gels. *Analyt biochem.* 75, 168-76.
- 863 54. Thony-Meyer, L., et al., 1995. *Escherichia coli* genes required for cytochrome  
864 c maturation. *J Bacteriol.* 177, 4321-6.
- 865 55. Tsapin, A. I., et al., 2001. Identification of a small tetraheme cytochrome c and  
866 a flavocytochrome c as two of the principal soluble cytochromes c in  
867 *Shewanella oneidensis* strain MR1. *Appl Environ Microbiol.* 67, 3236-44.

868 56. Venkateswaran, K., et al., 1999. Polyphasic taxonomy of the genus  
869 *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. Int J Syst  
870 Bacteriol. 49 Pt 2, 705-24.

871 57. Wang, V. B., et al., 2014. Uncovering alternate charge transfer mechanisms in  
872 *Escherichia coli* chemically functionalized with conjugated oligoelectrolytes.  
873 Chem Comm. 50, 8223-6.

874 58. Watson, V. J., Logan, B. E., 2010. Power production in MFCs inoculated with  
875 *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures. Biotechnol Bioengin. 105,  
876 489-98.

877 59. Yang, C., et al., 2006. Comparative genomics and experimental  
878 characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella*  
879 *oneidensis*. J Biol Chem. 281, 29872-85.

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894 **7 Supporting figures and tables**

895

896 **Tab. S1: List of strains used in this study.**

897

Tab. S1

species and strain	relevant genotype	reference or source
<i>E. coli</i> WT	aci q, PN25- <i>tetR</i> , SpR, <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$ , Phi80 <i>lacZDM15</i>	Lutz and Buijard, 1997
JG11	DH5 $\alpha$ ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)$ 4380508::( $P_{tet}$ <i>cymA</i> ) pEC86	Gescher et al., 2008
JG146	DH5 $\alpha$ ZI ( <i>napC-F</i> ) ( <i>frdA-D</i> ) 4380508::( $P_{tet}$ <i>cymA-mtrA</i> ) pEC86	Schütz et al., 2009
JG622	JG146 1195240::( $P_{ara}$ <i>stc</i> ) pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>ccpA</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>stc</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>ifcA</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>soxA</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>SO4048</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>SO4666</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>fccA</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>SO3300</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>SO3420</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>scyA</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>rrfA</i> pEC86	this study
	JG146 pMAL- <i>SO4485</i> pEC86	this study
	DH5 $\alpha$ ZI $\Delta(napC-F)$ 1195240::( $P_{ara}$ <i>stc</i> ) pEC86	this study
<i>S. oneidensis</i> MR-1	wild type strain	Venkateswaran et al., 1999
JG737	<i>S. oneidensis</i> MR-1 pBAD- <i>stc</i> -his	this study
<i>M. formicicum</i>	wild type strain	Ferry and Wolfe, 1976

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

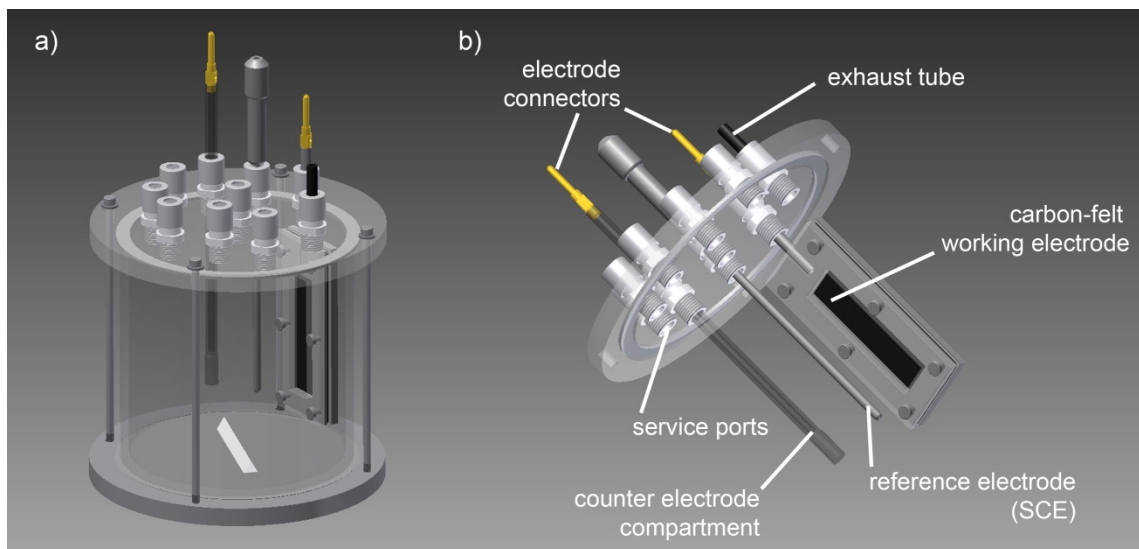
915

916

917

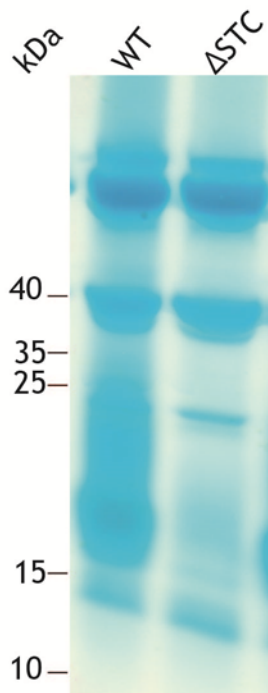
Tab. S2

number	name	sequence
P1	pAH95_Para_for:	TCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCA_AAGAAACCAATTGTCCATATTG
P2	STC_Para_rev:	GCACACTTAATAGTTTTTGTCTCAT_GGTATGTATATCTCTTCTTAA
P3	STC_for:	ATGAGCAAAAACTATTAAGTGTGC
P4	pAH95_STC_rev:	TCACTGATCAGTGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCGAGCTCGGTACCC_AATAGATATAAAAAACGCC
P5	pMAL_SO2727_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAGCAAAAACTATTAAGTG
P6	pMAL_So2727_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_CAATAGATATAAAAAACGCCAG
P7	pMAL_SO0970_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGTTTCAACAAGAAAGATTCAAAA
P8	pMAL_SO0970_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_ATTCAAGCTTGGCTCTCATG
P9	pMAL_SO3300_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGATAATGATGAAATATATATATA
P10	pMAL_SO3300_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_GCCTAGTTAGCTTTCGAATC
P11	pMAL_SO3420_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAAAAATACTCTAACTCT
P12	pMAL_SO3420_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_GAATAAAAAAGCCTGCAGTAAT
P13	pMAL_SO4485_for:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_ATGACTAAACCAACCCACAC
P14	pMAL_SO4485_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TTAATCATCCCAACGACCAAC
P15	pMAL_SO1421_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGTTGAATACCAAAATTATTACC
P16	pMAL_SO1421_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_ACTAATCTAACCTTCGAGAT
P17	pMAL_SO3980_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGC_AATGATGAAGAAGATGACAGG
P18	pMAL_SO3980_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_CTAATTTGCGGGGGCTTTG
P19	pMAL_SO4047_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAATCTTCTGCAATCTTATT
P20	pMAL_SO4047_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_AATTCCTCGCTTCATTTTAC
P21	pMAL_SO0970_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGTTTCAACAAGAAAGATTCAAAA
P22	pMAL_SO0970_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TCGTGCTATGTGAGCTTAAGG
P23	pMAL_SO0264_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAAAAAGCTTTAGCCATGA
P24	pMAL_SO0264_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TTACTTAGCTTTAGACATAAAAT
P25	pMAL_SO2178_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGACAAAACCTCACCGCTAT
P26	pMAL_SO2178_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_GTTTATTCTCGGCCTTTGTTT
P27	pMAL_SO4048_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAATAAAAAITAAAAATTAG
P28	pMAL_SO4048_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TTATTTTATATTGCAAAAGTAAT
P29	pMAL_SO4666_for:	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAAAAAGTTAGCTCTTGGC
P30	pMAL_SO4666_rev:	GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TAAACCATCAGCAATATGATAA
P31	pBAD_STC_for:	TTTGGGTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCC_ATG_AGCAAAAACTATTAAGTG
P32	pBAD_STC_rev:	CAGGCTGAAAATCTCTCTCATCCGCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTT_GGCGCCGTGATGGTGATG_AATAGATATAAAAAACGCC



923 Fig. S1: CAD-drawings of the utilized 2 l microbial electrochemical cell. a) Complete reactor setup. b) detailed description  
 924 of the components of the reactor lid.

Fig. S2



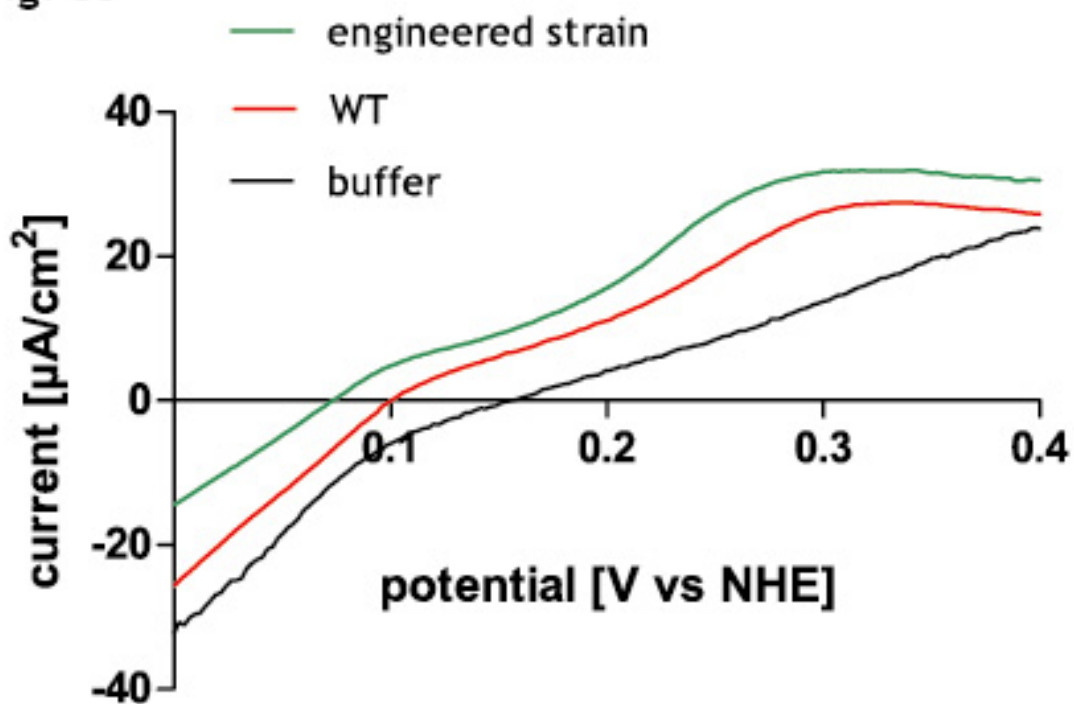
926

927 **Fig. S2: Heme stain of periplasmic protein fractions derived from *S. oneidensis* wild type and  $\Delta stc$  mutant.** 20  $\mu\text{g}$  of the  
928 periplasmic fraction *S. oneidensis* wild type (WT) and  $\Delta stc$  mutant ( $\Delta\text{STC}$ ) were loaded on a 10 % SDS-polyacrylamide gel and  
929 stained for heme-linked peroxidase activity. Broad band between 15 and 25 kDa indicates STC.

930

931

Fig. S3



932

933 **Fig. S3: Polarization curves.** Polarization curves were run with the wild type, the engineered strain and a buffer control without  
934 cells at a scan rate of  $5.5 \times 10^{-5} \text{V/s}$  with 40 mM glycerol as electron donor and 50  $\mu\text{M}$  methylene blue as electron shuttle.



# Genomic Plasticity Enables a Secondary Electron Transport Pathway in *Shewanella oneidensis*

M. Schicklberger, G. Sturm, J. Gescher

Institute for Applied Biosciences (IAB), Department of Applied Biology, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

Microbial dissimilatory iron reduction is an important biogeochemical process. It is physiologically challenging because iron occurs in soils and sediments in the form of insoluble minerals such as hematite or ferrihydrite. *Shewanella oneidensis* MR-1 evolved an extended respiratory chain to the cell surface to reduce iron minerals. Interestingly, the organism evolved a similar strategy for reduction of dimethyl sulfoxide (DMSO), which is reduced at the cell surface as well. It has already been established that electron transfer through the outer membrane is accomplished via a complex in which  $\beta$ -barrel proteins enable interprotein electron transfer between periplasmic oxidoreductases and cell surface-localized terminal reductases. MtrB is the  $\beta$ -barrel protein that is necessary for dissimilatory iron reduction. It forms a complex together with the periplasmic decaheme *c*-type cytochrome MtrA and the outer membrane decaheme *c*-type cytochrome MtrC. Consequently, *mtrB* deletion mutants are unable to reduce ferric iron. The data presented here show that this inability can be overcome by a mobile genomic element with the ability to activate the expression of downstream genes and which is inserted within the SO4362 gene of the SO4362-to-SO4357 gene cluster. This cluster carries genes similar to *mtrA* and *mtrB* and encoding a putative cell surface DMSO reductase. Expression of SO4359 and SO4360 alone was sufficient to complement not only an *mtrB* mutant under ferric citrate-reducing conditions but also a mutant that furthermore lacks any outer membrane cytochromes. Hence, the putative complex formed by the SO4359 and SO4360 gene products is capable not only of membrane-spanning electron transfer but also of reducing extracellular electron acceptors.

Dissimilatory iron reduction is a respiratory process in which proton gradient-dependent energy generation at the cytoplasmic membrane is coupled to the reduction of ferric iron (1–4). Microbial catabolic iron reduction has been studied intensively since its discovery as a respiratory process in the 1980s (2, 3, 5–9). For dissimilatory iron-reducing bacteria, the physiological challenge of this form of respiration is the existence of ferric iron at neutral pH primarily as crystalline iron minerals (10). Hence, an electron acceptor that cannot diffuse through the membranes of Gram-negative cells has to be reduced (11). As an answer to this physiological challenge, microbes have evolved an extended respiratory chain from the cytoplasmic membrane through the periplasm and across the outer membrane to transfer respiratory electrons to the iron mineral (for recent reviews, see references 4 and 12 to 16). The development of a protein complex enabling outer membrane-spanning electron transfer was most probably a key event in the evolutionary process resulting in modern mineral-respiring organisms. In *Shewanella oneidensis* MR-1, this complex is formed by the periplasmic decaheme *c*-type cytochrome MtrA, the outer membrane decaheme *c*-type cytochrome MtrC, and the  $\beta$ -barrel protein MtrB (17–21). MtrB seems to bring the two cytochromes in sufficient proximity to enable interprotein electron transfer (17, 18). The importance of this complex for respiration on ferric iron under anoxic conditions is displayed by the severe phenotypes of strains with mutations in the corresponding genes (19, 22–28). These mutants are severely impaired or unable to use ferric iron as an electron acceptor. Thus, the phenotype is independent of the species of the non-membrane-permeating iron form (24, 28, 29). Even the colloid ferric citrate cannot be used (23, 29). Interestingly, the complex has an intrinsic assembly control. In the absence of MtrA, MtrB is not detectable and complex formation is omitted (18, 30). Moreover, the presence of MtrA seems to be crucial for periplasmic stability of MtrB,

since the requirement of MtrA can be mitigated by turning off expression of the gene encoding the periplasmic protease DegP (30). Hence, under native promoter conditions, an MtrA null mutant is always an MtrB null mutant as well (18, 30). In contrast, MtrB production and formation of the MtrAB subcomplex could be observed even in the absence of MtrC (18, 30).

The chromosome of *S. oneidensis* MR-1 contains three additional homologs of the gene encoding MtrB (31). *mtrE* is part of a gene cluster that is similar to the *mtrABC* cluster, while *dmsF* and SO4359 are parts of operons that furthermore contain the genetic information for dimethyl sulfoxide (DMSO) reductases, which—in contrast to the case for other bacteria—are localized not to the periplasm but to the surface of the outer membrane (31). Nevertheless, only the cluster containing *dmsF* is upregulated and used under DMSO-reducing conditions, while the other shows no differential expression when aerobic and DMSO-reducing conditions are compared (31). Adjacent to all genes homologous to *mtrB* is always a gene similar to *mtrA*, which demonstrates the necessary interplay of both corresponding proteins for membrane-spanning electron transfer (see Fig. S1 in the supplemental material).

Coursolle and Gralnick studied the functionality of MtrB paralogs in a  $\Delta mtrB$  strain. Only expression of *mtrB* itself or *mtrE* could

Received 19 November 2012 Accepted 27 November 2012

Published ahead of print 7 December 2012

Address correspondence to J. Gescher, johannes.gescher@kit.edu.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03556-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.03556-12

TABLE 1 *S. oneidensis* MR-1 strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Reference or source
JG 7	Wild-type strain	6
JG 55	$\Delta mtrB$	27
JG 69	$\Delta mtrB$ pBAD $mtrB_{STREP}$	27
JG 171 ( $\Delta$ OMCA)	$\Delta mtrD$ -F $\Delta omcA$ $\Delta mtrC$ $\Delta$ SO_1659 $\Delta$ SO_2931 $\Delta mtrA$ Para $mtrB_{STREP}$	30
JG 240 ( $\Delta mtrB^S$ )	$\Delta mtrB$ suppressor strain	This study
JG 330	$\Delta mtrB^S$ $\Delta$ SO4358 $\Delta$ SO4357	This study
JG 363	$\Delta mtrB^S$ $\Delta$ SO4359	This study
JG 395	$\Delta mtrB^S$ $\Delta mtrC$	This study
JG 536	$\Delta mtrB^S$ $\Delta$ SO4359 pBAD_SO4359 $_{STREP}$	This study
JG 592	$\Delta mtrB^S$ $\Delta$ SO4359 $\Delta$ SO4360 pBAD_SO4359 $_{STREP}$	This study
JG 593	$\Delta mtrB^S$ $\Delta$ SO4359 $\Delta mtrA$ pBAD_SO4359 $_{STREP}$	This study
JG 560	$\Delta mtrB$ pBAD_SO4360/59 $_{STREP}$	This study
JG 594	$\Delta$ OMCA pBAD_SO4360/59 $_{STREP}$	This study

rescue the mutant phenotype. These findings are consistent with the high similarity of MtrDEF to MtrABC (26). Additional complementation experiments with a strain deficient in all periplasmic MtrA homologs revealed that only *mtrD* and *dmsE* expression could partly compensate for the loss of *mtrA* under ferric iron-reducing conditions, whereas replacement with SO4360 did not increase reduction rates compared to those of the mutant (25). Moreover, overexpression of the SO4360 gene product could not compensate for the loss of DmsE under DMSO-reducing conditions (25).

The goal of the present study was to identify alternative or less dominant pathways for iron reduction encoded within the *S. oneidensis* MR-1 chromosome. Therefore, we screened for gain-of-function mutants in a  $\Delta mtrB$  strain. As an answer to the above question, we observed that transcriptional activation of SO4360 and SO4359, caused by upstream insertion of a mobile genetic element, ISSod1, led to a strain with a regained ability to respire on ferric citrate. Subsequent experiments indicated that the *mtrAB* homologs SO4359 and SO4360 were required for the restored growth. Notably, coexpression of these genes in *trans* in an *mtrB* deletion mutant could complement for iron reduction. More importantly, the expression of SO4360 and SO4359 in *trans* in a strain depleted of all outer membrane *c*-type cytochromes and *mtrA* (referred to here as the  $\Delta$ OMCA strain) was also sufficient to complement the mutant for growth under iron-reducing conditions. Hence, it was discovered not only that the SO4359 and SO4360 gene products are redundant to MtrB and MtrA but that these two proteins most likely also function as a terminal reductase localized at the cell surface.

## MATERIALS AND METHODS

**Aerobic growth of *S. oneidensis* MR-1 and *Escherichia coli*.** *E. coli* and *S. oneidensis* MR-1 strains (Tables 1 and 2) were grown aerobically as batch cultures in LB medium consisting of 1% (wt/vol) Bacto tryptone, 1% (wt/vol) NaCl, and 0.5% (wt/vol) yeast extract. All flasks were shaken continuously at 180 rpm and incubated at 37°C and 30°C, respectively. If necessary, 2,6-diaminopimelic acid (DAP) (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), kanamycin (Kan) (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), or tetracycline (Tet) (15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) was added to the medium. Growth was determined by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>).

**Anaerobic growth of *S. oneidensis* MR-1.** All *S. oneidensis* MR-1 strains used in this work are listed in Table 1. These strains were grown aerobically at 30°C in LB medium or anaerobically in minimal medium (4

TABLE 2 *E. coli* strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Reference or source
JG 22 (DH5 $\alpha$ Z1)	<i>aci</i> <sup>+</sup> PN25- <i>tetR</i> Sp <sup>+</sup> <i>deoR</i> <i>supE44</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFV169</i> ) $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15	32
JG 98 (WM3064)	<i>thrB1004</i> <i>pro</i> <i>thi</i> <i>rpsL</i> <i>hds</i> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15RP4-1360 $\Delta$ ( <i>araBAD</i> )567 $\Delta$ <i>dapA1341::[erm pir(wt)]</i>	W. Metcalf, University of Illinois
JG 304	JG98 pMQ_ $\Delta$ SO4359	This study
JG 305	JG98 pMQ_ $\Delta$ SO4357 $\Delta$ SO4358	This study
JG 306	JG98 pMQ_ $\Delta mtrC$	This study
JG 526	JG98 pSB_ $\Delta mtrA$	This study
JG 557	JG98 pSB_ $\Delta$ SO4360	This study
JG 558	JG22 pBAD_SO4359 $_{STREP}$	This study
JG 559	JG22 pBAD_SO4360/59 $_{STREP}$	This study
JG 555	JG22 pBAD_wt:: <i>mCherry</i>	This study
JG 556	JG22 pBAD_ISSod1:: <i>mCherry</i>	This study

M) [1.27 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.73 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 485  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 9 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 57  $\mu$ M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5.4  $\mu$ M FeCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>, 67.2  $\mu$ M Na<sub>2</sub>EDTA, 3.9  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1.5  $\mu$ M Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>, and 1  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, pH 7.4] supplemented with 50 mM lactate as a carbon and electron source and 50 mM ferric citrate, 50 mM fumarate, or 20 mM DMSO as an electron acceptor. Anaerobic medium bottles were sealed with rubber stoppers. Oxygen was removed from the medium by repeatedly flushing the headspace of each bottle for 2 min with nitrogen, followed by a 2-min application of vacuum. Nitrogen gas and vacuum cycles were repeated 25 times before bottles were autoclaved. Anaerobic 150-ml serum bottles were inoculated with an *S. oneidensis* MR-1 culture to an initial OD<sub>600</sub> of 0.01. The optical density during anaerobic growth on ferric citrate was measured at a wavelength of 655 nm to avoid scattering caused by ferric iron.

**Ferrous iron measurements.** Ferrous iron concentrations were measured using the ferrozine assay described by Stookey (33), with minor modifications. Briefly, 100  $\mu$ l of sample was first acidified and diluted by addition of 900  $\mu$ l 2 M HCl. Subsequently, 20- $\mu$ l aliquots of acidified samples and ammonium(II) sulfate standard solutions were supplemented with 180  $\mu$ l of a 1-mg ml<sup>-1</sup> ferrozine [3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine] and 50% ammonium acetate solution. If necessary, samples were diluted further. Absorption was determined at 562 nm.

**Fractionation of cells.** The periplasmic fraction of anaerobically grown *S. oneidensis* MR-1 cells was isolated by use of polymyxin B as described by Pitts et al. (34). After polymyxin B treatment, the cells were harvested at 15,000 relative centrifugal force (RCF) and 4°C for 10 min, resuspended in 100 mM HEPES (pH 7.4) containing 10% glycerol and 0.1 mg/ml DNase I, and passed through a French pressure cell at 137 MPa. Unbroken cells were removed by a centrifugation step at 3,000 RCF and 4°C for 10 min. The supernatant was centrifuged at 208,000 RCF and 4°C for 60 min. The pellet contained the cell membranes. Separation of outer and cytoplasmic membranes was conducted according to the method of Leisman et al. (35).

**Promoter prediction.** The BPROM bacterial promoter predictor was used to identify entire (−35/−10) putative promoter regions (SoftBerry, Mt. Kisco, NY). *E. coli*-based predictions were deemed suitable due to a recent study on single-molecule characterization of the  $\sigma^{70}$  transcription factor of *S. oneidensis* MR-1 indicating that it recognizes −35/−10 regions with a motif similar to that of *E. coli* (36).

**Construction of pBAD\_SO4359 $_{STREP}$  and pBAD\_SO4360/59 $_{STREP}$ .** The vector pBAD\_*mtrB* $_{STREP}$  (Table 3) (27) was digested using the NcoI and PmeI enzymes. The SO4359 and SO4360/59 genes were amplified using primers 1 plus 2 and 3 plus 2, respectively. In both cases, the SO4359 gene product was thereby modified to contain the sequence for a C-terminal streptavidin (Strep) tag (Table 4). PCR fragments were cleaved with BspHI and cloned into the linearized pBAD backbone. The resulting plas-

TABLE 3 Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant genotype	Reference or source
pBAD202	<i>Para neo</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)
pMS3	pBAD_ <i>mtrB</i> <sub>STREP</sub>	27
pMS17	pBAD_ SO4359 <sub>STREP</sub>	This study
pMS18	pBAD_ SO4360 SO4359 <sub>STREP</sub>	This study
pMS19	pBAD_ wt:: <i>mCherry</i>	This study
pMS20	pBAD_ ISSod:: <i>mCherry</i>	This study
pMQ150	<i>cen6 r6k ura3 neo bla</i>	37
pMS21	pMQ150_ ΔSO4359	This study
pMS22	pMQ150_ Δ <i>mtrC</i>	This study
pMS23	pMQ150_ ΔSO4357 ΔSO4358	This study
pSB377	<i>r6k Tet<sup>r</sup></i>	38
pMS15	pSB_ ΔSO4360	This study
pMS16	pSB_ Δ <i>mtrA</i>	This study

mids, pMS17 and pMS18, were transformed into competent *E. coli* DH5α cells (Table 3). For heterologous protein expression of the SO4359<sub>STREP</sub> or SO4360/59<sub>STREP</sub> gene product in *E. coli*, cells were grown in LB medium to an optical density at 600 nm of 0.6 and then induced by addition of 0.15 mM arabinose to the medium. Cells were harvested 4 h after induction.

**Promoter fusion to *mCherry* reporter gene.** *In vitro* recombination of DNA fragments was done as described by Gibson et al. (39). The pBAD\_ *mtrB*<sub>STREP</sub> vector (30) was digested using the enzymes PmeI and NsiI. The *mCherry* reporter gene was amplified using primers 6 plus 7 or 6 plus 9, depending on the promoter used for fusion (Table 4) (40). The ISSod1 sequence was amplified using primers 5 and 10, whereas the fragment of the native promoter region was generated using primers 5 and 8 (Table 4). The vector backbone and the DNA fragments sharing terminal sequence overlaps were used in equimolar concentrations in a one-step isothermal reaction mix resulting in plasmids pMS19 and pMS20, respectively (Table 3). The reaction was performed in a final volume of 20 μl for 1.5 h at 50°C. After incubation, samples were dialyzed and subsequently transformed into *E. coli* DH5αZ1 competent cells.

**Construction of markerless gene deletion mutants.** Gene deletion mutants were constructed according to the protocol of Schuetz et al. (27). All primers used in this work are listed in Table 4. Regions of 500 bp flanking *mtrC* (primers 17 to 20), SO4357 and SO4358 (primers 21 to 24), or SO4359 (primers 25 to 28) were amplified (Table 4). The resulting fragments contained regions overlapping the vector pMQ150 sequence and each other (37, 41). The suicide plasmid pMQ150 was cleaved with BamHI and SalI. The two fragments and the vector were then combined using the Gibson method as described above, resulting in a pMQ150 suicide vector for each respective deletion mutant (pMS21 to pMS23) (Table 3). *E. coli* strain WM3064 was used as the conjugal donor strain for mating with *S. oneidensis* MR-1 strains.

TABLE 4 Primers used in this study

Primer no.	Name	Sequence	Purpose
1	BspHI_ SO4359_for	CATGTCATGAAGTTAAGTAAAACGACAATTGC	pBAD_ SO4359 <sub>STREP</sub>
2	SO4359 <sub>STREP</sub> _rev	TTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGCGCCAAAGCTTTTCTTA TATAAGAAACTG	pBAD_ SO4359 <sub>STREP</sub>
3	BspHI_ SO4360_for	CATGTCATGAAAAAATACTTTTATTAAAGCTAATATTTATTAGCG	pBAD_ SO4360/59 <sub>STREP</sub>
3	SO_4362_seq_rev	GCTTGTGCAAACCTCATCTGC	Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> determination
4	recG_seq_rev	GTGCGGTCTTCGTAGCGCAG	Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> determination
5	pBAD_ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> _prom_for	GATCAATTCGCGCGCGAAGGCGAAGCGGCATTGCTGCAAGTCGTTAGCAC	Promoter fusion to <i>mCherry</i>
6	<i>mCherry</i> _pBAD_rev	CCGCCAAAACAGCCAAAGCTGGAGACCGTTTTTATTGTATAACTCATCCATAC	Promoter fusion to <i>mCherry</i>
7	<i>mCherry</i> _natprom_for	CAATATTTGGGATTGTATTTAATATGGTTTCCAAAAGGGGAAG	Promoter fusion to <i>mCherry</i>
8	natprom_ <i>mCherry</i> _rev	CTTCCCCTTTGGAAACCATGGACCCAGCACCTGCATATAG	Promoter fusion to <i>mCherry</i>
9	<i>mCherry</i> _ISSod1_for	GTTTGGGTTGACCAGTACACATGGTTTCCAAAAGGGGAAG	Promoter fusion to <i>mCherry</i>
10	ISSod1_rev <i>mCherry</i>	CTTCCCCTTTGGAAACCATGTGTACTGGTCAACCCAAAC	Promoter fusion to <i>mCherry</i>
11	pSB_ <i>mtrA</i> _for	CTTAACGGCTGACATGGGAATTCCTGCAGCCCGGGCCATCACA ATGGCAATGTCTG	Δ <i>mtrA</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
12	pSB_ <i>mtrA</i> _rev	CAAGCTCAATAAAAAAGCCCCACCGCGGTGGCGGCCCGG	Δ <i>mtrA</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
13	pSB_ SO4360_for	CAAGCTCAATAAAAAAGCCCCACCGCGGTGGCGGCCACCGT TATGGCATTGCTGAC	Δ <i>mtrA</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
14	pSB_ SO4360_rev	CTTAACGGCTGACATGGGAATTCCTGCAGCCCGGGCCTGT CATCGCTTACCATTG	Δ <i>mtrA</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
15	pSB377_for	CTGACATGGGAATTCCTGCAGC	pSB377 test primer
16	pSB377_rev	CTGCTATCGATGACCTTCATGTTAAC	pSB377 test primer
17	<i>mtrC</i> _up_for	ATGATTACGAATTCGAGTCTGTTACCCGGGGCTTATCGTCTTGGTGACAGC	Δ <i>omcB</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
18	<i>mtrC</i> _up_rev	TTTGCCCAAGCAGGGGGAGC	Δ <i>omcB</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
19	<i>mtrC</i> _down_for	GCTCCCCTGCTTGGGCAAATTTTCCCTGCATAGGTTTGGC	Δ <i>omcB</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
20	<i>mtrC</i> _down_rev	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGCATGCTTAAGTTGCCACCAG	Δ <i>omcB</i> in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
21	SO4357/58_up_for	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGGCTTTGTAGGGTGCAAATTC	ΔSO4357/58 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
22	SO4357/58_up_rev	TAGTTGTAATAAATATGGATAGCCG	ΔSO4357/58 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
23	SO4357/58_down_for	GCGCTATCCATATTTATTACAACATAGAATCATCCCCTAAATTTAAAAGC	ΔSO4357/58 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
24	SO4357/58_down_rev	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGATCGGGGTGGATGTATATTC	ΔSO4357/58 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
25	SO4359_up_for	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGGTTGCTACGGGTAAATAAATG	ΔSO4359 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
26	SO4359_up_rev	ATTTAGGGGATGATTCTAATG	ΔSO4359 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
27	SO4359_down_for	CATTAGAATCATCCCCTAAATTACTCACTCCATTACTTCAG	ΔSO4359 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain
28	SO4359_down_rev	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGCATAATATTCACGCAGAGGTG	ΔSO4359 in Δ <i>mtrB</i> <sup>S</sup> strain

**Gene disruption of *mtrA* and SO4360 by use of pSB377.** Expression of *mtrA* or SO4360 was omitted using the suicide vector pSB377 (38). A DNA fragment homologous to *mtrA* or SO4360 was amplified using the primer pair 11 plus 12 or 13 plus 14, respectively (Table 4). The plasmid was digested using NotI. The linearized vector and the respective amplified fragment were combined by the Gibson method as described above, resulting in plasmids pMS15 and pMS16 (Table 3). WM3064 was used as the conjugal donor strain for mating with *S. oneidensis* MR-1 strains. A second crossover event was not performed, which resulted in gene disruption of *mtrA* or SO4360. The vectors pMS15 and pMS16 were sequenced prior to mating, using the primer pair 15 plus 16 (Table 4). Gene disruption was used to construct strains JG592 and JG593 (Table 1).

**Immunodetection of Strep-tagged proteins.** For visualization of Strep-tagged recombinant proteins through immunodetection, fractions were run in 10% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Roth, Karlsruhe, Germany) by semidry transfer blotting (Bio-Rad, Munich, Germany). Western blotting was performed following a standard procedure (42). Immunodetection was conducted using a primary antibody specific for the Strep epitope (Qiagen, Hilden, Germany) and a secondary anti-mouse antibody conjugated to alkaline phosphatase (AP) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) according to the manufacturer's instructions. For signal development, an AP-conjugate substrate kit (Bio-Rad) was used according to the manufacturer's instructions. Imaging of the blot was performed using a ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad, Munich, Germany).

**Solexa genome sequencing.** Isolation of chromosomal DNA was conducted according to the method of Marmur (43). Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 instrument with a read length of 46 bp by GATC Biotech. The reads were assembled using BWA software (44). Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) as well as insertions and deletions was done with SAMtools (44) and the assembly viewer Tablet (45).

**Fluorescence microscopy.** Prior to microscopy, cells were fixed in 4% formaldehyde for 1 h at 4°C and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the samples were immobilized on slides coated with poly-L-lysine at 46°C and then covered with 0.1% agarose. Samples were dehydrated with 100% ethanol and stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), using a 1- $\mu$ g/ml solution. Microscopy was performed with a Leica DM 5500 B upright research microscope (Wetzlar, Germany) equipped with a Leica DFC360FX camera (Wetzlar, Germany) and an HCX PL Fluotar 100.0  $\times$  1.30 oil-immersion objective. The exposure time for detection of the mCherry reporter was 391 ms, with a gain of 2.9, and that for DAPI was 159 ms, with a gain of 1.8. Image processing was carried out using the Leica Application Suite (LAS AF Lite), version 2.6.0.

**LC-MS/MS.** SDS-PAGE was conducted according to published procedures (46). For in-gel digestion, the excised gel bands were destained with 30% acetonitrile (ACN), shrunk with 100% ACN, and dried in a vacuum concentrator (model 5301; Eppendorf, Hamburg, Germany). Digestion with trypsin was performed overnight at 37°C in 0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8). About 0.1  $\mu$ g of protease was used for one gel band. Peptides were extracted from the gel slices with 5% formic acid. All liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses were performed on an ion-trap mass spectrometer (Agilent 6340; Agilent Technologies) coupled to a model 1200 Agilent nanoflow system via an HPLC-Chip Cube electrospray ionization (ESI) interface. Peptides were separated on an HPLC-Chip with an analytical column of 75  $\mu$ m in diameter and 150 mm in length and a 40-nl trap column, both packed with Zorbax 300SB C<sub>18</sub> (5- $\mu$ m particle size). Peptides were eluted using a linear acetonitrile gradient at 1%/min at a flow rate of 300 nl/min (starting with 3% acetonitrile). MS/MS analyses were performed using data-dependent acquisition mode. After an MS scan (standard enhanced mode), a maximum of three peptides was selected for MS/MS (collision-induced dissociation [CID], standard enhanced mode). Singly charged precursor ions were excluded from selection. The automated gain control was set to

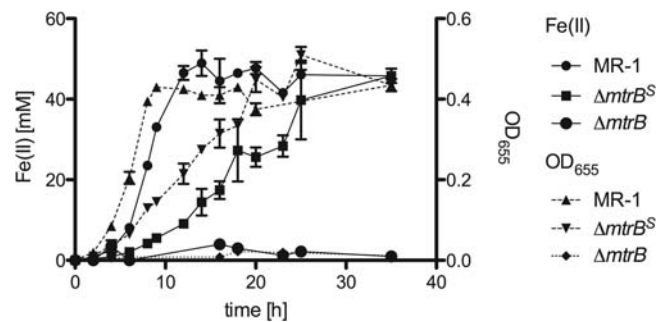


FIG 1 Correlation between ferric citrate reduction (left y axis, solid lines) and an increase of the optical density (right y axis, dashed lines). The *S. oneidensis* MR-1 wild type, a  $\Delta mtrB$  strain, and the isolated  $\Delta mtrB$  suppressor strain were grown in anaerobic 4 M minimal medium supplemented with 50 mM lactate and 50 mM ferric citrate. Error bars represent standard deviations for three individual replicates.

350,000. The maximum accumulation time was set to 300 ms. Mascot Distiller 2.3 was used for raw data processing and for generating peak lists, essentially with standard settings for the Agilent ion-trap instrument. Mascot Server 2.3 was used for database searching with the following parameters: peptide mass tolerance, 1.1 Da; MS/MS mass tolerance, 0.3 Da; enzyme, "trypsin," with 2 uncleaved sites allowed for trypsin; and variable modifications, carbamidomethyl (C), Gln  $\rightarrow$  pyroGlu (N-terminal Q), propionamide (C), and oxidation (M). For protein and peptide identification, the *Shewanella* and NCBI databases were used.

## RESULTS

**Isolation of an *mtrB* suppressor mutant strain.** To investigate whether alternative routes for dissimilatory iron reduction exist in *S. oneidensis* MR-1, we screened for an *mtrB* suppressor strain which regained the ability to respire on iron. Therefore, an *mtrB* null mutant was inoculated into anoxic 4 M minimal medium supplemented with lactate as an electron donor and ferric citrate as an electron acceptor. After prolonged incubation (30 days), ferric iron reduction was observed by a color change of the medium. At this point, the cells were harvested and an aliquot was used for inoculation of a further serum bottle with anoxic medium containing ferric citrate as an electron acceptor. This step was repeated twice until the incubation time for complete ferric iron reduction was decreased to 48 h (data not shown). Aliquots were streaked onto agar plates supplemented with lactate and ferric citrate and incubated under anoxic conditions. An isolated single colony, referred to as the  $\Delta mtrB^S$  strain, was chosen for molecular and biochemical characterization. The ability of the  $\Delta mtrB^S$  strain to respire on ferric citrate was determined by monitoring ferrous iron formation and optical density over time. As Fig. 1 indicates, the  $\Delta mtrB^S$  strain grew at about 30% of the wild-type rate, while the original  $\Delta mtrB$  mutant was not able to thrive under these conditions. The suppressor strain grew at wild-type rates, aerobically in LB medium and anaerobically in 4 M minimal medium with fumarate or DMSO as a terminal electron acceptor (data not shown).

**Involvement of SO4359 in ferric iron reduction.** Further experiments aimed at identifying possible key players responsible for the suppression of the *mtrB* mutation. Hence,  $\Delta mtrB^S$  and wild-type cells growing independently on ferric citrate were harvested at exponential phase and fractionated. Membrane and periplasmic fractions of both strains were separated using SDS-PAGE. Due to previously described homologs of *mtrB* and *mtrA* carried

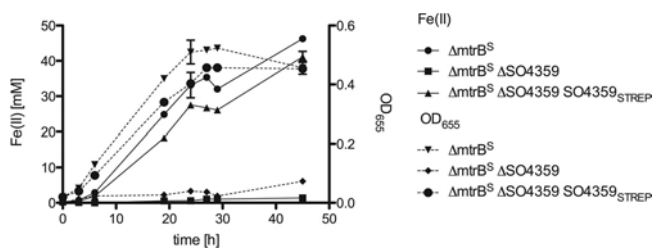


FIG 2 Correlation between ferric citrate reduction (left y axis, solid lines) and an increase of the optical density (right y axis, dashed lines) for similarly grown  $\Delta mtrB^S$ ,  $\Delta mtrB^S \Delta SO4359$ , and  $\Delta mtrB^S \Delta SO4359$  pBAD\_SO4359<sub>STREP</sub> strains on anaerobic 4 M minimal medium supplemented with 50 mM lactate and 50 mM ferric citrate. SO4359<sub>STREP</sub> expression was induced with 0.15 mM arabinose in the growth medium. Error bars represent standard deviations for three individual replicates.

in the *S. oneidensis* MR-1 chromosome, we sought for proteins with similar molecular weights to those of MtrA and MtrB that were detectable in the mutant but not the wild-type samples. A comparison of the mass spectrometry data obtained from the membrane fractions of the wild type and the  $\Delta mtrB^S$  strain revealed masses in the  $\Delta mtrB^S$  samples that most probably derived from the SO4359 gene product. These peptide signals were absent in the wild-type samples. The MtrA homolog encoded by SO4360 could be detected in both the membrane and soluble fractions of the suppressor strain and could not be observed in the wild type. Solexa sequencing of the mutant strain corroborated a possible involvement of SO4359 in complementing the  $\Delta mtrB$  mutant. A suspicious gap within the gene cluster carrying SO4362 to SO4357 was spotted when reads were aligned to the genome sequence of the ancestral strain. Subsequently, a markerless deletion mutant of the *mtrB* homolog SO4359 in the  $\Delta mtrB^S$  strain was constructed. The resulting mutant was unable to respire on ferric citrate and could be complemented by SO4359 expression in *trans* via a pBAD expression system (Fig. 2). Furthermore, the expressed gene had the information for a C-terminal Strep tag that was used for immunodetection (SO4359<sub>STREP</sub>). Cell viability was achieved only when expression of SO4359<sub>STREP</sub> was induced with 0.15 mM arabinose. Higher concentrations of arabinose in 4 M minimal medium supplemented with lactate as an electron donor and ferric citrate, fumarate, or DMSO as an electron acceptor had a lethal impact on the cells, indicating cell lysis due to toxic effects of SO4359 overexpression (data not shown). However, the ability to respire on ferric citrate of the *trans*-complemented  $\Delta mtrB^S \Delta SO4359$  strain with SO4359<sub>STREP</sub> supports the observation of a direct involvement of the SO4359 gene product in respiratory iron reduction of the suppressor strain (Fig. 2).

**Investigation of the underlying mechanism for gene upregulation.** All experiments conducted so far pointed toward expression of SO4359 as a physiological answer to the selective pressure of iron reduction in the absence of MtrB. Comparison of the  $\Delta mtrB^S$  genome to the  $\Delta mtrB$  reference genome by use of Tablet

software (45) revealed a gap within the SO4362-to-SO4357 gene cluster. Recently, a *cymA* suppressor mutant strain was isolated, and the suppression was found to be due to transcriptional activation of SirC and SirD by insertion of an insertion sequence (IS) element forming a hybrid constitutive promoter (47). Sequence analysis of the region containing the identified gap within SO4362 revealed an insertion sequence belonging to the same type of family (ISSod1). Analysis of the hybrid region by use of bioinformatic tools (BPROM; SoftBerry, Mt. Kisco, NY) displayed a putative  $\sigma^{70}$ -dependent promoter whereby the predicted  $-35$  region is derived from the IS element and the predicted  $-10$  region is part of SO4362 (Fig. 3).

Formation of a new hybrid promoter was tested experimentally using a reporter gene assay based on the detection of mCherry fluorescence. The entire region upstream of SO4360, including the native promoter upstream of SO4362 (positions 411,554 to 413,284 of *S. oneidensis* MR-1) from the suppressor strain (containing ISSod1) or the wild type, was cloned upstream of the reporter gene. Both designed vectors were transformed into *E. coli*, and expression of the mCherry reporter was monitored using fluorescence microscopy. As Fig. 4 shows, only the construct containing the genomic region from the suppressor strain including the ISSod1 sequence led to a detectable production of mCherry (Fig. 4).

Taken together, the data show that the ISSod1 sequence likely forms a constitutive hybrid promoter together with a part of SO4362, which consequently results in upregulation of the SO4362-to-SO4357 gene cluster. This supports the hypothesis of an involvement of SO4359 in respiratory iron reduction of the suppressor strain.

**MtrA or gene product of SO4360 as a periplasmic electron carrier?** As previously observed in *S. oneidensis* MR-1, MtrA seems to have a fundamental function, beyond its function as a periplasmic electron carrier, in the establishment of an outer membrane-spanning complex (18, 30). Due to the involvement of MtrA in complex formation, several possibilities for the reacquired ability to transfer electrons to ferric citrate by the suppressor mutant arise. (i) MtrA interacts with the protein encoded by the *mtrB* homolog SO4359. MtrA is involved in both the stability of the  $\beta$ -barrel protein and periplasmic electron transfer in a putative MtrA-SO4359 protein-MtrC complex. (ii) MtrA serves solely as an electron carrier in the putative complex, but the protein encoded by the *mtrA* homolog SO4360 is crucial for periplasmic stability of the SO4359 protein. (iii) Alternatively, the gene product of SO4360 replaces MtrA as the periplasmic electron carrier, but MtrA is necessary to prevent DegP-dependent degradation of the SO4359 protein. (iv) The protein encoded by SO4360 serves as an electron carrier and assists in establishment of the outer membrane complex.

To investigate whether MtrA or the MtrA homolog encoded by SO4360 is essential for the suppression of MtrB, we constructed mutants of the  $\Delta mtrB^S$  strain lacking either *mtrA* and SO4359 or



FIG 3 Incorporation of the ISSod1 insertion sequence into SO4362. The SO4360 sequence from nucleotides 48 to 79 is shown. Black arrows, coding sequence; gray arrows, newly formed  $\sigma^{70}$ -dependent promoter with  $-35$  and  $-10$  promoter regions. The poly-N sequence indicates that the inserted ISSod1 sequence is longer than the sequence shown (58).

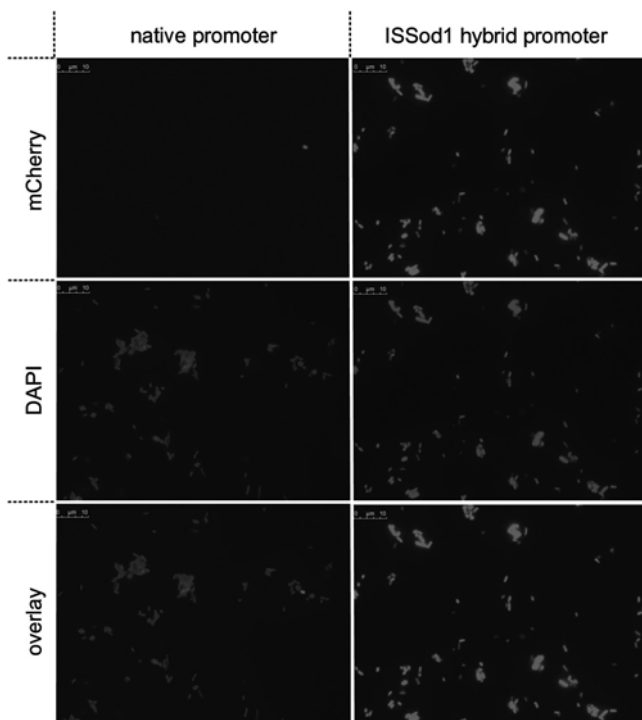


FIG 4 Probe for functionality of the newly formed constitutive hybrid promoter of the suppressor strain. The genomic region upstream of SO4359/60 of the suppressor or wild-type strain was cloned upstream of the *mCherry* reporter gene. Cells were grown aerobically on LB medium and monitored with an HCX PL Fluotar 100.0  $\times$  1.30 oil objective with an exposure time of 957 ms (upper panels). Viability of the cells was illustrated by DAPI staining (middle panels). Overlays are shown in the lower panels. The construct including the genomic region from the suppressor strain, as well as the ISSod1 sequence, showed detectable *mCherry* expression (upper right panel), whereas expression of the reporter gene was mostly omitted when regulated by the wild-type promoter without the ISSod sequence.

SO4360 and SO4359 (strains JG592 and JG593) (Table 1). SO4359<sub>STREP</sub> was expressed in *trans* in the individual mutant strains by the addition of 0.15 mM arabinose. Subsequently, the strains were tested for the ability to respire on ferric citrate by monitoring Fe(II) formation as well as changes in optical density over time. The resulting growth curves revealed that a deletion of *mtrA* in the  $\Delta mtrB^S$  strain did not affect the strain's ability to reduce ferric citrate at all, whereas a deletion of SO4360 in the  $\Delta mtrB^S$  strain severely impaired the ability to grow on ferric citrate (Fig. 5).

In addition, sole expression of SO4359<sub>STREP</sub> in *trans* in an *mtrB* mutant strain also was not sufficient to complement for iron respiration (data not shown), which furthermore suggests that coexpression of SO4360 is indispensable for growth of the  $\Delta mtrB^S$  strain under iron-reducing conditions. As a result of the above experiments, it is likely that MtrA is involved neither as a periplasmic electron carrier nor as an essential part for complex formation.

To answer the question concerning an involvement of the gene product of SO4360 in the stability of the SO4359-encoded protein, SO4359<sub>STREP</sub> was expressed in *trans* in a  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ SO4360 mutant strain. As a positive control for immunodetection, a similar experiment was conducted with a  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ *mtrA* mutant strain. Cells were grown anaerobically on 4 M min-

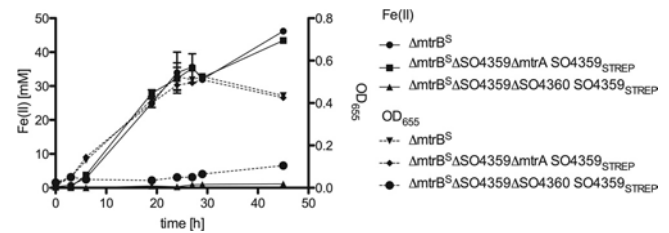


FIG 5 Correlation between ferric citrate reduction (left y axis, solid lines) and an increase of the optical density (right y axis, dashed lines) for similarly grown  $\Delta mtrB^S$ ,  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ *mtrA* pBAD\_SO4359<sub>STREP</sub>, and  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ SO4360 pBAD\_SO4359<sub>STREP</sub> strains on anaerobic 4 M minimal medium supplemented with 50 mM lactate and 50 mM ferric citrate. Error bars represent standard deviations for three individual replicates.

imal medium supplemented with 50 mM lactate and 50 mM fumarate. Subsequently, the cells were harvested at exponential phase and fractionated. Membrane fractions were separated into outer membrane and cytoplasmic membrane fractions by use of *N*-lauroylsarcosine (35). Equal amounts of protein (50  $\mu$ g) were separated using SDS-PAGE. Subsequent immunodetection revealed a sharp band for the  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ *mtrA* mutant strain, whereas the signal for the SO4359<sub>STREP</sub> protein was scattered over the entire blot for the  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ SO4360 sample (Fig. 6A). These results seem to indicate an involvement of the SO4360 MtrA homolog in stability of the SO4359 protein, although a complete loss of the signal, as shown recently for MtrB in the absence of MtrA, was not observed (30). Similar experiments were also conducted in *E. coli*, using a vector that contained either SO4359<sub>STREP</sub> or both SO4359<sub>STREP</sub> and SO4360 (referred to here as SO4360/59<sub>STREP</sub>). Surprisingly, and in contrast to the previously observed MtrA-dependent stability of MtrB in *S. oneidensis* MR-1 and *E. coli*, expression of SO4359<sub>STREP</sub> was not affected, or even was negatively affected, by coexpression of SO4360 in *E. coli* (Fig. 6B).

Thus, the results suggest an involvement of the SO4360 protein in electron transfer, but the periplasmic electron carrier is not involved or has a minor role in the stability of the SO4359 protein in the suppressor strain.

**The SO4359-SO4360 module.** Having shown that MtrA is not involved in electron transfer and that expression of the *mtrB* homolog SO4359<sub>STREP</sub> alone does not complement either a  $\Delta mtrB^S$   $\Delta$ SO4359  $\Delta$ SO4360 strain or a  $\Delta mtrB$  strain, the next question was if the SO4359-SO4360 module could complement a  $\Delta mtrB$  strain under dissimilatory iron-reducing conditions. Therefore, the vector containing SO4360 and SO4359<sub>STREP</sub> under the control of an arabinose-inducible promoter was transformed into an *S. oneidensis* MR-1  $\Delta mtrB$  strain. Subsequently, this strain was inoculated into 4 M minimal medium with lactate as an electron donor and ferric citrate as an electron acceptor. Gene expression was achieved by supplementing the medium with 0.15 mM arabinose. Induction of SO4360/59<sub>STREP</sub> resulted in the ability of the *mtrB* mutant to respire on ferric citrate to the same extent as that of the  $\Delta mtrB^S$  strain (Fig. 7). Without the addition of arabinose, the  $\Delta mtrB$  strain with SO4360/59<sub>STREP</sub> was severely impaired in iron respiration. Therefore, it seems reasonable to conclude that the lack of MtrB is compensated in the suppressor strain by production of both the SO4359 and SO4360 proteins.

**Deciphering the final reductase in the  $\Delta mtrB^S$  strain.** In *S. oneidensis* MR-1, wild-type electron transfer over the outer mem-

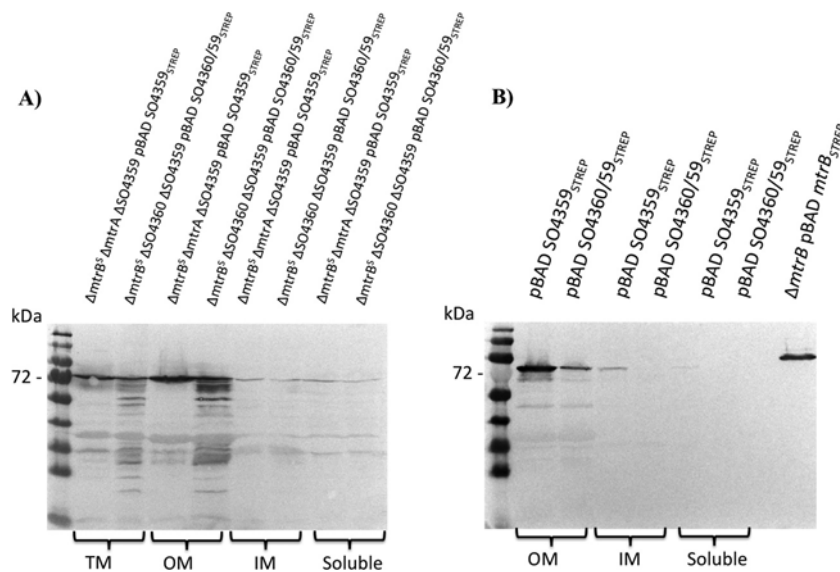


FIG 6 (A) Immunodetection of SO4359<sup>STREP</sup> protein in total membrane (TM), outer membrane (OM), inner membrane (IM), and soluble fractions of anaerobically grown cells of either the  $\Delta mtrB^S \Delta mtrA \Delta SO4359$  pBAD<sub>SO4359</sub><sup>STREP</sup> or  $\Delta mtrB^S \Delta SO4360 \Delta SO4359$  pBAD<sub>SO4359</sub><sup>STREP</sup> strain. (B) OM, IM, and soluble fractions with heterologous expression of either the SO4359<sup>STREP</sup> or SO4360-SO4359<sup>STREP</sup> protein in *E. coli*. Fifty-microgram protein samples were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel.

brane under anaerobic iron-reducing conditions occurs only when the MtrCAB proteins form an integral membrane-spanning complex. Having shown that the *mtrB* homolog SO4359 and the *mtrA* homolog SO4360 are essential for electron transfer to extracellular electron acceptors, the remaining aim was to elucidate the terminal ferric citrate reductase of the suppressor strain. Our hypotheses considered two possible enzymes which could be responsible for electron transfer to iron under anoxic conditions. The first was the *c*-type cytochrome MtrC, which today is well established as highly important for ferric iron reduction of the wild type (23, 24, 26). Specifically, the SO4359 protein could replace MtrB, and due to the high similarity of the  $\beta$ -barrel proteins, MtrC could also interact with the SO4359 protein. In that case, the SO4359 protein would serve as a sheath in which the SO4360 and MtrC proteins exchange electrons. The second hypothesis centered on the SO4358 and SO4357 DmsAB homologs, which could catalyze electron transfer to ferric iron in a rather unspecific reaction. In order to test the two hypotheses, we created in-frame gene deletion strains lacking either MtrC or both the SO4357 and SO4358 proteins in a  $\Delta mtrB^S$  background and tested them for the ability to

grow on ferric citrate. Surprisingly, both strains were not affected in ferric iron reduction and growth under iron-reducing conditions, as indicated in Fig. 8.

The only outer membrane cytochrome that can complement an *mtrC* deletion mutant is the highly similar cytochrome MtrF (17, 26, 29). Hence, it might be possible that the SO4359 and SO4360 proteins form a complex together with the *c*-type cytochrome MtrF.

To exclude interactions of the SO4360 and SO4359 proteins with MtrF or any other remaining outer membrane *c*-type cytochromes, we transformed SO4360 and SO4359<sup>STREP</sup> into an *S. oneidensis* MR-1 strain deficient in all outer membrane *c*-type cytochromes and *mtrA* ( $\Delta$ OMCA strain) (30). Thereafter, we again determined whether growth deficiency of this strain compared to the  $\Delta mtrB^S$  strain could be observed. Expression of SO4360 and SO4359<sup>STREP</sup> in the  $\Delta$ OMCA strain was achieved by adding 0.15 mM arabinose. The growth curve clearly revealed that the strain lacking any outer membrane *c*-type cytochromes was able to re-

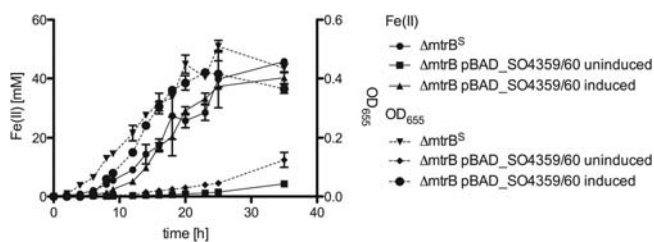


FIG 7 Correlation between ferric citrate reduction (left y axis, solid lines) and an increase in optical density (right y axis, dashed lines). Growth of the  $\Delta mtrB^S$  strain was compared to that of a  $\Delta mtrB$  pBAD<sub>SO4360/59</sub><sup>STREP</sup> strain in which expression was either induced with 0.15 mM arabinose or not induced. Error bars represent standard deviations for three individual replicates.

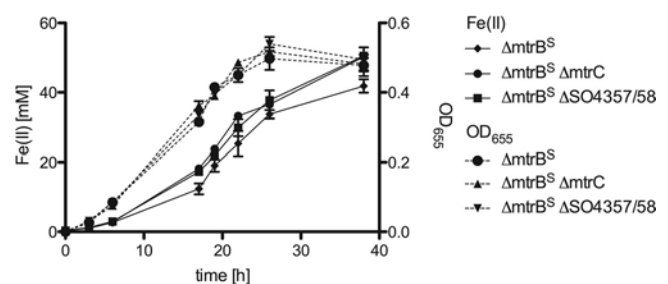
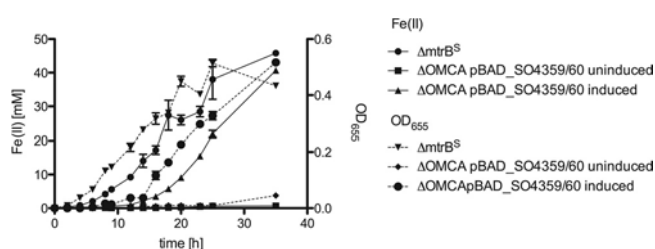


FIG 8 Correlation between ferric citrate reduction (left y axis, solid lines) and an increase of the optical density (right y axis, dashed lines) for similarly grown  $\Delta mtrB^S$ ,  $\Delta mtrB^S \Delta mtrC$ , and  $\Delta mtrB^S \Delta SO4357/58$  strains. Strains were inoculated into anaerobic 4 M minimal medium supplemented with 50 mM lactate and 50 mM ferric citrate. Error bars represent standard deviations for three individual replicates.



**FIG 9** Correlation between ferric citrate reduction (left y axis, solid lines) and an increase of the optical density (right y axis, dashed lines) for similarly grown  $\Delta mtrB^S$  strain and induced or uninduced  $\Delta OMCA$  pBAD\_SO4360/59<sub>STREP</sub> strain on anaerobic 4 M minimal medium supplemented with 50 mM lactate and 50 mM ferric citrate. Error bars represent standard deviations for three individual replicates.

spire on ferric citrate when SO4360 and SO4359<sub>STREP</sub> were expressed. When expression of the periplasmic electron transfer protein and the  $\beta$ -barrel protein was omitted, the  $\Delta OMCA$  strain lacked the ability to respire on ferric citrate (Fig. 9). To exclude a possible redundancy of the SO4357 and SO4358 final reductases to any known final ferric iron reductases and vice versa, SO4357 and SO4358 were deleted in the  $\Delta OMCA$  strain. Hence, this strain does not contain any cell surface-localized terminal reductases, which might transfer electrons to insoluble iron minerals. Still, the phenotype of this strain could still be rescued using the plasmid carrying SO4360/59<sub>STREP</sub> (see Fig. S2 in the supplemental material). Therefore, it seems as if a putative complex of the SO4359 and SO4360 proteins not only can complement an *mtrB* deletion but also can function as a terminal reductase for ferric citrate.

## DISCUSSION

Catabolic reduction of extracellular electron acceptors requires extended respiratory chains. This at least is the core understanding we have from previous studies that describe mechanisms for metal respiration in *Shewanella* and *Geobacter* strains (18, 26, 27, 48–51). So far, it is not known how *Geobacter* species transport respiratory electrons through the outer membrane. However, bacteria of the genus *Shewanella* achieve electron transfer over the outer membrane via a complex consisting of an outer membrane  $\beta$ -barrel protein and a periplasmic decaheme *c*-type cytochrome (4, 17, 18, 20). Apparently, this kind of module evolved in *Shewanella* to couple to either outer membrane cytochromes, as in the case of MtrAB and MtrDE, or proteins of the DMSO reductase family, as in the case of DmsEF and SO4359-60 (31). The number of MtrAB-like modules varies considerably within the sequenced *Shewanella* species. For instance, the genome of *Shewanella denitrificans* lacks this kind of module, and consequently, this is so far the only known *Shewanella* species that is incapable of respiring on ferric iron (52). The genome of *Shewanella sediminis*, on the other hand, encodes nine homologous MtrAB clusters, while the chromosomes of most other species encode two or three. Interestingly, in *S. oneidensis* MR-1, only two of the four clusters, namely, MtrCAB and DmsEFABGH, have an identified physiological function, being linked to anaerobic iron- and DMSO-reducing conditions, respectively (23).

Besides the role of MtrAB-like modules in iron and DMSO reduction in *Shewanella* strains, there is also strong evidence that similar clusters are used by ferrous iron-oxidizing organisms such as *Gallionella capsiferriformans*, *Sideroxydans lithotrophicus*, and

*Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 (53–57). Regarding ferrous iron oxidation, the MtrAB-like modules seem to be necessary for iron oxidation, as shown, for example, by deletion mutant analysis of the phototrophic iron-oxidizing bacterium *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 by Jiao and Newman (56). Further evidence for an involvement of MtrAB homologs in ferrous iron-oxidizing bacteria is provided by a recent work from Liu et al. showing complementation of an *S. oneidensis* MR-1 *mtrA* mutant by heterologous expression of *mtaA*, encoding a periplasmic decaheme *c*-type cytochrome of the neutrophilic ferrous iron-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 (57). It is so far not established whether ferrous iron oxidation takes place in the periplasm or at the cell surface, but the similarity to MtrAB-like modules and the possible detrimental effect of the formation of ferric iron minerals in the periplasm favor a surface-localized oxidation.

Interestingly, ferrous iron-oxidizing bacteria do not seem to need an outer membrane cytochrome, such as a ferrous iron oxidase. This oxidase might be dispensable due to the solubility of ferrous iron, which would imply that in these organisms the periplasmic MtrA homolog is the ferrous iron oxidase. This seems well possible, since a number of *c*-type cytochromes can catalyze at least the reverse reaction, i.e., the reduction of soluble or colloidal ferric iron forms such as ferric citrate or ferric-nitrilotriacetic acid (NTA) to ferrous iron (27, 34, 49). Hence, iron oxidation or reduction might not necessarily need specialized enzymes but rather proteins that have a suitable redox potential window and redox centers that are localized at least partly at the protein periphery.

Our data suggest that the SO4359-SO4360 module is a cluster that fulfills similar requirements to those fulfilled by the above-mentioned iron oxidases. In the absence of an outer membrane-localized terminal reductase, the corresponding outer membrane complex encoded by SO4359 and SO4360 seems to be able to interact with iron. These two proteins therefore encompass the final step of an alternate or secondary pathway for iron reduction in *S. oneidensis* MR-1. In contrast, although it is part of the native ferric iron reductase complex, the MtrAB heterodimer does not form a functional iron reductase in the absence of a cell surface-localized final reductase such as MtrC or MtrF. The structural and kinetic differences between MtrAB and the SO4359-SO4360 complex allowing for their physiological disparities are not known. One hypothesis to explain the physiological differences is that the pore of the SO4359 protein is wider and therefore allows ferric iron forms to reach the periplasmic cytochrome and that the SO4360 MtrA homolog protrudes through the pore and contacts ferric iron at the cell surface. A similar hypothesis was raised in the recent work of Bücking et al., which shows the necessity of SNPs in *mtrA* and *mtrB* to complement a deletion mutant lacking all outer membrane cytochromes (54). Bücking et al. speculated that the inability of the wild-type MtrAB subcomplex to transfer electrons could be due to steric hindrance of MtrB. We believe that at least one further hypothesis can be raised. As shown by Hartshorne et al., the redox properties of MtrA and MtrC are modulated upon formation of an MtrCAB complex (18). Since modulation of redox properties might be a result of conformational changes, one could also hypothesize that the interaction of the final reductase MtrC with the MtrAB subcomplex could probably be responsible for both (i) modulation of the redox properties of MtrA and MtrC and (ii) conformational changes of MtrB, thus enabling electron flow from MtrA via MtrC to the terminal electron acceptor.



**Functional redundancy and complex formation control.** It seems to be a disadvantage to the cell to insert MtrB-like proteins into the outer membrane without an attached periplasmic *c*-type cytochrome. This was shown by experiments that displayed an MtrA-dependent stability of MtrB (18, 30). In other words, an MtrA deletion mutant is not able to insert MtrB into the outer membrane, most probably because MtrB is degraded in the periplasmic space (30). This dependency does not seem to be as strict for the SO4359 integral membrane protein. Expression experiments conducted with *S. oneidensis* MR-1, using plasmids containing a copy of either SO4359 or SO4360 in conjunction with SO4360, revealed that the SO4359 protein is more prone to degradation in the absence of the SO4360 decaheme cytochrome. However, these results are not comparable to those for the complete loss of MtrB in an *mtrA* null mutant strain. Moreover, the control of complex formation seems to be completely absent in *E. coli* as a host. Heterologous expression experiments revealed independent production of the SO4359 protein even when the SO4360 periplasmic *c*-type cytochrome was not coexpressed. However, expression of the SO4359  $\beta$ -barrel protein was not sufficient to rescue the phenotype of an *mtrB* null mutant. Hence, although the SO4359 protein seems to be produced and inserted into the outer membrane, the interaction with the adjacently encoded SO4360 decaheme cytochrome cannot be overcome by an interaction with MtrA. A functional substitution of one MtrA-like decaheme cytochrome for another one has so far been shown only in the case of MtrA and MtrD (26). *mtrD* expression can complement an *mtrA* mutation in a strain that produces MtrCDB, but this complementation comes with a >2-fold decrease of the iron reduction rate compared to that of an isogenic strain that expresses the native MtrCAB complex constituents (26). So far, it is not clear if the reason for this decrease in the ferric iron reduction rate is the loss of a certain percentage of MtrB due to periplasmic degradation or a diminished interaction of MtrD with MtrC. However, most importantly, as combinatorial expression profiles in our and previous studies have shown, no significant iron reduction occurs without a functional MtrAB-like module (25, 26, 54).

To date, the biological reason for why MtrB-like proteins in *S. oneidensis* MR-1 seem to be protected from periplasmic degradation in the presence of specific periplasmic cytochromes as interaction partners is unclear. A direct interaction of the two corresponding proteins in the periplasm prior to insertion of the  $\beta$ -barrel protein in the outer membrane has not been shown so far. Many questions still remain open. Could other chaperone-like proteins be involved in the MtrA-dependent stability of MtrB? Where and when does the interaction of MtrA and MtrB occur? Are there any specific domains of the respective proteins which could be responsible for the stability of the  $\beta$ -barrel protein? An opportunity to understand the remaining questions might be given by the MtrAB-like module described here, which reveals a milder structural dependence of the SO4359 protein on the SO4360 protein yet a remaining functional dependency on each other.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Robert Shanks, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, for providing plasmid pMQ150 and Carmen Cordova, ETH Zürich (Switzerland), for providing plasmid pSB377. We thank Andreas Schlosser, ZBSA, Freiburg, Germany, for LC-MS/MS analysis and peptide identification.

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for funding.

#### REFERENCES

- Lovley DR. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* 55:259–287.
- Lovley DR, Phillips EJ. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1472–1480.
- Myers CR, Nealon KH. 1990. Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.* 172:6232–6238.
- Richter K, Schicklberger M, Gescher J. 2012. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:913–921.
- Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol.* 49:219–286.
- Myers CR, Nealon KH. 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron-acceptor. *Science* 240:1319–1321.
- Nealon KH, Myers CR. 1992. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:439–443.
- Thamdrup B, Rossello-Mora R, Amann R. 2000. Microbial manganese and sulfate reduction in Black Sea shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2888–2897.
- Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, Lies DP, Saffarini DA, MacGregor BJ, Ringelberg DB, White DC, Nishijima M, Sano H, Burghardt J, Stackebrandt E, Nealon KH. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:705–724.
- Cornell RM, Schwertmann U. 2003. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Wang Z, Liu C, Wang X, Marshall MJ, Zachara JM, Rosso KM, Dupuis M, Fredrickson JK, Heald S, Shi L. 2008. Kinetics of reduction of Fe(III) complexes by outer membrane cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6746–6755.
- Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS, Nealon KH, Osterman AL, Pinchuk G, Reed JL, Rodionov DA, Rodrigues JL, Saffarini DA, Serres MH, Spormann AM, Zhulin IB, Tiedje JM. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:592–603.
- Fredrickson JK, Zachara JM. 2008. Electron transfer at the microbe-mineral interface: a grand challenge in biogeochemistry. *Geobiology* 6:245–253.
- Gralnick JA, Newman DK. 2007. Extracellular respiration. *Mol. Microbiol.* 65:1–11.
- Richardson DJ. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146:551–571.
- Shi L, Rosso KM, Clarke TA, Richardson DJ, Zachara JM, Fredrickson JK. 2012. Molecular underpinnings of Fe(III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front. Microbiol.* 3:50.
- Clarke TA, Edwards MJ, Gates AJ, Hall A, White GF, Bradley J, Reardon CL, Shi L, Beliaev AS, Marshall MJ, Wang Z, Watmough NJ, Fredrickson JK, Zachara JM, Butt JN, Richardson DJ. 2011. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:9384–9389.
- Hartshorne RS, Reardon CL, Ross D, Nuester J, Clarke TA, Gates AJ, Mills PC, Fredrickson JK, Zachara JM, Shi L, Beliaev AS, Marshall MJ, Tien M, Brantley S, Butt JN, Richardson DJ. 2009. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:22169–22174.
- Myers CR, Myers JM. 2002. MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5585–5594.
- Ross DE, Ruebush SS, Brantley SL, Hartshorne RS, Clarke TA, Richardson DJ, Tien M. 2007. Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5797–5808.
- Shi L, Chen B, Wang Z, Elias DA, Mayer MU, Gorby YA, Ni S, Lower BH, Kennedy DW, Wunschel DS, Mottaz HM, Marshall MJ, Hill EA, Beliaev AS, Zachara JM, Fredrickson JK, Squier TC. 2006. Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two

- outer membrane decaheme *c*-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* 188:4705–4714.
22. Beliaev AS, Saffarini DA. 1998. *Shewanella putrefaciens* *mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J. Bacteriol.* 180:6292–6297.
  23. Beliaev AS, Saffarini DA, McLaughlin JL, Hunnicutt D. 2001. MtrC, an outer membrane decaheme *c* cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol. Microbiol.* 39:722–730.
  24. Bretschger O, Obratsova A, Sturm CA, Chang IS, Gorby YA, Reed SB, Culley DE, Reardon CL, Barua S, Romine MF, Zhou J, Beliaev AS, Bouhenni R, Saffarini D, Mansfeld F, Kim BH, Fredrickson JK, Nealson KH. 2007. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7003–7012.
  25. Coursolle D, Gralnick JA. 2010. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Mol. Microbiol.* 77:995–1008.
  26. Coursolle D, Gralnick JA. 2012. Reconstruction of extracellular respiratory pathways for iron(III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Front. Microbiol.* 3:56.
  27. Schuetz B, Schicklberger M, Kuermann J, Spormann AM, Gescher J. 2009. Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7789–7796.
  28. Shi L, Squier TC, Zachara JM, Fredrickson JK. 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem *c*-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* 65:12–20.
  29. Bücking C, Popp F, Kerzenmacher S, Gescher J. 2010. Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 306:144–151.
  30. Schicklberger M, Bücking C, Schuetz B, Heide H, Gescher J. 2011. Involvement of the *Shewanella oneidensis* decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the beta-barrel protein MtrB. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1520–1523.
  31. Gralnick JA, Vali H, Lies DP, Newman DK. 2006. Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:4669–4674.
  32. Lutz R, Bujard H. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-12 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 25:1203–1210.
  33. Stookey LL. 1970. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42:779–781.
  34. Pitts KE, Dobbin PS, Reyes-Ramirez F, Thomson AJ, Richardson DJ, Seward HE. 2003. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *J. Biol. Chem.* 278:27758–27765.
  35. Leisman GB, Waukau J, Forst SA. 1995. Characterization and environmental regulation of outer membrane proteins in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:200–204.
  36. Gassman NR, Ho SO, Korlann Y, Chiang J, Wu Y, Perry LJ, Kim Y, Weiss S. 2008. In vivo assembly and single-molecule characterization of the transcription machinery from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Protein Expr. Purif.* 65:66–76.
  37. Shanks RM, Caiazza NC, Hinsa SM, Toutain CM, O'Toole GA. 2006. *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5027–5036.
  38. Kaniga K, Bossio JC, Galan JE. 1994. The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol. Microbiol.* 13:555–568.
  39. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6:343–345.
  40. Koerdt A, Paulick A, Mock M, Jost K, Thormann KM. 2009. MotX and MotY are required for flagellar rotation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* 191:5085–5093.
  41. Shanks RM, Kadouri DE, MacEachran DP, O'Toole GA. 2009. New yeast recombineering tools for bacteria. *Plasmid* 62:88–97.
  42. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:4350–4354.
  43. Marmur J. 1961. Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3:208–218.
  44. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760.
  45. Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, Marshall D. 2010. Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* 26:401–402.
  46. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
  47. Cordova CD, Schicklberger MFR, Yu Y, Spormann AM. 2011. Partial functional replacement of CymA by SirCD in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* 193:2312–2321.
  48. Firer-Sherwood M, Pulcu GS, Elliott SJ. 2008. Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:849–854.
  49. Gescher JS, Cordova CD, Spormann AM. 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Mol. Microbiol.* 68:706–719.
  50. Inoue K, Qian X, Morgado L, Kim BC, Mester T, Izallalen M, Salgueiro CA, Lovley DR. 2010. Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme *c*-type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3999–4007.
  51. Leang C, Coppi MV, Lovley DR. 2003. OmcB, a *c*-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 185:2096–2103.
  52. Coby AJ, Picardal FW. 2005. Inhibition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reduction by microbial Fe(III) reduction: evidence of a reaction between NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and cell surface-bound Fe<sup>2+</sup>. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5267–5274.
  53. Bird LJ, Bonnefoy V, Newman DK. 2011. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol.* 19:330–340.
  54. Bücking C, Piepenbrock A, Kappler A, Gescher J. 2012. Outer-membrane cytochrome-independent reduction of extracellular electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Microbiology* 158:2144–2157.
  55. Emerson D, Fleming EJ, McBeth JM. 2010. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:561–583.
  56. Jiao Y, Newman DK. 2007. The *pio* operon is essential for phototrophic Fe(II) oxidation in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. *J. Bacteriol.* 189:1765–1773.
  57. Liu J, Wang Z, Belchik SM, Edwards MJ, Liu C, Kennedy DW, Merkley ED, Lipton MS, Butt JN, Richardson DJ, Zachara JM, Fredrickson JK, Rosso KM, Shi L. 2012. Identification and characterization of MtoA: a decaheme *c*-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1. *Front. Microbiol.* 3:37.
  58. Kears M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649.

# Investigation of the Electron Transport Chain to and the Catalytic Activity of the Diheme Cytochrome *c* Peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*<sup>∇†</sup>

Björn Schütz,<sup>1</sup> Julian Seidel,<sup>2</sup> Gunnar Sturm,<sup>3</sup> Oliver Einsle,<sup>2</sup> and Johannes Gescher<sup>3\*</sup>

*Institut für Biologie II, Mikrobiologie, Universität Freiburg, Schänzlestr. 1, D-79104 Freiburg, Germany*<sup>1</sup>; *Institut für organische Chemie und Biochemie, Biochemie, Universität Freiburg, Albertstr. 21, D-79104 Freiburg, Germany*<sup>2</sup>; and *Institut für angewandte Biowissenschaften, Angewandte Biologie, Karlsruher Institut für Technologie, Fritz-Haber-Weg 2, D-76131 Karlsruhe, Germany*<sup>3</sup>

Received 17 March 2011/Accepted 30 June 2011

**Bacterial diheme *c*-type cytochrome peroxidases (BCCPs) catalyze the periplasmic reduction of hydrogen peroxide to water. The gammaproteobacterium *Shewanella oneidensis* produces the peroxidase CcpA under a number of anaerobic conditions, including dissimilatory iron-reducing conditions. We wanted to understand the function of this protein in the organism and its putative connection to the electron transport chain to ferric iron. CcpA was isolated and tested for peroxidase activity, and its structural conformation was analyzed by X-ray crystallography. CcpA exhibited *in vitro* peroxidase activity and had a structure typical of diheme peroxidases. It was produced in almost equal amounts under anaerobic and microaerophilic conditions. With 50 mM ferric citrate and 50 μM oxygen in the growth medium, CcpA expression results in a strong selective advantage for the cell, which was detected in competitive growth experiments with wild-type and Δ*ccpA* mutant cells that lack the entire *ccpA* gene due to a markerless deletion. We were unable to reduce CcpA directly with CymA, MtrA, or FccA, which are known key players in the chain of electron transport to ferric iron and fumarate but identified the small mono-heme ScyA as a mediator of electron transport between CymA and BCCP. To our knowledge, this is the first detailed description of a complete chain of electron transport to a periplasmic *c*-type cytochrome peroxidase. This study furthermore reports the possibility of establishing a specific electron transport chain using *c*-type cytochromes.**

The gammaproteobacterium *Shewanella oneidensis* is known as a model organism for the elucidation of biochemical mechanisms that enable an organism to respire on ferric (oxy)hydroxides (30). This respiratory process is biochemically challenging due to the insolubility of the terminal electron acceptor under neutral pH conditions, which demands an extended respiratory chain leading to the cell surface (47). Nevertheless, *Shewanella* and other dissimilatory iron reducers can greatly contribute to the oxidation of organic carbon sources in anaerobic freshwater and marine sediments and submerged soils (29, 47).

It is well established that *c*-type cytochromes are the essential electron transport chain proteins that transfer electrons to ferric iron (47). *S. oneidensis* contains the genetic information for 42 *c*-type cytochromes that mostly seem to be upregulated under anaerobic conditions. However, a stringent regulatory response to the available anaerobic electron acceptor seems to be mostly absent (4, 32). Hence, the periplasm of *S. oneidensis* cells grown under dissimilatory iron-reducing conditions contains numerous individual *c*-type cytochromes that might build an electron transport network (44). So far, three periplasmic *c*-type cytochromes have been shown to be essential to, or at

least involved in, the electron transport chain to ferric iron. CymA, a cytoplasmic-membrane-bound *c*-type cytochrome belonging to the NapC/NirT protein family, directs electrons from the menaquinol pool to the periplasm (36). This protein seems to be the branching point for a number of anaerobic electron transport chains, since it is also essential for growth with fumarate, nitrate, nitrite, and dimethyl sulfoxide (DMSO) (34, 45). The periplasmic *c*-type cytochrome MtrA and the periplasmic fumarate reductase FccA were shown to be very abundant under dissimilatory iron-reducing conditions. It was furthermore shown that they can be reduced directly by CymA and can exchange electrons. MtrA is an essential component of the electron transport chain mediating the reduction of ferric iron and is part of a protein complex that consists of the outer membrane cytochrome MtrC and the outer membrane β-barrel protein MtrB. This MtrA-MtrB-MtrC complex was shown to be capable of transferring electrons over a liposome membrane and hence *in vivo* most probably also over the outer membrane (21).

Besides MtrA and FccA, the periplasmic diheme peroxidase CcpA is abundant under dissimilatory iron-reducing conditions (44). Proteins of the *c*-type cytochrome peroxidase family can be found in yeast and bacteria. In bacteria, these enzymes are diheme proteins with two *c*-type heme groups (1). They seem to comprise a mechanism which protects the bacterial cell from oxidative damage caused by hydrogen peroxide or the peroxide-based formation of hydroxyl radicals via the Fenton reaction (52, 6). While bacteria often use different enzymes like catalase, glutathione peroxidase (Gpx), alkyl-hydroperoxide

\* Corresponding author. Mailing address: Institut für angewandte Biowissenschaften, Angewandte Biologie, Karlsruher Institut für Technologie, Fritz-Haber-Weg 2, D-76131 Karlsruhe, Germany. Phone: 49-721-608-41940. Fax: 49-721-608-41941. E-mail: johannes.gescher@kit.edu.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 8 July 2011.

TABLE 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Reference or source
<i>S. oneidensis</i>		
JG7 (MR-1)	Wild-type strain	35
JG51	$\Delta mtrA/pBADmtrA_{Strep-His}$	44
JG221	$\Delta ccpA$ (SO_2178)	This study
JG228	$\Delta fccA/pBADfccA_{Strep}$	44
JG231	$\Delta ccpA/pBADccpA_{His}$	This study
JG397	<i>S. oneidensis/pBADscyA_{His}</i>	This study
JG437	<i>S. oneidensis</i> 263645::[T <sub>ionB</sub> poly(A) araC P <sub>BAD</sub> ]	This study
<i>E. coli</i> AS457	DH5 $\alpha$ ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)$ 4380508::(P <sub>tet</sub> <i>cymA</i> )/pEC86	19
<i>S. cerevisiae</i> JG26 (InvSc1)	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52 his3-1/his3-1</i>	Invitrogen <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Karlsruhe, Germany.

reductase (Ahp), thiol peroxidase (Tpx), and bacterioferritin comigratory proteins (Bcp) as defense mechanisms against reactive oxygen species in the cytoplasm, cytochrome *c* peroxidases and some catalases catalyze the removal of hydrogen peroxide from the periplasm (1). However, their role is often not clear. Exposure of bacterial cells to excess oxygen increases the amount of hydrogen peroxide. But paradoxically, BCCPs are often upregulated preferentially under microaerobic or anaerobic conditions. It was speculated that hydrogen peroxide could be an alternative terminal electron acceptor and that cytochrome *c* peroxidases are used to transfer electrons to hydrogen peroxide (41). In *Geobacter sulfurreducens*, a BCCP was thought to be involved directly in the electron transport chain to ferric iron, but an additional study pointed toward an indirect effect since the mutant produced had a polar effect on following genes (5, 23). Other studies suggest that BCCPs play an important role in some pathogenic bacteria to protect the cell against hydrogen peroxide-producing phagocytes (53). However, because of many other reactive oxygen species-detoxifying enzymes present in bacteria and the often lacking phenotype of *bccP* deletion mutants, the true physiological role of cytochrome *c* peroxidases is not clear.

In this paper, the function of *S. oneidensis* CcpA is examined. We show that CcpA is expressed under strictly anaerobic and microaerophilic conditions and that its expression results in a selective advantage for *Shewanella* cells. A detailed biochemical characterization established that CcpA has the typical peroxidase structure and function. Surprisingly, CcpA is not directly connected to other periplasmic *c*-type cytochromes but is reduced via a distinct electron transport chain.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** The chemicals and biochemicals used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), and Promega (Mannheim, Germany). Enzymes were purchased from New England Biolabs (Frankfurt, Germany) and Biotline (Luckenwalde, Germany).

**Microorganisms and plasmids.** *S. oneidensis* MR-1 was used for expression of plasmid-carried *c*-type cytochrome genes. *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 was used for the construction of pMQ150-based suicide plasmids that were later utilized for the production of markerless deletion mutants of *S. oneidensis* (44, 46) (Table 1). General cloning reactions were performed with *Escherichia coli* TBI (2). Plasmid pBAD202 was purchased from Invitrogen (Karlsruhe, Germany).

**Growth conditions and media.** *E. coli* strains were grown at 37°C in LB medium or under anoxic conditions at 30°C in M9 minimal medium (47.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.2 mM NaCl, 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl) supplemented with 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 485  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 1.5 g liter<sup>-1</sup> Casamino Acids, 15  $\mu$ M thiamine

hydrochloride, and trace elements (5  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 57  $\mu$ M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5.4  $\mu$ M FeCl<sub>2</sub>, 1.3  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>, 67.2  $\mu$ M Na<sub>2</sub>EDTA, 3.9  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1.5  $\mu$ M Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 5  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>, and 1  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>). Glycerol was added to the medium as a carbon and electron source at a concentration of 0.5% (wt/vol). For anaerobic growth, 70 mM DMSO was provided as an electron acceptor. *S. oneidensis* strains were grown in LB medium or anoxically in mineral medium with a pH of 7.4 containing 50 mM lactate as the carbon and electron source and 50 mM ferric citrate, 100 mM fumarate, or 30 mM DMSO as a terminal electron acceptor. Mineral medium [1.27 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.73 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 9 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] was supplemented with 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, and trace elements (see above). If necessary, kanamycin (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) or chloramphenicol (30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) was added to the medium.

**Cloning of *ccpA*<sub>His</sub> and *scyA*<sub>His</sub>.** *ccpA*<sub>His</sub> was cloned into pBAD202 via TOPO cloning according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). This plasmid was used for overexpression of CcpA and  $\Delta ccpA$  complementation. PCR fragments were amplified in 2 steps. First, primers 1 and 2 were utilized to generate a fragment containing the *E. coli ompA* leader sequence for Sec system transfer into the periplasm, a His tag, and an overlap with primer 3 (see Table S1 in the supplemental material). *ccpA* (SO\_2178) was later amplified using primers 3 and 4, which led to the production of a truncated gene lacking sequence information for the native *sec* leader sequence (see Table S1). In another PCR, the fragments were fused using primers 1 and 4. Wild-type *scyA* was amplified with primers 5 and 6 (see Table S1). Primer 6 contains the genetic information for a C-terminal His tag. The fragment was cloned into pBAD202 via TOPO cloning according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

**Expression and purification of CcpA<sub>His</sub>, ScyA<sub>His</sub>, FccA<sub>Strep</sub>, and MtrA<sub>Strep-His</sub>.** All of the proteins used in this study were expressed in *S. oneidensis*. The cells were grown in LB medium at 30°C to an optical density at 600 nm of 0.5 and thereafter induced by the addition of 10 mM arabinose to the medium. After induction, the temperature was decreased to 14°C and growth was continued for 12 h. Cells were harvested via centrifugation at 3,000  $\times$  g and 4°C for 10 min. Periplasmic fractions were prepared as described previously (44). CcpA<sub>His</sub>, ScyA<sub>His</sub>, and MtrA<sub>Strep-His</sub> were purified using a 20-ml nickel-charged chelating cellulose column (Biotline, Luckenwalde, Germany). Thereafter, a HiLoad 26/60 Superdex 200 gel filtration column (GE, Freiburg, Germany) was charged with the BCCP-, ScyA-, and MtrA-containing fractions. FccA<sub>Strep</sub> was purified according to Schuetz et al. (44).

**Enzymatic characterization of CcpA<sub>His</sub>.** All steps were performed under anoxic conditions at 30°C. CcpA<sub>His</sub> was reduced by dithionite and subsequently loaded onto a PD10 column to remove surplus dithionite. Peroxidase activity was determined with reduced CcpA<sub>His</sub> using the chromogenic 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) (ABTS) assay (7). The assay mixture contained 0.1 M HEPES (pH 7.5), 3 mM ABTS, 5.1  $\mu$ g reduced CcpA<sub>His</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations ranging from 0.40  $\mu$ M to 50  $\mu$ M. ABTS oxidation was monitored photometrically at 420 nm (absorption coefficient [ $\epsilon$ ] = 36 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Quantification of CcpA in periplasmic protein fractions.** CcpA was detected by Western blotting after peroxidase activity staining with Immun-Star WesternC from Bio-Rad (Munich, Germany) using a ChemiDoc XRS+ detection system. Signals were quantified using the Image Lab software (Bio-Rad, Munich, Germany).

**Enzyme assays with *E. coli* membrane fractions.** *E. coli* AS457 cells were grown anaerobically in M9 minimal medium with DMSO as the terminal electron acceptor (Table 1). The *cymA*-containing operon was induced with 0.43 mM anhydrotetracycline. Membrane fractions from these cells and control cells that

were not induced with anhydrotetracycline were prepared as described before (44). Membrane integrity was tested using NADH dehydrogenase activity as described by Osborn et al. (37). Direct and indirect electron transfer from CymA to CcpA<sub>HIS</sub> was tested using a reaction mixture containing (0.5-ml total volume) 0.1 M HEPES (pH 7.5), 10 mM glycerol-3-phosphate, and 25  $\mu$ l of the membrane fraction (1.31 mg protein ml<sup>-1</sup>). Thereafter, 2.2 nmol CcpA<sub>HIS</sub> was added to the mixture. This amount far exceeds the catalytic concentrations of CymA in the membrane fraction. Electron transfer was recorded photometrically using the typical absorption maximum of reduced *c*-type cytochromes at 552 nm. Since electron transfer from CymA to CcpA<sub>HIS</sub> could not have been detected in these tests, the assays were repeated using catalytic amounts of purified FccA<sub>Strept</sub> (30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> [final concentration]), of purified MtrA<sub>Strept-HIS</sub> (16  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), of size exclusion-derived protein pools that were obtained from periplasmic protein fractions of *S. oneidensis*  $\Delta$ ccpA mutant cells (see below), and of purified ScyA<sub>HIS</sub> (49  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

**Construction of a markerless ccpA deletion in *S. oneidensis*.** Markerless deletion mutants were constructed as described previously (44). The 500-bp PCR fragments flanking *ccpA* (SO\_2178; amplified with primers 7 to 10; see Table S1 in the supplemental material) were cloned into linearized plasmid pMQ150 using an *S. cerevisiae*-based recombination system (46).

**Construction of a conditional scyA mutant of *S. oneidensis*.** We and others were unable to construct a markerless  $\Delta$ scyA mutant as described for *ccpA* (18). Hence, a conditional mutant with an inducible promoter upstream of *scyA* was constructed. The pBAD promoter was cloned in front of the *scyA* gene to gain control over gene expression via arabinose addition to the medium. Readthrough from the *araC* promoter to the cytochrome *c* biogenesis gene cluster promoter and vice versa was prohibited by insertion of the bidirectional, rho-independent *tonB* terminator downstream of the *araC* gene (40). The individual parts of the construct were generated by PCR using primers 11 to 14 (*S. oneidensis* was used as the template) and 15 and 16 (the pBAD202/D-TOPO vector was used as the template) (see Table S1 and Fig. S1 in the supplemental material). The *tonB* terminator and a poly(A) sequence were inserted artificially using primer 15. Fragment assembly and insertion into the pMQ150 vector were performed by isothermal *in vitro* assembly (20). The resulting vector was transformed into *E. coli* S-17. Following conjugation, 1st and 2nd crosses were performed as described previously (44).

**Competitive growth experiment.** *S. oneidensis* wild-type and  $\Delta$ ccpA mutant cells were grown at 30°C in mineral medium with 25 mM lactate as the sole carbon and electron source and 50 mM DMSO as the terminal electron acceptor. Cells were harvested and then washed with mineral medium and adjusted to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 1.2. Afterwards, the two cell suspensions were mixed at a 1:1 ratio and 100 ml mineral medium containing 25 mM lactate, 50  $\mu$ M oxygen, and 50 mM ferric citrate was inoculated with 1 ml of this cell mixture. To determine if both wild-type and  $\Delta$ ccpA mutant cells were at a 1:1 ratio, samples were taken and a series of dilutions was plated on LB-agar plates. The same procedure was followed when 35 mM ferric citrate was reduced. Subsequently, 1 ml of this culture was used to inoculate a new bottle containing 100 ml of the above-described mineral medium and when the added 35 mM ferric iron was reduced, samples were taken and plated on LB-agar plates. This step was repeated again. The colonies were then tested for the existence of the *ccpA* gene using primers 17 and 18 (see Table S1 in the supplemental material). Ninety-six colonies were tested at each time point. The experiment was performed in independent triplicates.

**Inhibition zone plate assay.** *S. oneidensis* wild-type and  $\Delta$ ccpA and  $\Delta$ ccpA mutant cells complemented with the *ccpA*<sub>HIS</sub>-carrying plasmid were grown at 30°C in mineral medium with 50 mM lactate as the sole carbon and electron source and 100 mM fumarate as the terminal electron acceptor. One-hundred-microliter volumes of the individual strains were plated on corresponding agar plates when the cells reached stationary phase. These plates furthermore contained 100 mM arabinose to induce the plasmid-carried copy of the *ccpA* gene. Ten microliters of a 10% hydrogen peroxide solution was pipetted onto filter papers, and these filter papers were set in the middle of each plate. Afterwards, the plates were incubated for 4 days at 30°C in a 1% O<sub>2</sub>-99% N<sub>2</sub> atmosphere. Thereafter, inhibition zones were measured and compared to those obtained with the wild type.

**Identification of *c*-type cytochromes from gel filtration fractions.** *S. oneidensis*  $\Delta$ ccpA mutant cells were grown at 30°C in mineral medium with 25 mM lactate as the sole carbon and electron source and 50 mM ferric citrate as the terminal electron acceptor. Cells were harvested, and the periplasmic fraction was prepared as described above. Thereafter, a HiLoad 26/60 Superdex 200 gel filtration column (GE, Freiburg, Germany) was loaded with 2 ml of this periplasmic fraction (3.43 mg ml<sup>-1</sup>). The flowthrough fraction was analyzed using a Quad Tech detector system (Bio-Rad, Munich, Germany) set to 408 and 420 nm.

Fractions showing a signal at 408/420 nm were used for the enzyme assay with *E. coli* membrane fractions (as described above). Fractions showing electron transfer activity from CymA to CcpA were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After heme-linked peroxidase staining (51), a band at 10 kDa was excised from the gel and analyzed by mass spectrometry.

**Quantification of cells and ferrous iron during growth experiments.** *S. oneidensis* strains JG7 and JG221 (Table 1) were grown under anoxic conditions in mineral medium with 30 mM DMSO as the terminal electron acceptor and 50 mM lactate as the sole carbon and electron source. In the mid-logarithmic growth phase, cells were washed with mineral medium lacking the electron donor and acceptor and transferred to mineral medium containing 50 mM ferric citrate and 50  $\mu$ M oxygen as the terminal electron acceptors and 15 mM lactate as the sole electron donor and carbon source. At various time points, samples were taken and subsequently used to determine the number of CFU by plating a series of dilutions onto LB-agar plates. The same experiment was performed with mineral medium containing 50 mM ferric citrate, 15 mM lactate, and 1.5 mM titanium(III) citrate. Titanium(III) citrate was prepared as described by Zehnder and Wuhrmann (54).

**Preparation of medium containing oxygen at micromolar concentrations.** Twenty-five-milliliter volumes of mineral medium with 25 mM lactate was used to fill 120-ml bottles sealed with rubber stoppers. Oxygen was removed from the medium by repeatedly flushing the headspace of each bottle for 2 min with nitrogen and then applying a vacuum for 2 min. Nitrogen gas and vacuum cycles were repeated several times. Afterwards, 0.1 mM resazurin was added and titrated with a 10 mM dithionite solution until the color change provided evidence of reduced medium. The amount of dithionite added was used to calculate the initial amount of oxygen in the medium. Oxygen concentrations were measured in triplicates in bottles that contained the same volume as the bottles that were inoculated later but did not contain the terminal electron acceptor ferric iron. Therefore, we did not have to account for dithionite-based ferric iron reduction.

**Peroxide reduction cell suspension assay.** Overnight cultures of *S. oneidensis* wild-type cells and strains JG221, JG231, and JG437 (Table 1) were grown anaerobically in minimal medium containing 50 mM fumarate as an electron acceptor and 50 mM lactate as the sole carbon and electron source. The cells were harvested and washed with minimal medium lacking the electron acceptor. All further steps were performed at 10°C under anoxic conditions. To the assay mixture containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a final concentration of 50  $\mu$ M and minimal medium, cells were added to a final OD<sub>600</sub> of 0.3. Immediately after the addition of cells and after different time points, 200- $\mu$ l samples were taken. The reaction was stopped with 800  $\mu$ l 70% ethanol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was quantified according to Cohn et al. (8). To identify whether electron flow from the menaquinol pool via CymA is the only way to transfer electrons to ScyA and CcpA, we used the menaquinol analog 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (HQNO) at a final concentration of 25  $\mu$ M to inhibit electron transfer via CymA (24, 42).

**Determination of protein and SDS-PAGE.** Protein was determined by the method of Bradford with bovine serum albumin as the standard (9). PAGE (10% polyacrylamide) was performed according to Laemmli (26). Proteins were visualized by Coomassie blue staining. Gels were examined for the presence of *c*-type cytochromes by heme-linked peroxidase staining as described before (51).

**Crystallization and data collection.** CcpA crystals suitable for solving the three-dimensional structure were obtained by sitting-drop vapor diffusion using a reservoir solution containing 26% (wt/vol) polyethylene glycol 2000 monomethyl ether and 0.1 M bis-(2-hydroxyethyl)-amino-*tris*-(hydroxymethyl)methane buffer at pH 5.0. One microliter of the reservoir solution was mixed with 1  $\mu$ l of dithionite-reduced protein solution (7.5 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) and equilibrated against 200  $\mu$ l of reservoir solution. The crystallization was carried out under anoxic conditions in an N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (95%/5%) atmosphere at <1 ppm O<sub>2</sub>. All solutions were degassed by various vacuum and N<sub>2</sub> cycles using modified Schlenk techniques. Thin, elongated crystal plates appeared after several days and tended to intergrow, such that individual plates had to be manually removed from plate clusters for data collection. After the addition of 10% (vol/vol) 2*R*,3*R*-butanediol as a cryoprotectant, the crystals were mounted in nylon loops and flash-cooled in liquid nitrogen. Data were collected at beam line X11 at EMBL/DESY, Hamburg, Germany. Diffraction data were indexed and integrated using MOSFLM (28) and scaled and converted to intensities using programs in the CCP4 suite (3).

Crystals of CcpA belonged to space group P1 with unit cell parameters of  $a = 50.8 \text{ \AA}$ ,  $b = 81.2 \text{ \AA}$ ,  $c = 85.9 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 114.0^\circ$ ,  $\beta = 102.1^\circ$ , and  $\gamma = 90.0^\circ$ , with four monomers per asymmetric unit. For data collection statistics, see Table S2 in the supplemental material.

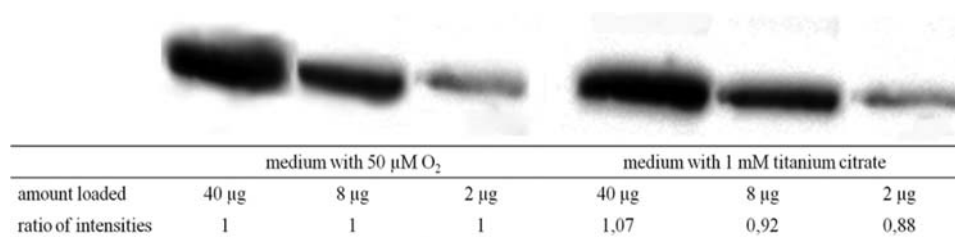


FIG. 1. Relative quantification of CcpA in periplasmic fractions of *S. oneidensis* wild-type cells grown under microoxic or anoxic conditions. Various amounts of periplasmic protein fractions were subjected to SDS-PAGE. Bands corresponding to CcpA were quantified for their intensity after peroxidase staining using the Image Lab software (Bio-Rad). The intensity of each CcpA signal derived from cells grown under microoxic ferric-iron-reducing conditions was set to 1 and thereafter correlated with the signal intensities quantified from cells grown in medium that was further reduced using titanium citrate.

**Structure solution and refinement.** Phase information for CcpA was obtained by molecular replacement with MOLREP (3) using the structure of *G. sulfurreducens* CcpA (Protein Data Bank ID: 3HQ6) (22) as a search model. The two proteins show a sequence identity of 66%. Amino acid exchanges and manual rebuilding were carried out in COOT (14), and refinement was done using REFMAC5 (33). The final structure was validated using PROCHECK (27). Figures were created using PyMOL (10). For refinement statistics, see Table S3 in the supplemental material.

**Protein structure accession number.** The coordinates of CcpA were deposited in the Protein Data Bank (accession number 3O5C).

## RESULTS

**Presence of CcpA under anaerobic and microaerobic growth conditions.** CcpA is a periplasmic *c*-type cytochrome. Its production under dissimilatory iron-reducing conditions in *S. oneidensis* results in a prominent signal on a heme activity stain of a periplasmic protein fraction (44). The aim of the first set of experiments was to establish whether CcpA production is triggered by the presence of oxygen. Hence, *S. oneidensis* was grown in minimal medium under dissimilatory iron-reducing conditions either in medium containing 50  $\mu\text{M}$  oxygen or in medium that was fully reduced using 1 mM titanium citrate. Periplasmic fractions from both experimental setups were prepared when cells reached the mid-logarithmic growth phase. CcpA signal quantification revealed that the concentration of this protein within the periplasmic fraction was impacted only slightly, if at all, by the presence of micromolar concentrations of oxygen (Fig. 1). This might imply that the production of this peroxidase is a constitutively expressed mechanism of detoxification that is beneficial for growth within the ecological niche of *S. oneidensis*.

**Distribution of *ccpA* within the genus *Shewanella*.** Using the Joint Genome Institute integrated microbial genomes tool, we looked for orthologs of *ccpA* from *S. oneidensis* within the genomes of other sequenced strains of the genus. The analysis revealed that 17 of the 21 sequenced strains contain a *ccpA* ortholog (see Table S4 in the supplemental material). *ccpA* most likely forms a single gene operon, since it is flanked by genes coding in opposite directions or else the gap between the start codon of *ccpA* and the stop codon of the next upstream gene is at least 234 bp (see Table S4). Interestingly, *ccpA* can be found in two genomic contexts. In one group of strains (*S. oneidensis*, *Shewanella* sp. strain MR7, *Shewanella* sp. strain MR-4, *S. putrefaciens* CN-32, *S. putrefaciens* 200, *Shewanella* sp. strain W3-18-1, *S. baltica* OS185, *S. baltica* OS195, *S. baltica* OS223, and *S. baltica* OS155), *ccpA* is flanked by a hypothetical

gene and a gene for a nucleoid-associated protein that are both oriented in opposite directions with respect to *ccpA*. In the other group (*S. sediminis*, *S. benthica*, *S. woodyi*, *S. halifaxensis*, *S. pealeana*, and *S. piezotolerans*), a small transmembrane protein is encoded by a gene that is found upstream of *ccpA* and is oriented in the same direction while a hypothetical gene is found downstream and is oriented in the opposite direction. A neighbor-joining algorithm-based tree derived from an alignment of the *ccpA* genes showed nicely that the various genomic contexts are mirrored within the similarity of *ccpA* sequences (see Fig. S2A in the supplemental material). Furthermore, the *ccpA* sequence-based tree is almost fully confirmed by a 16S rRNA-based tree of the 17 *Shewanella* strains (see Fig. S2B).

**Enzymatic characterization.** A His-tagged version of CcpA from a plasmid and under arabinose promoter control was expressed in *S. oneidensis*. The enzyme was thereafter purified using metal affinity and gel permeation chromatography. Purified CcpA<sub>His</sub> was characterized for its H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reducing activity using a colorimetric test based on the oxidation of the electron donor ABTS. CcpA<sub>His</sub> showed a maximum reaction rate of  $20.2 \pm 0.8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$  and a half-maximal rate at an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of  $11.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ . The turnover number was determined to be  $23.1 \text{ s}^{-1}$ . The measured reaction rates agree well with rates determined for other *c*-type cytochrome peroxidases (22, 50).

**Three-dimensional structure of CcpA<sub>His</sub>.** The structure of CcpA<sub>His</sub> was solved by X-ray crystallography to a resolution of 1.8 Å. The protein did not crystallize in the as-isolated (oxidized) state but yielded well-diffracting crystals in the all-ferrous form after reduction with sodium dithionite. CcpA<sub>His</sub> forms a homodimer that is highly similar to the dimers observed in other bacterial diheme peroxidases from *Pseudomonas aeruginosa* (17), *Nitrosomonas europaea* (48), *Paracoccus denitrificans* (13), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (previously *Pseudomonas nautica*) (11), *Paracoccus pantotrophus* (12), and *G. sulfurreducens* (22) (Fig. 2; see Fig. S3 in the supplemental material). As reduction of at least the high-potential heme group leads to a well-described conformational rearrangement of three loop regions of the protein that is an essential prerequisite for activity, the dithionite-reduced structure of CcpA<sub>His</sub> shows the open (or OUT) conformation of the enzyme, with the distal axial histidine ligand of the low-potential heme removed and this position revealed as the binding site for the substrate hydrogen peroxide (Fig. 2; see Fig. S3). The protein chain folds into two distinct domains, both of



FIG. 2. Three-dimensional structure of *S. oneidensis* CcpA. The protein shows the typical architecture of bacterial cytochrome *c* peroxidases, consisting of two distinct globular domains with a canonical globin fold that each contain one *c*-type heme group. The reduced (active) form of the protein has the distal axial position of the low-potential heme group (top) exposed as a binding site for the substrate. The high-potential heme group (bottom) has His and Met as axial ligands and serves as an electron transfer center. Conserved features further include a functionally essential tryptophan residue and a coordinated calcium ion (green) in the domain interface.

which show a predominantly  $\alpha$ -helical globin fold. The N-terminal domain covalently binds the active-site high-potential heme via thioether bonds involving residues Cys-60 and Cys-63, with the following His-64 forming the proximal axial ligand to the heme iron (see Fig. S3). The C-terminal domain contains the electron transfer low-potential heme group that is bonded to residues Cys-204 and Cys-207 of the second heme-binding motif, again with the subsequent His-208 residue as the proximal axial ligand. The distal position is coordinated by the  $S_{\gamma}$  atom of Met-279. Between the two domains, residue Trp-103 is juxtaposed between the high- and low-potential heme groups, and its presence was shown to be essential for intramolecular electron transfer (38) (see Fig. S3). BCCPs also generally contain a calcium ion in the intradomain interface, and CcpA<sub>His</sub> is no exception, with  $Ca^{2+}$  being coordinated by the side chains of Asn 88 and Pro 232.

**Selective advantage resulting from CcpA production.** Various reports about periplasmic peroxidases were published that showed that the function of these proteins is not always reflected in a detectable phenotype of deletion mutants with changes in the corresponding genes (53, 1). Since CcpA is abundant under microoxic conditions, we wanted to determine whether this situation might be different in *S. oneidensis*. Therefore,  $\Delta ccpA$  mutant and wild-type cells were grown under dissimilatory iron-reducing conditions in medium containing 50  $\mu$ M oxygen. Wild-type cells grew 1.4-fold faster than mutant cells (Fig. 3). This seemingly subtle difference in growth became more prominent when comparative growth experiments were performed. Wild-type and mutant cells were added at a 1:1 ratio in the above-described medium. When 70% of the ferric iron was reduced, a fraction of the culture was used as the inoculum for another growth experiment. Within only three rounds of incubation and inoculation, the concentration of the mutant cells dropped from 50% to 20%

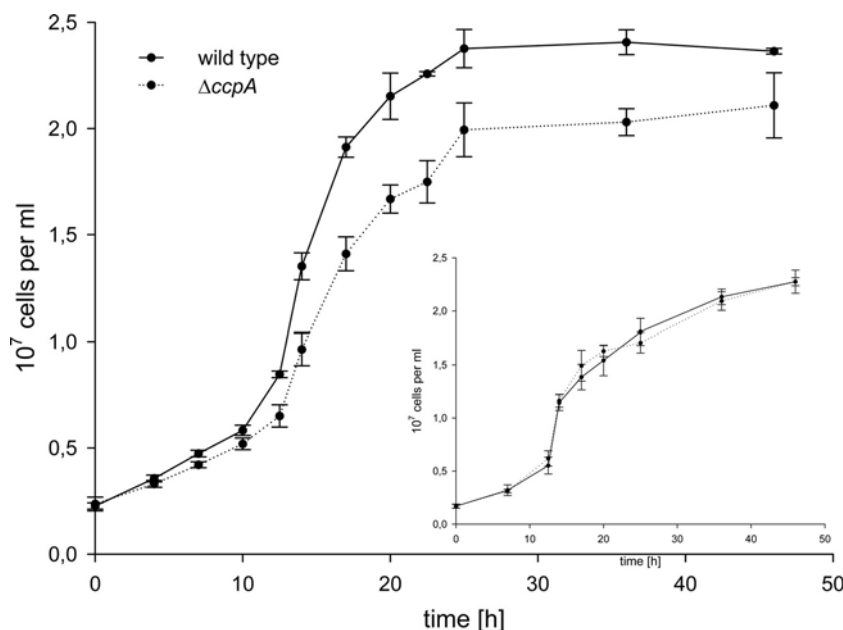


FIG. 3. Growth of *S. oneidensis* wild-type and  $\Delta ccpA$  mutant cells. Cells were grown in independent triplicates under microaerophilic conditions in medium containing 50 mM ferric citrate and 15 mM lactate. Growth was determined via the quantification of CFU on LB-agar plates. The inset shows a control experiment performed with medium that was further reduced with 1.5 mM titanium citrate.

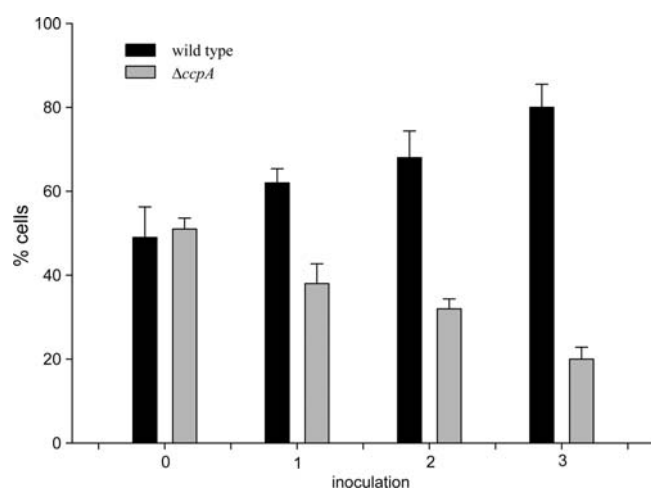


FIG. 4. Competitive growth experiments. *S. oneidensis* wild-type and  $\Delta ccpA$  mutant cells were mixed at a 1:1 ratio and subsequently added to microoxic medium containing 50  $\mu$ M oxygen, 50 mM ferric citrate, and 25 mM lactate. An aliquot of the sample was plated on LB medium immediately after the inoculation of the first bottle (inoculation 0) and when 35 mM ferrous iron was produced (inoculation 1). At this point, 1% of the culture was used for the inoculation of another bottle. Again, after reduction of 35 mM ferric citrate (inoculation 2), cells were plated on LB agar and 1% of the culture was used for the last inoculation that was used, as well as for the quantification of CFU after the reduction of 35 mM ferric citrate (inoculation 3). Wild-type and  $\Delta ccpA$  mutant cells were distinguished by PCR. All experiments were conducted in independent triplicates.

while the concentration of wild-type cells increased accordingly (Fig. 4). Hence, production of CcpA results in a selective advantage under microaerophilic growth conditions. To exclude the possibility that this difference is caused by a secondary effect of the *ccpA* deletion, cells were grown in anoxic medium that was reduced using titanium citrate. The absence of oxygen makes the production of hydrogen peroxide impossible, and therefore, growth differences should not be detectable. As Fig. 3 indicates, under these growth conditions, both cultures grew with the same doubling time and therefore CcpA production was not advantageous under oxygen-free conditions.

A selective advantage of CcpA production due to higher hydrogen peroxide tolerance was furthermore detected using a simple "zone of inhibition" plate assay. Cultures of *S. oneidensis* wild-type and  $\Delta ccpA$  and  $\Delta ccpA$  mutant cells complemented using a pBAD plasmid carrying the *ccpA* gene under arabinose promoter control were plated on medium containing lactate as a carbon and energy source and fumarate as an electron acceptor. Ten microliters of a 10%  $H_2O_2$  solution was added to the center of the plate. The inhibition zone without bacterial growth of the  $\Delta ccpA$  mutant was  $24\% \pm 1\%$  larger than that of the wild type. The inhibition zone of the complemented mutant was only  $9\% \pm 1\%$  larger than that of the wild type. Therefore, and hence underlining the previous experiments, CcpA evidently provides for higher hydrogen peroxide tolerance.

**The electron transport chain to CcpA.** The periplasm of *S. oneidensis* contains a variety of different *c*-type cytochromes, and these cytochromes were hypothesized to build a dynamic

electron transfer network that is dependent on the connection to the menaquinol pool via the membrane-bound tetraheme *c*-type cytochrome CymA. Therefore, we examined whether BCCP is part of this network and what the potential electron donors for this enzyme might be. To gain this information, we used an already established enzyme assay that is based on an *E. coli* strain that contains a copy of the *cymA* gene from *S. oneidensis* in its genome (19). In brief, when this *E. coli* strain is grown under anaerobic conditions with glycerol as a carbon source and DMSO as the electron acceptor in medium that contains anhydrotetracycline, it is possible to reduce membrane-bound CymA using glycerol-3-phosphate. When catalytic amounts of this membrane fraction with glycerol-3-phosphate are added to high concentrations of various periplasmic *c*-type cytochromes, it is feasible to directly monitor the reduction process using the distinct absorption maxima of reduced *c*-type cytochromes at 521 and 552 nm. Using this assay, direct electron transfer from CymA to the highly abundant periplasmic cytochromes FccA and MtrA of *S. oneidensis* was shown and quantified (44). In contrast to FccA and MtrA, direct reduction of CcpA<sub>His</sub> via CymA was not detectable using this assay, although the catalytic function of the membrane fractions was shown to be adequate using purified MtrA and FccA. Hence, CcpA does not seem to be directly connected to CymA. It was then asked whether MtrA or FccA could function as a protein shuttling electrons between CymA and CcpA. Therefore, catalytic amounts of CymA containing membranes and FccA<sub>Strep</sub> (249 pmol) or MtrA<sub>Strep-His</sub> (255 pmol) were added to 2.2 nmol CcpA<sub>His</sub> (see Fig. S4 in the supplemental material). Again, electron transfer onto CcpA<sub>His</sub> was not detectable. Since CymA, MtrA<sub>Strep-His</sub>, and FccA<sub>Strep</sub> were not suitable for electron transfer to CcpA, a periplasmic fraction from  $\Delta ccpA$  mutant cells grown under dissimilatory iron-reducing conditions was used. Using a small amount of this fraction (32  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> [final concentration]), electron transfer from CymA to CcpA<sub>His</sub> was detectable at a rate of 23 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> membrane protein. Isolation of the potential electron transferring cytochrome was conducted using a gel filtration column. The periplasmic fraction was loaded on the column, and all fractions that contained detectable amounts of *c*-type cytochromes were used in the above-described assay. Only the fractions with small proteins showed the ability to transfer electrons from CymA to CcpA<sub>His</sub>. The corresponding fractions were subjected to SDS-PAGE. This gel was subsequently used for heme activity staining, and only one heme-containing protein was detectable, at a molecular mass of 10 kDa (see Fig. S5 in the supplemental material). This band was excised from the gel and mass spectrometrically analyzed using an *S. oneidensis* peptide database. The monoheme protein ScyA (SO\_0264) was the only detectable *c*-type cytochrome in the excised gel fragment. ScyA has a deduced molecular mass of 8.3 kDa, which agrees well with the spot detected at 10 kDa. A His-tagged version of ScyA was thereafter purified using metal-chelating and gel permeation chromatography to confirm that it is able to transfer electrons between CymA and CcpA<sub>His</sub> (see Fig. S4 in the supplemental material). We repeated the assay by adding small amounts of ScyA<sub>His</sub> (49  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) to the reaction mixture and could detect electron transfer from CymA to CcpA<sub>His</sub> via ScyA<sub>His</sub> at a rate of 158 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> membrane protein. Thus, electron transfer to CcpA via ScyA seems



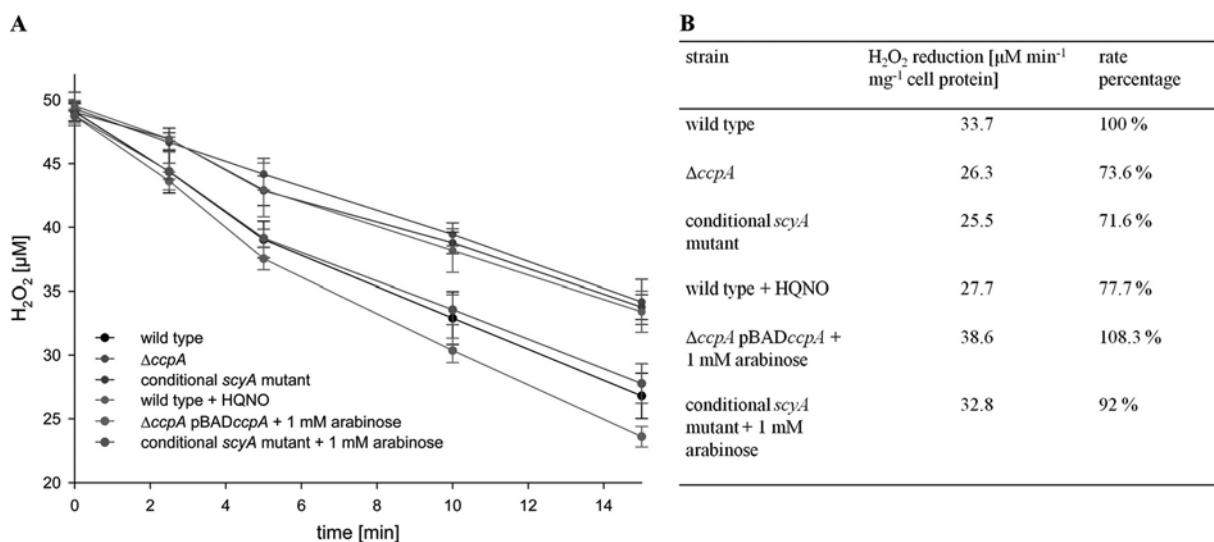


FIG. 5. Cell suspension assay. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction was measured in cell suspension experiments using cells that were grown anaerobically with fumarate as an electron acceptor. The assay mixture contained minimal medium, 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and cells with a final OD<sub>600</sub> of 0.3. (B) Overview of the hydrogen peroxide reduction rates measured. The wild-type rate was arbitrarily set to 100%.

to be specific and CcpA does not seem to be part of a CymA-MtrA-FccA-based electron transfer network in the periplasm of *S. oneidensis*. The dependence on CymA as a membrane-bound electron donor for ScyA was tested using membranes from the corresponding strain that was grown in the absence of anhydrotetracycline. CymA expression was therefore omitted. Electron transfer to CcpA was not detectable using these membranes.

**Comparison of hydrogen peroxide reduction rates of *scyA* and *ccpA* mutant cells.** If ScyA is the only connection for CcpA to CymA and thereby to the menaquinol pool, then *scyA* and *ccpA* mutants should both show equally decreased hydrogen peroxide reduction rates compared to that of the wild type. Interestingly, we and others were unable to construct a markerless *scyA* deletion mutant (18). Therefore, a conditional *scyA* mutant with a pBAD promoter in front of the gene was constructed. Addition of arabinose was necessary to obtain mutant cells during second-cross-over selection. Still, addition of arabinose was not crucial for growth of the mutant cells but increased their doubling time. Arabinose addition might not be essential at this stage due to the leakiness of the promoter.

Wild-type and  $\Delta ccpA$  and conditional *scyA* mutant cells were grown anaerobically in medium containing fumarate as an electron acceptor and lactate as a carbon and electron source. Cells were then washed, and hydrogen peroxide reduction rates were determined in a cell suspension assay. Both mutants showed a 30% decreased rate of hydrogen peroxide reduction compared to that of the wild type, which we regard as evidence that ScyA is the only periplasmic electron donor for CcpA (Fig. 5). Complementation of the mutants, achieved by the addition of arabinose either to the conditional *scyA* mutant or to the *ccpA* mutant carrying a plasmid containing the *ccpA* gene under arabinose promoter control, restored the ability of the cells to reduce hydrogen peroxide to wild-type or even higher levels (Fig. 5).

**Hydrogen peroxide reduction rates in HQNO-treated wild-type cells.** Finally, it was determined whether electrons that are

transferred to CcpA are derived from the menaquinol pool of the cell and are therefore most probably transported by CymA into the periplasm. We expected that hydrogen peroxide reduction would be equally impacted in wild-type and  $\Delta ccpA$  mutant cells when wild-type cells were treated with the menaquinol analogue HQNO (25, 42, 31). Hence, wild-type cells were preincubated with 25  $\mu\text{M}$  HQNO and tested again for the ability to remove hydrogen peroxide in cell suspension assays. Hydrogen peroxide was reduced by these cells at a rate of 27.69  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{cell protein}$ , which is 78% of the wild-type activity and is therefore very close to the activities recorded for the *ccpA* and *scyA* mutants. We regard these results as strong evidence for a menaquinol pool-based origin of electrons that are transferred to CcpA.

## DISCUSSION

Bacterial *c*-type cytochrome peroxidases seem to be part of an array of enzymes that protect cells from oxidative stress in an orchestrated way. *S. oneidensis*, for instance, contains, besides *ccpA*, three genes that are similar to genes coding for catalases (SO\_1070, SO\_0725, and SO\_4405), two genes similar to genes encoding glutathione peroxidases (SO\_1563 and SO\_3349), one gene similar to genes coding for thioredoxin-dependent thiol peroxidases, and one gene potentially coding for a superoxide dismutase (SO\_2881). This position within a multitude of other enzymes that all reduce the concentration of reactive oxygen species might be the reason for the often lacking phenotype of *c*-type cytochrome peroxidase deletion mutants. Interestingly, bacterial cytochrome peroxidases are upregulated under microaerophilic to anaerobic growth conditions. Hence, it was tested whether under these microaerophilic growth conditions a phenotypic advantage of CcpA production might become obvious. A competitive growth experiment impressively showed the benefit of CcpA production for *S. oneidensis*. Within only three cycles of incubation and inoculation in medium containing oxygen and ferric iron,

a decrease in the percentage of  $\Delta ccpA$  mutant cells from 50 to 20% occurred, while the wild-type concentration rose from 50 to 80%. The cell suspension assays conducted further revealed that CcpA accounts for 30% of the total hydrogen peroxide removal activity of the cell. Hence, the strong selective advantage revealed in the competitive growth experiments is surprising and although other enzymes might be expressed to cope with oxidative stress too, CcpA seems to function as a major protectant for the cell. This selective advantage seems to be high enough to disregard the costs of the production of a heme cofactor-containing enzyme. Of note, the selective advantage of the wild type over the  $ccpA$  mutant could be furthermore caused by a facilitated formation of proton motive force since catabolic electrons are transferred onto hydrogen peroxide. Still, CcpA accounts for only 30% of the overall hydrogen peroxide removal activity of the cell, and the hydrogen peroxide concentration in the growth medium will be below a thousandth of the ferric iron concentration. Hence, we favor the assumption that the selective advantage is due to hydrogen peroxide detoxification.

*Shewanella* species are obligate respiratory organisms and can use oxygen and an array of different anaerobic substances as electron acceptors. Most of the described *Shewanella* species were isolated either from an aquatic sediment or the oxic/anoxic interface region of seawater (16). In these areas, fluctuations of the available oxygen concentration on a low overall basis have to be assumed. Thus, the microoxic growth experiments conducted might indeed reflect the *in situ* niche of organisms belonging to the genus *Shewanella*. If this is true and considering the demonstrated growth advantage of the wild type over a  $\Delta ccpA$  mutant, it is not surprising that most of the sequenced *Shewanella* strains contain a  $ccpA$  ortholog. Furthermore, we observed that 16S rRNA gene- and  $ccpA$  sequence-based trees cluster very similarly. This is evidence of the existence of  $ccpA$  in the ancestor of these strains and consequently negates the possibility of the acquisition of  $ccpA$  via horizontal gene transfer in one group of strains.

We were surprised to see that CcpA could not have been reduced directly by CymA or using the abundant periplasmic cytochrome MtrA or FccA as an electron shuttle. Usually it is assumed that *c*-type cytochrome-mediated electron transfer processes are rather unspecific and that cytochromes with at least overlapping redox potentials can exchange electrons (15). CcpA reduction, instead, seems to demand the presence of the small mono-heme cytochrome ScyA, although redox potentials of cytochrome groups in MtrA with  $-375$  to  $-200$  mV and FccA with  $-102$  to  $-238$  mV should provide electrons at a potential sufficient to reduce a di-heme peroxidase (39, 53). We hypothesize that *S. oneidensis* CcpA might demand a specific electron-donating cytochrome since the high-potential heme site—similar to other members of the CcpA family—is rather deeply embedded in the overall structure, as shown in Fig. 2. If this feature causes the inability of CcpA to accept electrons from CymA, FccA, or MtrA directly, we have to assume that the coordinates of heme sites in these three proteins have to be considerably different since all three are most likely capable of donating electrons to and accepting them from each other. Indeed, the structure of the *S. oneidensis* FccA ortholog in *S. frigidimarina* (Molecular Modeling Database ID: 35974) clearly indicates that the *c*-type cytochrome-containing domain

displays 3 of the 4 heme groups at the surface of the enzyme, unlike BCCP. CymA is a member of the NapC/NrfH family of tetraheme cytochromes *c* (49) and is likely to be highly similar in structure to the NrfH subunit of the dissimilatory cytochrome *c* nitrite reductase NrfHA (43), which shows a large extent of heme group exposure. Although structural information about MtrA is not available, it seems plausible that the situation is similar, since the cofactor density (measured in the amount of cytochrome cofactor per kDa) in these proteins is almost four times as high as in CcpA. On the basis of this argument, it seems appropriate to assume that proteins like MtrA might have evolved in an environment that selected for electron-harvesting proteins that were able to accept electrons from a multitude of other periplasmic proteins.

Although CcpA is not directly connected to CymA, we could show *in vitro* that its electron donor, ScyA, can be reduced by CymA and that electrons for CcpA reduction are most probably taken from the menaquinol pool. Hence, hydrogen peroxide could theoretically function as the terminal electron acceptor under anaerobic conditions with an electron transport chain that potentially consists of CymA, ScyA, and BCCP. Even more importantly, the anaerobic respiratory chain can provide electrons for the detoxification of reactive oxygen species. If the niche of *Shewanella* strains is supposed to be within the oxic/anoxic interface, then it could be extremely beneficial to fuel peroxidases using anaerobic electron transport chains since this would guarantee a fast response to hydrogen peroxide evolution that could lead via the Fenton reaction to the highly reactive hydroxyl radical.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grants Ei-520/1 and IRTG 1478 to O.E. and grant GE 2085/2-1 to J.G. Diffraction data were collected at beam line X11 at EMBL/DESY, Hamburg, Germany.

#### REFERENCES

1. Atack, J. M., and D. J. Kelly. 2007. Structure, mechanism and physiological roles of bacterial cytochrome *c* peroxidases. *Adv. Microb. Physiol.* **52**:73–106.
2. Ausubel, F. M., et al. 1987. *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York, NY.
3. Bailey, S. 1994. The Ccp4 Suite—programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**:760–763.
4. Beliaev, A. S., et al. 2005. Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *J. Bacteriol.* **187**:7138–7145.
5. Butler, J. E., F. Kaufmann, M. V. Coppi, C. Nunez, and D. R. Lovley. 2004. MacA, a di-heme *c*-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **186**:4042–4045.
6. Cabisco, E., E. Piulats, P. Echave, E. Herrero, and J. Ros. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**:27393–27398.
7. Childs, R. E., and W. G. Bardsley. 1975. Steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* **145**:93–103.
8. Cohn, C. A., A. Pak, D. Strongin, and M. A. Schoonen. 2005. Quantifying hydrogen peroxide in iron-containing solutions using leuco crystal violet. *Geochem. Transact.* **6**:47–51.
9. Coligan, J. E., and V. B. Chanda. 1995. *Current protocols in protein science*. Wiley, New York, NY.
10. DeLano, W. L. 2002. The PyMOL molecular graphic system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA.
11. Dias, J. M., et al. 2004. Structural basis for the mechanism of  $Ca^{2+}$  activation of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617. *Structure* **12**:961–973.
12. Echalié, A., C. F. Goodhew, G. W. Pettigrew, and V. Fulop. 2006. Activation and catalysis of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus pantotrophus*. *Structure* **14**:107–117.
13. Echalié, A., C. F. Goodhew, G. W. Pettigrew, and V. Fulop. 2004. Crystal-

- lization and preliminary X-ray diffraction analysis of a dihaem cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **60**:331–333.
14. Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan. 2010. Features and development of Coot. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **66**:486–501.
  15. Firer-Sherwood, M., G. S. Pulcu, and S. J. Elliott. 2008. Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window. J. Biol. Inorg. Chem. **13**:849–854.
  16. Fredrickson, J. K., et al. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. Nat. Rev. Microbiol. **6**:592–603.
  17. Fülöp, V., C. J. Ridout, C. Greenwood, and J. Hajdu. 1995. Crystal-structure of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. Structure **3**:1225–1233.
  18. Gao, H., et al. 2010. Impacts of *Shewanella oneidensis* *c*-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. Microb. Biotechnol. **3**:455–466.
  19. Gescher, J. S., C. D. Cordova, and A. M. Spormann. 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. Mol. Microbiol. **68**:706–719.
  20. Gibson, D. G., et al. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat. Methods **6**:343–345.
  21. Hartshorne, R. S., et al. 2009. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**:22169–22174.
  22. Hoffmann, M., J. Seidel, and O. Einsle. 2009. CcpA from *Geobacter sulfurreducens* is a basic di-heme cytochrome *c* peroxidase. J. Mol. Biol. **393**:951–965.
  23. Kim, B. C., and D. R. Lovley. 2008. Investigation of direct vs. indirect involvement of the *c*-type cytochrome MacA in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. FEMS Microbiol. Lett. **286**:39–44.
  24. Krab, K., and M. Wikstrom. 1980. Effect of 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide on proton permeability of the mitochondrial membrane. Biochem. J. **186**:637–639.
  25. Kurokawa, T., and J. Sakamoto. 2005. Purification and characterization of succinate: menaquinone oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. **183**:317–324.
  26. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680–685.
  27. Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton. 1993. Procheck—a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. **26**:283–291.
  28. Leslie, A. G. W. 1992. Joint CCP4 + ESF-EAMCB newsletter on protein crystallography no. 26. [http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/mosfilm/mosfilm\\_user\\_guide.html](http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/mosfilm/mosfilm_user_guide.html).
  29. Lovley, D. R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiol. Rev. **55**:259–287.
  30. Lovley, D. R., D. E. Holmes, and K. P. Nevin. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Adv. Microb. Physiol. **49**:219–286.
  31. Maklashina, E., and G. Cecchini. 1999. Comparison of catalytic activity and inhibitors of quinone reactions of succinate dehydrogenase (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and fumarate reductase (menaquinol-fumarate oxidoreductase) from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. **369**:223–232.
  32. Meyer, T. E., et al. 2004. Identification of 42 possible cytochrome *c* genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. OMICS **8**:57–77.
  33. Murshudov, G. N., A. A. Vagin, and E. J. Dodson. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **53**:240–255.
  34. Myers, C. R., and J. M. Myers. 1997. Cloning and sequence of *cyma*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol. **179**:1143–1152.
  35. Myers, C. R., and K. H. Neelson. 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science **240**:1319–1321.
  36. Myers, J. M., and C. R. Myers. 2000. Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. J. Bacteriol. **182**:67–75.
  37. Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi, and J. Carson. 1972. Mechanism of assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*—isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. **247**:3962–3972.
  38. Pettigrew, G. W., A. Echaliier, and S. R. Pauleta. 2006. Structure and mechanism in the bacterial dihaem cytochrome *c* peroxidases. J. Inorg. Biochem. **100**:551–567.
  39. Pitts, K. E., et al. 2003. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA. J. Biol. Chem. **278**:27758–27765.
  40. Postle, K., and R. F. Good. 1985. A bidirectional rho-independent transcription terminator between the *E. coli tonB* gene and an opposing gene. Cell **41**:577–585.
  41. Richardson, D. J., and S. J. Ferguson. 1995. Competition between hydrogen-peroxidase and nitrate for electrons from the respiratory chains of *Thiosphaera pantotropha* and *Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiol. Lett. **132**:125–129.
  42. Richter, K., C. Bucking, M. Schicklberger, and J. Gescher. 2010. A simple and fast method to analyze the orientation of *c*-type cytochromes in the outer membrane of Gram-negative bacteria. J. Microbiol. Methods **82**:184–186.
  43. Rodrigues, M. L., T. F. Oliveira, I. A. Pereira, and M. Archer. 2006. X-ray structure of the membrane-bound cytochrome *c* quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. EMBO J. **25**:5951–5960.
  44. Schuetz, B., M. Schicklberger, J. Kuermann, A. M. Spormann, and J. Gescher. 2009. Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. Appl. Environ. Microbiol. **75**:7789–7796.
  45. Schwab, C., S. K. Chapman, and G. A. Reid. 2003. The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. Biochemistry **42**:9491–9497.
  46. Shanks, R. M. Q., N. C. Caiazza, S. M. Hinsa, C. M. Toutain, and G. A. O'Toole. 2006. *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from Gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **72**:5027–5036.
  47. Shi, L., T. C. Squier, J. M. Zachara, and J. K. Fredrickson. 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme *c*-type cytochromes. Mol. Microbiol. **65**:12–20.
  48. Shimizu, H., et al. 2001. Crystal structure of *Nitrosomonas europaea* cytochrome *c* peroxidase and the structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidases. Biochemistry **40**:13483–13490.
  49. Simon, J., et al. 2000. A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. Mol. Microbiol. **35**:686–696.
  50. Tano, T., K. Sakai, T. Sugio, and K. Imai. 1977. Physiological studies on thiobacilli. 9. Purification and some properties of a ferrocyclochrome *c*-hydrogen-peroxide oxidoreductase from *Thiobacillus thiooxidans*. Agric. Biol. Chem. **41**:323–330.
  51. Thomas, P. E., D. Ryan, and W. Levin. 1976. Improved staining procedure for detection of peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **75**:168–176.
  52. Touati, D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch. Biochem. Biophys. **373**:1–6.
  53. Turner, S., E. Reid, H. Smith, and J. Cole. 2003. A novel cytochrome *c* peroxidase from *Neisseria gonorrhoeae*: a lipoprotein from a Gram-negative bacterium. Biochem. J. **373**:865–873.
  54. Zehnder, A. J. B., and K. Wuhrmann. 1976. Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for culture of obligate anaerobes. Science **194**:1165–1166.