

# Eisen und Mangan: Wechselwirkungen und Homöostase in

## *Escherichia coli* mit dem Schwerpunkt ZupT

### D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Nadine Taudte

geb. am 28.07.1977 in Zeitz

Gutachter:

Prof. Dr. Gregor Grass

Prof. Dr. Klaus Hantke

Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Verteidigung: 21. September 2010, Halle (Saale)

# I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS .....	I
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
1. EINLEITUNG .....	1
2. MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1. Bakterienstämme und Plasmide .....	11
2.2. Kultivierungsbedingungen .....	14
2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien .....	14
2.2.2. Nährmedien und Zusätze für Sf9 Insektenzellen .....	17
2.2.3. Anzucht, Induktion und Zellernte von <i>E. coli</i> .....	18
2.2.4. Stammhaltung .....	18
2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA.....	19
2.3.1. Isolierung von DNA .....	19
2.3.1.1. Plasmidisolierung mittels <i>Spin</i> Säulen .....	19
2.3.1.2. Isolation genomischer DNA mittels <i>Spin</i> Säulen .....	19
2.3.1.3. Mikroplasmidpräparation .....	19
2.3.2. DNA-Techniken .....	20
2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese .....	20
2.3.2.2. DNA-Größenstandard .....	20
2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung .....	20
2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	20
2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA .....	21
2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	21
2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	21
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	21
2.3.3.1. Auswahl der Primer.....	21
2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
2.3.3.3. <i>Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis</i> -PCR .....	28
2.3.3.4. <i>Overlap extension</i> PCR .....	28
2.3.4. DNA-Transfer in <i>Escherichia coli</i> und Selektion rekombinanter Klone .....	29
2.3.4.1. Transformation nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode.....	29
2.3.4.2. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation .....	29
2.3.4.3. Selektion plasmidtragender <i>E. coli</i> -Klone .....	30
2.3.4.4. Inaktivierung chromosomaler Gene von <i>E. coli</i> .....	30
2.3.4.5. Gentransfer durch P1-Transduktion.....	31
2.3.5. DNA-Sequenzierung .....	31
2.3.5.1. Sequenzierung unter Verwendung des <i>DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit</i> .....	31
2.3.5.2. Sequenzierung durch kommerzielle Anbieter.....	32
2.3.5.3. Auswertung der Sequenzdaten.....	32
2.4. Zellwachstumsversuche in Flüssigmedien .....	32
2.4.1. Messung der Zelltrübung.....	32
2.4.2. Zellanzucht von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen .....	33
2.5. Enzymologische Methoden - Bestimmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität.....	35
2.5.1. Zellanzucht der <i>E. coli</i> -Stämme.....	35
2.5.2. Probenvorbereitung für Aktivitätsfärbung der Superoxid-Dismutasen.....	35
2.5.3. Aktivitätsfärbung der Superoxid-Dismutasen in der Nativen PAGE (Zymogramm) .....	35

<b>2.6. Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.6.1. Protein-Expression und -Reinigung über das <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> II <i>Protein Purification System</i> .....	36
2.6.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte .....	36
2.6.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt .....	37
2.6.1.3. Membranpräparation und Solubilisierung .....	37
2.6.1.4. Native Proteinreinigung mittels <i>StrepTactin</i> -Chromatographie .....	37
2.6.2. <i>Bac-to-Bac</i> <sup>®</sup> <i>Baculovirus Expression System</i> .....	38
2.6.2.1. Konstruktion rekombinanter Bacmid-DNA.....	38
2.6.2.2. Transfektion in <i>Spodoptera frugiperda</i> Sf9 zur Herstellung rekombinanter Baculoviren .....	39
2.6.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	40
2.6.3.1. BCA-Test .....	40
2.6.3.2. Bradford-Proteinbestimmung .....	40
2.6.4. Konzentrieren von Proteinlösungen .....	41
2.6.5. Elektrophoretische Methoden.....	41
2.6.5.1. Probenvorbereitung .....	41
2.6.5.2. Proteinmarker .....	41
2.6.5.3. Lineare SDS-PAGE .....	42
2.6.5.4. Native PAGE.....	42
2.6.5.5. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot) .....	43
2.6.5.6. <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> II Detektionssystem .....	43
2.6.6. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen und PVDF-Membranen.....	44
2.6.6.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau .....	44
2.6.6.2. Unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau-Rot.....	44
<b>2.7. Transportstudien mit radioaktiven Isotopen und ganzen Zellen</b> .....	<b>44</b>
2.7.1. Zellanzucht der <i>E. coli</i> Stämme.....	44
2.7.2. Aufnahmeexperiment mit radioaktivem <sup>55</sup> Fe .....	44
2.7.3. Aufnahmeexperiment mit radioaktivem <sup>57</sup> Co, <sup>65</sup> Zn, <sup>109</sup> Cd und <sup>54</sup> Mn .....	45
2.7.3.1. Radioaktive Aufnahmeexperimente zur Bestimmung der Transport-Kinetik .....	45
2.7.3.2. Kompetitive Inhibition der <sup>65</sup> Zn <sup>2+</sup> -Aufnahme mit anderen Schwermetallen .....	46
2.7.3.3. Untersuchung des radioaktiven Zn <sup>2+</sup> -Transportes in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	46
2.7.3.4. Inhibition des radioaktiven Metall-Transportes mit FCCP, CCCP und Orthovanadat.....	46
<b>2.8. Spektroskopische und Analytische Methoden</b> .....	<b>46</b>
2.8.1. Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) .....	46
2.8.1.1. Zellanzucht.....	47
2.8.1.2. Probenvorbereitung .....	47
2.8.1.3. AAS.....	47
2.8.2. <i>Inductively-Coupled-Plasma-Mass-Spectrometry</i> (ICP-MS).....	49
2.8.2.1. Zellanzucht.....	49
2.8.2.2. Probenvorbereitung und ICP-MS Messung.....	49
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1. Charakterisierung des ersten bakteriellen ZIP-Transporters ZupT</b> .....	<b>50</b>
3.1.1. Der bakterielle ZIP-Transporter ZupT weist ein breites Substratspektrum auf .....	50
3.1.2. Überexpression und Reinigung von ZupT über das <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> II-System.....	53
3.1.3. Wie wird der ZupT-Transport energetisiert?.....	54
3.1.4. Der ZupT-vermittelte Zn <sup>2+</sup> -Transport wird durch äquimolare Mengen an Cadmium gehemmt .....	56
3.1.5. Welche Aminosäuren sind am ZupT-vermittelten Metall-Transport beteiligt? .....	59
<b>3.2. Neue Zusammenhänge zwischen Mangan- und Eisen-Homöostase in <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>65</b>
3.2.1. Mangan verbessert erheblich das Wachstum einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante .....	65
3.2.2. Wie viel Eisen bzw. Mangan kann die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante im Vergleich zum <i>E. coli</i> Wildtyp W3110 aufnehmen? .....	66

3.2.3. Mangan verleiht der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber Trockenstress.....	69
3.2.4. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist sensitiver gegenüber oxidativem Stress als <i>E. coli</i> Wildtyp W3110 .....	70
3.2.4.1. Mangan schützt die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vor oxidativem Stress. ....	70
3.2.4.2. Die Manganhaltige Superoxid-Dismutase SodA scheint für den aeroben Metabolismus der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante essenziell zu sein .....	71
3.2.5. Auch das anaerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante kann durch Mangan verbessert werden.....	74
3.2.6. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist sensitiver gegenüber dem Fe(III)-Antagonist Gallium als <i>E. coli</i> Wildtyp W3110.....	75
3.2.6.1. Gallium verringert nicht den intrazellulären Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des <i>E. coli</i> Wildtyps .....	76
3.2.6.2. Gallium führt zu einer verminderten FeSOD (SodB)-Aktivität in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante .....	78
3.2.7. PitA ist vermutlich ein weiterer unspezifischer Eisen-Transporter im <i>E. coli</i> Stamm ECA458( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ ) .....	79
3.2.7.1. Die Deletion von <i>pitA</i> in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verursacht vermindertes Wachstum unter Eisenlimitation .....	79
3.2.7.2. Die Deletion von <i>pitA</i> in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante führt zur erhöhten Sensitivität gegenüber dem Fe(III)-Antagonisten Gallium.....	81
3.2.7.3. Die Expression von <i>pitA</i> in <i>trans</i> im Deletionsstamm ECA588 führt zum verbesserten Wachstum unter Eisenlimitation.....	83
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1. Charakterisierung des bakteriellen ZIP-Transporters ZupT .....</b>	<b>86</b>
4.1.1. ZupT, ein ZIP-Transporter mit breitem Substratspektrum .....	86
4.1.2. Ist ZupT vorrangig ein Zink-Transporter? .....	87
4.1.3. Der ZupT-Transport wird vermutlich durch <i>proton-motive force</i> energetisiert .....	90
4.1.4. Spezifische Aminosäure-Reste in der TMH IV und V sind wichtig für den Metall-Transport durch ZupT.....	92
4.1.5. Welche Rolle spielen die Histidin-Reste in der „Variablen Region“ im ZupT-vermittelten Metall-Transport?.....	95
<b>4.2. Das Zusammenspiel von Eisen- und Mangan-Homöostase in einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ....</b>	<b>98</b>
4.2.1. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist dennoch in der Lage, Eisen und Mangan aufzunehmen... ..	99
4.2.2. Mangan schützt vermutlich vor Protein-Oxidation, verursacht durch Trockenstress .....	103
4.2.3. Mangan fördert die SodA-Aktivität.....	104
4.2.4. Mangan schützt direkt vor oxidativem Stress .....	108
4.2.5. Mangan scheint auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu spielen.....	109
4.2.6. Gallium als Fe(III)-Substituent verschärft vermutlich die indirekte Eisenlimitation und oxidativen Stress in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante.....	111
4.2.6.1. Wie wird Gallium in die Zelle transportiert?.....	111
4.2.6.2. Warum ist Gallium für die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante toxisch? .....	112
4.2.7. Ist PitA ein weiterer Eisen- und Mangan-Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante? ....	115
<b>4.3. Ausblick.....</b>	<b>120</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>123</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple-capsid Nucleopolyhedrovirus</i>
ADP	Adenindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
amp <sup>(R)</sup>	Ampicillin <sup>(Resistenz)</sup>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAS	Casaminosäurehydrolysat
<i>cat</i>	Chloramphenicol Aminotransferase
CCCP	Carbonyl cyanid 3-chlorophenylhydrazon
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
cm <sup>(R)</sup>	Chloramphenicol <sup>(Resistenz)</sup>
cpm	<i>counts per million</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
DIP	2,2'-Dipyridyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADH <sub>2</sub>	reduziertes Flavinadenindinucleotid
FCCP	Carbonyl cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazon
FIT	<i>FER-like iron deficiency-induced transcription factor</i>

FLP	Flippase (Rekombinase)
FKS	Fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononucleotid
FRT	<i>FLP recognition target</i>
Fur	<i>ferric uptake regulator</i>
G	Guanin
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
gen	Gentamicin <sup>(Resistenz)</sup>
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	Guanintriphosphatase
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylat
HRD	<i>histidine rich domain</i>
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRT	<i>iron-regulated transporter</i>
<i>kan</i>	Kanamycin-Resistenz-Gen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
km <sup>(R)</sup>	Kanamycin <sup>(Resistenz)</sup>
LB	Luria-Bertani-Medium
LZT	<i>LIV-1 subfamily ZIP zinc transporter</i>
M	Molarität
Me	Metall
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
MRD	<i>metal response domain</i>
MW	Molekulargewicht
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen <sup>(R)</sup>	Penicillin <sup>(Resistenz)</sup>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOD (Sod)	Superoxid-Dismutase
strep <sup>(R)</sup>	Streptomycin <sup>(Resistenz)</sup>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TB	<i>terrific broth</i> (Nährmedium)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
Tet <sup>(R)</sup>	Tetracyclin (Resistenz)
TG	Trockengewicht
TMH	transmembrane Helix
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-Ethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-MM	Tris-gepuffertes Minimalmedium
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZIP	<i>ZRT, IRT-like proteins</i>
ZRT	<i>zinc-regulated transporter</i>

### Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# 1. Einleitung

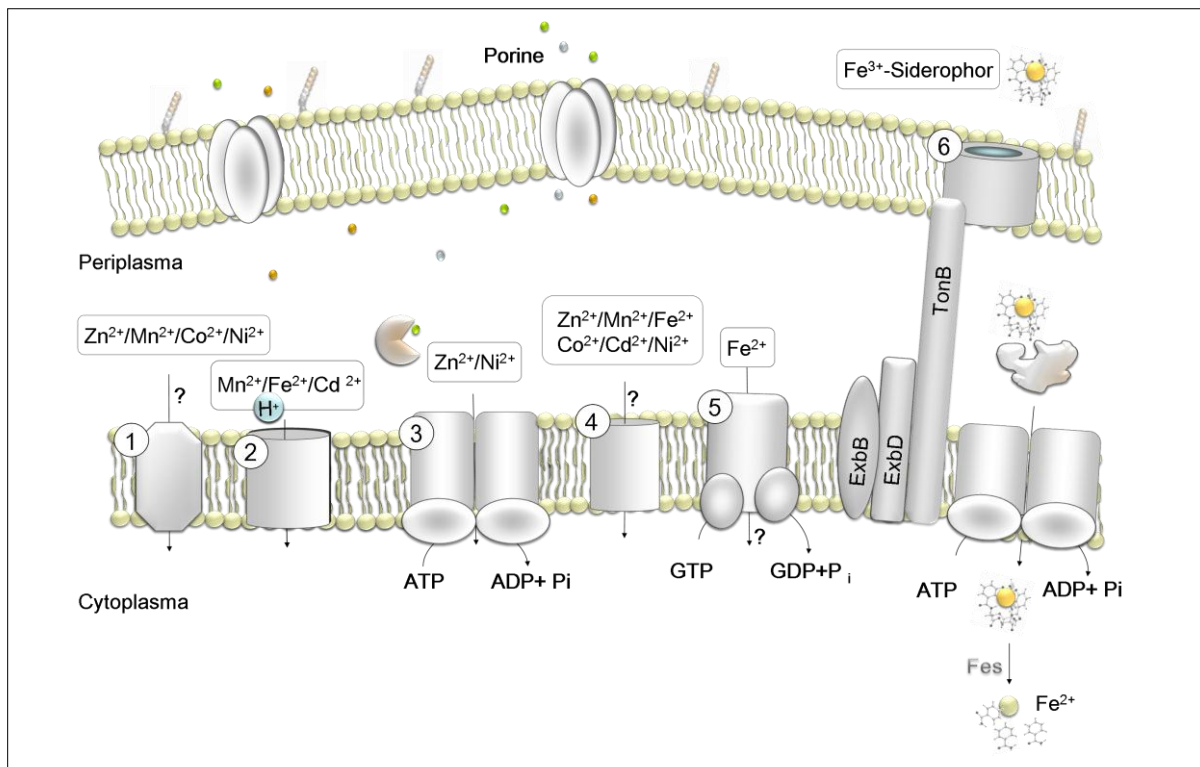
„Bakterien stehen auf Heavy Metal“ so hieß es einst in einem Artikel (Spiegel-online, 2004). Aber wozu benötigen Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, Schwermetalle? Viele dieser Übergangsmetalle, so z. B. Zink, Mangan, Eisen, Kupfer und Cobalt, sind aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften ideale Bindungspartner für Schwefel-, Stickstoff- oder Sauerstoffatome (Nies, 2007) und sichern somit als Kofaktoren vieler Enzyme sowohl deren strukturelle Integrität als auch die Katalyse biochemischer Reaktionen. Im Modellorganismus *Escherichia coli* ist z. B. Zink unentbehrlich für die Funktionen von DNA- und RNA-Polymerasen (Coleman, 1998; Grass, 2006a). Mangan gewährleistet als Kofaktor biochemische Reaktionen wichtiger Enzyme wie z. B. der manganhaltigen Superoxid-Dismutase SodA, mit der reaktive Sauerstoffspezies detoxifiziert werden (Fridovich, 1995), und der alternativen Ribonukleotid-Reduktase NrdEF (Jordan *et al.*, 1998; Eliasson *et al.*, 1996). Durch die Anwesenheit von zwei Cobalt-Ionen im aktiven Zentrum der Methionin-Amino-peptidase ist die hydrolytische Aktivität dieses Enzyms und somit die N-terminale Modifikation neu translatierter Polypeptide möglich (Kobayashi und Shimizu, 1999). Eisen und Kupfer sind essenzielle Bestandteile der Enzyme der Atmungskette, da sie Elektronentransportvorgänge gewährleisten und somit der Energiekonservierung dienen. Ähnlich wie Mangan dient Eisen als Kofaktor einer anderen Superoxid-Dismutase, SodB (Fridovich, 1995). Als Bestandteil der Ribonukleotid-Reduktase NrdAB ist Eisen für die Reduktion der 2'-Hydroxylgruppen von Nukleotiden und somit für die DNA-Synthese unentbehrlich (Jordan *et al.*, 1998). Schon diese wenigen Beispiele belegen, dass Übergangsmetalle für viele biochemische Reaktionen enorm wichtig sind, weswegen sie als Biometalle bezeichnet wurden (Grass, 2006a). Um metallabhängige zelluläre Prozesse aufrechtzuerhalten, muss ein ständiger, jedoch streng kontrollierter Nachschub dieser Metalle aus der extrazellulären Umgebung erfolgen. In Bakterien wie *E. coli* K12 übernehmen eine Reihe von Transporter diese Aufgabe (Abb. 1).

So können Übergangsmetalle durch unspezifische Transport-Systeme, wie dem Phosphat-Aufnahme-System PitA und dem Magnesium-Transporter CorA in das Cytoplasma aufgenommen werden. PitA, als *low affinity* P<sub>(i)</sub>-Transporter bewerkstelligt neben dem *high affinity* PstSACB und weiteren Systemen wie PitB, GlpT und UhpT die Phosphat-Versorgung in *E. coli* (Hayashi *et al.*, 1964; Winkler, 1966; Medveczky und Rosenberg, 1971; Willsky *et al.*, 1973; Rosenberg *et al.*, 1977; van Veen, 1997; Harris *et al.*, 2001). Da PitA im Gegensatz zum Pst-System, eine niedrige Affinität zum Phosphat besitzt, dient es hauptsächlich der anorganischen Phosphat-Aufnahme unter hohen Phosphat-Konzentrationen. Dabei wird Phosphat in Form von Metall-Komplexen im Symport mit Protonen in das Cytoplasma aufgenommen, sodass ebenso unspezifisch Metall-Ionen, z. B. Zink, durch PitA in das Cytoplasma gelangen (van Veen *et al.*, 1994; Beard *et al.*, 2000). Die Expression von *pitA* wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Zum einen wurde gezeigt, dass die Expression von *pitA* durch Zink induziert wird (Jackson *et al.*, 2008) zum



anderen wurde bewiesen, dass die Expression von *pitA* z. B. in *Mycobacterium smegmatis* konstitutiv erfolgt (Gebhard *et al.*, 2009).

*CorA* (*Co* *r*esistance *A*) ist Mitglied der gleichnamigen Transporter-Familie und wurde als Haupt-Transportsystem für Magnesium identifiziert. *CorA* ist zusätzlich in der Lage, Übergangsmetall- Ionen wie Nickel, Cobalt, Zink und Mangan zu transportieren (Park *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 2006). Die Expression dieses Transporters in *E. coli* erfolgt konstitutiv (Smith *et al.*, 1993). Ursprünglich wurde dieser Transporter aufgrund der höheren Cobalt-Resistenz einer Mutante benannt, die eine Mutation dieses Gens trug (Silver 1969; Park *et al.*, 1976; Hmiel *et al.*, 1986). Strukturelle Analysen ergaben, dass *CorA* einen trichterförmigen pentameren Komplex in der Cytoplasmamembran bildet, wobei jedes Monomer aus zwei transmembranen Helices (TMH) besteht. Der innere Raum wird hauptsächlich von TMH I gebildet, der von einem Ring, bestehend aus TMH II, umgeben ist (Niegowski und Eshaghi, 2007). Der genaue Transportmechanismus von *CorA* ist jedoch bisher unbekannt.



**Abb. 1: Metall-Aufnahme-Systeme in *Escherichia coli* K12**

Diese Abbildung veranschaulicht alle bisher bekannten Aufnahme-Systeme, verschiedener Transport-Familien, über die Übergangsmetalle in das Cytoplasma von *E. coli* K12 transportiert werden. Dabei werden Übergangsmetalle durch unspezifische Transporter, wie dem PitA- bzw. CorA-System (1) in das Cytoplasma transportiert. MntH, ein Vertreter der NRAMP-Familie, katalysiert den Transport von Mangan, Eisen und Cadmium (2). Spezifische ABC-Transporter gewährleisten den Transport von Zink oder Nickel (3). ZupT, der bakterielle ZIP-Transporter, ist in der Lage, eine Vielzahl zweiwertiger Metall-Kationen, z. B. Zink, Cobalt oder Eisen zu transportieren (4). Die Aufnahme von Eisen(II) wird durch das Feo-System (5) und die von Eisen(III)-Komplexe durch Rezeptor-vermittelte-Aufnahme (6) gewährleistet

Mangan, aber auch Eisen, Cobalt, Zink und Cadmium werden durch MntH (*M*anganese *t*ransport, *H*<sup>+</sup>-*s*timulated), dem bisher einzigen Vertreter der NRAMP (*N*atural *r*esistance *a*ssociated

*macrophage protein*)-Familie in *E. coli* transportiert (Makui *et al.*, 2000; Courville *et al.*, 2008). Der Transport, der durch dieses integrale Membranprotein bewerkstelligt wird, erfolgt protonenabhängig. Sowohl unter Eisen- als auch unter Mangan-Mangel wird die Expression des *mntH* Gens induziert, und wird dual, durch Fur und MntR kontrolliert (Patzner und Hantke, 2001).

Zur Familie der ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter gehört das *high affinity* Zink-Aufnahme-System Znu (*Zinc uptake*). Die Expression von *znuABC* wird durch Zur, einem Mitglied der Fur-Familie, reguliert und unter niedrigen extrazellulären Zink-Konzentrationen exprimiert (Patzner und Hantke, 2000). Das Znu-System besteht aus den Proteinen ZnuA, ZnuB und ZnuC. Als periplasmatisches Bindeprotein besitzt ZnuA die Funktion, Zink im Periplasma zu binden und anschließend zum spezifischen, in der Cytoplasmamembran lokalisierten, integralen Membranprotein ZnuB zu leiten. Durch ZnuB wird der Zink-Transport durch die Cytoplasmamembran gewährleistet, dabei wird der Transport durch ATP-Hydrolyse, die durch die ATPase ZnuC katalysiert wird, energetisiert (Patzner und Hantke, 1998; Hantke, 2005). Ein weiterer ABC-Transporter, NikABCDE, sichert in einem ähnlichen Transport-Mechanismus den Transport von Nickel in das Cytoplasma (Navarro *et al.*, 1993). Die Expression von *nikABCDE* wird in Anwesenheit hoher Nickel-Konzentrationen durch NikR, einem metallregulatorischen Protein, reprimiert (De Pina *et al.*, 1999).

Neben dem ZnuABC-System trägt ZupT, ein bakterieller Vertreter der ZIP-Familie, zur Zinkversorgung der Zelle bei (Grass *et al.*, 2002). Die Familie der ZIP (*ZRT,IRT like proteins*)-Transporter wurde erstmalig 1996 entdeckt und nach den ersten identifizierten ZIP-Proteinen, IRT1 (*Iron regulated transporter*) aus *Arabidopsis thaliana* und ZRT1 (*Zinc regulated transporter*) aus *Saccharomyces cerevisiae* benannt (Eide *et al.*, 1996; Zhao und Eide, 1996a; Grotz *et al.*, 1998). ZIP-Transporter sind ubiquitär verbreitet und kommen in Eubakterien, Archaeen und Eukaryoten bis hin zum Menschen vor (Zimmermann *et al.*, 1984; Gaither und Eide, 2001a). Bisher wurden ca. 90 Mitglieder der ZIP-Familie identifiziert. Die ZIP-Transporter wurden anhand konservierter Sequenzbereiche in vier Unterfamilien eingeteilt: ZUPI, ZUPII, GufA und LIV-I (Eide, 2001) (Abb. 2).

Die Unterfamilie ZUPI umfasst meist ZIP-Transporter aus Pilzen und Pflanzen, wohingegen ZIP-Transporter aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und Säugetieren in die Unterfamilie ZUPII eingeordnet wurden, zu der ebenso die SLC39 Protein-Familie gehört. Diese umfasst 14 Protein-Mitglieder, die zum SLC39 Gen aus *Homo sapiens sapiens* Ähnlichkeiten aufweisen (Eide, 2004). Viele dieser ZIP-Transporter aus beiden Unterfamilien sind am Zink-Transport beteiligt. Putative bakterielle ZIP-Transporter sind in der GufA (*gene of unknown function A*) Unterfamilie anzutreffen (McGowan *et al.*, 1993). Zu dieser Unterfamilie gehört ZupT, der erste bakterielle ZIP-Transporter (Grass *et al.*, 2002).

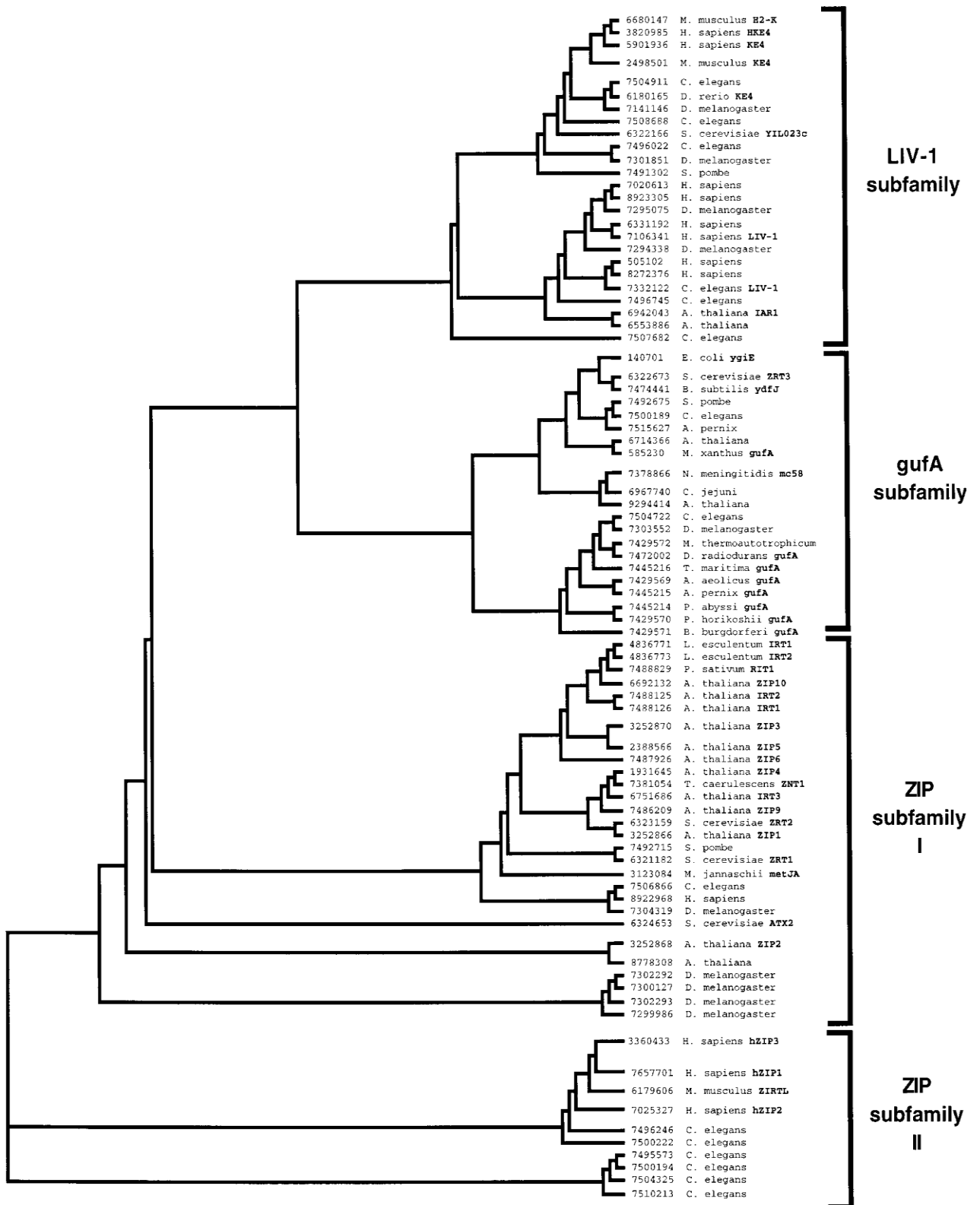
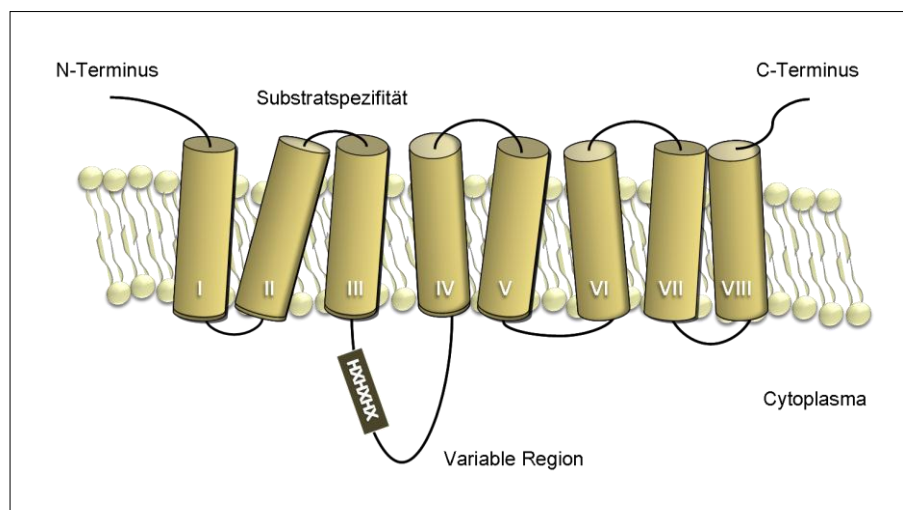


Abb. 2: Systematik und Vorkommen von Proteinen der ZIP-Transporter-Familie (Gaïther und Eide, 2001a)  
 Dargestellt ist ein Dendrogramm aus Gaïther *et al.*, 2001, dass die Sequenz-Homologien zwischen verschiedenen ZIP-Transportern und deren Einteilung in die verschiedenen Unterfamilien wiedergibt.

GufA wurde aufgrund von DNA-Sequenz-Analysen 1993 aus *Myxococcus xanthus* identifiziert, dessen Funktion, wie für alle anderen putativen ZIP-Transporter, noch nicht experimentell geklärt ist (McGowan *et al.*, 1993). ZIP-Transporter-Gene, die mit dem Östrogen-regulierten Gen *Liv-1* verwandt sind, wurden in die LIV-1 Unterfamilie eingeordnet und umfassen meist ZIP-Transporter aus Eukaryoten. Mitglieder dieser Unterfamilie werden als LZT (*LIV-1 subfamily ZIP zinc transporter*) bezeichnet (Taylor und Nicholson, 2003). 1994 wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expressionsrate des ZIP-Transporters *Liv-1* in malignen Brustkrebs-Zellen beschrieben und kann somit als Biomarker für diese Erkrankung dienen (Manning *et al.*, 1994; Manning *et al.*, 1995).

Die meisten ZIP-Transporter besitzen vermutlich acht Transmembran-Helices, wobei der N- bzw. C-Terminus extracytoplasmatisch lokalisiert ist (Guerinot 2000; Gaither und Eide 2001a) (Abb. 3). Alle ZIP-Transporter weisen zwischen transmembraner Helix III und IV einen cytoplasmatischen *loop* auf, dessen Sequenz und Länge innerhalb der ZIP-Familie wenig konserviert ist (Guerinot 2000). Aus diesem Grund wurde diese Region als „Variable Region“ bezeichnet.



**Abb. 3: Putatives Topologiemodell eines ZIP-Transporters**

Für die meisten ZIP-Transporter werden acht transmembrane Helices postuliert. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind extracytoplasmatisch lokalisiert. In IRT1 ist der extracytoplasmatische *loop* zwischen TMH II und TMH III für die Substratspezifität von entscheidender Bedeutung. Zwischen TMH III und IV befindet sich die „Variable Region“, ein cytoplasmatischer *loop*, der vermehrt Histidin-Reste (z. B. HXHXXH) aufweist und vermutlich am Metall-Transport direkt oder indirekt beteiligt ist.

Dennoch ist auffällig, dass viele ZIP-Transporter in dieser Region Sequenz-Wiederholungen von Histidin-Resten aufweisen. In ZRT1 aus *S. cerevisiae* ist das Sequenz-Motiv HDHTHDE in der „Variablen Region“ aufzufinden. IRT1 aus *A. thaliana* besitzt das Motiv HGHGHG in dieser Region. Aufgrund des häufigen Vorkommens von Histidin-Resten in allen ZIP-Transportern könnte diese Region für den Metall-Transport von entscheidender Rolle sein. Jedoch konnte in Nishida *et al.* (2008) und Milon *et al.* (2006) gezeigt werden, dass eine Mutation der Histidin-Reste in der „Variablen Region“ den Metall-Transport nicht vollständig zum Erliegen bringen. Somit scheinen diese Histidin-Reste nicht essenziell für den Metall-Transport zu sein. Sie sind

aber in jedem Fall am Transport direkt oder indirekt beteiligt. Ihnen könnte ebenfalls eine regulatorische Funktion zukommen. Innerhalb der ZIP-Familie ist der höchste Grad an konservierten Aminosäuren in den TMH IV und V zu finden. Diese Helices sind zum Teil amphipatisch und weisen konservierte Histidin-Reste mit angrenzenden polaren oder geladenen Aminosäuren auf. Es wird vermutet, dass TMH IV und V eine aquatische Pore bilden, durch die das Metall-Kation transportiert werden kann (Eng *et al.*, 1998). Wie wichtig diese konservierten Aminosäure-Reste in den TMH IV und V sind, zeigen Veröffentlichungen, in denen durch Mutation dieser Aminosäure-Reste ein Funktionsverlust des ZIP-Transporters eintrat (Rogers *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde in Rogers *et al.* (2000) beschrieben, dass der extrazelluläre *loop* zwischen TMH II und III von IRT1 vermutlich an der Metallbindung beteiligt ist und somit für die Substratspezifität verantwortlich sein könnte.

So verschieden wie die ZIP-Transporter in ihrer Sequenz sein können, so verschieden kann auch ihr Substratspektrum sein. Wie jedoch im Einzelnen der Transport-Mechanismus erfolgt, ist bisher noch unbekannt. Dies schließt auch die Energetisierung des ZIP-vermittelten Transportes ein. Aufgrund bisheriger Publikationen scheint es, dass ZIP-Transporter verschiedene Energiequellen für den Metall-Transport nutzen können. So wurde nachgewiesen, dass der ZRT1- bzw. ZRT2-vermittelte  $Zn^{2+}$ -Transport in *S. cerevisiae* energieabhängig erfolgt (Zhao und Eide, 1996a; Zhao und Eide, 1996b), wohingegen der  $Zn^{2+}$ -Transport, vermittelt durch den humanen ZIP-Transporter hZIP1 durch Hydrogencarbonat *in vivo* stimuliert wird. Daher wurde hier ein  $HCO_3^-/Me^{2+}$ -Symport postuliert (Gaither und Eide, 2000). Dieser Transport-Mechanismus wird ebenfalls für die in der Maus vorkommenden ZIP-Transporter ZIP8 und ZIP14 angenommen (Adair und Apt, 1990; He *et al.*, 2006; Girijashanker *et al.*, 2008).

ZupT [Zinc uptake transporter, ursprünglich als YgiE annotiert (Blattner *et al.*, 1997)] ist der erste charakterisierte bakterielle ZIP-Transporter (Grass *et al.*, 2002), der in *Escherichia coli* neben Zink ebenfalls Substrate wie Eisen, Cobalt und vermutlich Mangan, Cadmium und Nickel aus dem Periplasma in das Cytoplasma transportiert (Grass *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu vielen anderen ZIP-Transportern wird die Expression von *zupT* nicht reguliert, sondern erfolgt konstitutiv. Interessanterweise wird jedoch die Expression von *zupT* aus *Cupriavidus metallidurans* durch Zink-Mangel induziert und durch Zink-Überschuss reprimiert (Voigt, 2008; Scherer, persönliche Mitteilung). Im filamentösen Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* wurde kürzlich ein putatives ZIP-Transport-Protein identifiziert, dessen Expression, ebenso wie die Expression von *zupT* aus *C. metallidurans*, nicht konstitutiv erfolgt, sondern entsprechend der intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Konzentration reguliert wird (Hudek *et al.*, 2009).

Neben der Zink-Aufnahme gewährleistet ZupT auch die Eisenversorgung der Zelle. Insbesondere für das Biometall Eisen existieren in *E. coli* eine Vielzahl von Transport-Systemen. Da Eisen in zwei Oxidationsstufen, Fe(II) oder Fe(III) vorliegt, entwickelten sich im Laufe der Evolution für beide Ionen verschiedene Transport-Systeme. Auch MntH und vermutlich ebenfalls PitA sind in der Lage, neben weiteren Substraten, Fe(II) in das Cytoplasma aufzunehmen (Grass *et al.*, 2005; Makui *et al.*, 2000; Courville *et al.*, 2008; van Veen *et al.*, 1994). Ein weiteres Fe(II)-Transport-

System ist das FeoABC-System. Dieses wurde erstmalig durch Hantke *et al.* (1987) in *E. coli* identifiziert und 1993 in Kammler *et al.* als das Feo (*ferrous iron*) Aufnahme-System bezeichnet. Die Gene *feoABC*, in einer Operonstruktur angeordnet, codieren für FeoA, einem kleinen, cytoplasmatischen Protein, für das integrale Membranprotein FeoB und für ein weiteres kleines cytoplasmatisches Protein, FeoC. Die Funktion von FeoA bzw. FeoC ist bisher unbekannt, jedoch führen einzelne Deletionen dieser Gene zu einer verminderten Eisen-Aufnahme im *E. coli* Deletionsstamm ECA137( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mnth \Delta zupT \Delta corA \Delta entC$ ) (Taudte, 2003). Da der Feo-vermittelte Fe(II)-Transport durch Einsatz von Vanadat inhibiert werden konnte, wurde zunächst angenommen, dass der Fe(II)-Transport durch ATP-Hydrolyse energetisiert wird (Velayudhan *et al.*, 2000). In Marlovits *et al.* (2002) wurde jedoch nachgewiesen, dass die N-terminale Domäne von FeoB ein Binde- und Hydrolysemotiv für GTP besitzt und eine GTP-Bindung für den Fe(II)-Transport notwendig ist. Dadurch, dass die GTP-Hydrolyse jedoch sehr langsam erfolgt, reicht vermutlich eine Energetisierung des Transportes durch GTP-Hydrolyse nicht aus (Hantke, 2003). Kürzlich wurde, zusätzlich zur G-Proteindomäne am N-Terminus von FeoB, die erste bakterielle GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*)-ähnliche Domäne innerhalb FeoB identifiziert (Eng *et al.*, 2008). Möglicherweise wird der FeoABC-vermittelte Fe(II)-Transport durch einen G-proteinartigen-Zyklus reguliert. Wie jedoch das G-Protein, die GDI-ähnliche Domäne und transmembrane Domänen von FeoB zusammen arbeiten, ist bisher noch unbekannt.

Im aeroben Milieu und bei neutralem pH-Wert ist Ferro-Eisen Fe(II) nicht stabil. Unter diesen Bedingungen ist Eisen als Ferri-Eisen Fe(III) kaum löslich (Löslichkeit  $<10^{-18}$  M bei pH 7.0), es liegt als Eisenhydroxid-Komplex vor und ist für die Zelle nicht ohne Weiteres verfügbar (Bagg und Neilands, 1987; Andrews *et al.*, 2003; Braun und Hantke, 2007). Dieses Problem umgehen viele Mikroorganismen wie *E. coli*, indem Fe(III) durch spezifische Siderophoren mit hoher Affinität komplexiert wird und anschließend an spezifische Rezeptoren in der äußeren Membran binden, um in das Periplasma transportiert zu werden. Siderophoren sind organische, Fe(III)-spezifische Liganden, die unter Eisenlimitation von Pilzen, Gräsern und Bakterien synthetisiert werden (Neilands, 1995). Dabei unterscheidet man u. a. Hydroxamate, Catecholate und  $\alpha$ -Hydroxycarboxylate (Neilands, 1995; Stintzi *et al.*, 2000). In natürlichen Habitaten ist es für Bakterien ökonomischer, Siderophoren, die von anderen Mikroorganismen synthetisiert werden (Xenosiderophoren), zur Fe(III)-Aufnahme zu nutzen als dass sie vom Bakterium selbst produziert werden (Bagg und Neilands, 1987; Matzanke *et al.*, 1997; Braun und Hantke, 2007). So ist *E. coli* zwar in der Lage, Enterobactin, eine Siderophore vom Catechol-Typ, zu synthetisieren, besitzt jedoch darüber hinaus eine Vielzahl von Rezeptoren, die Siderophore anderer Mikroorganismen spezifisch binden (Pollack und Neilands, 1970; Raymond *et al.*, 2003). Dazu zählen die Xenosiderophoren vom Hydroxamat-Typ Ferrichrom, Coprogen, Ferrioxamin und Rhodotorulat. Ferrichrom wird z. B. vom Brandpilz *Ustilago maydis* unter Eisenlimitation gebildet (Wang *et al.*, 1989; Ardon *et al.*, 1998), Coprogen ist ein Siderophor, das von *Neurospora crassa* (Hantke, 1983) und einigen *Penicillium*-Arten synthetisiert wird (Sauer *et al.*, 1987), Ferrioxamin wird von

vielen Streptomycceten gebildet und Rhodotorulat ist ein Syntheseprodukt vieler Hefepilze der Gattung *Rhodotorula* (Haas, 2003; Winkelmann, 2007).

Um das Eisen aufnehmen zu können, das von diesen Siderophoren komplexiert wurde, sind spezifische Rezeptoren notwendig. So bindet z. B. FecA Citrat-Fe(III)-Komplexe (Hussein *et al.*, 1981; Zimmermann *et al.*, 1984; Ferguson *et al.*, 2002; Enz *et al.*, 2003). FepA oder auch CirA und FiuA sind spezifische Rezeptoren für Enterobactin-Fe(III)-Komplexe bzw. dessen Synthesevorstufen, die ebenfalls als Siderophoren dienen können (Hantke, 1990; Buchanan *et al.*, 1999; Nikaido und Rosenberg, 1990; Braun und Endriss, 2007).

Der Transport über die äußere Membran hinweg ist bei allen Siderophor-Fe(III)-Aufnahmesystemen ähnlich. In einem TonB-ExbB-ExbD abhängigen Prozess wird der Fe(III)-Siderophor-Komplex durch den Rezeptor, ein  $\beta$ -barrel Protein, in das Periplasma geschleust. Die dafür notwendige Energie wird vom elektrochemischen Potential der Cytoplasmamembran bereitgestellt und über Interaktion des TonB-ExbB-ExbD-Komplexes mit dem Rezeptor der Transport des Fe(III)-Siderophor-Komplexes energetisiert (Andrews *et al.*, 2003; Braun und Hantke, 2007). Anschließend wird der Fe(III)-Siderophor-Komplex im Periplasma entlassen und von einem spezifischen Bindeprotein gebunden, das dieses Substrat zum ABC-Transporter leitet. Als spezifische Bindeproteine fungieren z. B. FecB, im Falle des Fe(III)-Citrat-Transportes und FepB im Falle des Fe(III)-Enterobactin-Transportes (Stephens *et al.*, 1995; Braun und Braun, 2002; Braun und Herrmann, 2007; Braun und Hantke, 2007).

Nach Bindung des Substrates durch den spezifischen ABC-Transporter erfolgt durch ATP-Hydrolyse die Aufnahme des Fe(III)-Siderophor-Komplexes in das Cytoplasma. Die Aufnahme z. B. des Fe(III)-Citrates katalysiert der ABC-Transporter FecCDE und die Aufnahme des Fe(III)-Enterobactins- bzw. dessen Hydrolyseprodukte wird durch den ABC-Transporter FepBCDG bewerkstelligt (Andrews *et al.*, 2003; Braun und Braun, 2002; Braun, 2003; Grass, 2006b; Braun und Hantke, 2007). Im Cytoplasma hydrolysiert das Fes-Protein die Esterbindung des Fe(III)-Enterobactin-Komplexes. Daraus resultiert das Monomer Dihydroxyl-benzoyl-serin, das eine niedrige Affinität zum dreiwertigen Eisen aufweist (Brickman und McIntosh, 1992). Womöglich wird dadurch Fe(III) freigesetzt und gleichzeitig zum Fe(II) reduziert. Wie jedoch dieser Prozess im Detail stattfindet, ist bisher noch nicht geklärt. In der Vergangenheit wurde eine mögliche Reduktase-Aktivität des Fes-Proteins diskutiert (Ecker *et al.*, 1986; Matzanke *et al.*, 1986; Brickman und McIntosh, 1992; Lin *et al.*, 2005). Zusätzlich herrschen im Cytoplasma reduzierende Bedingungen, die eine Elektronen-Aufnahme und somit eine Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) fördern würden. Im Cytoplasma wird entweder das Eisen direkt in den Stoffwechsel eingeschleust oder es kann dazu genutzt werden, ein Eisenreservoir aufzubauen oder dieses zu erweitern. Dazu fungieren spezifische Speicherproteine wie das Ferritin, das Bakterioferritin, das nur in Eubakterien vertreten ist, und das Dps-Protein, das in allen Prokaryoten vorkommt und primär die DNA vor oxidativen Schäden schützt (Almiron *et al.*, 1992; Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Waidner *et al.*, 2002). Diese Proteine nehmen zwar Fe(II) auf, deponieren es aber in der Fe(III)-Form, wobei die Oxidation durch das Protein katalysiert wird.

Eisen als Biometall ist zwar häufig während des bakteriellen Wachstums limitierend, dennoch hätte ein etwaiger Überschuss an Fe(II)-Ionen im Cytoplasma drastische Folgen. Aus der Fenton-Reaktion und der Haber-Weiss-Reaktion würden äußerst reaktive Hydroxylradikale resultieren, die Biomoleküle, einschließlich der DNA, angreifen (Fridovich, 1986a; Imlay, 1988; Imlay und Linn, 1988). Um dies zu vermeiden, reguliert in *E. coli* das Fur Protein (*ferric-uptake regulator protein*) die eisenabhängige Expression von mehr als 100 Genen (Hantke, 1981; Andrews *et al.*, 2003; McHugh *et al.*, 2003). Fur fungiert als Repressor, der erst in Anwesenheit des Ko-Repressors Fe(II) seine Aktivität entfaltet. Liegt Eisen in der Zelle im Überschuss vor, so erhöht sich die Affinität von Fur zur Fur-Bindestelle der DNA, der so genannten Fur-Box. Zwei Fur-Fe<sup>2+</sup>-Homodimere binden an diese spezifische Sequenz und unterbinden somit die Expression zur Eisenaufnahme relevanter Gene (Escolar *et al.*, 1998; Lee und Helmann, 2007). Darüber hinaus kann der Fur-Fe<sup>2+</sup>-Komplex in einigen Fällen als Aktivator fungieren, indem er z. B. die Expression des *sodB* Gens in *E. coli* indirekt, durch Abwesenheit einer kleinen regulatorischen RNA RyhB induziert (Dubrac und Touati, 2002; Masse´ und Gottesman, 2002). Die sRNA (*small RNA*) RyhB übernimmt eine wichtige Funktion in der Regulation der Eisenhomöostase in *E. coli*. Unter Eisenlimitation findet die Expression von *ryhB* statt und resultiert in einer Repression von 18 mRNA-Transkripten, die für 56 Proteine codieren. Vieler dieser Proteine sind am Eisen-Metabolismus beteiligt (Masse´ *et al.*, 2005). Dazu bindet, in Anwesenheit des RNA Chaperons Hfq, RyhB als antisense RNA die *target*-mRNA. Nach Degradierung der RNaseE, die Bestandteil dieses Multiprotein-Komplexes ist, erfolgt der Abbau beider RNAs. (Masse´ *et al.*, 2003; Masse´ *et al.*, 2007). Auf diese Art und Weise kann die Proteinbiosynthese eisenhaltiger Enzyme schnell dem intrazellulären Eisengehalt angepasst werden und eine unkontrollierte Akkumulation von Fe(II)-Ionen im Cytoplasma verhindert werden.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen nicht nur als Folge der Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion sondern auch im Zuge des aeroben Metabolismus durch Autooxidation von Enzymen, die oft Komponenten der Atmungskette sind, so z. B. die NADH-Dehydrogenase II (Messner und Imlay, 2002; Seaver und Imlay, 2004). Dabei findet ein univalenter Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff statt und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. Organismen haben im Laufe der Evolution zum Schutz vor oxidativem Stress verschiedene Strategien entwickelt. In *E. coli* existieren eine Reihe von Enzymen, die die Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies durch deren Umsetzung verhindern und somit oxidativen Stress vorbeugen. Zu diesen Enzymen gehören Katalasen, Peroxidasen, die Wasserstoffperoxid zu Wasser umsetzen (Hassan und Fridovich, 1978) und Superoxid-Dismutasen, die Superoxid-Anion zu Wasserstoffperoxid disproportionieren (Saltzman und Fridovich, 1973; Fridovich, 1995; Imlay, 2003; Imlay 2008). Eine *E. coli*-Zelle muss sofort auf oxidative Stressbedingungen reagieren können. Das SoxRS- und OxyR-Regulon spielen dabei eine zentrale Rolle. Sie aktivieren nicht nur die Genexpression von Schutzenzymen sondern sind ebenfalls in der Lage, die Expression von Genen globaler Regulatoren, wie z. B. die von *fur*, zu



aktivieren und somit indirekt die Aufnahme von redoxaktivem Eisen zu beeinflussen (Zheng et al., 1999; Imlay 2008).

Zusammenfassend ist die Metall-Aufnahme in *E. coli* sehr komplex und unterliegt strengster Kontrolle. Der genaue Transport-Mechanismus vieler Aufnahme-Systeme ist oft noch unbekannt. Ein Beispiel dafür ist der bakteriellen ZIP-Transporters ZupT. Viele Fragen hinsichtlich des Metall-Transportes durch ZupT sind noch nicht beantwortet: so wäre es aufschlussreich zu wissen, ob ZupT, genauso wie IRT1 aus *A. thaliana*, einen extrazellulärer *loop* besitzt, der für die Substratspezifität verantwortlich sein könnte oder ob die „Variable Region“ von ZupT im Metall-Transport involviert ist. Für einige ZIP-Transporter wurde bereits gezeigt, dass konservierte Histidin-Reste und angrenzende polare oder geladene Aminosäure-Reste in THM IV und V für den Metall-Transport essenziell sind. Existieren diese ebenfalls in ZupT und wenn ja, übernehmen diese Aminosäure-Reste eine Funktion im Metall-Transport? Welche Energiequelle treibt den Metall-Transport durch ZupT voran? Ist der Transport-Mechanismus ein  $\text{HCO}_3^-$ /Metall-Symport, wie es für hZIP1 postuliert wird oder ist der Metall-Transport streng energieabhängig? All diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit erörtert werden und zum besseren Verständnis für den Transport-Mechanismus des ersten bakteriellen ZIP-Transporters beitragen.

Nicht nur im Transport-Mechanismus sondern auch in der Metall-Aufnahme als solche bestehen noch viele Unklarheiten. So wurde in der vorliegenden Arbeit ein *E. coli* Deletionsstamm konstruiert, der in allen, für das Wachstum im definierten Medium relevanten Eisen-Aufnahme-Systemen deletiert ist. Überraschenderweise ist diese Mutante dennoch in der Lage, unter Eisen-limitation zu wachsen. Gibt es in *E. coli* weitere, bisher unbekannte Eisen-Aufnahme-Systeme, die die Eisenversorgung sicherstellen? Oder verliert Eisen unter diesen Umständen die herausragende Bedeutung im Stoffwechsel und kann die Funktion von Eisen durch andere Metalle ersetzt werden? Dies könnte im Einklang mit Wachstumsexperimenten stehen, in denen das Wachstum dieses *E. coli* Deletionsstammes durch Zusatz von Mangan deutlich verbessert werden konnte. Welche Funktion übernimmt Mangan in diesem *E. coli* Deletionsstamm? Diese Fragen galt es ebenfalls zu untersuchen und damit neue Zusammenhänge zwischen Eisen- und Mangan-Homöostase in einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante aufzudecken.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i>			
W3110	plasmidfrei	<i>E. coli</i> Wildtyp	(Mosteller und Goldstein, 1975)
JM 83	plasmidfrei	<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , <i>rspL</i> , (str <sup>R</sup> ), <i>thi</i> , $\phi 80$ , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	(Vieira und Messing, 1982)
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lac</i> q $\Delta$ M15, Tn10 (tet <sup>R</sup> )]	(Bullock 1987), Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21	pLys3	<i>F dcm</i> , <i>omp</i> , <i>hsdS</i> , ( <i>r<sub>B</sub></i> <i>m<sub>B</sub></i> ), <i>lon</i> , <i>gal</i> , DE3, (pLysS, cm <sup>R</sup> ), Überexpressionsstamm für <i>Strep-tagII</i> <sup>®</sup> -System	Stratagene GmbH, Heidelberg
BW25141	pKD3	Derivat von pANTS <sub><math>\gamma</math></sub> mit FRT-flankierter Chloramphenicol-Kassette, cm <sup>R</sup>	(Datsenko und Wanner, 2000)
BW25141	pKD4	Derivat von pANTS <sub><math>\gamma</math></sub> mit FRT-flankierter Kanamycin-Kassette ( <i>kan</i> ), km <sup>R</sup>	(Datsenko und Wanner, 2000)
BW25113	pKD46	<i>lac<sup>A</sup></i> , <i>rrnB</i> <sub>T14</sub> , $\Delta lacZ$ WJ16, <i>hsdR</i> 514, $\Delta araBA$ -D <sub>AH33</sub> , $\Delta rhaBAD$ <sub>LD78</sub> Red. <i>disruption system</i> ( $\gamma$ , $\beta$ , <i>exo</i> unter Kontrolle von <i>araBp</i> ), amp <sup>R</sup>	(Datsenko und Wanner, 2000)
BT340	pCP20	hitzeinduzierbare FLP Synthese, amp <sup>R</sup>	(Datsenko und Wanner, 2000)
	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	<i>lacPOZ</i> zur Klonierung von PCR-Produkten, amp <sup>R</sup>	Promega, Madison, WI-USA
VS102	pACYC184	<i>low-copy</i> plasmid, tet <sup>R</sup> , cm <sup>R</sup>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

## Fortsetzung Tab. 1:

EC973	pECD754	<i>zupT</i> als <i>EcoRI</i> Fragment mit Promotor-Region in pACYC 184 kloniert, Disruption der <i>cat</i> -Kassette, tet <sup>R</sup>	(Grass <i>et al.</i> , 2005)
EC979	pECD755	pECD754 Derivat mit ZupT E <sub>60</sub> D, tet <sup>R</sup>	Stammsammlung, AG Nies
ECA532	pECD1033	pECD754 Derivat mit ZupT H <sub>89</sub> R, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA533	pECD1034	pECD754 Derivat mit ZupT H <sub>87</sub> R, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA534	pECD1035	pECD754 Derivat mit ZupT H <sub>89</sub> A, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA535	pECD1036	pECD754 Derivat mit ZupT H <sub>87</sub> A, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA536	pECD1037	pECD754 Derivat mit ZupT E <sub>123</sub> D, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA537	pECD1038	pECD754 Derivat mit ZupT E <sub>123</sub> A, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA538	pECD1039	pECD754 Derivat mit ZupT E <sub>152</sub> A, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA539	pECD1040	pECD754 Derivat mit ZupT E <sub>152</sub> D, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA540	pECD1041	pECD754 Derivat mit ZupT S <sub>117</sub> V, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA541	pECD1042	pECD754 Derivat mit ZupT H <sub>119</sub> R, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA542	pECD1043	pECD754 Derivat mit ZupT H <sub>148</sub> R, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA543	pECD1044	pECD754 Derivat mit ZupT M <sub>62</sub> A, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA544	pECD1045	pECD754 Derivat mit ZupT D <sub>82</sub> A, tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
	pASK-IBA3	Expressionsvektor mit C-terminalen <i>Strep-tag</i> <sup>®II</sup> , amp <sup>R</sup>	IBA-GmbH, Göttingen
	pASK-IBA7	Expressionsvektor mit N-terminalen <i>Strep-tag</i> <sup>®II</sup> , amp <sup>R</sup>	IBA-GmbH, Göttingen
ECA545	pECD1046	<i>zupT</i> als <i>EcoRI/PstI</i> Fragment kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA3 Derivat (C-terminaler <i>Strep-tag</i> <sup>®II</sup> )	(Grass <i>et al.</i> , 2002)
ECA546	pECD1047	pECD1046 Derivat mit ZupT E <sub>60</sub> D, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA547	pECD1048	pECD1046 Derivat mit ZupT H <sub>89</sub> R, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA548	pECD1049	pECD1046 Derivat mit ZupT H <sub>87</sub> R, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA549	pECD1050	pECD1046 Derivat mit ZupT H <sub>89</sub> A, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA550	pECD1051	pECD1046 Derivat mit ZupT H <sub>87</sub> A, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA551	pECD1052	pECD1046 Derivat mit ZupT E <sub>123</sub> D, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA552	pECD1053	pECD1046 Derivat mit ZupT E <sub>123</sub> A, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA553	pECD1054	pECD1046 Derivat mit ZupT E <sub>152</sub> A, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA554	pECD1055	pECD1046 Derivat mit ZupT E <sub>152</sub> D, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA555	pECD1056	pECD1046 Derivat mit ZupT S <sub>117</sub> V, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA556	pECD1057	pECD1046 Derivat mit ZupT H <sub>119</sub> R, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA557	pECD1058	pECD1046 Derivat mit ZupT H <sub>148</sub> R, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

## Fortsetzung Tab. 1:

ECA558	pECD1059	pECD1046 Derivat mit ZupT D <sub>82</sub> A, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA559	pECD1060	pECD1046 Derivat mit ZupT M <sub>62</sub> A, amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
	pACYC177	<i>low-copy</i> plasmid; km <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
ECA560	pECD1061	<i>zupT</i> als <i>Scal</i> Fragment mit Promotor-Region und Stoppcodon in pACYC177 kloniert), Disruption der Amp-Kassette, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA561	pECD1062	pECD1061 Derivat mit ZupT E <sub>60</sub> D, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA562	pECD1063	pECD1061 Derivat mit ZupT H <sub>89</sub> R, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA563	pECD1064	pECD1061 Derivat mit ZupT H <sub>87</sub> R, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA564	pECD1065	pECD1061 Derivat mit ZupT H <sub>89</sub> A, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA565	pECD1066	pECD1061 Derivat mit ZupT H <sub>87</sub> A, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA566	pECD1067	pECD1061 Derivat mit ZupT E <sub>123</sub> D, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA567	pECD1068	pECD1061 Derivat mit ZupT E <sub>123</sub> A, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA568	pECD1069	pECD1061 Derivat mit ZupT E <sub>152</sub> A, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA569	pECD1070	pECD1061 Derivat mit ZupT E <sub>152</sub> D, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA570	pECD1071	pECD1061 Derivat mit ZupT S <sub>117</sub> V, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA571	pECD1072	pECD1061 Derivat mit ZupT H <sub>119</sub> R, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA572	pECD1073	pECD1061 Derivat mit ZupT H <sub>148</sub> R, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA573	pECD1074	pECD1061 Derivat mit ZupT D <sub>82</sub> A, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA574	pECD1075	pECD1061 Derivat mit ZupT M <sub>62</sub> A, km <sup>R</sup>	diese Arbeit
ECA458	plasmidfrei	$\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$	diese Arbeit
VS148	plasmidfrei	$\Delta fecA-E::kan \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC::cat$	(Grass <i>et al.</i> , 2005)
ECA575	plasmidfrei	$\Delta rcnA \Delta corA$	diese Arbeit
ECA349	plasmidfrei	$\Delta corA \Delta rcnA \Delta zupT::cat$	diese Arbeit
GR354	plasmidfrei	$\Delta znuABC \Delta zupT::cat$	(Grass <i>et al.</i> , 2002)
GR362	plasmidfrei	$\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB::cat \Delta zitB \Delta zntA::km_{Dis}$	(Grass <i>et al.</i> , 2002)
ECA578	plasmidfrei	$\Delta zupT \Delta mntH$	diese Arbeit
ECA579	plasmidfrei	$\Delta zupT \Delta mntH \Delta zntA::cat$	diese Arbeit
ECA580	plasmidfrei	$\Delta zupT \Delta mntH \Delta zntA \Delta yodA::cat$	diese Arbeit
ECA584	plasmidfrei	$\Delta mntH::cat$	diese Arbeit
ECA585	plasmidfrei	$\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta sodA::kan$	diese Arbeit

## Fortsetzung Tab. 1:

ECA586	plasmidfrei	$\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ $\Delta sodB::kan$	diese Arbeit
ECA594	plasmidfrei	$\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ $\Delta corA::cat$	diese Arbeit
ECA588	plasmidfrei	$\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ $\Delta pitA::cat$	diese Arbeit
ECA596	pECD1082	<i>pitA</i> als <i>EcoRI/PstI</i> Fragment kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA3 Derivat (C-terminaler <i>Strep-tag</i> <sup>®II</sup> )	diese Arbeit
ECA610	pECD1096	<i>pitA</i> mit Promotorregion als <i>XbaI/PstI</i> Fragment kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA3 <sup>+</sup> Derivat (C-terminaler <i>Strep-tag</i> <sup>®II</sup> )	diese Arbeit
<b><i>Bac-to-Bac</i><sup>®</sup> Baculovirus Expression System</b>			
Sf9	plasmidfrei	Insektenzellen, pen <sup>R</sup> /strep <sup>R</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DH10 $\alpha$ ™	pMON7124	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta(ara, leu)$ 7697 <i>galJ galK</i> $\lambda$ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i> /bMon14272 /pMon7124, kan <sup>R</sup> , tet <sup>R</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
	pFastBac™ 1	Polyhedrinpromotor, SV40 Polyadenylations-signal, Tn7L und Tn7R, f1 origin, pUC origin, amp <sup>R</sup> , gen <sup>R</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ECA581	pECD1076	<i>zupT</i> als <i>XbaI / HindIII</i> Fragment mit ATG, <i>Strep-tag</i> <sup>®II</sup> C-terminal und Stoppcodon in pFastBac™ 1, amp <sup>R</sup> , gen <sup>R</sup>	diese Arbeit

## 2.2. Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien

#### A) Difco™ LB Broth, Lennox (Becton Dickinson, Heidelberg)

20 g

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli* Stämmen.

#### B) Difco™ LB Agar, Lennox (Becton Dickinson, Heidelberg)

35 g, ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Dieses Festmedium diente der Zellanzucht von *E. coli* Stämmen.

C) SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

20 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

0.5 g NaCl

10 ml 0.25 M KCl

NaOH ad pH 7.0

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

SOB-Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* zur Gewinnung elektrokompeter Zellen eingesetzt. Nach der Elektroporation wurde zu den Zellen SOC-Medium, das sich aus SOB-Medium, 5 µl/ml 1 M MgSO<sub>4</sub> und 20 µl/ml 1 M Glucose zusammensetzt, hinzu gegeben.

E) Spurenelementlösung SL6 (10-fach) nach Pfennig (1974)

0.1 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

0.03 g MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O

0.3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0.2 g CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

0.01 g CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

0.188 g NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

0.03 g Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

F) Tris-gepuffertes Minimalmedium (Mergeay *et al.*, 1985)

Komponente A (20-fach):

800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

121.1 g Tris-HCl

HCl ad pH 7.0

danach Zugabe von:

93.6 g NaCl

29.8 g KCl

21.4 g NH<sub>4</sub>Cl

4.0 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

0.60 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat

2 ml Spurenelementlösung SL6 (10-fach) nach Pfennig (1974)

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Komponente B (20-fach):

900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

19.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 10 H<sub>2</sub>O

4.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Für die Anzucht von *E. coli* wurden 3 g/l Casaminosäurenhydrolysat und 20 g/l Glycerin für areobe Kultivierung zugesetzt und autoklaviert. Für anaerobe Anzucht wurde dem Medium

nach dem Autoklavieren steril filtrierte Glucose in der Endkonzentration von 20 g/l als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

G) Tris-gepuffertes Minimalmedium ohne Eisen und mit desferriertem Casaminosäurehydrolysat

Die Komponente A wurde ohne Eisen-Ammonium-Citrat hergestellt. Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt.

10 g Casaminosäurehydrolysat (CAS) wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit 100 ml 3%igem 8-Quinolinol in Chloroform extrahiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut mit 100 ml reinem Chloroform extrahiert (nach Bagg und Neilands, 1987). Das desferrierte CAS wurde nach dem Autoklavieren in gewohnter Konzentration den Komponenten beigemischt. Als Kohlenstoffquelle diente auch hier 20 g/l Glycerin.

H) L-broth

LB-Medium wurde mit 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt.

Dieses Medium diente zur Herstellung von P1-Phagenlysaten und zur P1-Phagen-Transduktion.

I) SM+Ca<sup>2+</sup> -Medium

2 ml 1.0 M Tris-HCL pH 7.5

2 ml 5 M NaCl

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

0.5 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>

Dieses Medium wurde in P1-Phagen-Transduktionen eingesetzt.

J) Weichagar

0.7 % Bacto-Agar

0.4% Glucose

1 g Difco™ LB Broth, Lennox

2.5 mM CaCl<sub>2</sub>

ad 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Dieser Agar wurde zur Herstellung von Phagenlysaten verwendet. Dabei wurden alle Komponenten vermischt, unter Rühren aufgekocht und jeweils 2 ml aliquotiert und autoklaviert.

E) Medienzusätze

**Schwermetallsalze**

Die Schwermetallsalze ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub> lagen als 1 M wässrige Stammlösungen vor. Eine 50 mM wässrige Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Stammlösung wurde stets frisch hergestellt. Die Stammlösung wurde im sterilen Medium auf die beschriebene Endkonzentration verdünnt. FeSO<sub>4</sub> wurde z. T. in Anwesenheit von Ascorbat (beides immer frisch hergestellt)

zugegeben, dabei lag  $\text{FeSO}_4$  als 100 mM wässrige Stammlösungen vor und Ascorbat in einer 1 M Stammlösung.

### Chelatoren

Für Wachstumsversuche wurde als  $\text{Fe}^{2+}$ -Chelator 2,2'-Dipyridyl (DIP) und als  $\text{Zn}^{2+}$ -Chelator N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-Ethylenediamine (TPEN) verwendet. Dabei wurde DIP in 96%igem Ethanol und TPEN in 50%igem Ethanol gelöst. Die Stammlösung (0.1 M DIP, 50 mM TPEN) wurde im sterilen Medium auf die beschriebene Endkonzentration verdünnt.

### Antibiotika und andere Medienzusätze

Die Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte nach Ausubel *et al.* (1993). Die Stammlösungen wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt und den sterilen Medien in den in Tabelle 2 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

**Tab. 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Medium**

Antibiotika/Mediumzusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.	125 mg/l
Kanamycin	25/50 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.	25/50 mg/l
Gentamicin	7/10 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.	7/10 mg/l
Chloramphenicol	15/25 mg/ml 96 % Ethanol	15/25 mg/l
IPTG	40 mg/ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.	40 mg/l
X-Gal	48 mg/ml DMF	48 $\mu\text{g}/\text{ml}$
AHT	2 mg/ml DMF	200 $\mu\text{g}/\text{l}$

### 2.2.2. Nährmedien und Zusätze für Sf9 Insektenzellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

#### A) SF 900 II SFM Medium mit L-Glutamin ( Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Das Medium wurde beim Hersteller erworben und bei  $4^\circ\text{C}$ , im Dunkeln gelagert.

#### B) Konditioniertes Medium

$2\text{-}3 \cdot 10^7$  Zellen/1.5 ml einer vitalen Sf9-Zellkultur wurden für 5-10 min bei 100 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand mit einem 0.2  $\mu\text{m}$  Filter steril filtriert wurde, wurde es als konditioniertes Medium zur Kryokonservierung eingesetzt.



### C) Kryomedium

Besteht aus 50 % konditioniertem Medium, 50 % frischem SF 900 II SFM Medium und 7.5 % DMSO. Das Kryomedium dient zur Lagerung von Sf9-Insektenzellen bei -80°C für 3 Tage und anschließend in flüssigen Stickstoff.

### D) Medienzusätze

#### **Antibiotika**

Als Antibiotika für Sf9-Insektenkultivierung diente eine Kombination aus Penicillin und Streptomycin, das kommerziell erworben wurde (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Dabei wurden 2.5 ml/l Medium in der jeweiligen Wachstumsphase der Insektenzellen eingesetzt.

#### **Weitere Medienzusätze**

Steril filtriertes Fetales Kälberserum (FKS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde 1 bzw. 2%ig zur Vermehrung des Virusstocks eingesetzt.

### **2.2.3. Anzucht, Induktion und Zellernte von *E. coli***

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C/37°C (Brutraum) in schräg eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (HS500, IKA Labortechnik) oder auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200-250 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) ermittelt. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bzw. anaerob bei 30°C/37°C (im Brutraum) für 12-48 h inkubiert. Zur Erzeugung eines anaeroben Milieus im Anaerobentopf wurde Anaerocult® A (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation in der Sorvall RC5 (Fisher Scientific, Schwerte) mit 20200 g für 20 min bei 4°C, der Eppendorf Centrifuge 5804R (4500 g, 15 min, 4°C) bzw. -5417R (Eppendorf, Hamburg) mit 10500 g für 30 min bei 4°C oder in der Sigma Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen, Osterode) mit 10500 g bei Raumtemperatur.

### **2.2.4. Stammhaltung**

*E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum entsprechender Konzentration kultiviert. Die Stämme wurden aller vier Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 30°C bzw. 37°C wurden alle Platten im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Um einer Kontamination der Stämme vorzubeugen, wurden alle Stämme mit neu konstruierten Plasmiden sowie die Stämme, mit denen ständig gearbeitet wurde, in Glycerinkulturen bei -80°C

aufbewahrt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Glycerin [Endkonzentration 20 % (v/v)] versetzt.

## 2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

### 2.3.1. Isolierung von DNA

Da es für die Arbeit mit DNA erforderlich war, vorhandene DNasen zu inaktivieren, wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen vor Beginn der Versuche bei 121°C autoklaviert. Hitzeinstabile Geräte wurden mit 70%igem Ethanol abgerieben, hitzelabile Lösungen filtersterilisiert.

#### 2.3.1.1. Plasmidisolierung mittels *Spin* Säulen

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung, zur präparativen Restriktion und zur Transformation eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eluiert. Es wurden 4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 10500 g pelletiert (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte unter Verwendung des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bzw. des *QIAprep Plasmid Spin Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.3.1.2. Isolation genomischer DNA mittels *Spin* Säulen

Diese Methode diente zur Gewinnung genomischer DNA, die als *template* in PCR eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit erhitztem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eluiert. Es wurden 1.5 ml Übernachtskultur der zu untersuchenden *E. coli* Stämme bei 10500 g zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellpellet wurde für die Isolation der genomischen DNA mittels *E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit* (peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.3.1.3. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnten so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach überprüft werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) sowie 10 µl Stopp-Mix [40 % Glycerin (v/v), 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) für 10 s und Zentrifugation für 5 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden ca. 35 µl des wässrigen Überstandes im 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

## 2.3.2. DNA-Techniken

### 2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA). Dabei variierte die Gel-Konzentration von 0.8 (w/v) bei großen Fragmenten bis zu 2 % (w/v) bei kleinen Fragmenten. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)] eingesetzt. Die Agarose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde dem Puffer zugegeben und in der Mikrowelle (Bosch Hausgeräte) gelöst. Anschließend wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung 0.5 g/l Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel gegossen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Volumen Stopp-Lösung [40 % (v/v) Glycerin, 0.1 g/l SDS, 0.1 M EDTA,  $\pm$  2.5 g/l BPB] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-20  $\mu$ l (analytische Gele) bzw. 20-120  $\mu$ l (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer, Reiskirchen bzw. Biometra®, Göttingen) bis die Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (Gel Jet Imager, Intas, Göttingen), die Dokumentation mittels der dazugehörigen Bild-Aufnahme-Software.

### 2.3.2.2. DNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe dem *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) (14 Fragmente der Größen 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp) und dem *Gene Ruler* 1 kb DNA *Ladder* (MBI) (14 Fragmente der Größen 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp).

### 2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Fragmente wurde entweder mit dem GenQuant (Pharmacia Biosystems, Freiburg) bestimmt oder durch Vergleich der Fluoreszenzintensität Ethidiumbromid-markierter DNA-Proben mit Standards (DNA-Fragmente bekannter Konzentration). Dies war vor allem für Sequenzreaktionen wichtig. Die Konzentrationsbestimmung für Ligationen erfolgte durch direkten Vergleich der miteinander zu ligierenden Fragmente.

### 2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 (analytisch) bis 100  $\mu$ l (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0.1 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10-fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro  $\mu$ g DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h oder über Nacht bei der für das Enzym

spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37°C spaltet.

#### **2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA**

Die Reinigung der DNA erfolgte über den *E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit* (peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen). Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silika-Gel-Membran, während Verunreinigungen (z. B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Es wurde nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers vorgegangen. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift erfolgte die Elution der DNA mit 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

#### **2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment rasch aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

#### **2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl durchgeführt. Das Verhältnis Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:5. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2-3 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

#### **2.3.3.1. Auswahl der Primer**

Die Ableitung der Primer erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms OLIGO aus bekannten Sequenzen.

Die Oligonukleotid-Primer (Tabelle 3) wurden von kommerziellen Anbietern (Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst (Stammlösung mit 100 pmol/µl) und auf eine Endkonzentration von 10 pmol/µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5'→ 3' <sup>Position<sup>a)</sup></sup>	Bemerkung
<b>Deletions- und Testprimer</b>		
$\Delta yodA$ P1 d → (=down)	395CTG TTT TGG CGA TTC GTC TTT ACA AAC TGG CTG TTG CTT <i>GCG ATT GTG TAG</i> <i>GCT GGA GCT</i>	Deletionsprimer für <i>yodA</i> mit 39 Basen Übereinstimmung <i>upstream yodA</i> und 21 Basen, die in pKD3 binden.
$\Delta yodA$ P2 u ← (=up)	1080GCG GCA TCG AGG CGT TAT CAT GAG AAT ACT CAA TGA GAC <i>CCA TGG TCC ATA</i> <i>TGA ATA TCC TCC</i>	Deletionsprimer für <i>yodA</i> mit 39 Basen Übereinstimmung <i>downstream yodA</i> und 24 Basen, die in pKD3 binden.
<i>entC</i> Test d →	185TTT TGT GGA TGA TAT GGA TAC GTC	Testprimer, der 16 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>entC</i> Test u ←	1445GCC TTT TTC CCG ATA GCG ACG	Testprimer, der ca. 70 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>fecE</i> Test d →	229TGT ATT TCC GCT TCC ACG CTG	Testprimer, der 40 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>fecA</i> Test u ←	188TGA TGG GGA AGG TAT GAC GCC	Testprimer, der ca. 13 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>feo</i> Test d →	162CGC ATC TGG CAA CGA ACG C	Testprimer, der 380 bp <i>upstream</i> vom <i>feoA</i> ATG bindet.
<i>feo</i> Test u ←	3433TTA TGG AAA GCC GCA CGC AA	Testprimer, der ca. 50 bp <i>downstream</i> vom <i>feoC</i> Stoppcodon bindet.
<i>mntH</i> Test d →	35GAG AAT CGC AAC AAC GGC AAG TG	Testprimer, der 360 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>mntH</i> Test u ←	1681TTA CGC CGC ATC CGC CAA TAG TG	Testprimer, der 50 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>zupT</i> Test d →	35GCC TGC GGG AAG CCA CCA AAG TC	Testprimer, der ca. 370 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.

## Fortsetzung Tab. 3:

<i>zupT</i> Test u	←	1294GCT GGC AGA AGT TGT CCA TGC GC	Testprimer, der 50 bp <i>upstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>yohM</i> Test d ( <i>Pst</i> I d)	→	240CGC GCT TTC AGT TTC TGT TTA TCA	Testprimer, der ca. 160 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>yohN</i> Test u ( <i>Eco</i> RI u)	←	800TAA CAA GCA AGA CGA GCA AGT GGC	Testprimer, der ca. 600 bp <i>downstream</i> vom <i>yohN</i> ATG bindet.
<i>corA</i> Test d	→	155TGC CCA CCG AAC TGT CCG ATA	Testprimer, der ca. 30 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>corA</i> Test u	←	1293AAT TGC CGT AGC AGC CTA TGT TG	Testprimer, der 130 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>znuABC</i> Test d	→	1233CCA GGG CGA CAG AGC GGG C	Testprimer, der ca. 1000 bp <i>upstream</i> vom <i>znuA</i> ATG bindet.
<i>znuABC</i> Test u	←	1096AAT ATG CCT GAT GCG ACG CTG T	Testprimer, der ca. 100 bp <i>downstream</i> vom <i>znuB</i> Stoppcodon bindet.
<i>zitB</i> Test d	→	77CCA CGC AGT AAC CCT GCA AAA	Testprimer, der ca. 120 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>zitB</i> Test u	←	1262TGC ACT TCA GGG CGT TTA CGC	Testprimer, der 110 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>zntB</i> Test d	→	40AAC AGT TTC GCC GCG CTA TTG	Testprimer, der ca. 360 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.
<i>zntB</i> Test u	←	1915AAG GTT CGT GAG TTG GGC GGG	Testprimer, der 520 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>zntA</i> Test d Disrupt.	→	310GCA CGC CAA CTC TCT CTG AAA ACG	Testprimer, der ca. 110 bp <i>downstream</i> vom ATG bindet.
<i>zntA</i> Test u Disrupt.	←	2408CGG TTT GCC TTA TCT CCT GCG	Testprimer, der 10 bp <i>downstream</i> vom Stoppcodon bindet.
<i>zntA</i> Test d	→	105CGT CCG CTC GCT GTA TCT CTG	Testprimer, der ca. 100 bp <i>upstream</i> vom ATG bindet.

## Fortsetzung Tab. 3:

<i>zntA</i> Test u	←	2482GAT GCC GCC TTT TCC CCT C	Testprimer, der 90 bp downstream vom Stoppcodon bindet.
<i>sodA</i> Test d	→	52AAC AGG CTG ACT GGC CGC	Testprimer, der ca. 350 bp upstream vom ATG bindet.
<i>sodA</i> Test u	←	1109ATC ACA AAA AAA CCA CCG CCG	Testprimer, der 80 bp downstream vom Stoppcodon bindet.
<i>sodB</i> Test d	→	131CGG CGT GTA TGT CGG CAA	Testprimer, der ca. 270 bp upstream vom ATG bindet.
<i>sodB</i> Test u	←	1047ATC GAT GAT CCG CGT AGG CCT	Testprimer, der ca. 60 bp downstream vom Stoppcodon bindet.
<i>pitA</i> Test d	→	113GAA CAG AAC ATA CCC GCC GCA	Testprimer, der ca. 290 bp upstream vom ATG bindet.
<i>pitA</i> Test u	←	1950TGT CAC AAT CTG AAG CGG GCC	Testprimer, der ca. 50 bp downstream vom Stoppcodon bindet.

Überexpressionsprimer und Primer zur Komplementation in *trans*

<i>zupT</i> <i>EcoRI</i> d	→	94TCG <u>GAA TTC</u> GTA CCT CTC ATT CTG ACC ATA CTG GCG	5'-codierender Bereich von <i>zupT</i> für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>zupT</i> <i>PstI</i> u	←	838TTG <u>CTG CAG</u> ACC AAT TCC CGC CGT TTG TA	3'-codierender Bereich von <i>zupT</i> ohne Stoppcodon für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>zupT</i> <sub>Prom.</sub> <i>EcoRI</i> d	→	139ACA <u>GAA TTC</u> GCG GGA AGC CAC CAA AGT CAT	5'-codierender Bereich von <i>zupT</i> mit Promotorregion für Klonierung in pACYC184.
<i>zupT</i> <sub>Prom.</sub> <i>EcoRI</i> u	←	1337TAA <u>GAA TTC</u> CGA GAG AAG AGA CAG CCG AAA AGG	3'-codierender Bereich von <i>zupT</i> mit Stoppcodon für Klonierung in pACYC.
<i>zupT</i> <sub>Prom.</sub> <i>Scal</i> d	→	139ACA <u>AGT ACT</u> GCG GGA AGC CAC CAA AGT CAT	5'-codierender Bereich von <i>zupT</i> mit Promotorregion für Klonierung in pACYC177.
<i>zupT</i> <sub>Prom.</sub> <i>Scal</i> u	←	1337TAA <u>AGT ACT</u> CGA GAG AAG AGA CAG CCG AAA AGG	3'-codierender Bereich von <i>zupT</i> mit Stoppcodon für Klonierung in pACYC177.

## Fortsetzung Tab. 3:

<i>pitA</i> <i>EcoRI</i> d	→	204CGT <u>GAA TTC</u> CTA CAT TTG TTT GCT GGC CTG	5'-codierender Bereich von <i>pitA</i> für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>pitA</i> <i>PstI</i> u	←	1677GTA <u>CTG CAG</u> CAG GAA CTG CAA GGA GAG CCA	3'-codierender Bereich von <i>pitA</i> ohne Stoppcodon für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>pitA</i> <sub>Prom.</sub> <i>XbaI</i> d	→	110ACC <u>TCT AGA</u> CGC AGA ACA GAA CAT ACC CGC	5'-codierender Bereich von <i>pitA</i> mit Promotorregion für Klonierung in pASK-IBA3 <sup>+</sup> .
<i>pitA</i> <sub>Prom.</sub> <i>PstI</i> up	←	1677GTA <u>CTG CAG</u> CAG GAA CTG CAA GGA GAG CCA	3'-codierender Bereich von <i>pitA</i> ohne Stoppcodon für Klonierung in pASK-IBA3 <sup>+</sup> .
<b><i>zupT</i> Mutagenese Primer</b>			
<i>zupT</i> E60D d	←	165GCA CTA GCA GCT <u>GAC</u> GGA ATG TCG CC	<i>Quick-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>zupT</i> ein, A <sub>180</sub> C (E <sub>60</sub> D).
<i>zupT</i> E60D u	→	191GG CGA CAT TCC <u>GTC</u> AGC TGC TAG TGC	
<i>zupT</i> H89R d	←	243GAC CGC ATG TTG CCA <u>CGT</u> GCT CAT CCG CAG GAT T	<i>Quick-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>zupT</i> ein, A <sub>260</sub> G (H <sub>89</sub> R).
<i>zupT</i> H89R u	→	277A ATC CTG CGG ATG AGC <u>ACG</u> TGG CAA CAT GCG GTC	
<i>zupT</i> E123D d	←	348AGT CTG CAT AAC TTC CCG <u>GAC</u> GGG ATT GCC ACC TTT	<i>Quick-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>zupT</i> ein, A <sub>369</sub> C (E <sub>123</sub> D).
<i>zupT</i> E123D u	→	384AAA GGT GGC AAT CCC <u>GTC</u> CGG GAA GTT ATG CAG ACT	
<i>zupT</i> E123A d	←	348AGT CTG CAT AAC TTC CCG <u>GCA</u> GGG ATT GCC ACC TTT	<i>Quick-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>zupT</i> ein, A <sub>368</sub> C (E <sub>123</sub> A).
<i>zupT</i> E123A u	→	384AAA GGT GGC AAT CCC <u>TGC</u> CGG GAA GTT ATG CAG ACT	
<i>zupT</i> E152A d	←	437CG TTG CAC AAT ATC CCT <u>GCA</u> GGT CTG GCA GTG GCA G	<i>Quick-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>zupT</i> ein, A <sub>456</sub> C (E <sub>152</sub> A).
<i>zupT</i> E152A u	→	466C TGC CAC TGC CAG ACC <u>TGC</u> AGG GAT ATT GTG CAA CG	



## Fortsetzung Tab. 3:

<i>zupT</i> E152D d	←	441CAC AAT ATC CCT <u>GAC</u> GGT CTG GCA GT	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> E152D u	→	466AC TGC CAG ACC <u>GTC</u> AGG GAT ATT GTG	<i>zupT</i> ein, A <sub>456</sub> C (E <sub>152D</sub> ).
<i>zupT</i> S117V d	←	333G CTC ACT CTC GGC ATC <u>GTT</u> CTG CAT AAC TTC CCG	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> S117V u	→	366CGG GAA GTT ATG CAG <u>AAC</u> GAT GCC GAG AGT GAG C	<i>zupT</i> ein, A <sub>350</sub> G, G <sub>351</sub> T (S <sub>117V</sub> ).
<i>zupT</i> H119R d	←	334CTC ACT CTC GGC ATC AGT CTG <u>CGT</u> AAC TTC CCG GAA GG	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> H119R u	→	CC TTC CGG GAA GTT <u>ACG</u> CAG ACT GAT GCC GAG AGT GAG	<i>zupT</i> ein, A <sub>356</sub> G, (H <sub>119R</sub> ).
<i>zupT</i> H148R d	←	427CTG GCC GTC GCG TTG <u>CGC</u> AAT ATC CCT GAA GGT CTG G	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> H148R u	→	463C CAG ACC TTC AGG GAT ATT <u>GCG</u> CAA CGC GAC GGC CAG	<i>zupT</i> ein, A <sub>442</sub> G, (H <sub>148R</sub> ).
<i>zupT</i> M62A d	←	166GCA CTA GCA GCT GAA GGA <u>GCG</u> TCG CCT GTG TTG GGT	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> M62A u	→	ACC CAA CAC AGG CGA <u>GCG</u> TCC TTC AGC TGC TAG TGC	<i>zupT</i> ein, A <sub>184</sub> G und T <sub>185</sub> C, (M <sub>62A</sub> ).
<i>zupT</i> D82A d	←	226T GGC TAT TTT GGC CTG <u>GCC</u> CGC ATG TTC CCA CAT G	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> D82A u	→	262C ATG TGG CAA CAT GCG <u>GGC</u> CAG GCC AAA ATA GCC A	<i>zupT</i> ein, A <sub>245</sub> C (D <sub>82A</sub> ).
<i>zupT</i> H89A d	←	243GAC CGC ATG TTG CCA <u>GCT</u> GCT CAT CCG CAG GAT T	Quick-Change Mutagenese- Primer, führen Mutation in
<i>zupT</i> H89A u	→	277A ATC CTG CGG ATG AGC <u>AGC</u> TGG CAA CAT GCG GTC	<i>zupT</i> ein, C <sub>265</sub> G, A <sub>266</sub> C (H <sub>89A</sub> ).

## Sonstige Primer

pASK d	→	90AAA AGT GAA ATG AAT AGT TCG ACA AAA	Sequenzierprimer für <i>zupT</i> - und <i>pitA</i> -Konstrukte in pASK-
pASK u	←	292CGG TAA ACG GCA GAC AAA AAA AAT G	IBA3/3+.

**Fortsetzung Tab. 3:**

<i>pACYC184 d</i>	→	<u>22</u> ATT CAC ATT CTT GCC CGC CTG	Sequenzier- und Kontroll- primer für <i>zupT</i> Konstrukte in <i>pACYC184</i> .
<i>pACYC184 u</i>	←	<u>4221</u> GCT CAC CGT CTT TCA TTG CCA	
<i>pACYC177 d</i>	→	<u>4221</u> GCT CAC CGT CTT TCA TTG CCA	Sequenzier- und Kontroll- primer für <i>zupT</i> Konstrukte in <i>pACYC177</i> .
<i>pACYC177 u</i>	←	<u>22</u> ATT CAC ATT CTT GCC CGC CTG	
<i>pFastBac</i> <sup>TM</sup> 1	→	AGC TCA CTA GTC GCG GCC G	Sequenzierprimer für <i>zupT</i> Konstrukte in <i>pFastBac</i> <sup>TM</sup> 1, bindet in der MCS.
M13 fwd	→	GTT TTC CAG TCA CGA C	Kontrollprimer zur Inte- gration der <i>zupT</i> Konstrukte in der Bacmid-DNA
M13 rev	←	CAG GAA ACA GCT ATG AC	(Baculovirus Expression)

a) Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet. Unterstrichene, vergrößerte und **fett** dargestellte Basen weisen auf Basen-Austausche in *zupT* hin. Tiefergestellte Ziffern kennzeichnen die Basenposition in der jeweiligen Gensequenz. *Kursiv* dargestellte Basen in den Deletionsprimer sind zur Sequenz von pKD3 bzw. pKD4 homolog.

**2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von durch Transformation erzeugten Klonen.

Für präparative Zwecke wurde eine Polymerase mit 3'-5'-*proof-reading*-Aktivität [*Pwo* (Roche, Mannheim)] oder das *TaqI Tgo*-Gemisch [*Expand*<sup>TM</sup> *Long Template PCR System* (Roche, Mannheim)] eingesetzt. In diesem Fall diente gereinigte DNA als *template* für die Reaktion.

Zur Analyse wurde *Taq*-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Hierbei wurden entweder gereinigte Plasmide oder frisches Koloniematerial als *template* verwendet. Die Zellen wurden mit sterilem Zahnstocher von der Agaroberfläche in 40 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> überführt. Nach Erhitzen für 10 min auf 96°C und anschließender Zentrifugation konnte der Überstand als *template* eingesetzt werden.

**Reaktionsansatz:**

1 µl	<i>template</i> -DNA (ca. 100 ng/µl)	0.7 -1 µl Polymerase
5 µl	10 x PCR Puffer	(5 µl DMSO)
1 µl	20 mM dNTP-Mix	ad 50 µl steriles H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
1 µl	Primer 1 (10 pmol)	
1 µl	Primer 2 (10 pmol)	

Die Reaktionen wurden als *Hot-Start*-Reaktionen im PCR-Block (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen) nach folgendem Protokoll gefahren:

1.	2 min	96°C	<i>Hot-Start</i>
2.	30 sec	96°C	Denaturierung
3.	30 sec	x°C	<i>Annealing</i>
4.	1 min/kb	68/72°C	<i>Extension (Pwo, Taq<sup>+</sup> TgoI Taq)</i>
	Schritt 2-4:	25-30 Zyklen	
5.	4 min	68/72°C	Nachsynthese ( <i>Pwo, Taq<sup>+</sup> TgoI Taq</i> )
6.	Pause	4°C	

Das Temperaturprotokoll wurde dem jeweiligen Primer-Paar (*Annealing*-Temperatur) und *template* (*Extension*-Zeit), sowie der verwendeten Polymerase (*Extension*-Temperatur: 68°C/72°C) angepasst.

#### 2.3.3.3. *Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis-PCR* (Stratagene *Cloning Systems*, Heidelberg)

Diese Methode diente zur Mutagenese eines oder mehreren nebeneinander liegender Basenpaare. Wichtig hierfür ist das Vorliegen der zu mutierenden Sequenz in einem relativ kleinen doppelsträngigen, *supercoiltten* Vektor (z. B. pACYC, pASK-IBA), der aus einem *dam<sup>r</sup>* *E. coli*-Stamm isoliert wurde. Je ein Mutagenese-Primer für jeden Strang, die zueinander komplementär sind, diente zum Einführen der gewünschten Mutation. Sie wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt, die dann das gesamte Plasmid mit Insert amplifizierte. Um *second-site*-Reversionen zu verhindern, wurde die *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt. Wichtig war außerdem nur wenige Zyklen zu durchlaufen (16+1 pro jeden Basenaustausch). Einige *Quick-Change* PCR Ansätze wurden in Anwesenheit von DMSO und Pfu-Polymerase durchgeführt, die eine Extensionszeit von 1 kb/2 min aufwies. Anschließend wurde der PCR-Ansatz gereinigt und mit *DpnI* behandelt. Dieses Enzym verdaut spezifisch die parentale, *dam*-methylierte DNA, nicht aber das PCR-Produkt. Der mutierte Vektor konnte anschließend für Transformations-Experimente eingesetzt werden, ohne dass vorher eine Ligation erfolgen musste.

#### 2.3.3.4. *Overlap extension PCR*

Auch diese Methode diente zur Mutagenese mehrerer nebeneinander liegender Basenpaare. Dabei wurden zwei mit Standard-PCR generierte Amplika, an deren Enden durch „Mutagenese-Primer“ die gewünschte Veränderung der Basenfolge eingeführt wurde, als *template* eingesetzt. Die beiden Amplika überlappen randständig in einem Bereich von ca. 30 bp. Die „Randprimer“ der ersten beiden PCRs wurden für die zweite Reaktion verwendet. Die *Annealing*-Temperatur

der Gesamtreaktion wurde durch die *Annealing*-Temperaturen der eingesetzten „Randprimer“ und des überlappenden Zwischenbereiches festgelegt.

### 2.3.4. DNA-Transfer in *Escherichia coli* und Selektion rekombinanter Klone

#### 2.3.4.1. Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode

##### A) Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes inkubiert. Diese Kultur wurde in frischem LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte [OD 600 nm] von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, gekühltes Greiner-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 4500 g und 4°C in der Eppendorf Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg). Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis gelagert. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80°C gelagert.

##### B) Transformation

Die Transformation selbst wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der zu transformierenden DNA vorsichtig gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C an, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis für 2 min gekühlt wurden. Nach Zugabe von z. B. 400 µl LB-Medium zu 100 µl Zellen und einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C/30°C wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C/ 30°C inkubiert.

#### 2.3.4.2. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation (nach Dower *et al.*, 1988)

##### A) Herstellung kompetenter Zellen

50 ml SOB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit einer Vorkultur 1:100 beimpft und bei 30°C oder 37°C unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach 15-minütigem Abkühlen auf Eis zentrifugiert (15 min 4500 g, 4°C) und das Zellpellet dreimal mit je 50 ml 10%igen, eiskaltem Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 800 µl Glycerin [10 % (v/v)] resuspendiert. Die elektrokompenten Zellen wurden als 40 µl-Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

##### B) Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit dem *Gene Pulser® II Electroporation System* (BIORAD, München). Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in sterile, gekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 1.8 kV und 200 Ω, wodurch

eine Feldstärke von 12.5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3.5-4.5 ms erreicht wurden. Sofort nach Impuls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 30°C/37°C inkubiert. 50-1000 µl des Ansatzes wurden auf Selektivagar ausplattiert.

#### **2.3.4.3. Selektion plasmidtragender *E. coli*-Klone**

Die Transformanten wurden auf LB-Agar-Platten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums und, wenn nötig, X-Gal und IPTG selektiert. Rekombinante Klone konnten aufgrund der vermittelten Antibiotikaresistenz und/oder der Fähigkeit, X-Gal als Substrat zu spalten, identifiziert werden, was sich in der Blaufärbung der Klone feststellen ließ.

#### **2.3.4.4. Inaktivierung chromosomaler Gene von *E. coli* (Datsenko und Wanner, 2000)**

Dieses System beruht auf dem Prinzip der ortsspezifischen Rekombination unter Verwendung des  $\lambda$  Red ( $\gamma$ ,  $\beta$ , *exo*) Rekombinase Systems. Ein chromosomales Gen wird gegen eine selektierbare Antibiotikaresistenz ausgetauscht, welche durch PCR amplifiziert wurde. Die genutzten Primer enthielten zum einen eine zum Zielgen 39 nt homologe Sequenz für die Rekombination und zum anderen eine zu pKD3 bzw. pKD4 21 nt homologe Sequenz. Mit amplifiziert wurden FRT (FLP *recognition target*)-sites, die für die Entfernung der Antibiotikaresistenz notwendig sind.

##### A) Inaktivierung der Gene

*E. coli* BW25113 wurde bei 30°C in Gegenwart von 1 mM L-Arabinose in SOB-Medium inkubiert und elektrokompente Zellen, wie zuvor beschrieben, hergestellt. Unter Kontrolle des Arabinose-Promotors stehen die Gene des  $\lambda$  Red ( $\gamma$ ,  $\beta$ , *exo*) Rekombinase Systems, sodass in Anwesenheit von L-Arabinose die Expression der Gene des  $\lambda$  Red Rekombinase Systems stattfinden kann. Die Zellen wurden mit gereinigten PCR-Produkten (ca. 39 bp *up*- und *downstream* des zu deletierenden Genes, FRT-sites und Antibiotikaresistenz-Kassette) elektroporiert, 1h bei 37°C schütteln inkubiert und anschließend über Nacht bei RT inkubiert. Zur Selektion von Deletionsmutanten wurde der gesamte Elektroporationsansatz auf Antibiotika-haltigen (Kanamycin bzw. Chloramphenicol) Agar ausplattiert. Die Überprüfung des Genaustausches gegen die Antibiotikaresistenz erfolgte mittels PCR.

##### B) Eliminierung der Antibiotikaresistenz

Das Plasmid pCP20 hat eine Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenz, ein temperatursensitives Replikationsorigin und eine temperaturabhängige Induzierbarkeit der FLP-Synthese. Die Deletionsmutanten wurden mit pCP20 transformiert und auf Ampicillin bei 30°C selektiert. Kolonien wurden auf Nichtselektivagar bei 43°C inkubiert und dann auf den Verlust sämtlicher Resistenzkassetten getestet. Der Großteil der Klone verliert bei diesem Schritt die FRT-flankierte Resistenzkassette und gleichzeitig das FLP-Helferplasmid (pCP20). Die Kontrolle der Deletion erfolgte mittels PCR.

**2.3.4.5. Gentransfer durch P1-Transduktion (Provence, 1981)****A) Gewinnung des P1-Lysates**

Eine Übernachtskultur von *E. coli* wurde 1:20 in LB-Medium mit 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (L broth) verdünnt und 90 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein vorhandenes P1-Lysat 1:20 in L broth verdünnt. Zu 100 µl dieser Verdünnung wurden 900 µl der *E. coli* Kultur gegeben und zur Phagenabsorption 20-30 min bei 37°C inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden zu 2 ml Weichager pipettiert und auf LB-Agar gegeben. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Weichagar mit 5 ml LB-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> abgeschwemmt und in ein steriles 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Es wurden 0.15 ml Chloroform zu je 5 ml Lysat gegeben und 2 min kräftig gevortext. Das Lysat wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag abzentrifugiert (4500 g, 4°C, 30 min) und der Überstand in ein 2 ml Eppendorf tube überführt. Nach Zugabe von einigen Tropfen Chloroform wurde das Lysat bei 4°C gelagert.

**B) P1-Transduktion**

Eine Übernachtskultur des *E. coli* Zielstammes wurde 1:20 in LB-Medium mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> verdünnt und 100 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde zentrifugiert (5 min, 4500 g) und in 1/10 Vol. SM+Ca<sup>2+</sup>-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden 20 min bei RT inkubiert. Das P1-Lysat wurde in SM+Ca<sup>2+</sup> 1:10 verdünnt und anschließend 0.1 ml Zellen hinzu pipettiert, die zuvor in SM+Ca<sup>2+</sup>-Medium inkubiert wurden. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.2 ml LB-Medium mit 50 mM Na-Citrat wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann 200 µl auf Selektivagar ausplattiert. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

**2.3.5. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurde durch enzymatische Synthese eine markierte, komplementäre Kopie des zu sequenzierenden Matrizenstranges erstellt.

**2.3.5.1. Sequenzierung unter Verwendung des *DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit* (GE Healthcare, Freiburg)**

Für die Sequenzreaktion, die im Uno-Thermoblock (Biometra, Göttingen) stattfand, wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

Plasmid-DNA (0.5 µg)	2 µl
Primer (4 pM)	2 µl
ABI- <i>Sequencing-Mix</i>	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 10 µl

Die Sequenzreaktionen erfolgten nach folgendem Programm:

1)	Denaturierung	95°C	1 min
2)	Denaturierung	95°C	1 min
3)	<i>Annealing</i> (je nach Primer)	52°C/60°C	30 s
4)	<i>Extension</i>	60°C	2 min
	Schritt 2-4:	33 Zyklen	
5)	Pause	4°C	

Die DNA wurde anschließend zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl Ethanol zugegeben wurden. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei RT und 10500 g und anschließendem 5 min Waschen mit 70%igem (v/v) Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und war bei -20°C bis zur Sequenzierung stabil. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzreaktion erfolgte durch Ute Lindentrauß.

### 2.3.5.2. Sequenzierung durch kommerzielle Anbieter

Für diese Sequenzreaktionen wurden 0.8 µg Plasmid DNA und 20 pmol Primer, in einem Gesamtvolumen von 10 µl, verwendet. Dabei wurde auf Anbieter wie Microsynth AG, Lindau; Agowa, Berlin oder auch Seqlab, Göttingen zurückgegriffen.

### 2.3.5.3. Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Programms Chromas. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen Clone 5 (*Clone Manager-Version 7.0, Scientific & Educational Software, USA*) ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Internet-Programm *Basic Logic Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm ClustalW vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen, Hydrophathieprofilen und die Berechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der AS-Sequenzen erfolgte mit dem Internet-Programm *Expasy* des *Expasy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

## 2.4. Zellwachstumsversuche in Flüssigmedien

### 2.4.1. Messung der Zelltrübung

Das Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) diente der Zelltrübungsmessung wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Dazu wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, da er im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) das meiste Licht transmittiert. Zur Kalibrierung der Skala wurde unbeimpftes Medium (Nullwert) verwendet. Aus den erhaltenen

Klett-Einheiten konnte unter Verwendung einer Eichkurve die Konzentration der zugehörigen Zellsuspension ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch Verwendung von Seitenarmkolben während der Bakterienkultivierung keine Probennahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

Neben der kontinuierlichen Messung des Zellwachstums wurde die Zelldichte nach einer definierten Wachstumszeit (16 h, 20 h oder 24 h) bestimmt. Dazu wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) ermittelt. Die Bestimmung des Zelltrockengewichtes und der Zellzahl erfolgte mittels Eichkurven.

#### **2.4.2. Zellanzucht von *Escherichia coli*-Stämmen in Wachstumsversuchen**

##### A) Wachstums-Endpunktbestimmungen

Vorkulturen wurden, wenn nötig mit Antibiotika, in LB über Nacht bei 37°C angezogen. Diese LB-Kulturen wurden in Tris-MM, 1:400 verdünnt und ebenfalls für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 1:400 Verdünnung der zweiten Vorkultur im entsprechenden Tris-MM, d. h. für Wachstums-Endpunktbestimmungen unter Eisenlimitation wurde eisenfreies Minimalmedium (mit desferriertem CAS und eisenfreier Komponente A) verwendet und für phosphatfreies Tris-MM wurde die Komponente B ohne Phosphat verwendet. Das Wachstum der Mittelkultur erfolgte im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 rpm. Nach 2-stündigem Wachstum wurden 10 µl dieser Mittelkulturen in 4 ml des jeweiligen Tris-MM überimpft, wobei verschiedene Schwermetalle bzw. Chelatoren in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt wurden. Das Wachstum der Hauptkultur erfolgte für 16 h, 20 h bzw. 24 h im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 rpm. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) bestimmt. Für Wachstums-Endpunktbestimmungen in Anwesenheit von CdCl<sub>2</sub> wurden die Vorkulturen sowohl in LB-Medium als auch in Minimalmedium zusätzlich mit 50 µM EDTA inkubiert. Die Hauptkulturen wurden direkt aus der Minimal-Vorkultur 1:400 angeimpft und gleichzeitig mit 50 µM EDTA und steigenden CdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen versetzt. Die Bestimmung der Optischen Dichte erfolgte wie oben beschrieben.

##### B) Trockenstress-Experimente mit anschließender Wachstums-Endpunktbestimmungen

Vorkulturen wurden in LB über Nacht bei 37°C angezogen. Diese LB-Kulturen wurden in Tris-MM, in Tris-MM mit 100 µM MnCl<sub>2</sub> oder in Tris-MM mit 100 µM FeCl<sub>3</sub>, 1:400 verdünnt und ebenfalls für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 1 ml der Minimal-Kultur wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen und die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Die Zellen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> so verdünnt, dass in 5 µl Zellsuspension 10<sup>6</sup> Zellen enthalten sind. Anschließend wurden 10<sup>6</sup> Zellen pro 5 µl auf sterile Filterblättchen gegeben und für 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 h inkubiert. Die Filterblättchen wurden in 4 ml LB-Medium gegeben und auf Eis gelagert. Das Wachstum der Kulturen erfolgte bei 37°C und bei 150 rpm. Nach 16-stündiger Inkubation wurde die Optische



Dichte bei 600 nm mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) bestimmt.

#### C) Anaerobe Wachstums-Endpunktbestimmungen

Die Vor- und Mittelkulturen wurden wie oben beschrieben beimpft. Eine 2-stündige Mittelkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur verwendet (1:400). Als Medium für die Hauptkultur diente Tris-MM ohne Eisen mit desferriertem CAS und Glucose als C-Quelle. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von  $\text{MnCl}_2$  oder  $\text{FeSO}_4$  zum Medium hinzu gegeben. Nahezu anaerobe Wachstumsbedingungen wurden erreicht, indem 15 ml Greiner mit Medium vollständig befüllt und fest verschraubt wurden. Das Wachstum der Kulturen erfolgte nicht schüttelnd bei 37°C. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde jeweils nach 16 h, 24 h und 48 h mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) bestimmt.

#### D) Zeitabhängige Wachstumsversuche

Für die Anzucht der kontinuierlich zu vermessenden Hauptkulturen wurden citratgespülte Seitenarmkolben verwendet. Vor- und Mittelkulturen wurden wie oben beschrieben angezogen. Es wurden 10 ml Tris-MM ohne Eisen mit desferriertem CAS 1:400 mit der entsprechenden Mittelkultur beimpft. Als Zusätze für die Hauptkultur wurde 2,2'-Dipyridyl,  $\text{FeSO}_4$  oder  $\text{MnCl}_2$  eingesetzt. Zeitabhängige Wachstumsversuche in Gegenwart von  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  erfolgten in Tris-MM. Das Zellwachstum erfolgte bei 37°C im Schüttelwasserbad (Infors AG, Bottmingen) und wurde kontinuierlich bis zum Erreichen der stationären Phase mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

#### E) Zeitabhängige Wachstumsversuche unter oxidativen Stressbedingungen

25 ml Tris-MM ohne Eisen und mit desferrierten CAS mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  oder mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  wurden 1:400 mit der entsprechenden Mittelkultur beimpft. Als Kontrolle diente das gleiche Minimal-Medium ohne Schwermetall-Zusatz, dass ebenfalls mit einer Mittelkultur 1:400 beimpft wurde. Nachdem die Kulturen eine Optische Dichte von 100 Klett erreichten, wurden die Zellen mit doppelten Volumen mit Tris-MM ohne Eisen und mit desferrierten CAS gewaschen. Anschließend wurden zweimal jeweils 10 ml einer Kulturen in neue Seitenarmkolben pipettiert und nur zu einem Ansatz 150  $\mu\text{M}$  Paraquat hinzugegeben. Das Zellwachstum erfolgte weiterhin bei 37°C im Schüttelwasserbad (Infors AG, Bottmingen) und wurde kontinuierlich bis zum Erreichen der stationären Phase mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

## 2.5. Enzymologische Methoden - Bestimmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität

### 2.5.1. Zellanzucht der *E. coli*-Stämme

Ziel war es zu untersuchen, welche Superoxid-Dismutasen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen im Deletionsstamm ECA458 ( $\Delta fecA-E$ ,  $\Delta feoABC$ ,  $\Delta mnth$ ,  $\Delta zupT$ ,  $\Delta entC$ ) aktiv sind. Dazu wurden Vorkulturen in LB-Medium bei 37°C angezogen, die anschließend in Tris-MM 1:400 verdünnt wurden und ebenfalls bei 37°C für 16 h schüttelnd inkubiert wurden. Diese zweite Vorkultur wurde 1:400 in Tris-MM ohne Eisen und desferriertem CAS verdünnt. Das Wachstum dieser Mittelkultur erfolgte im Inkubationsschüttler für 2 h bei 37°C. Nach 2-stündigen Wachstum wurde mit dieser Mittelkultur 100 ml Tris-MM ohne Eisen und desferriertem CAS mit entsprechenden Zusätzen (2.5  $\mu\text{M}$  DIP, 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  oder 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ +10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ) 1:400 beimpft. Auf die gleiche Art und Weise wurden Kulturen mit 2, 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , jedoch in Tris-MM inkubiert. Das Wachstum der Kulturen erfolgte in 300 ml Seitenarmkolben bei 37°C im Schüttelwasserbad (Infors AG, Bottmingen) bis 100 Klett.

### 2.5.2. Probenvorbereitung für Aktivitätsfärbung der Superoxid-Dismutasen

Nach Zentrifugation der Kulturen (15 min, 4500 g bei 4°C) wurde das Pellet in 2 ml 100 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 1 mM Proteaseinhibitor PMSF resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French*-Presse (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm<sup>2</sup>) in zwei Durchgängen aufgeschlossen. Als Alternative zur *French*-Presse wurden die Kulturen im Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW 60) aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen für 6 x 30 s bei Intervalleinstellung 75 % und 80 % Watt Leistung unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Zellen 30 s auf Eis abgekühlt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 10000 g in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg). Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Überstände mit Bradford-Reagenz bestimmt und 70  $\mu\text{g}$ -200  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein in einer Nativen PAGE eingesetzt.

### 2.5.3. Aktivitätsfärbung der Superoxid-Dismutasen in der Nativen PAGE (Zymogramm) (nach Beauchamp und Fridovich, 1971)

Die SOD-Aktivitätsfärbung in der Nativen PAGE beruht auf der Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)-Methode. TEMED als Radikalstarter bewirkt am Licht die Oxidation von Riboflavin. Im Verlauf dieser Reaktion werden  $\text{O}_2 \cdot$  Radikale freigesetzt, die einen Farbumschlag des NBT von gelb nach blau-schwarz bewirken. Die SOD konkurriert mit NBT um die Radikale und verhindert dadurch eine Schwarzfärbung des Gels.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Native Gel 20 min im Dunkeln mit Lösung A (12.5 mg NBT, 5 mg Riboflavin in 50 ml inkubiert  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ) inkubiert. Danach wurden 150  $\mu\text{l}$  TEMED

zugegeben und das Gel im Tageslicht inkubiert. Das blaugefärbte Gel mit ungefärbten Bereichen, die den SOD-Banden entsprechen, wurde bei Erreichen eines guten Kontrastes in Wasser gespült und somit die Reaktion gestoppt.

## 2.6. Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1. Protein-Expression und -Reinigung über das *Strep-tag*<sup>®II</sup> *Protein Purification System* (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Mittels des *Strep-tag*<sup>®II</sup> Überexpressionssystems können exprimierte Proteine in einer Einschnitt-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Reinigung des *Target*-Proteins wird N-terminal ein *tag* eingefügt, der aus 8 AS (WSHPQFEK) besteht. Dieser *Strep-tag*<sup>®II</sup> bindet spezifisch an *StrepTactin*, das als Säulenmaterial verwendet wurde. Weiterhin beeinflusst dieser *tag* normalerweise weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Die Induktion der Expression erfolgte durch AHT (Anhydrotetracyclin), da das Gen des zu exprimierenden Proteins hinter einen *tet*-Promotor kloniert wurde. Unspezifisch bindende Proteine konnten während eines Waschschruttes entfernt werden, während das *Target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule eluiert werden konnte.

#### 2.6.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

##### A) Protein-Expression in BL21(pLys)

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21(pLys) transformiert. Die Vorkultur, die über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, wurde 2%ig in frisches LB- oder TB-Medium überführt. Die Hauptkulturen in LB- oder TB-Medien zur Überexpression wurden schüttelnd bei 37°C inkubiert, bis sie eine Optische Dichte von OD<sub>600</sub> = 0.6 bzw. 1.0 erreichten. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von 200 µg AHT/l induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°C oder über Nacht bei 15°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 4500 g und 4°C (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

##### B) Protein-Expression zum Nachweis der ZupT- Mutanten-Proteine in der Membran

Die Plasmidkonstrukte, wurden u. a. in ECA580 ( $\Delta zupT \Delta mntH \Delta zntA \Delta yodA::cat$ ) oder ECA577 ( $\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB::cat \Delta zitB \Delta zntA::km_{Dis}$ ) transformiert. Es erfolgte eine Inkubation dieser transformierten Stämme in LB- Medium über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM verdünnt und ebenfalls bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur, bestehend aus mindestens 100 ml Tris-MM und Ampicilin auf ca. 30 Klett angeimpft. Bis zur Verdopplung der Klettzahl erfolgte das Zellwachstum bei 37°C schüttelnd. Anschließend wurden die Kulturen mit 200 µg AHT/l versetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 30 min bei

4500 g und 4°C (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

### 2.6.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

#### A) Ultraschall

Das Zellpellet wurde in 2 ml (pro 100 ml Kultur z. B. ECA580 mit exprimiertem *zupT*) Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl] mit 1 mM Proteaseinhibitor PMSF und 10 µg/ml DNaseI resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 6 x 30 s bei Intervalleinstellung 70 % bei 80 W Leistung unter Kühlung aufgeschlossen, zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Zellen 30 s auf Eis abgekühlt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die aufgeschlossenen Kulturen 30 min bei 10000 g in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R bei 4°C zentrifugiert.

#### B) *French-Press*

Das Zellpellet wurde in 30 ml (pro 1000 ml Kultur) Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl] resuspendiert und 1 mM PMSF versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French-Press* (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm<sup>2</sup>) in mehreren Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge (20200 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

### 2.6.1.3. Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand einer Ultrazentrifugation (Beckmann Coulter, Krefeld) (100000 g, 1 h, 4°C) unterzogen. Das so gewonnene Membranpellet wurde in Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl] aufgenommen und die Proteinkonzentration mit Bradford Reagenz oder mit dem BCA-Kit bestimmt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Die Solubilisierung der Membran erfolgte mit 1 % Laurylsarcosin oder mit 1 % n-Dodecyl-β-D-Maltosid für 1 h auf Eis. Nach der Solubilisierung schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge für 30 min bei 100000 g und 4°C an, um ungelöste Membranreste und Zelltrümmer zu pelletieren. Die gewonnenen Membranproteine konnten für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

### 2.6.1.4. Native Proteinreinigung mittels *StrepTactin*-Chromatographie

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml-10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1-5 ml Säulenmaterial (*StrepTactin*) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl] equilibriert. Die Zellextrakte, welche das *Strep-tag*<sup>®</sup>II-Fusionsprotein enthielten, wurden auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 10 Vol. Tris-Puffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), mit 150 mM NaCl] und 5 Vol. Tris-Puffer ohne Salz entfernt. Das *Target*-Protein wurde mittels 3–4 Vol. Puffer E [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 mM Desthiobiotin] eluiert. Das

Säulenmaterial wurde durch Spülen mit 10 Vol. Puffer R [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM HABA] regeneriert.

### 2.6.2. *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Trotz zahlreicher, methodischer Variationen des unter 2.6.1. beschriebenen Systems und die Verwendung weiterer *E. coli* Stämmen zur Überexpression von *zupT*, war es nicht gelungen ausreichende Proteinmengen von ZupT zu gewinnen. Aus diesem Grund wurde versucht, mit dem *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) die Ausbeute an exprimierten ZupT zu erhöhen.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass zunächst rekombinante Baculoviren generiert werden, die anschließend zur Transfektion von *Spodoptera frugiperda* Sf9 Insektenzellen eingesetzt werden und somit zur einer hohen Expressionsrate des gewünschten Proteins führen (Abb. 4).

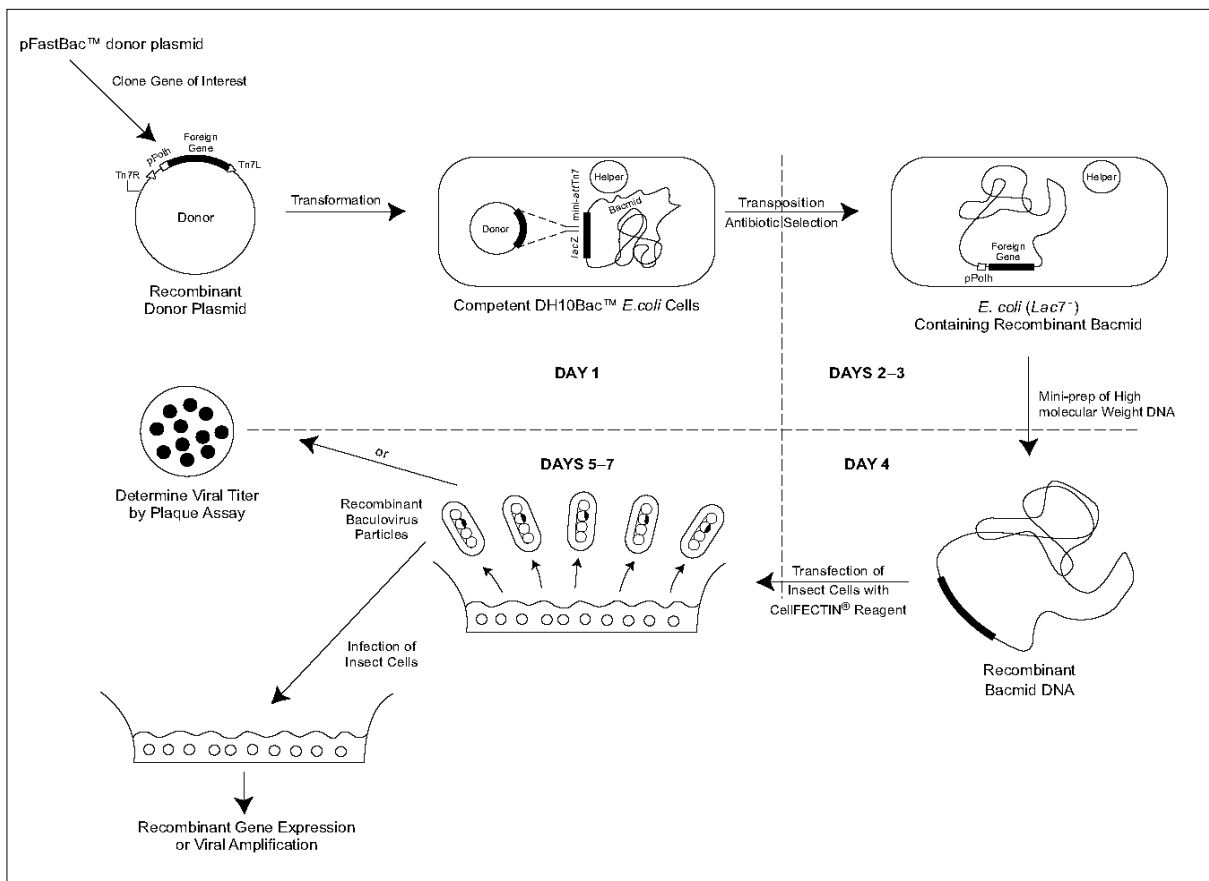


Abb. 4: Das *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

#### 2.6.2.1. Konstruktion rekombinanter Bacmid-DNA

Zunächst wurde *zupT* mit Startcodon, *Strep-tag*<sup>®</sup>II und Stoppcodon in das Donorplasmid *pFastBac*<sup>™</sup>1 *downstream* vom Baculovirus-spezifischen Polyhedrin (PH)-Promotor kloniert. Die Expressions-Kassette, bestehend aus Gentamicin-Kassette, *zupT* unter der Kontrolle vom PH-Promotor und SV40 Polyadenylierungssignal, ist jeweils flankiert von *Tn7R* und *Tn7L*. Diese

Konsensussequenzen sind essenziell für die Integration der Expressions-Kassette in das Virusgenom. Das Virusgenom liegt als Baculovirus *shuttle* Vektor (Bacmid, bMON14272) in DH10Bac™-Zellen vor. Darüber hinaus besitzen DH10Bac™-Zellen ein Helferplasmid (pMON7124), das eine Transposase codiert. Transformiert man nun das pFastBac™1-Konstrukt in DH10Bac™-Zellen, so findet eine ortsspezifische Rekombination der Expressions-Kassette über die *attTn7-sites* in das Bacmid statt. Die *attTn7-sites* befinden sich in *lacZ $\alpha$* , sodass durch  $\alpha$ -Komplementation rekombinante Bacmid-DNA selektiert werden konnte. Die Selektion rekombinanter Bacmid-DNA wird durch Antibiotika-Marker, die vom Bacmid codiert werden, unterstützt. Anschließend wurde die rekombinante Bacmid-DNA isoliert und für die Transfektion in Sf9 Insektenzellen eingesetzt, sodass rekombinante Baculoviren generiert werden konnten.

### 2.6.2.2 Transfektion in *Spodoptera frugiperda* Sf9 zur Herstellung rekombinanter Baculoviren

#### A) Kultivierung von Sf9 Insektenzellen

Die Kultivierung der Insektenzellen und die Transfektion erfolgten in Zusammenarbeit mit Ines Sommerer und PD Dr. med. habil. Dominik Huster an der Medizinischen Fakultät, Universität Leipzig. Die Lagerung von Sf9 Insektenzellen erfolgte im Kryomedium in flüssigen Stickstoff, wobei  $3 \cdot 10^7$  Zellen/1.5 ml vorlagen. Diese Zellen wurden im 37°C-Wasserbad für eine Minute erwärmt. Anschließend wurden 30 ml SF-900 II Medium mit diesen Zellen beimpft, sodass eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml vorlag. Das Wachstum der Zellkultur erfolgte bei 27°C, unter Lichtausschluss und unter ständigem Schütteln bei max. 150 rpm für ca. 2 Tage. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Anzahl und die Vitalität der Insektenzellen bestimmt. Betrug die Konzentration an vitalen Zellen  $1.2 \cdot 10^6$  Zellen/ml so wurde eine erneute Passage in frischem SF-900 II Medium vorgenommen und für weitere 2 Tage bei 27°C, unter Lichtausschluss und unter ständigem Schütteln bei max. 150 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte erneut die Bestimmung der Anzahl der vitalen Zellen, die für die Transfektion eingesetzt wurden.

#### B) Transfektion

In 35 mm Zellkulturschälchen wurden  $9^5$  Sf9 Zellen in 2 ml SF-900 II Medium mit Penicillin und Streptomycin gegeben und zur Anhaftung an die Schälchenoberfläche für 1 h bei 27°C ohne Schütteln, im Dunkeln inkubiert. Während dessen wurde 2  $\mu$ g Bacmid DNA in 100  $\mu$ l SF-900 II Medium aufgenommen und 6  $\mu$ l Cellfectin® Reagenz [besteht 1:1.5 aus N,N<sup>I</sup>, N<sup>II</sup>, N<sup>III</sup>-Tetramethyl-N, N<sup>I</sup>, N<sup>II</sup>, N<sup>III</sup>-tetrapalmitylspermin (TM-TPS) und Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE)] ebenfalls in 100  $\mu$ l SF-900 II Medium verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte Bacmid-DNA und das verdünnte Cellfectin® Reagenz vereint, vorsichtig gemischt und bei RT inkubiert. Während der Inkubation des DNA-Lipid-Gemisches wurden die Sf9 Insektenzellen einmal mit 2 ml SF-900 II Medium ohne Antibiotika gewaschen. Zu dem DNA-Lipid-Gemisch wurden 800  $\mu$ l SF-900 II Medium hinzu gegeben, vorsichtig gemischt und anschließend der gesamte Ansatz pro  $9^5$  Insektenzellen/well hinzugefügt. Dem schloss sich eine 5-stündige Inkubation bei 27°C an.

Danach wurde der DNA-Lipid-Komplex entfernt und 2 ml SF-900 II Medium mit Penicillin und Streptomycin zu den Insektenzellen hinzu gegeben. Nach 72 h Stunden bei 27°C wurde der P1 Virusstock isoliert, sofern die Insektenzellen typische Infektionsmerkmale aufwiesen.

#### C) Erhöhung des Virustiters zur gesteigerten Protein-Expressionsrate

Der P1 Virusstock wurde gewonnen, indem die Zellen nach der 72-stündigen Inkubation in einem Greiner vereint wurden (in drei *wells* wurde die selbe Transfektion durchgeführt) und bei 500 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand mit einem 0.2 µM Filter sterilfiltriert wurde. Nach der Zugabe von 2 % FKS konnte der P1 Virusstock zum einem bei -80°C gelagert werden und zum anderen zur erneuten Infektion einer 50 ml Sf9 Insektenkultur, die drei Tage zuvor beimpft wurde, eingesetzt werden. Dafür wurden 2.5 ml P1 Virusstock zu 50 ml Sf9-Kultur ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und 1 % FKS hinzu gegeben. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 27°C unter ständigem Schütteln bei 150 rpm inkubiert. Zur Isolierung des P2 Virusstockes wurden die Zellen für 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand erneut sterilfiltriert und mit 2 % FKS versetzt. Dieser P2 Virusstock kann ebenfalls bei -80°C gelagert werden und zur Gewinnung des P3 Virusstockes für eine erneute Transfektion eingesetzt werden. Dazu wurde eine 200 ml Sf9-Kultur mit einer Konzentration von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml, die drei Tage zuvor beimpft wurde, mit 10 ml sterilfiltrierten P2 Virusstock und 1 % FKS versetzt. Diese transfizierten Insektenzellen wurden erneut für drei Tage bei 27°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Zur Gewinnung des Zellpellets und des P3 Virusstock wurden die Kulturen zentrifugiert. Der P3 Virusstock wurde wie der P1 und der P2 Virusstock isoliert und gelagert.

#### D) Zellaufschluss und Gewinnung vom gereinigten ZupT

Das Insektenzellpellet wurde in HB-Puffer (25 mM Imidazol, 0.25 M Saccharose, 1 mM DTT, Protease Inhibitor) resuspendiert und die Zellen mit einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Die Membranpräparation und die Proteinreinigung wurden wie unter 2.6.1.3. bzw. 2.6.1.4. beschrieben, durchgeführt.

### **2.6.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

#### **2.6.3.1. BCA-Test** (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit*, Sigma GmbH, Osterode)

Zu 50 µl Proteinlösung wurden 1 ml BCA-Lösung zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 37°C inkubiert und danach die Absorption bei 562 nm gegen einen Nullwert bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichreihe, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml BSA-Lösung erstellt wurde.

#### **2.6.3.2. Bradford-Proteinbestimmung** (Bradford, 1976)

Für die Proteinbestimmung wurden 50 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. Verdünnung mit 750 µl Bradford-Lösung (Roti®-Quant, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Absorptions-

messung bei 595 nm mit dem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde.

#### 2.6.4. Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen konnten mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert oder in andere Lösungen umgepuffert werden. Vor dem Benutzen wurden die Vivaspin-Röhrchen einmal mit dem zu verwendeten Puffer gespült (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg). Anschließend wurde die einzuengende Proteinlösung in die Röhrchen gegeben und erneut bei 4000 g, 4°C zentrifugiert bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war. Beim Umpuffern wurde der neue Puffer mindestens dreimal über die Säule gegeben. Zur Lagerung wurde die Säule mit 70%igem Ethanol gespült und anschließend in 20%igem Ethanol gelagert.

#### 2.6.5. Elektrophoretische Methoden

Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Biometra GmbH, Göttingen) oder in einer vertikalen Elektrophoresekammer (*Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm oder Glasplatten mit integrierten 7.5 mm *Spacern* verwendet.

##### 2.6.5.1. Probenvorbereitung

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer [0.125 M Tris-HCl pH (6.8), 20 g/l SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0.5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau (BPB)] gemischt und 10 min bei 40°C oder 5 min bei 95° denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufs Gel.

##### 2.6.5.2. Proteinmarker

Um Aussagen über die Größe der im Gel analysierten Proteine treffen zu können, wurden Proteinmarker aufgetragen. Dabei wurden folgende Marker verwendet: *Broad Range* (#7702) (NEB GmbH, Frankfurt am Main) mit 13 Proteinen von 212, 158, 116, 97.2, 66.4, 55.6, 42.7, 36.5, 26.6, 20, 14.3, 6.5, 3.4 und 2.3 kDa, der *Strep-tag*® Proteinmarker von IBA GmbH, Göttingen mit Proteinbanden der Größen 100, 60, 45, 30, 23.5 und 16 kDa und die Fermentas Marker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (#SM0671) mit folgenden Proteingrößen 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 und 10 kDa und der *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (#SM0661) mit *Strep-tag*® Proteinen der Größe: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, und 10 kDa.



**2.6.5.3. Lineare SDS-PAGE (Laemmli 1970)**

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet.

<u>Trenngel:</u>	<u>12.5 %</u>
30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid Stammlösung	2.5 ml
1.88 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.2 ml
5 g/l SDS	1.2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	1.1 ml
TEMED	5 µl
APS (10%ig)	30 µl

Das Gelgemisch wurde nach vorsichtigem Mischen luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um eine planare Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml Wasser überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser wieder entfernt und 1.5 ml Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde.

<u>Sammelgel:</u>	
30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid Stammlösung	0.33 ml
0.625 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.4 ml
5 g/l SDS	0.4 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	0.87 ml
TEMED	2 µl
APS (10%ig)	10 µl

Der Elektrodenpuffer [30.2 g/l, 144 g/l Glycin, 10 g/l SDS] wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben, der Kamm unter Puffer entnommen und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Stromstärke und 200 V durchgeführt.

**2.6.5.4. Native PAGE**

In der Nativen Page wurden lösliche Proteinfractionen verschiedener Kulturen aufgetrennt und anschließend auf die Superoxid-Dismutase-Aktivität untersucht.

Die Proben wurden vor der Auftragung auf ein Gel mit 0.2 Vol. 5x Beschwerungslösung [20 % (w/v) Saccharose, 0.1 % (w/v) BPB] versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und  $I_{\max}$  durchgeführt.

Elektrodenpuffer: 12.1 g Tris, 7.5 g Glycin, ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Gelzusammensetzung:	<u>Sammelgel (8 %)</u>	<u>Trenngel (10 %)</u>
40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	0.4 ml	1.5 ml
2.5 M Tris-HCL, pH 8.5	0.2 ml	0.2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	1.4 ml	3.9 ml
TEMED	2 µl	5 µl
10 % (w/v) APS	15 µl	40 µl

#### 2.6.5.5. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Eschwege) oder Nitrocellulose (Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren) mittels *Semi-Dry-blot*. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> geschwenkt (nur PVDF Membran). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min in Towbin-Puffer [25 mM Tris-HCL, 0.192 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol]. Vier Lagen Blottingpapier (VWR International GmbH, Dresden) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in Towbin-Puffer getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer für 15 min in Towbin-Puffer geschwenkt. In der Blotapparatur (BIORAD, München) wurden zwei Lagen Blottingpapier, die Membran, das Proteingel und zwei weitere Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinander gelegt, die Apparatur verschlossen und Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke und -Spannung (3 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche, 15 V) für 30 min. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt und die Membran luftgetrocknet.

#### 2.6.5.6. *Strep-tag*<sup>®</sup> II Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Der spezifische Nachweis *Strep-tag*<sup>®</sup> II-haltiger Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mittels *StrepTactin*<sup>®</sup>-Peroxidase-Konjugat. Die Blot-Membran (56 cm<sup>2</sup>) wurde in 20 ml Blockingpuffer [1 x PBS-Puffer (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl) mit 3 % BSA (w/v) und 0.5 % Tween 20] für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in PBS-Puffer mit 0.1 % v/v Tween 20 gewaschen. Nach dem letzten Wachsritt wurde 10 ml PBS-Puffer mit 0.1 % v/v Tween 20 hinzu gegeben. Das *StrepTactin*<sup>®</sup>-Peroxidase-Konjugat wurde 1:100 in PBS-Puffer mit 0.2 % BSA und 0.1 % Tween verdünnt und 10 µl davon zu 10 ml PBS-Puffer mit 0.1 % v/v Tween 20 gegeben. Mit dieser Lösung wurde die Membran zusätzlich für eine Stunde schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 1 min in PBS-Puffer mit 0.1 % v/v Tween 20 und 2 x 1 min in PBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde einige Minuten in Lösung A [5 ml 100 mM Tris-HCL, pH 8.0, 51 µl 3 % (w/v) 4-Chloronaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol) und 23 µl p-Cumarsäure (gelöst in DMSO)] und Lösung B (5 ml 100 mM Tris-HCL, pH 8.0, 4 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen Folie gelegt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>™</sup> ECL, Amersham Biosciences, UK) für einige Minuten exponiert.

## 2.6.6. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen und PVDF-Membranen

### 2.6.6.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (Weber und Osborn 1969)

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung (2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0.5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärbelösung (40 % Ethanol, 7.5 % Essigsäure). Die Gele wurden bis zur Trocknung in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufbewahrt.

### 2.6.6.2. Unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau-Rot (Toplab GmbH, Martinsried)

Zur N-terminalen Sequenzierung von ZupT wurde das gereinigte Protein auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Eschwege) geblottet. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Membran in einer Ponceau-Rot-Färbelösung (0.5 % Ponceau S, 1 % Essigsäure). Anschließend wurde die Membran so lange mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Nach dem Ausschneiden der Proteinbande erfolgte die N-terminale Anequenzierung durch Toplab GmbH, Martinsried.

## 2.7. Transportstudien mit radioaktiven Isotopen und ganzen Zellen

### 2.7.1. Zellanzucht der *E. coli* Stämme

Nach einer Vorkultur in LB-Medium und Zusatz und dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C wurden die Zellen 1:400 in Tris-MM verdünnt, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt. Das Wachstum dieser Mittelkultur erfolgte schüttelnd bei 37°C über Nacht. Mit der Mittelkultur wurde die Hauptkultur, bestehend aus Tris-MM und Ampicilin auf ca. 30 Klett angeimpft. Bis zur Verdopplung der Klettzahl erfolgte das Zellwachstum bei 37°C schüttelnd. Anschließend wurden die Kulturen mit 200 µg AHT/l versetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Induktion wurden die Kulturen im entsprechenden Medium bzw. Puffer gewaschen und die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Für die Transportstudien wurden die Kulturen auf eine Optische Dichte von ca. 0.4 eingestellt.

### 2.7.2. Aufnahmeexperiment mit radioaktivem <sup>55</sup>Fe (nach Kammler *et al.*, 1993)

Hierzu wurden die Zellen in Tris-MM ohne Eisen und ohne CAS gewaschen. Zu Beginn wurde die Zelldichte mit dem Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) bestimmt. Die Aufnahmeuntersuchungen wurden nach der Filtrationsmethode in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer radioaktiven <sup>55</sup>Fe-Lösung (1 mCi in 0.1 M HCL, Perkin Elmer *Life Science* INC., Boston) gestartet, die neben dem radioaktiven Metallisotop, FeSO<sub>4</sub> und Ascorbat enthielt. Die radioaktive <sup>55</sup>Fe-Lösung wurde so eingesetzt, dass die Eisen-Gesamtkonzentration 5 µM und die Ascorbat-Konzentration 1 mM betrug. Nach definierten Zeiten

(0.12, 2.5, 5, 10, 15, 20 und 25 min) wurden 400 µl Proben entnommen und filtriert (NC 45, Schleicher und Schüll, Dassel). Um unspezifisch gebundenes Metall von der Zelloberfläche zu entfernen, wurden die Filter mit 12 ml Waschpuffer (0.1 mM LiCl) gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt. Die Zählzeit betrug 2 min. Die gemessene Radioaktivität wurde in *counts per million* (cpm) angegeben. Als Absolutwert wurden 400 µl Probe aus der jeweiligen Kultur entnommen und ohne Filtration in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt und vermessen.

### 2.7.3. Aufnahmeexperiment mit radioaktivem $^{57}\text{Co}$ , $^{65}\text{Zn}$ , $^{109}\text{Cd}$ und $^{54}\text{Mn}$

Hierfür wurden die Zellen nach Induktion der *zupT* Expression in 10 mM Tris-HCl pH 7.0 (für  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -uptake) oder in Tris-MM ohne Eisen, CAS, Spurenelementlösung und Phosphat (für  $\text{Mn}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -uptake) gewaschen und aufgenommen. Das Aufnahmeexperiment wurde durch Zugabe der radioaktiven Lösung, die jeweils aus radioaktivem (1 mCi in 0.1 M HCL, Perkin Elmer *Life Science* Inc., Boston bzw. Irvine *Biomedical* Inc., Irvine für  $^{57}\text{CoCl}_2$ ) und nichtradioaktivem Metall bestand, gestartet. Dabei wurde für den  $\text{Co}^{2+}$ -uptake 2.5 µM  $^{57}\text{CoCl}_2$ , für den  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -uptake 1 µM  $^{65}\text{ZnCl}_2$  bzw.  $^{109}\text{CdCl}_2$  und für den  $\text{Mn}^{2+}$ -uptake 1.4 µM  $^{55}\text{MnCl}_2$  eingesetzt. Nach definierten Zeiten wurden die jeweiligen Probenvolumina (300-400 µl) entnommen und filtriert. Um unspezifisch gebundenes Metall von der Zelloberfläche zu entfernen, wurden die Filter mit 12 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt. Die Radioaktivität der Proben wurde wie unter 2.7.2. beschrieben, bestimmt.

#### 2.7.3.1. Radioaktive Aufnahmeexperimente zur Bestimmung der Transport-Kinetik

Für die Bestimmung der Kinetik für den *ZupT*-vermittelten Metalltransport war es notwendig die Aufnahmeexperimente in einem Medium vorzunehmen, das keine Komponenten enthielt, die den Metalltransport beeinträchtigen. Somit wurden die Kulturen nach der Induktion der *zupT* Expression mit AHT in Tris-MM ohne Eisen, CAS, Spurenelementlösung und Phosphat gewaschen und resuspendiert. Die Kulturen wurden auf eine Optische Dichte von ca. 0.4 eingestellt. Die Aufnahmeuntersuchungen wurden nach der Filtrationsmethode in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde nach Zugabe der radioaktiven Lösung, die jeweils aus radioaktiven (1 mCi in 0.1 M HCL, Perkin Elmer *Life Science* Inc., Boston bzw. Irvine *Biomedical* Inc., Irvine für  $^{57}\text{CoCl}_2$ ) und nichtradioaktiven Metall bestand, gestartet. Proben wurden nach definierten Zeiten entnommen, wobei die Probennahme nur in dem Zeitfenster erfolgte, indem der Transport noch nicht gesättigt war, d. h. proportional zur Reaktionszeit erfolgte. Zur Bestimmung der Transport-Kinetik wurden unterschiedliche Konzentrationen an radioaktiven Metalllösungen eingesetzt und die Transportgeschwindigkeit bestimmt.

### 2.7.3.2. Kompetitive Inhibition der $^{65}\text{Zn}^{2+}$ -Aufnahme mit anderen Schwermetallen

Die Zellen wurden nach Induktion der *zupT* Expression in Tris-MM ohne Eisen, CAS, Spurenelementlösung und Phosphat gewaschen und resuspendiert und die Kulturen auf eine Optische Dichte von ca. 0.4 eingestellt. Die Reaktion wurde nach Zugabe einer radioaktiven Lösung, die aus 1 mM  $^{65}\text{ZnCl}_2$  (jeweils aus radioaktiver und nicht radioaktiver Lösung hergestellt) und verschiedener Konzentration (1 mM, 5 mM, 20 mM oder 50 mM) an  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  oder  $\text{FeSO}_4$  bestand, gestartet. Die radioaktive Lösung wurde 1:500 eingesetzt. Als Kontrolle wurde das  $^{65}\text{Zn}^{2+}$ -Aufnahmeexperiment ohne Zusatz von Schwermetallen durchgeführt. Allgemein wurde das Aufnahmeexperiment wie unter 2.7.3 beschrieben durchgeführt.

### 2.7.3.3. Untersuchung des radioaktiven $\text{Zn}^{2+}$ -Transportes in Abhängigkeit vom pH-Wert

Eine Kultur wurde nach Induktion der *zupT* Expression aufgeteilt und in Tris/Mes-Minimalmedium ohne Eisen, CAS, Spurenelementlösung und Phosphat mit einem pH-Wert von 6.0, 6.5 oder 7.2 gewaschen und resuspendiert. Die Optische Dichte der Kulturen wurde auf ca. 0.4 eingestellt. Für das radioaktive Aufnahmeexperiment wurde 1  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{ZnCl}_2$  eingesetzt und bei verschiedenen pH-Werten wie unter 2.7.3 beschrieben, durchgeführt.

### 2.7.3.4. Inhibition des radioaktiven Metall-Transportes mit FCCP, CCCP und Orthovanadat

Die Zellen wurden nach Induktion der *zupT* Expression in Tris-MM ohne Eisen, CAS, Spurenelementlösung und Phosphat gewaschen und resuspendiert. Die Kulturen wurden auf eine Optische Dichte von ca. 0.4 eingestellt. Bevor die Reaktion durch Zugabe der radioaktiven Lösung (Endkonzentration 1  $\mu\text{M}$   $^{57}\text{CoCl}_2$  bzw. 1  $\mu\text{M}$   $^{65}\text{ZnCl}_2$ ) gestartet wurde, wurden die Zellen mit jeweils 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  FCCP bzw. CCCP und 0.5 mM oder 1 mM Orthovanadat für 5 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Das radioaktive Aufnahmeexperiment wurde wie unter 2.7.3. beschrieben, durchgeführt.

## 2.8. Spektroskopische und Analytische Methoden

### 2.8.1. Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)

Um eine Aussage über den intrazellulären Eisen- bzw. Mangangehalt in Zellen des *E. coli* Stammes W3110 und der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in verschiedenen Wachstumsphasen treffen zu können, wurde die Atom-Absorptions-Spektroskopie angewandt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, das Licht verschiedener Wellenlängen mit einer bestimmten Intensität durch eine atomisierte Probe absorbiert und dadurch geschwächt wird. Durch das Verhältnis Intensität des ungeschwächten Lichtes und Intensität des absorbierten Lichtstrahles durch das zu messende Element, kann der Metallgehalt in der jeweiligen Probe bestimmt werden. Die Atomisierung der Proben erfolgte durch starkes Erhitzen im Graphitrohr. Um die Konzentration an Eisen bzw. Mangan in Zellen bestimmen zu können, wurde eine Kalibrierungskurve für das entsprechende Metall erstellt.

### 2.8.1.1. Zellanzucht

Vorkulturen wurden in LB über Nacht bei 37°C angezogen. Diese LB-Kulturen wurden in Tris-MM, 1:400 verdünnt und ebenfalls für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 1:400 Verdünnung der zweiten Vorkultur in Tris-MM ohne Eisen und mit desferriertem CAS. Das Wachstum der Mittelkultur erfolgte im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 rpm. Nach 2-stündigem Wachstum wurde mit der Mittelkultur ca. 50 ml bzw. 20 ml Tris-MM ohne Eisen und mit desferrierten CAS, in citratgespülte 300 ml Seitenarmkolben beimpft. Das Wachstum erfolgte während des gesamten Experimentes bei 37°C im Schüttelwasserbad (Infors AG, Bottmingen). Die Optische Dichte wurde mit dem Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) bestimmt. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten geerntet: in der lag-Phase (15 Klett), in der exponentiellen Phase und in der stationären Phase. Nach Zentrifugation wurden die Zellen zweimal mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 und 100 µM EDTA und einmal mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 gewaschen. Die Zellen wurden zwischen den Waschschritten auf Eis gelagert. Nach Waschen der Kulturen wurden die Zellen in ca. 500 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 resuspendiert und die Optische Dichte bei 600 nm mit dem Spektrophotometer (SmartSpec™ 3000, BIORAD, München) bestimmt. Die Zellsuspension wurde so verdünnt, dass in 80 µl Suspension  $10^8$  Zellen enthalten waren. 80 µl dieser Zellsuspension wurden in ein neues Eppendorftube überführt und in der SpeedVac SVC 100E (Savant, Instruments, Inc. Farmingdale, New York) eingengt. Als Negativkontrolle für die spätere Messung in der AAS dienten 80 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, die genauso vorbereitet wurden wie die Zellsuspensionen. Anschließend wurden die Zellen bei -20°C gelagert. Zur Messung des Metallgehaltes in Medien wurden 50 µl des Mediums in Eppendorftubes überführt und auf dieselbe Art und Weise wie Zellen für die AAS-Messung vorbereitet.

### 2.8.1.2. Probenvorbereitung

Zum Ansäuern der Proben und zur Entfernung des Kohlenstoffgehaltes im Probenmaterial wurde zum Zellpellet 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ig, Fe-Gehalt: <0.00000003 %, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 150 µl HNO<sub>3</sub> (65%ig, Fluka, Fe-Gehalt: <0.000001 %) hinzu gegeben und für ca. 12 h bei 40°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit reinem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) auf 500 µl Endvolumen aufgefüllt und in der AAS vermessen.

### 2.8.1.3. AAS

Die Messung des Eisen- oder Mangangehaltes in den Proben erfolgte nach folgenden Parametern:

	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>
<b>Optische Parameter</b>		
Wellenlänge	248.3 nm	279.5 nm
Spaltbreite	0.2 nm	0.2 nm
Lampen-Typ	M-HKL	M-HKL
HKL-Strom	6.0 mA	7.0 mA
Untergrund-Korrektur	Ein/3-Feld	Ein/2-Feld
Feldstärke	0.8 T/0.5 T	0.8 T
<b>Integrationsparameter</b>		
Integr.-art	Signal-A	Signal-A
Integr.-zeit	4.0 s	3.0 s
Verzögerungszeit	0	0
Messzyklen	3	3
<b>Ofen</b>		
Trocknungs-Temp.	85/95/110°C	85/95/110°C
Pyrolyse	1200 °C	800 °C
Atomisieren	2200 °C	1900 °C
Heizrata	FP	1500 °C/s
Haltezeit	4 s	3 s
<b>Probengeber</b>		
Typ/Teller	MPE60/89 Pos.	MPE60/89 Pos.
Arbeitsweise	kontinuierlich	kontinuierlich
Injektion	20 µl/-0.9 mm	20 µl/-0.9 mm
Autom. Tiefenkorrektur	ein	ein
Verdünnung	bei Überschreitung	bei Überschreitung
Modifier (5 µl)	0.1 % Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-
<b>Kalibration</b>		
Verfahren	Standard	Standard
Herstellen durch:	Verdünnen	Verdünnen
Kalibrierbereich:	0-100 µg/l	0-8 µg/l
Anzahl d. Std.:	6	5
Kall-0:	0	0
Stammlösung:	100 µg/l	8 µg/l
Bezugsfunktion:	linear	linear
Messzyklen:	3	3

### **2.8.2. Inductively-Coupled-Plasma-Mass-Spectrometry (ICP-MS)**

Die ICP-MS ist ein weiteres Verfahren, mit deren Hilfe der Eisen- oder Galliumgehalt in Zellen der *E. coli* Deletionsstammes ECA458, des *E. coli* Wildtyps W3110 und des Deletionsstammes ECA588( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta pitA::cat$ ) unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt wurde. Der Vorteil gegenüber der Atom-Absorptions-Spektroskopie besteht darin, dass innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl von Elementen in geringsten Konzentrationen bestimmt werden können. Das Prinzip beruht auf der Ionisierung des Probenmaterials in einem Plasma von ca. 5000°C. Die Ionen werden in Richtung des Massenspektrometers in einem elektrischen Feld beschleunigt. Dort werden die Masse der Elemente und deren Isotope erfasst.

#### **2.8.2.1. Zellanzucht**

Die Zellanzucht erfolgte wie unter 2.8.1.1. beschrieben, jedoch wurde der *E. coli* Deletionsstamm ECA458 und *E. coli* Wildtyp in 10 ml Tris-MM ohne Zusatz, mit 2, 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  inkubiert. Das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 fand in 10 ml Tris-MM ohne Zusatz, mit 2 oder 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  statt. Auch hier erfolgte das Wachstum während des gesamten Experimentes bei 37°C im Schüttelwasserbad (Infors AG, Bottmingen). Die Optische Dichte wurde mit dem Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) bestimmt. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und wie unter 2.8.1.1. beschrieben, gewaschen und für die ICP-MS Messung vorbereitet.

#### **2.8.2.2. Probenvorbereitung und ICP-MS Messung**

Die Probenvorbereitung und ICP-MS Messung erfolgte an der *University Nebraska-Lincoln*, USA. Die Probenvorbereitung wurde von Christophe Espirito Santo, *School of Biological Sciences, University Nebraska-Lincoln* vorgenommen. Dabei wurden die Proben in 40  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und 40  $\mu\text{l}$   $\text{HNO}_3$  hinzu gegeben. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation der Proben bei 70°C. Die Proben wurden mit reinstem Wasser verdünnt, welches Standards für Arsen und Indium enthält. Die ICP-MS-Messung erfolgte durch Dr. Javier Seravalli *Redox Biology Center, Biochemistry Department, University Nebraska-Lincoln*.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung des ersten bakteriellen ZIP-Transporters ZupT

#### 3.1.1. Der bakterielle ZIP-Transporter ZupT weist ein breites Substratspektrum auf

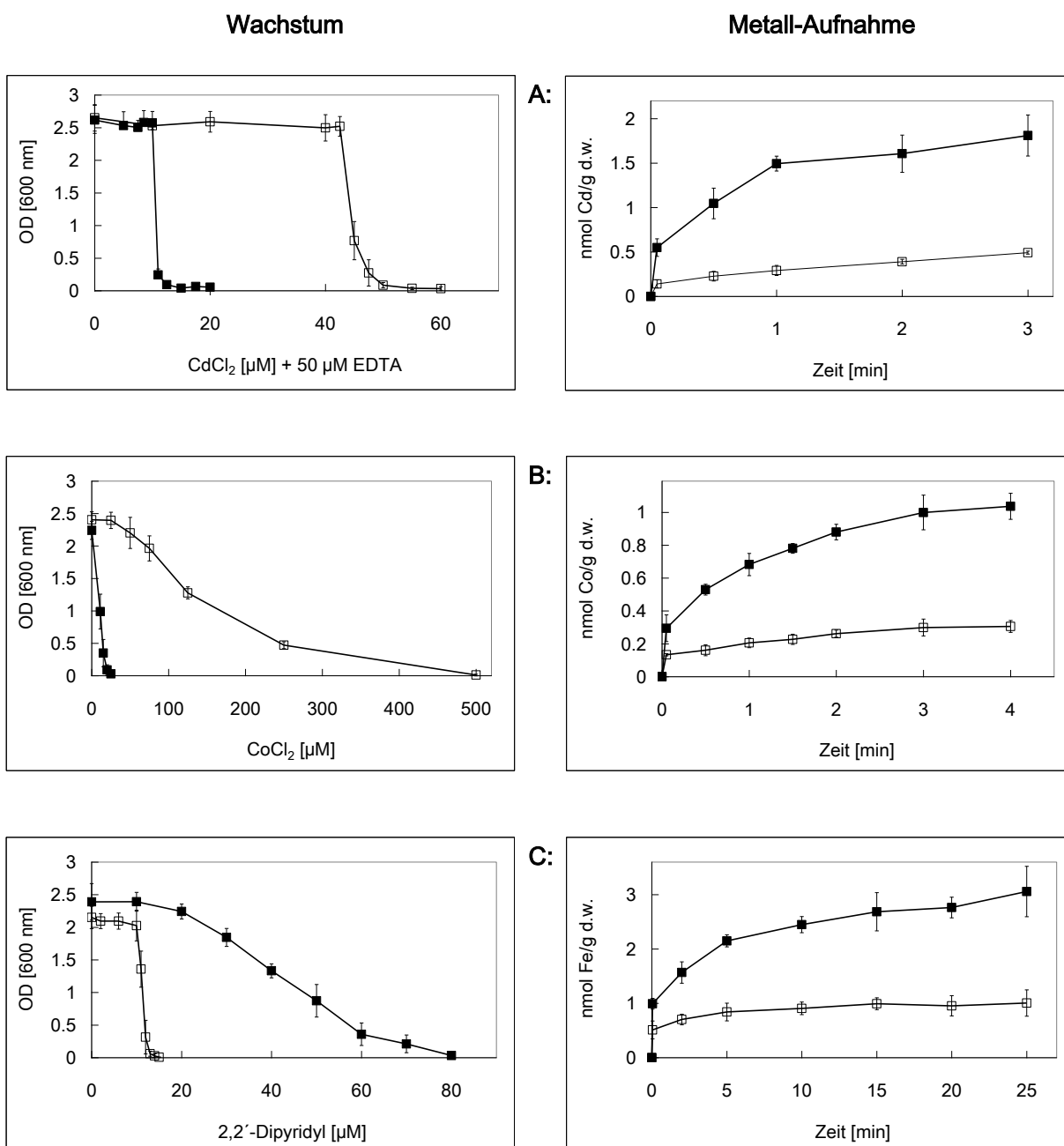
Ursprünglich wurde der erste bakterielle ZIP-Transporter ZupT (früher *ygiE*) aus *Escherichia coli* als *Zinc uptake transporter* identifiziert (Grass *et al.*, 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass ZupT zur zellulären Zink-Aufnahme beiträgt. Zink schien bereits zu diesem Zeitpunkt nicht das einzige Substrat von ZupT zu sein. Um das vollständige Substratspektrum von ZupT zu untersuchen, wurden spezifische Deletionsstämme verwendet bzw. konstruiert. Diese Mutanten sind in allen bekannten Aufnahme- und Efflux-Systemen für ein bestimmtes Metall deletiert. So wurde der Deletionsstamm ECA580( $\Delta zupT \Delta mntH \Delta zntA \Delta yodA::cat$ ) für die Untersuchung der Cadmium-Aufnahme, der Deletionsstamm ECA458( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ ) bzw. VS148( $\Delta fecA-E::kan \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC::cat$ ) für die Untersuchung der Mangan- bzw. Eisen-Aufnahme und der Deletionsstamm ECA349( $\Delta corA \Delta rcnA \Delta zupT::cat$ ) für die Untersuchung der Cobalt-Aufnahme konstruiert. Die Deletionsstämme GR362( $\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB::cat \Delta zntA::km_{Dis} \Delta zitB$ ) und GR354( $\Delta znuABC \Delta zupT::cat$ ) wurden für die Untersuchung der Zink-Aufnahme verwendet.

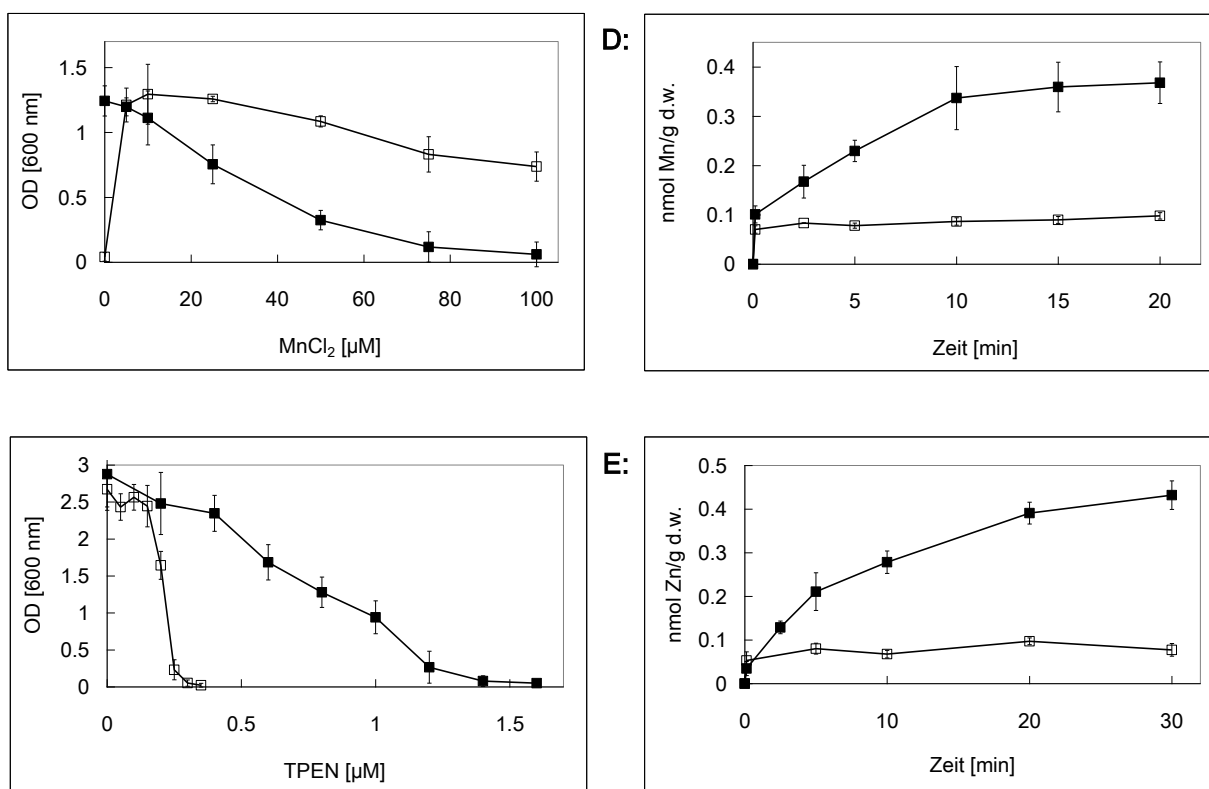
Sowohl in Wachstums-Endpunktbestimmungen als auch in radioaktiven Aufnahmeexperimenten mit ganzen Zellen wurde das Substratspektrum von ZupT bestimmt. Dazu wurden für Wachstums-Endpunktbestimmungen die jeweiligen Deletionsstämme mit dem *low-copy* Plasmid pECD754(pACYC184::*zupT*) transformiert, um eine Komplementation von *zupT* in *trans* erzielen zu können. Da auf diesem Plasmid nicht nur das Gen *zupT* sondern auch die zugehörige Promotorregion codiert ist, wurde eine konstitutive Expression von *zupT* erreicht, die der natürlichen Situation nahe kommt. Da jedoch die Expression des tet<sup>R</sup>-codierenden *low-copy* Plasmids pACYC184 das Wachstum des Deletionsstamm ECA458 in Anwesenheit von Mangan auf unbekannte Weise stark negativ beeinflusste, wurde *zupT* inklusive Promotorregion in das km<sup>R</sup>-codierende *low-copy* Plasmid pACYC177 kloniert [pECD1061 (pACYC177::*zupT*)] und für Wachstums-Endpunktbestimmungen eingesetzt. Für radioaktive Aufnahmeexperimente wurden die jeweiligen Deletionsstämme mit dem Plasmid pECD1046(pASK-IBA3::*zupT*) transformiert. Eine Expression von *zupT* wurde nach Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) als Induktor erzielt.

Je nachdem, in welchem Deletionsstamm *zupT* in *trans* exprimiert wurde, konnte entweder ein vermindertes (Abb. 5A, B, D) oder verbessertes Wachstum (Abb. 5C, E) dieser *E. coli* Stämme beobachtet werden. Im Falle von z. B. Cadmium ist das verminderte Wachstum darauf zurückzuführen, dass durch den vermehrten Metall-Einstrom durch ZupT eine erhöhte Toxizität verursacht wurde und somit das Wachstum in Anwesenheit steigender Metall-Konzentrationen beeinträchtigt wurde. Dies ist in Abb. 5A, B und D verdeutlicht: der *E. coli* Deletionsstamm ECA580( $\Delta zupT \Delta mntH \Delta zntA \Delta yodA::cat$ ) mit *zupT* in *trans* ist gegenüber Cadmium um das 4-fache sensitiver als

der Deletionsstamm mit Leervektor (Abb. 5A). Die Expression von *zupT* in *trans* beeinträchtigte das Wachstum des Cd<sup>2+</sup>-spezifischen Deletionsstammes ECA580 so stark, dass die Medien mit 50 µM des Metallchelators EDTA versetzt werden mussten, um ein Wachstum dieses Stammes gewährleisten zu können. Aus diesem Grund wurden sämtliche Medien in Wachstums-Endpunktbestimmungen mit 50 µM EDTA versetzt.

Im Co<sup>2+</sup>-spezifischen Deletionsstamm ECA349( $\Delta corA \Delta rcnA \Delta zupT::cat$ ) führte die Expression von *zupT* in *trans* zu einer 10-fach höheren Sensitivität gegenüber CoCl<sub>2</sub> als im Deletionsstamm mit Leervektor (Abb. 5B).





**Abb. 5: ZupT transportiert Cadmium, Cobalt, Eisen, Mangan und Zink**

LB-Übernachtskulturen wurden 1:400 in Tris-MM (+50 µM EDTA für CdCl<sub>2</sub>-Endpunktbestimmungen) verdünnt und 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Vorkulturen wurden entweder direkt 1:400 in der Hauptkultur in Anwesenheit von **A**: 50 µM EDTA und steigenden CdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen eingesetzt oder erneut in Tris-MM (für C, D: Tris-MM ohne Eisen und mit desferriertem CAS) 1:400 verdünnt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Diese Mittelkulturen wurden 1:400 in der Hauptkultur eingesetzt und in Anwesenheit von **B**: steigenden CoCl<sub>2</sub>-Konzentrationen, **C**: 1mM Ascorbat und steigende 2,2'-Dipyridyl-Konzentrationen, **D**: steigende MnCl<sub>2</sub>-Konzentrationen und **E**: steigenden TPEN-Konzentrationen inkubiert. Dabei diente der jeweilige Metall-spezifische Deletionsstamm mit *zupT*, kloniert in pACYC in *trans* für Endpunktbestimmungen (linke Seite) bzw. kloniert in pASK-IBA3 für radioaktive Metall-Aufnahmeexperimente (rechte Seite) als Positivkontrolle (■). Der jeweilige Deletionsstamm mit dem Leervektor stellte jeweils die Negativkontrolle dar (□). Nach 16-stündigem Wachstum (24 h für **C**;) wurde die Optische Dichte bei 600 nm ermittelt. Für radioaktive Metall-Aufnahmeexperimente wurde Tris-MM mit den Minimalkulturen auf 30 Klett angeimpft. Bis zur Verdopplung der Zellzahl erfolgte das Wachstum bei 37°C, anschließend wurde die *zupT* Expression durch Zugabe von 200 µg/l AHT induziert und die Zellen erneut bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Zellen im jeweiligen Puffer gewaschen und resuspendiert. Durch Zugabe von **A**: 1 µM <sup>109</sup>CdCl<sub>2</sub>, **B**: 2.5 µM <sup>57</sup>CoCl<sub>2</sub>, **C**: 5 µM <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub>, 1mM Ascorbat, **D**: 1.4 µM <sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub> und **E**: 1 µM <sup>65</sup>ZnCl<sub>2</sub> wurden radioaktive Metall-Aufnahmeversuche gestartet. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und vermessen. Die Kulturen wurden während des Versuches bei 37°C schüttelnd inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

In Wachstums-Endpunktbestimmungen in Anwesenheit steigender MnCl<sub>2</sub>-Konzentrationen unterschieden sich der Deletionsstamm ECA458, der *zupT* in *trans* exprimiert und die zugehörige Negativkontrolle in zwei Merkmalen: das Wachstum der Negativkontrolle wurde zunächst durch Mangan verbessert, jedoch ist der Mutantenstamm, mit *zupT* in *trans*, sensitiv gegenüber höheren MnCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (Abb. 5D). Dagegen führte eine Expression von *zupT* in *trans* in der Deletionsmutante VS148(Δ*fecA-E::kan* Δ*feoABC* Δ*mntH* Δ*zupT* Δ*entC::cat*) (Abb. 5C) unter Eisenlimitation bzw. in der Zink-Aufnahme-Mutante GR354(Δ*znuABC* Δ*zupT::cat*) (Abb. 5E) unter Zinklimitation zu einem verbesserten Wachstum. Eisen- oder Zinklimitation wurde durch den Einsatz verschiedener Chelatoren, wie dem Fe(II)-Chelator 2,2'-Dipyridyl (DIP) (Pugsley und Reeves,

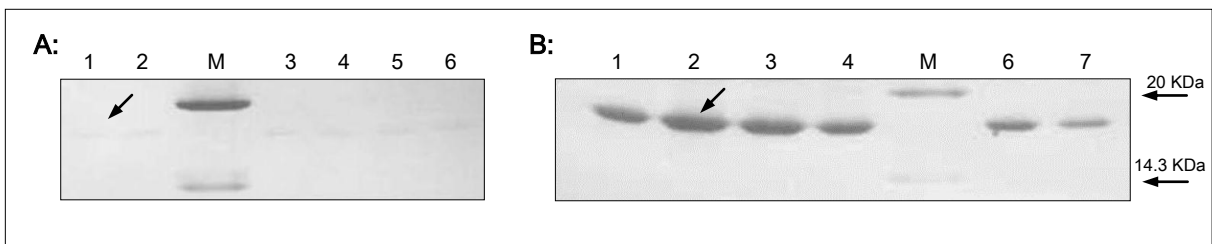
1976; Angerer *et al.*, 1992; Kammler *et al.*, 1993; Dubrac und Touati, 2000) oder dem Zn<sup>2+</sup>-Chelator TPEN [N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-Ethylendiamine] (Patzner und Hantke, 1998; Outten und O'Halloran, 2001; Graham *et al.*, 2009) in den Wachstumsversuchen erzielt. Vermutlich wurden durch ZupT essenzielle Eisen- bzw. Zink-Ionen in das Cytoplasma transportiert und förderten somit das Wachstum. So wuchs die Deletionsmutante VS148 mit *zupT* in *trans* noch bei einer 5-fach höheren 2,2'-Dipyridyl-Konzentration als die entsprechende Negativkontrolle. Ein ähnlicher, positiver Effekt auf das Wachstum wurde im Mutantenstamm GR354( $\Delta znuABC$   $\Delta zupT::cat$ ), der *zupT* in *trans* exprimiert, beobachtet. Hierbei führte die Expression von *zupT* zu einer 4-fach höheren Resistenz gegenüber TPEN als die dazugehörige Negativkontrolle. Isotopen-Aufnahmeexperimente in ganzen Zellen unterstützen die Ergebnisse der Wachstums-Endpunktbestimmungen und zeigen, dass die Induktion der Expression von *zupT* in den jeweiligen *E. coli* Deletionsstämmen zu einer gesteigerten Akkumulation des entsprechenden Schwermetalls führte.

### 3.1.2. Überexpression und Reinigung von ZupT über das *Strep-tag*<sup>®</sup>II-System

Für weiterführende Experimente wurde versucht, ZupT als *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsprotein zu exprimieren und über Affinitäts-Chromatographie zu reinigen. Die Voraussetzung dafür bietet das Plasmid pECD1046, das zu Beginn dieser Arbeit vorlag. Hier wurde *zupT* in den pASK-IBA3 Vektor so kloniert, dass die Expression von *zupT* unter der Kontrolle des *tetAp* Promotors stand und somit durch Zugabe von AHT induziert werden konnte.

Aus der Überexpression resultierte ZupT als C-terminales Fusionsprotein mit dem *Strep-tag*<sup>®</sup>II Epitop, bestehend aus den Aminosäuren WSHPQFEK, das dann an das Säulenmaterial StrepTactin-Sepharose bindet, so dass die Reinigung von ZupT durch Affinitäts-Chromatographie bis zur Homogenität vorgenommen werden konnte. Trotz zahlreicher Variationen in der Art und Weise der Überexpression (Verwendung verschiedener *E. coli* Überexpressionsstämmen, verschiedener Medien, Inkubation bei verschiedenen Temperaturen, Induktion der Expression durch verschiedene AHT-Konzentrationen, verschiedene Induktionszeiten) oder auch in der Protein-Reinigung selbst (Verwendung verschiedener Detergenzien zur Solubilisierung des Membranproteins) konnten maximal 50 µg gereinigtes ZupT aus 10 x 200 ml Kultur gewonnen werden. Darüber hinaus war ein Nachweis von ZupT in der Membran-Fraktion zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Aus diesem Grund wurde auf das *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zurückgegriffen. Mit Hilfe dieses Systems wird ein hoher Titer rekombinanter Baculoviren (*Autographa californica multiple-capsid Nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) erzeugt, die in Insekten-Zellkultur zu einer hohen Expressionsrate des Zielproteins führen. Rekombinante AcMNPV Baculovirus-DNA entsteht durch spezifische Transposition des zu exprimierenden Fremd-Gens von einem Spenderplasmid (pFastBac<sup>™</sup> 1) in die AcMNPV-DNA (Bacmid). Das Bacmid kann in *E. coli* als Plasmid replizieren und ist für *Spodoptera frugiperda* Sf9-Insektenzellen infektiös.

Ausgehend vom Plasmid pECD1046(pASK-IBA3::*zupT*) wurde *zupT* mit C-terminalem *Strep-tag*<sup>®</sup> unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Xba*I/*Hind*III in das Donorplasmid pFastBac<sup>™</sup>1 kloniert. Das daraus resultierende Donorplasmid pECD1076(pFastBac<sup>™</sup>::*zupT*<sub>Strep</sub>) wurde in DH10Bac<sup>™</sup> *E. coli* Zellen transformiert. Diese Zellen besaßen nicht nur das Bacmid, sondern zusätzlich ein Helferplasmid, das eine Transposase codierte. Dadurch wurde eine ortsspezifische Rekombination über *mini-attTn7 sites* des *zupT*<sub>Strep</sub>-Konstruktes in das Bacmid ermöglicht, wodurch *in vivo* ein Fusionsplasmid entstand. Dieses Fusionsplasmid wurde in Sf9 Insektenzellen transferiert und ermöglichte die Expression von *zupT*<sub>Strep</sub>. Nach der Membranpräparation erfolgte die Reinigung des C-terminalen *Strep-tag*<sup>®</sup> Proteins über Affinitäts-Chromatographie. Mit dem *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System* konnte aus 200 ml transfizierter Sf9-Insektzellkultur ca. 1 mg ZupT gereinigt werden (Abb. 6). Dies entspricht einer 20-fachen Steigerung der Ausbeute im Vergleich zur jenen Ausbeute, die durch herkömmliche Überproduktion in *E. coli* BL21 gewonnen werden konnte. Dass es sich wirklich um ZupT in den Elutionsfraktionen handelte, wurde durch Sequenzierung des N-Terminus bestätigt (Toplab GmbH, Martinsried).



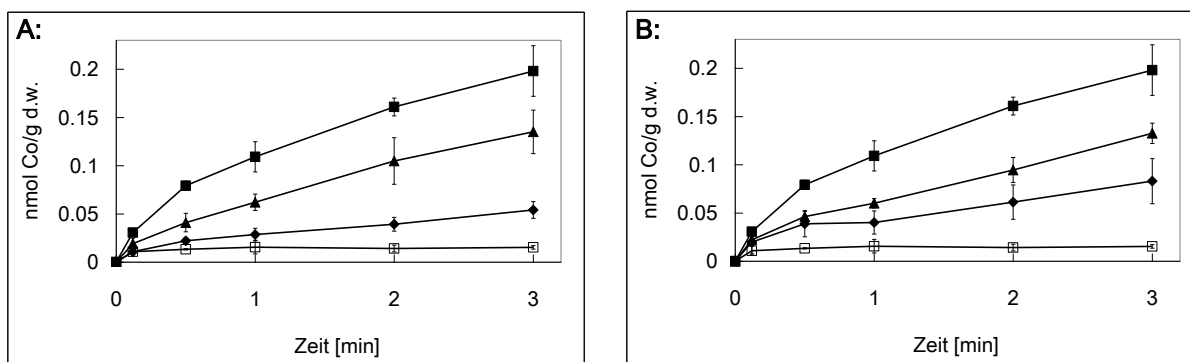
**Abb. 6: Vergleich der Ausbeute des gereinigten ZupT-Proteins durch Überexpression in *E. coli* BL21(pLys) und im *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System***

ZupT wurde in beiden Fällen als C-terminale *Strep-tag*<sup>®</sup>II-Fusionen *in vivo* synthetisiert und über das *Strep-tag*<sup>®</sup>II-System gereinigt. Solubilisiert wurde mit dem Detergenz Dodecylmaltosid. In einer 12.5%igen SDS-PAGE wurden 20 µl der gewonnenen Eluate, resultierend aus (A) der Überexpression im *E. coli* Stamm BL21(pLys), 1-6: aufgetragen wurden 20 µl der Elutionsfraktionen 3 bis 8 und (B) dem *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System*, 1-7: aufgetragen wurden 20 µl der Elutionsfraktionen 2 bis 7. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt. Zur Größenbestimmung wurde der Protein Marker, Broad Range (#7702, NEB GmbH, Frankfurt am Main) (Spur M) verwendet.

### 3.1.3. Wie wird der ZupT-Transport energetisiert?

Bisher war es weitgehend unklar, welche Energiequelle von ZIP-Proteinen für den Metall-Transport genutzt wird. So könnte eine ATP-Hydrolyse, ein H<sup>+</sup>- oder Na<sup>+</sup>-Metall/Symport oder ein HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Metall/Symport, wie es schon für die humanen ZIP-Transporter hZIP2, hZIP8 und hZIP14 (Gaither und Eide, 2000; He *et al.*, 2006; Girijashanker *et al.*, 2008) beschrieben wurde, den Transport von Metallen energetisieren. Um diese Frage hinsichtlich der Energetisierung des ZupT-vermittelten Metall-Transportes zu klären, wurde in radioaktiven Aufnahmeexperimenten zum einen die Protonophoren FCCP (Carbonyl cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazon) und CCCP (Carbonyl cyanid 3-chlorophenylhydrazon) und zum anderen der ATPase-Hemmer Orthovanadat eingesetzt. Bevor die Aufnahmeexperimente durch Zugabe von 1 µM <sup>57</sup>CoCl<sub>2</sub> gestartet wurden, wurden Zellen des Deletionsstammes ECA349(Δ*corA* Δ*rcnA* Δ*zupT*::*cat*) mit *zupT* *in trans* für 5 Minuten mit jeweils einem dieser Inhibitoren inkubiert und so der Einfluss von

FCCP, CCCP bzw. Orthovanadat auf die Cobalt-Akkumulation untersucht. Abbildung 7 zeigt, dass die Protonophoren FCCP und CCCP die Cobalt-Aufnahme verminderten. Schon der Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  FCCP bzw. 10  $\mu\text{M}$  CCCP führten zu einer eindeutigen Inhibierung des Cobalt-Transportes. Wurden 25  $\mu\text{M}$  FCCP bzw. 25  $\mu\text{M}$  CCCP im radioaktiven Aufnahmeexperiment eingesetzt, so konnte eine stärkere Inhibierung des Cobalt-Transportes festgestellt werden. Auch der radioaktive  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport im *E. coli* Stamm GR362( $\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB \Delta zitB::cat \Delta zntA::km_{Dis}$ ), der *zupT* in *trans* exprimierte, konnte durch Einsatz von FCCP und CCCP inhibiert werden (Daten nicht gezeigt).



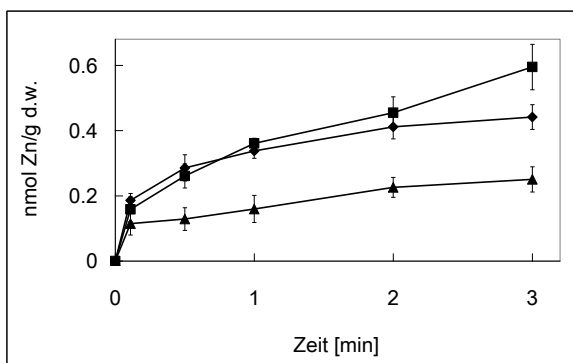
**Abb. 7: Radioaktive Aufnahmeexperimente in Anwesenheit der Protonophoren FCCP oder CCCP**

Nach Anzucht und Induktion der Expression von *zupT* wurden die Kulturen in Tris-MM (ohne Spurenelementlösung, Eisen, CAS und ohne Phosphat resuspendiert und auf die Optische Dichte [OD 600 nm] von 0.4 eingestellt. Die Kulturen wurden für fünf Minuten mit **A:** 10  $\mu\text{M}$  FCCP (▲), 25  $\mu\text{M}$  FCCP (◆) und mit **B:** 10  $\mu\text{M}$  CCCP (▲), 25  $\mu\text{M}$  CCCP (◆) inkubiert. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$   $^{57}\text{CoCl}_2$  wurde das Experiment gestartet und nach bestimmten Zeiten Proben entnommen. Als Positivkontrolle diente in beiden Fällen ein Experiment ohne Zusatz der Protonophoren (■) und als Negativkontrolle eine Kultur ohne *zupT* (□). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Das gleiche Experiment wurde mit dem *E. coli* Stamm ECA458( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ ) mit *zupT* in *trans* durchgeführt. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Mangan-Akkumulation durch Einsatz der Protonophoren stark vermindert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Orthovanadat hingegen musste in hohen Konzentrationen (1.0 mM) eingesetzt werden, um hinsichtlich des  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Transportes einen Hemmeffekt zu erzeugen. Der Einsatz von Orthovanadat im radioaktiven  $\text{Mn}^{2+}$ -Aufnahmeexperiment übte jedoch keinen Einfluss auf die  $\text{Mn}^{2+}$ -Akkumulation aus (Daten nicht gezeigt). Lösungsmittel, in denen die Inhibitoren vorlagen, wie Ethanol, Methanol und  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  beeinflussten das Transportexperiment nicht. Um auszuschließen, dass dieser Hemmeffekt durch Zelltod resultierte, wurden Zellen nach 5-, 10- und 20-minütiger Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor entnommen und auf LB-Agarplatten inkubiert. Die Behandlung mit Inhibitoren resultierte in einer unveränderten CFU. Daher konnte ein genereller negativer Effekt der Inhibitoren auf die Lebensfähigkeit der Zellen ausgeschlossen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob eine Änderung des externen pH-Wertes und somit eine Änderung der externen Protonen-Konzentration die Transport-Aktivität von *ZupT* beeinflussen würde. In Abb. 8 ist ersichtlich, dass eine Erhöhung des pH-Wertes zu einer

zunehmenden  $Zn^{2+}$ -Akkumulation in *zupT* exprimierenden GR362( $\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB \Delta zitB::cat \Delta zntA::km_{Dis}$ )-Zellen führte, wobei eine maximale  $Zn^{2+}$ -Akkumulation bei physiologischem pH-Wert erreicht wurde. Der radioaktive Zink-Transport konnte in Puffern mit höheren pH-Werten nicht untersucht werden, da vermutlich Zinkhydroxid im Verlaufe des Experimentes präzipitierte. Dies wurde dadurch erkenntlich, dass während des radioaktiven Aufnahmeexperimentes innerhalb weniger Minuten die Werte der *total cpm* extrem abnahmen, die im Normalfall konstant bleiben sollten (z. B. pH-Wert 8: Zeitpunkt „0“ 8905 *total cpm* und Zeitpunkt „1.5 min“ 4392 *total cpm*, bei pH-Wert 9 wurde eine gesteigerte Abnahme der *total cpm* beobachtet). Darüber hinaus wurde ebenso eine pH-Wert-Abhängigkeit des Cobalt- und Mangan-Transportes durch ZupT beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 8: Radioaktive  $Zn^{2+}$ -Aufnahmeexperimente in Gegenwart verschiedener pH-Werte**

Nach Anzucht und Induktion der Expression von *zupT* wurden die Kulturen in Tris/Mes-MM ohne Spurenelementlösung, Eisen, CAS, Phosphat und verschiedener pH-Werte: pH 6.0 (▲), pH 6.5 (●) oder pH 7.2 (■) resuspendiert und auf die Optische Dichte [OD 600 nm] von 0.4 eingestellt. Durch Zugabe von  $1 \mu M$   $^{65}ZnCl_2$  wurde das Aufnahmeexperiment gestartet und nach bestimmten Zeiten Proben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

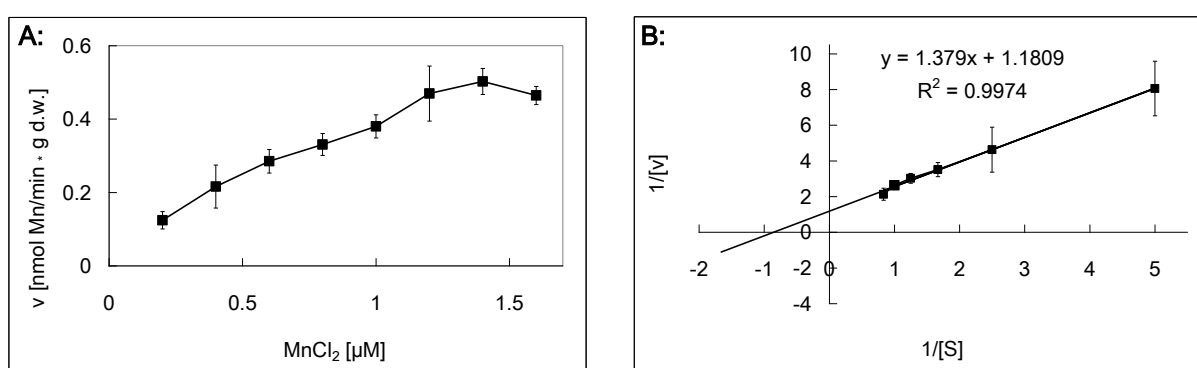
In Gaither *et al.* (2000) wurde für den humanen ZIP-Transporter hZIP2 ein  $Zn^{2+}/HCO_3^-$ -Symport als Transportmechanismus *in vivo* postuliert.

Dementsprechend wurde in radioaktiven Aufnahmeexperimenten untersucht, inwiefern die Transport-Aktivität von ZupT durch Einsatz von Bicarbonat beeinflusst werden kann. Weder in  $Cd^{2+}$ -,  $Co^{2+}$ - noch in  $Zn^{2+}$ -Aufnahmeexperimenten konnte ein Einfluss von  $HCO_3^-$  beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Anwesenheit von NaCl,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  und KCl veränderte in keinem der Fälle die Transport-Aktivität von ZupT (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu hZIP2, 8 und 14 scheint der ZupT-vermittelte Metall-Transport nicht durch Einsatz von Hydrogencarbonat und anderen Salzen stimuliert zu werden. Sie scheinen nicht die treibende Kraft für den Metall-Transport zu sein, vielmehr besteht die Möglichkeit, dass der Metall-Transport durch *proton-motive force* energetisiert werden könnte.

#### 3.1.4. Der ZupT-vermittelte $Zn^{2+}$ -Transport wird durch äquimolare Mengen an Cadmium gehemmt

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass ZupT ein breites Substratspektrum besitzt. Wird jedoch jedes Substrat mit derselben Affinität von ZupT gebunden und mit derselben Geschwindigkeit in das Cytoplasma transportiert? Um diese Frage beantworten zu können, wurde die Transport-Kinetik von ZupT näher untersucht. Dadurch, dass die Energiequelle für alle ZIP-Transporter noch nicht zweifelsfrei identifiziert wurde und somit radioaktive Aufnahmeexperimente in *right*

*side out* Vesikeln nicht durchführbar waren, wurde die Transport-Kinetik von ZupT für Zink, Cobalt und Mangan in ganzen Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die für das jeweilige Metall spezifischen Deletionsstämme [GR362( $\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB \Delta zitB::cat \Delta zntA::km_{Dis}$ ) für  $ZnCl_2$ , ECA349( $\Delta corA \Delta rcnA \Delta zupT::cat$ ) für  $CoCl_2$  und ECA458( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mnth \Delta zupT \Delta entC$ ) für  $MnCl_2$ ] mit pECD1046(pASK-IBA3::*zupT*) transformiert, sodass durch AHT die *zupT* Expression induziert werden konnte. Um die Transport-Kinetik von ZupT bestimmen zu können, wurde zunächst der Zusammenhang zwischen Substratkonzentration ( $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$  und  $MnCl_2$ ) und Transportgeschwindigkeit ermittelt. Die Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration zeigte einen hyperbolischen Kurvenverlauf und folgte somit der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 9A).



**Abb. 9: Transport-Kinetiken Diagramme am Beispiel der ZupT-vermittelten Mangan-Aufnahme**

Nach Anzucht und Induktion der Expression von *zupT* wurden die Kulturen in Tris-MM (ohne Spurenelementlösung, Eisen, CAS und ohne Phosphat) resuspendiert und auf die Optische Dichte [OD 600 nm] von 0.4 eingestellt. Zunächst wurden die Metall-Konzentrationen in radioaktiven Isotopen-Aufnahmeexperimenten bestimmt, bei der sich eine Sättigung des Transportes einstellte. Anschließend wurden die Transportgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt, mit deren Hilfe die Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt werden konnte. **A** zeigt die Substratsättigungskurve, **B** ist die doppeltreziproke Auftragung der Transportdaten als Lineweaver-Burk-Diagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

In Tabelle 4 sind die  $K_m$ -Werte und die maximale Geschwindigkeiten für die Substrate Zink, Cobalt und Mangan aufgeführt. Diese Daten deuten darauf hin, dass vermutlich Zink affiner gebunden und effektiver durch ZupT transportiert wird als Cobalt und Mangan. Die Substrate werden wahrscheinlich mit folgender Präferenz von ZupT gebunden:  $Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ .

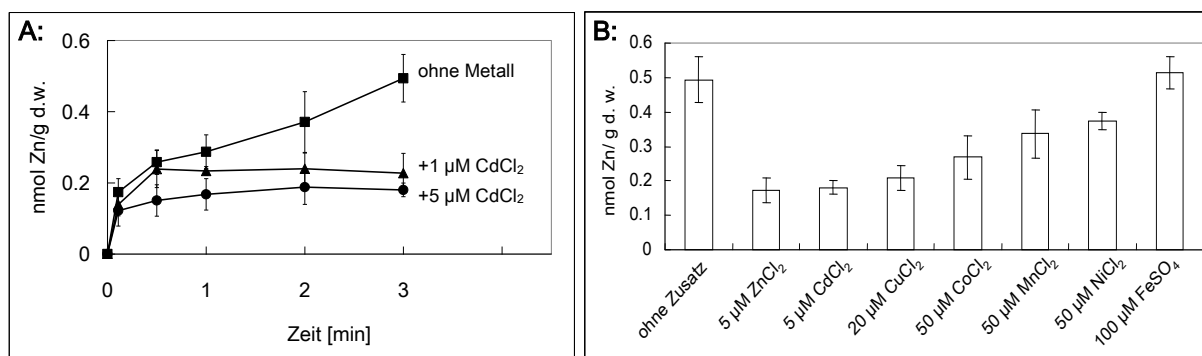
**Tab 4: Kinetik-Parameter für den ZupT-vermittelten  $Co^{2+}$ -,  $Zn^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ - Transport**

Metall	$K_m$ [ $\mu M$ ]	$v_{max}$ [nmol/ min · g d.w.]
$CoCl_2$	$0.91 \pm 0.09$	$0.49 \pm 0.03$
$ZnCl_2$	$0.71 \pm 0.14$	$1.87 \pm 0.03$
$MnCl_2$	$1.16 \pm 0.29$	$0.85 \pm 0.009$



Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Substrate lassen vermuten, dass die Transport-Effektivität der Substrate nach folgender Reihe differieren:  $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ . Für weitere Metalle wie z. B. Eisen konnte aufgrund der verbliebenen Aktivität unbekannter Transporter in der zugehörigen Negativkontrolle die Transport-Kinetik nicht quantitativ bestimmt werden.

Kompetitions-Experimente sollten mehr Aufschluss über die Substratspezifität von ZupT geben. Dazu wurden radioaktive Isotopen-Aufnahmeexperimente mit  $1 \mu\text{M}$   $^{65}\text{ZnCl}_2$  (Endkonzentration) im *E. coli* Stamm GR362 ( $\Delta znuABC \Delta zupT \Delta zntB \Delta zitB::cat \Delta zntA::km_{Dis}$ ) mit *zupT* in *trans* durchgeführt. Die radioaktive Stammlösung von  $1 \mu\text{M}$   $^{65}\text{ZnCl}_2$  (Endkonzentration) wurde mit den potentiell inhibierenden Metallen gemischt und anschließend für Aufnahmeexperimente eingesetzt. Zunächst wurden äquimolare Mengen, d. h. Endkonzentration von  $1 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  oder  $\text{FeSO}_4$  zur  $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Stammlösung hinzu gegeben. Schon der Einsatz äquimolarer Mengen von  $\text{CdCl}_2$  hemmten eindeutig den  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport durch ZupT (Abb. 10A). Durch eine Erhöhung der Endkonzentration auf  $5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wurde ein maximaler Hemmeffekt des  $\text{Zn}^{2+}$ -Transportes erreicht, da eine Verdopplung der  $\text{CdCl}_2$ -Konzentration den  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport im selben Maße hemmte wie  $5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Abb. 10). In dieser Konzentration wirkte ebenfalls  $\text{CuCl}_2$  als Inhibitor des  $\text{Zn}^{2+}$ -Transportes. Dabei konnte bei einem 20-fachen Überschuss an  $\text{CuCl}_2$  die maximale Competition des  $\text{Zn}^{2+}$ -Transportes beobachtet werden (Abb. 10B). Dagegen mussten  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ , und  $\text{NiCl}_2$  in einem 50-fachen Überschuss eingesetzt werden, damit eine eindeutige Hemmung des  $\text{ZnCl}_2$ -Transportes eintrat.  $\text{FeSO}_4$  hingegen wirkte nicht als Inhibitor. Sowohl  $1 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  oder  $100 \mu\text{M}$  zugesetztes  $\text{FeSO}_4$  hemmte den  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport in keiner Weise.



**Abb. 10: Hemmung des ZupT-vermittelten Zink-Transportes durch andere Schwermetalle**

Nach Anzucht und Induktion der Expression von *zupT* wurden die Kulturen in Tris-MM ohne Spurenelementlösung, Eisen, CAS und ohne Phosphat resuspendiert und die Optische Dichte [OD 600 nm] von 0.4 eingestellt. Durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$   $^{65}\text{ZnCl}_2$  (Endkonzentration) bzw. zusätzlich verschiedener Metalle wurde das radioaktive Aufnahmeexperiment gestartet und nach bestimmten Zeiten Proben entnommen. **A:** Hemmung des  $\text{Zn}^{2+}$ -Transportes am Beispiel mit  $\text{CdCl}_2$  [ohne Metall (■), mit  $1 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (▲) und  $5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (●)] **B:**  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport wird durch verschiedene Schwermetalle im unterschiedlichen Maße gehemmt. Gezeigt sind die Werte, die in den Proben bestimmt wurden, die nach 3 min entnommen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

### 3.1.5. Welche Aminosäuren sind am ZupT-vermittelten Metall-Transport beteiligt?

In Rogers *et al.* (2000) wurde gezeigt, dass Mutationen in den konservierten Histidin-Resten und benachbarten polaren oder geladenen Aminosäure-Resten in TMH IV und V zu einem Funktionsverlust von IRT1, dem ersten ZIP-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*, führten. Weiterhin wurde bewiesen, dass bestimmte Aminosäure-Reste im cytoplasmatischen *loop*, die „Variable Region“, für die Substratspezifität von IRT1 verantwortlich sind. Ausgehend von diesen Arbeiten sollten in ZupT gezielt Aminosäure-Reste mutiert werden, um so Aminosäuren zu identifizieren, die für die Substratspezifität und/oder den Transport notwendig sein könnten.

Um zunächst einen Eindruck über die Sequenz-Homologien zwischen ZupT und anderen ZIP-Transportern zu gewinnen, wurden mit ClustalW *multiple Alignments* durchgeführt (Abb. 11). Dabei ist auffällig, dass besonders in den transmembranen Helices IV und V der bakteriellen ZIP-Transporter konservierte Aminosäure-Reste vorhanden sind und der cytoplasmatische *loop* zwischen den transmembranen Helices III und IV stark in Länge und Sequenz variiert, wie es schon in Guerinot (2000) beschrieben wurde.

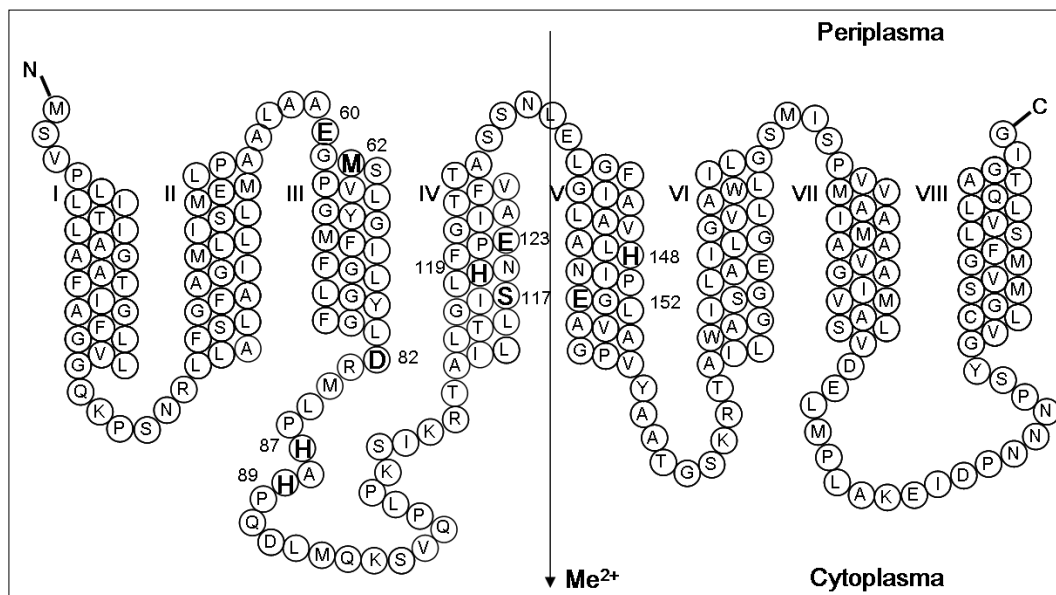
ZRT1	---MSNVTTTPWWKQWDPSEVTLADKTPDDVWKTCVLQGVYFGGNEYNGNLGARISSVFVI	57
IRT1	MKTI FLVLI FVSVFAISPATSTAPEECGSESANPCVNK-----AKALPLKVIAIFVI	51
hZIP1	---MGPWGEPELLVWRPEAVASEPPVPVG-----LEVKLGALVLL	37
ZupT	-----MSVPLILTILA	11
GufA	-----MGAGLVASLLA	11
	: : .:	
	TMH II	
ZRT1	LFVSTFFTFMPLISTKVKRLRIPL-----YVYLFAKYFGSGVIVATAFIHMLDPAYGAIG	112
IRT1	LIASMIGVGAPLFSRNVSFLQPDG-----NIFTI IKCFASGIILGTGMHVLPDSFEMLS	106
hZIP1	LVLTLCLSLVPICVLRPPGANHEGASRQKALS LVSCFAGGVFLATCLLDLLPDYLA AID	97
ZupT	GAATFIGAFLGVLGQKPSNR-----LLAFSLGFAAGIMLLISLMEMLPAALAAEG	61
GufA	GTATGLGALPVLVTSELSRKAQGP-----DVGLQRGRDAGGQSFSLVIPAMELVRGQGH	65
	: : : . : . * . : :	
	TMH III	
ZRT1	GTTCVQQTGNWGLYSWCPAIMLTSLFTFFLTDLFSSVWVERKYGLSHDHTHDEIKDTVVR	172
IRT1	-SICLEEN-PWHKFPFSGFLAML SGLITLAIDSMATSLYTSKN-----	147
hZIP1	--EALAALHVT LQFPLQEFILAMGFFLVLMVEQITLAYKEQSG-----	138
ZupT	-----MSPVLGYGMFIFGLLGYFG LDR-----	83
GufA	-----DGPSAALRVAAGVLLGGLFLRVWHD-----	90
	:	
	TMH IV	
ZRT1	NTAAVSSSENDNENGTANGSHDTKNGVEYYEDSDATSM DVVQSFQAQFYAFLILEFGVIFH	232
IRT1	-----AVGIMPHGHGHGHPANDVTLPIKEDDSSNAQLLR----YRVIAMVLELGIIVH	197
hZIP1	-----PSPLEETRALLGTVNGGPQHWHHDGPGVPQASGAPATPSALRACVLVFSLALH	190
ZupT	-----MLP HAH P Q D L M Q S V Q P L P K S -----IKRTA I L L T L G I S L H	119
GufA	-----LMPHEHALKGHEGHGGTKWNS-----ALLFV LAMTLH	122
	: .. : : : : *	
	TMH V	
ZRT1	SVMIGLN--LGSVG-DEFSS--LYPVLV F H Q S F E G L G I G A R L S A I E F P R S K R W P W A L C V	287
IRT1	SVVIGLS--LGATS-DTCTIKGLIAALCFHQMFEGMGLGGC I L Q A E Y T N M K ---K F V M A F	251
hZIP1	SVFEGLA--VGLQR-DRARAMELCLALLLHKGILAVSLSLRLQLSHLRAQV---VAGCGI	244
ZupT	NFP E G I A T F V T A S S - N L E L G F G I A L A V A L H N I P E G L A V A G P V Y A A T G S K R T - - - - - A I	171
GufA	NFPEGLAVGVSFAAPQPELGLSVALGIGANIPEGLVVALALRASGASASR-----AA	175
	.. * : : : : : : : : : : :	

	TMH VI	TMH VII	
ZRT1	AYGLTTPICVAIGLGVTRTRYVSGSYTALVISGVLDAISAGILLYTGLVELLARDFIFNPQ		347
IRT1	FFAVTTPFGIALGIALSTVYQDNSPKALITVGLLNACSGLLIYMALVDLLAAEFMG-PK		310
hZIP1	LFSCMTPLGIGLGAALAESAG---PLHQLAQSVLEGMMAAGTFLYITFLEILPQELAS--S		299
ZupT	LWAGISGLAEIILGGVLAWLILG-SMISPVVMAAIMAAVAGIMVALSVDELMPLAKEIDPN		230
GufA	FLALLTGMVEPVGALFGVLALS---LSSALLPWGLAFAGGAMLYVISHEMIPESHRRGGFE		232
	. : : :*	. . * :: : : .	
	TMH VIII		
ZRT1	RTKDLRELSFNVICTLFGAGIMALIGKWA		376
IRT1	LQGSIKMQFKCLIAALLGCGGMSIIAKWA		339
hZIP1	EQRILKVILLLAGFALLTGLLFIQI----		324
ZupT	NNPSYGVLCGMSVMGFSLVLLQTAGIG--		257
GufA	REATTGLMWGFVLALVLDMSLG-----		254

**Abb. 11: Sequenz-Alignment von ZupT mit anderen ZIP-Transportern**

Dargestellt ist ein *Alignment* von ZupT aus *E. coli* mit verwandten ZIP-Transportern: ZRT1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, IRT1 aus *Arabidopsis thaliana*, hZIP1 aus *Homo sapiens* und GufA aus *Myxococcus xanthus*. Identische (\*) und ähnliche ( . und :) AS sind unterhalb der Sequenz gekennzeichnet, ebenfalls die putativen transmembranen Helices (TMH) I bis VIII. **Fett** sind die Aminosäuren in ZupT gekennzeichnet, die gegen andere Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden.

Mit Hilfe des Programms <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> konnte eine Topologie-Vorhersage getroffen werden und für den ersten bakteriellen ZIP-Transporter ZupT ein zweidimensionales Topologiemodell erstellt werden (Abb. 12). Auch hier werden für ZupT acht transmembrane Helices postuliert, dabei ist der N- und C-Terminus im Periplasma lokalisiert.



**Abb.12: Putatives Topologie-Modell von ZupT**

Dargestellt sind die transmembranen Helices, gekennzeichnet von I-VIII und die Aminosäuren mit Positionsangaben, die durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden.

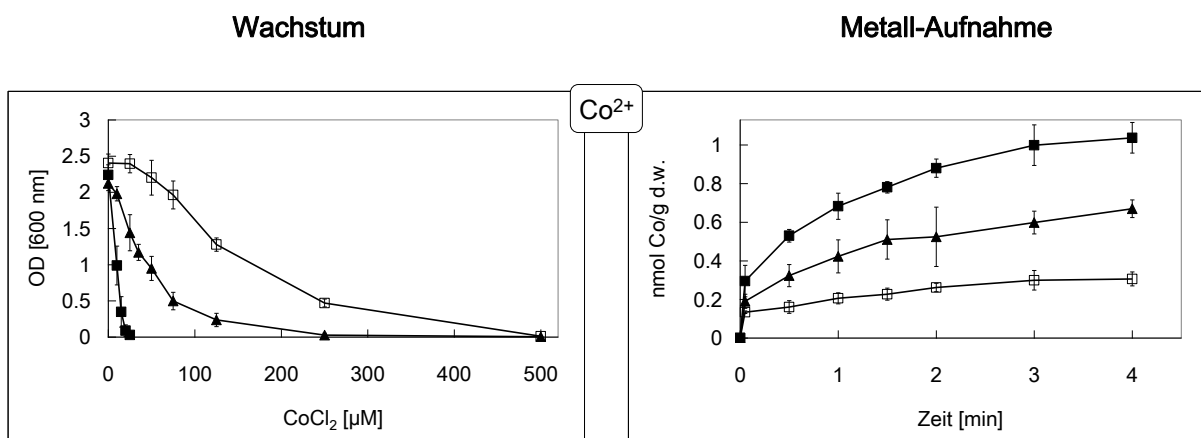
Weiterhin besitzt ZupT die für ZIP-Transporter charakteristische „Variable Region“ zwischen transmembraner Helix III und IV (Abb. 2). Um den Transport-Mechanismus von ZupT verstehen zu können, schien es bedeutsam, putative periplasmatische oder cytoplasmatische Metall-

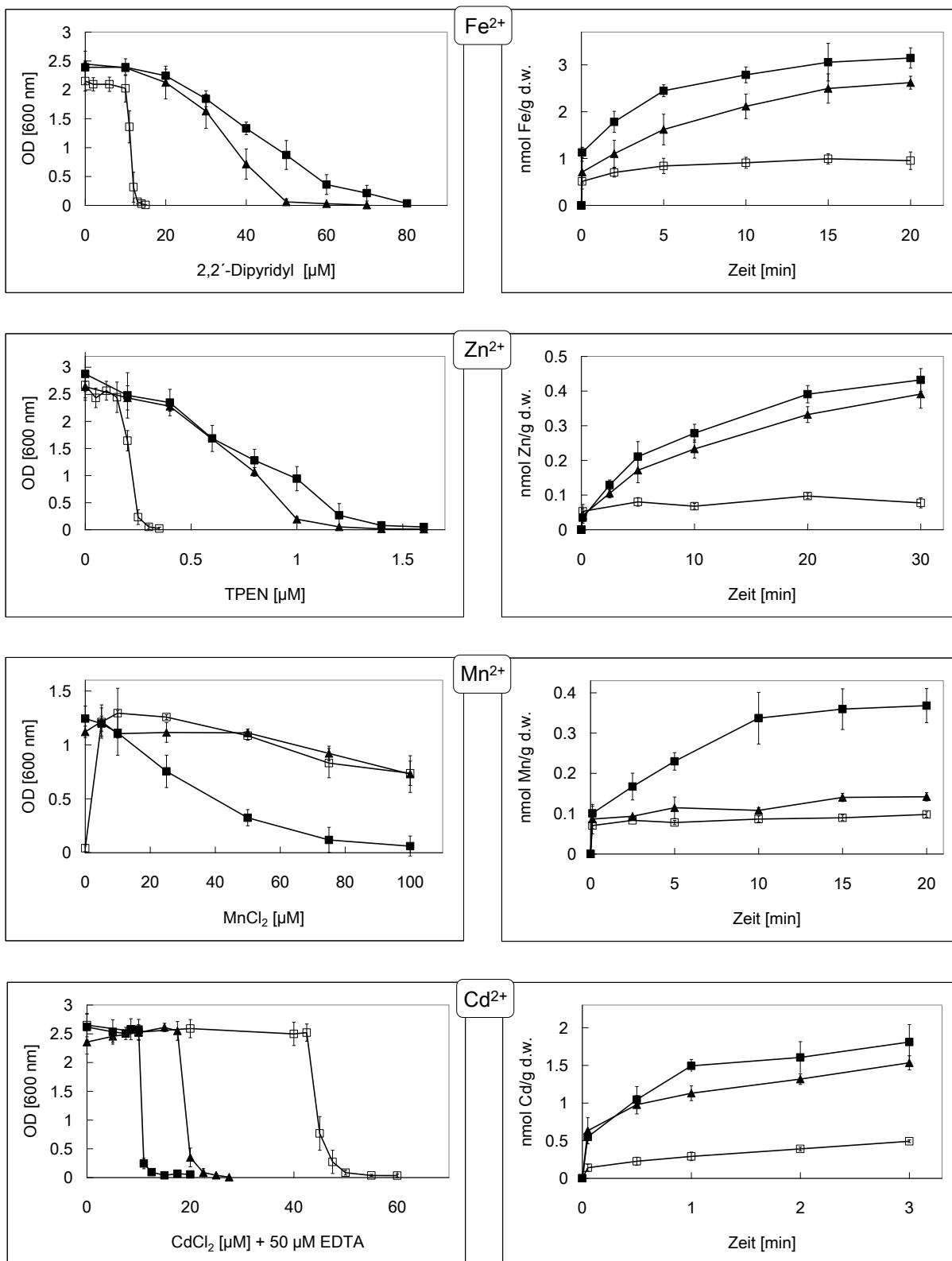
bindestellen und für den Transport essenzielle Aminosäuren aufzudecken. Aus diesem Grund wurden folgende Aminosäure-Austausche vorgenommen: E<sub>60</sub>D, M<sub>62</sub>A, D<sub>82</sub>A, H<sub>87</sub>R, H<sub>87</sub>A, H<sub>89</sub>R, H<sub>89</sub>A, S<sub>117</sub>V, H<sub>119</sub>R, E<sub>123</sub>D, E<sub>123</sub>A, H<sub>148</sub>R, E<sub>152</sub>D und E<sub>152</sub>A (Abb. 12).

Die mutierten *zupT*-Gene, vorliegend in *low*- und *high-copy* Plasmiden, wurden in den jeweiligen Deletionsstämmen in *trans* exprimiert. Als Positivkontrolle diente das von pECD754 (pACYC184::*zupT*), pECD1061(pACYC177::*zupT*) bzw. pECD1046(pASK-IBA3::*zupT*) codierte ZupT Wildtypprotein. In Tabelle 5 sind die Auswirkungen der jeweiligen Mutationen im ZupT Protein hinsichtlich des Cobalt-, Eisen-, Zink-, Mangan- und Cadmium-Transportes zusammengefasst. Die AS-Austausche M<sub>62</sub>A, D<sub>82</sub>A, H<sub>87</sub>R, H<sub>87</sub>A und H<sub>89</sub>R im ZupT Protein führten zu keinem Funktionsverlust, alle Mutantenproteine waren in der Lage, die entsprechenden Metalle zu transportieren. Allerdings konnte zum Teil eine gesteigerte Resistenz gegenüber einigen Metallen festgestellt werden. Wurde jedoch das Histidin an Position 89 in der „Variablen Region“ gegen ein Alanin ausgetauscht, so war diese ZupT-Mutante kaum noch in der Lage, Cobalt und Eisen zu transportieren. Darüber hinaus schien der Zink- und Mangan-Transport in solchen Zellen, zumindest in Wachstums-Endpunktbestimmungen, eingeschränkt zu sein. Der Cadmium-Transport wurde jedoch durch diese Mutation im Protein nicht beeinflusst.

Die Mutation des Glutamates an Position 60 im extracytoplasmatischen *loop* zwischen TMH II und TMH III führte zum Verlust des Cd<sup>2+</sup>-Transportes und in einer eingeschränkten Co<sup>2+</sup>-Transport-Aktivität in Wachstums-Endpunktbestimmungen.

Für die ZupT-Mutante, deren Serin an Position 117 gegen Valin ausgetauscht wurde, konnte kein Mangan-Transport festgestellt werden, wohingegen ein eingeschränkter Cobalt-Transport für diese ZupT-Mutante beobachtet wurde. Interessanterweise war jedoch diese Mutante in der Lage, Eisen, Cadmium und Zink zu transportieren (Abb. 13).





**Abb. 13: Untersuchung des Einflusses der Mutation im *zupT*-Gen auf den Metall-Transport und auf das Wachstum am Beispiel der S117V *ZupT*-Mutante**

Der Einfluss der Mutationen im *zupT*-Gen wurde in Wachstums-Endpunktbestimmungen (linke Seite) und in radioaktiven Aufnahmeexperimenten (rechte Seite) wie unter Abb. 5 beschrieben, untersucht. Gezeigt ist das Wachstum und die Metall-Aufnahme am Beispiel der *ZupT* Mutante S117V (▲). Dabei diente der jeweilige Metall-spezifische Deletionsstamm mit *zupT* in *trans* als Positivkontrolle (■) und mit Leervektor als Negativkontrolle (□). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die vollständige Mutanten-Analyse ist in Tab. 5 zusammengefasst.

Wurden die konservierten Histidin- und Glutamat-Reste in TMH IV und TMH V mutiert (H<sub>119</sub>R, E<sub>123</sub>D, E<sub>123</sub>A, H<sub>148</sub>R, E<sub>152</sub>D und E<sub>152</sub>A), führte dies zu drastischeren Auswirkungen auf den ZupT-vermittelten Transport. So konnte nur noch ein stark eingeschränkter Zn<sup>2+</sup>- und Cd<sup>2+</sup>-Transport, zumindest in Cd<sup>2+</sup>-Aufnahmeexperimenten, der Mutante ZupT H<sub>119</sub>R beobachtet werden. Alle weiteren Metalle konnten nicht von diesem Mutanten-Protein transportiert werden. Das Glutamat an Position 123 wurde sowohl gegen ein Aspartat als auch gegen ein Alanin ausgetauscht. Für beide Mutanten-Proteine konnte nur in den Metall-Aufnahmeexperimenten ein stark verminderter Cd<sup>2+</sup>-Transport festgestellt werden. Während die ZupT-Mutante E<sub>123</sub>D keinen weiteren Metall-Transport katalysieren konnte, war das Mutanten-Protein ZupT E<sub>123</sub>A in der Lage, wenn auch eingeschränkt, Zink zu transportieren. Ähnliches konnte für die ZupT-Mutante, deren Histidin an Position 148 gegen ein Arginin ausgetauscht wurde, beobachtet werden.

**Tab. 5: Einfluss der Mutationen im *zupT*-Gen auf den Co<sup>2+</sup>-, Fe<sup>2+</sup>-, Zn<sup>2+</sup>-, Mn<sup>2+</sup>- und Cd<sup>2+</sup>-Transport und auf das Wachstum**

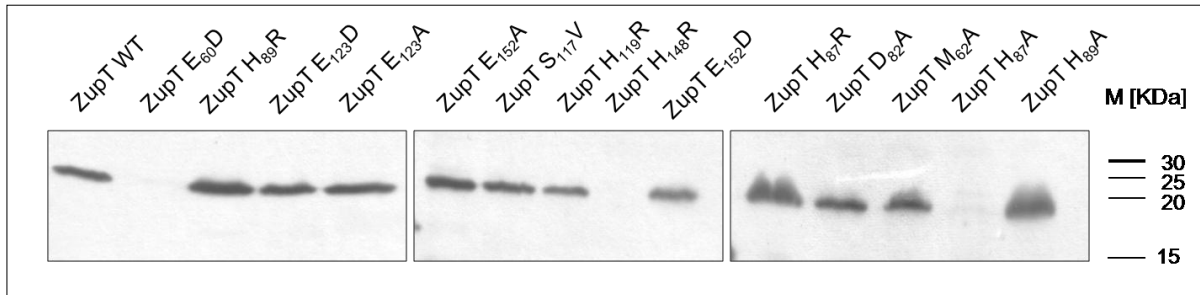
Mutante	Co	Co	Fe	Fe	Zn	Zn	Mn	Mn	Cd	Cd
	Wachstum	uptake	Wachstum	uptake	Wachstum	uptake	Wachstum	uptake	Wachstum	Uptake
E <sub>60</sub> D	++ --	-	++++	-	++++	-	++++	-	+ ---	+ ---
M <sub>62</sub> A	+++++	+++++	++++	++++	++++	++++	+++++	++++	+++++	+++++
D <sub>82</sub> A	+++++	+++++	++++	++++	++++	++++	+++++	++++	+++++	+++++
H <sub>87</sub> R	+++++	+++++	++++	++++	++++	++ --	+++++	++++	++++	++++
H <sub>87</sub> A	+++++	-	++++	-	++++	-	+++++	-	++++	-
H <sub>89</sub> R	+++++	+++++	++++	++++	++++	++++	+++++	++++	++++	++++
H <sub>89</sub> A	-	-	-	+ ---	++ --	++++	++ --	++++	++++	++++
S <sub>117</sub> V	++ --	++ --	+++ -	+++ -	++++	++++	-	-	+++ -	+++ -
H <sub>119</sub> R	-	-	-	-	++ --	+ ---	-	-	-	+++ -
E <sub>123</sub> D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ --
E <sub>123</sub> A	-	-	-	-	++ --	++ --	-	-	-	+ ---
H <sub>148</sub> R	-	-	-	-	++ --	-	-	-	-	-
E <sub>152</sub> D	++ --	++ --	++ --	++ --	-	-	-	-	++ --	+ ---
E <sub>152</sub> A	+ ---	-	+ ---	-	++++	+ ---	+ ---	-	++++	+++ -

++++ WT, +++ - nahezu WT, ++ -- intermediär, + --- nahezu funktionslos, - funktionslos, orange sind diejenigen Mutanten-Proteine dargestellt, die eine Funktion in der Substratspezifität von ZupT übernehmen könnten.

Wurde das konservierte Glutamat an Position 152 im ZupT-Protein gegen ein Aspartat ausgetauscht, so resultierte dies in einem Funktionsverlust hinsichtlich des  $Zn^{2+}$ - und des  $Mn^{2+}$ -Transportes. Im Gegensatz dazu konnten Cobalt, Eisen und Cadmium durch dieses Mutanten-Protein, im eingeschränkten Maße, transportiert werden. Wurde jedoch dieses Glutamat gegen ein Alanin ausgetauscht, so blieb zwar der Funktionsverlust hinsichtlich des  $Mn^{2+}$ -Transportes erhalten, jedoch war diese Mutante nun in der Lage, wenn auch eingeschränkt, Zink zu transportieren. Darüber hinaus konnte ein wildtypähnlicher  $Cd^{2+}$ -Transport für diese Mutante festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war diese Mutante kaum noch in der Lage, Cobalt und Eisen zu transportieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass besonders die konservierten Aminosäuren H<sub>119</sub>, E<sub>123</sub> und H<sub>148</sub> in den transmembranen Helices IV und V für den Metall-Transport essenziell sind und weitere Aminosäuren wie E<sub>60</sub>, H<sub>89</sub>, S<sub>117</sub> und E<sub>152</sub> eine Funktion hinsichtlich der Substratspezifität übernehmen könnten.

Der Nachweis des Wildtyp-Proteins in der Cytoplasmamembran erwies sich als sehr schwierig. ZupT konnte, trotz zahlreicher Variationen in der Art und Weise der Überexpression, nicht in der Membran nachgewiesen werden. Für eine Detektion war die Reinigung von ZupT über das *Strep-tag*<sup>®</sup>II-System notwendig, jedoch aufgrund der geringen Ausbeute, nicht optimal. Nachdem innerhalb der Arbeitsgruppe das *Strep-tag*<sup>®</sup>II-Detektions-System mit spezifischem Antikörper *Strep-Tactin*<sup>®</sup> optimiert und eine weitere Anzuchtmethodik zur Überexpression von ZupT etabliert wurde, gelang es letztendlich, das Wildtyp-Protein in der Membran nachzuweisen. Dazu wurde das in pASK-IBA3 klonierte *zupT*-Gen bzw. die mutierten *zupT*-Gene im  $Cd^{2+}$ -spezifischen Deletionsstamm (ECA580), auf dieselbe Art und Weise wie für radioaktive Aufnahmeexperimente, exprimiert.

Die Induktion der Expression resultierte durch Zugabe von AHT für eine Stunde. Nach Zellaufschluss erfolgte die Isolation der Membran und durch *Immunoblotting* der Nachweis der Proteine. Abbildung 14 zeigt den Nachweis von ZupT bzw. der ZupT-Mutanten in der Membran. Dabei ist auffällig, dass die Mutanten-Proteine E<sub>60</sub>D, H<sub>148</sub>R und H<sub>87</sub>A entweder gar nicht oder in sehr geringen Mengen in der Membran nachgewiesen werden konnten. Die Ursache dafür könnte entweder ein niedriges Expressionsniveau oder ein verminderter Einbau der Mutanten-Proteine in der Cytoplasmamembran sein. Dadurch, dass im Rohextrakt vergleichbar geringere Mengen von diesen Mutanten-Proteinen nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt), ist das niedrige Expressionsniveau dieser ZupT-Varianten eine Erklärung für die geringen Mengen dieser Mutanten-Proteine in der Membran. Die Expression dieser ZupT-Mutanten wurde ebenfalls in weiteren Metall-spezifischen Deletionsstämmen durchgeführt, auch hier wurden diese Mutanten-Proteine in nur sehr geringen Mengen in der Membran nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren ZupT-Mutanten konnten eindeutig in der Membran detektiert werden, sodass die Effekte in den Wachstums-Endpunktbestimmungen und den radioaktiven Aufnahmeexperimenten auf intakte ZupT-Mutanten zurückzuführen sind.



**Abb.14: Nachweis der ZupT-Mutanten-Proteine in Membran-Fractionen**

Die Kulturen wurden auf dieselbe Art und Weise wie für radioaktive Isotopen-Aufnahmeexperimente angezogen und mit dem Induktor AHT inkubiert. Aus 100 ml Minimal-Kultur wurde die Membranfraktion gewonnen und 50 µg Membran in einer 12.5%igen SDS-PAGE aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch Bindung des *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugates an die Fusionsproteine. Dargestellt sind Immunoblots resultierend aus der Induktion der Proteine im Cd<sup>2+</sup>-spezifischen *E. coli* Stamm ECA580 ( $\Delta zupT \Delta mntH \Delta zntA \Delta yodA::cat$ ). Zur Größenbestimmung wurde der *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*, MBI Fermentas, (St. Leon-Rot) (Spur M) verwendet.

## 3.2. Neue Zusammenhänge zwischen Mangan-und Eisen-Homöostase in *Escherichia coli*

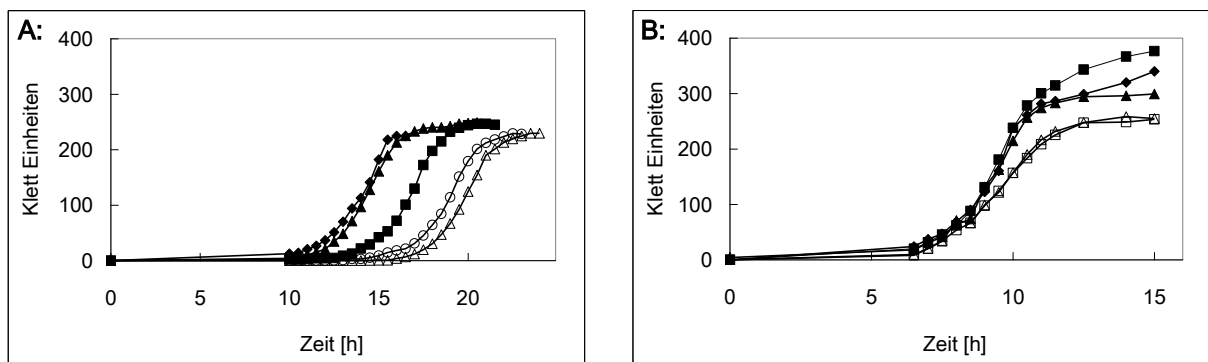
### 3.2.1. Mangan verbessert erheblich das Wachstum einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante

Untersuchungen zum Mangan-Transport von ZupT deckten eine Besonderheit hinsichtlich des Wachstums der Deletionsmutante ECA458 auf. Das Wachstum dieses *E. coli* Stammes mit dem *low-copy* Plasmid pACYC177 in *trans* konnte unter Eisenlimitation erheblich durch Mangan verbessert werden (Abb. 5E). Das zeitabhängige Wachstumsverhalten der Deletionsmutante ECA458, jedoch ohne *low-copy* Plasmid pACYC177 in *trans*, konnte dieses Ergebnis validieren (Abb. 15). Diese Mutante zeichnet sich durch die deletierten Gene der Eisen- bzw. Mangan-Aufnahme-Systeme *fecA-E*, *feoABC*, *mntH*, *zupT* und *entC* aus. Aufgrund dieser Deletionen ist diese Mutante nicht mehr in der Lage, Fe(III) durch die Siderphoren Citrat und Enterobactin, Fe(II) durch das Feo-System und Fe(II) bzw. Mn(II) durch ZupT und MntH aufzunehmen. Fe(III) kann ebenfalls durch Xenosiderophoren wie z. B. Ferrichrom oder Coprogen komplexiert werden und über das Fhu-System in *E. coli* transportiert werden (Hantke, 1983; Sauer *et al.*, 1990; Braun *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2003; Braun und Hantke, 2007). Da jedoch in allen folgenden Experimenten Tris-MM zu Kultivierung dieses Deletionsstammes verwendet wurde, kann eine Fe(III)-Aufnahme durch das Fhu-System ausgeschlossen werden. Demzufolge fehlen dieser Mutante alle, für das Wachstum in definiertem Medium relevanten Eisen- und Mangan-Aufnahme-Systeme, sodass diese Mutante als Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in der vorliegenden Arbeit bezeichnet wurde.

Abbildung 15A zeigt, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ( $\Delta fecA-E$ ,  $\Delta feoABC$ ,  $\Delta mntH$ ,  $\Delta zupT$ ,  $\Delta entC$ ) unter Eisen-Mangelbedingungen ca. zehn Stunde später in die exponentielle Phase eintrat als der *E. coli* Wildtyp Stamm. Gab man zum Medium 2.5 µM des Fe(II)-Chelators 2,2'-Dipyridyl hinzu, so verschlechterte sich das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-



Mutante geringfügig. In der stationären Phase wurden ähnliche Zelldichten erreicht, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Chelators. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  oder 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  zum Medium, konnte das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verbessert werden, wobei Mangan das Wachstum stärker förderte als Eisen. Schon ca. 12 h nach Start des Experimentes konnte der Eintritt in die exponentielle Phase verzeichnet werden, ca. zwei Stunden früher als die Zellen, die mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  inkubiert wurden. Gab man beide Metalle gleichzeitig zum Medium, so verbesserte sich das Wachstum nur geringfügig im Vergleich zum Wachstum in Anwesenheit von Mangan. Darüber hinaus wurden durch Zugabe von Eisen und/oder Mangan höhere Zelldichten in der stationären Phase erreicht. Dagegen wurde das Wachstum des *E. coli* Wildtyps in Gegenwart von 2,2'-Dipyridyl, Mangan und/oder Eisen kaum beeinflusst. Alle *E. coli* Wildtyp-Kulturen traten bereits nach ca. 6.5 h in die exponentiellen Phasen ein. Nur die Zelldichten in den stationären Phasen unterscheiden sich je nach Wachstumsbedingungen, dabei wurden besonders in Anwesenheit von Eisen höhere Zelldichten erzielt. (Abb. 15B).



**Abb. 15: Zeitabhängiges Wachstumsverhalten der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 und des *E. coli* Wildtyps W3110 unter Eisen-Mangelbedingungen oder in Anwesenheit von Mangan und Eisen**

LB-Übernachtskulturen wurden 1:400 in Tris-MM verdünnt und 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Minimal-Kulturen wurden in Tris-MM ohne Eisen und mit desferriertem CAS 1:400 angezogen und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Diese Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (A) und des *E. coli* Wildtyps W3110 (B) wurden erneut 1:400 in 10 ml Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS verdünnt und ohne Zusatz ( $\circ$ ), mit 2.5  $\mu\text{M}$  2,2'-Dipyridyl ( $\Delta$ ), mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  ( $\blacksquare$ ), mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  ( $\blacktriangle$ ) oder mit jeweils 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  ( $\blacklozenge$ ) inkubiert. Das Zellwachstum erfolgte bei 37°C und wurde kontinuierlich bis zum Erreichen der stationären Phase mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

### 3.2.2. Wie viel Eisen bzw. Mangan kann die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp W3110 aufnehmen?

In zeitabhängigen Wachstumsexperimenten wurde gezeigt, dass das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 im Vergleich zum Wildtyp stark beeinträchtigt war und darüber hinaus durch den Zusatz von Mangan oder Eisen im Medium in unterschiedlichem Maße verbessert werden konnte. Was ist jedoch die Ursache für das verminderte Wachstum ohne und für das verbesserte Wachstum mit Mangan der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante? Kann die Bestimmung des intrazellulären Eisen- und Mangangehalts dieses Stammes einen Aufschluss über das beobachtete Wachstumsverhalten geben? Um diese Frage beantworten zu

können, wurde der Mangan- und Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des *E. coli* Wildtyps durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) untersucht. Dazu wurden die Kulturen auf die gleiche Art und Weise angezogen wie für zeitabhängige Wachstumsexperimente. Dadurch, dass der Metallgehalt während der verschiedenen Wachstumsphasen variieren könnte, wurde der Mangan- und Eisengehalt von Zellen bestimmt, die sich in der lag, exponentiellen oder stationären Phase befanden. Nach entsprechender Probenvorbereitung wurde der Metallgehalt von  $10^8$ -Zellen bestimmt. Tabelle 6 und 7 zeigen, dass viel mehr Eisen als Mangan während allen Wachstumsphasen, unabhängig von den Anzuchtsbedingungen, in Zellen beider Stämme vorhanden war. Zum anderen nahm der Eisengehalt, im Gegensatz zum Mangangehalt, während des Wachstums in beiden Stämmen, besonders wenn Eisen zugegeben wurde, stark ab. Die Daten zeigen, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante offenbar noch in der Lage ist, Eisen aufzunehmen, wobei ein niedrigerer Eisengehalt als im Wildtyp während des Wachstums unter nahezu allen Wachstumsbedingungen nachgewiesen wurde. Nur unter Zusatz von Mangan war der Eisengehalt beider Stämme während allen Wachstumsphasen ähnlich.

**Tab. 6: Vergleich des Eisengehaltes in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und im *E. coli* Wildtyp innerhalb verschiedener Wachstumsphasen und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen**

Wachstums-Phase Phase	lag-Phase		exponentielle Phase		stationäre Phase	
	W3110 [ng Fe/ $10^8$ Zellen]	ECA458 <sup>1</sup> [ng Fe/ $10^8$ Zellen]	W3110 [ng Fe/ $10^8$ Zellen]	ECA458 <sup>1</sup> [ng Fe/ $10^8$ Zellen]	W3110 [ng Fe/ $10^8$ Zellen]	ECA458 <sup>1</sup> [ng Fe/ $10^8$ Zellen]
Mediumzusatz						
ohne	17.2±2	6.6±1.7	10.1±3	6.1±2.2	1.8±0.3	1.2±0.01
2.5 µM DIP	9.5±1.6	5.3±1.7	20.9±3.5	6.6±1.7	2.8±0.8	2.7±0.3
10 µM FeSO <sub>4</sub>	748.8±203.7	533.6±160.9	34.3±2.8	23.0±3.7	23.7±2.6	14.0±0.7
10 µM MnCl <sub>2</sub>	8.8±1.4	3.6±1.07	9±0.6	8.8±1.2	1.6±0.2	1.8±0.3
10 µM FeSO <sub>4</sub> / 10 µM MnCl <sub>2</sub>	729.1±103.7	444.7±84.4	33.5±1.5	25.1±3.6	19.3±2.5	12.2±2.1

<sup>1</sup>ECA458 =  $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$

Ein besonders hoher Eisengehalt wurde in den lag-Phase Zellen beider Stämme bestimmt, die unter Eisenzusatz im Medium inkubiert wurden. Dieser war 50-fach höher als der Eisengehalt von Zellen, die ohne Zusatz inkubiert wurden. Auffällig ist, dass der Eisengehalt dieser Zellen in der

exponentiellen Phase um das 20-fache abnahm, da vermutlich mehr Eisen von den Zellen verbraucht wurde als aufgenommen werden konnte.

Wurden die Stämme ohne Zusatz oder mit 2.5  $\mu\text{M}$  DIP angezogen, so wurde zu Beginn des Wachstums in Zellen des Wildtyps ein 2-fach höherer Mangangehalt als in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante festgestellt, der im Laufe des Wachstums um ca. die Hälfte abnahm. Der Mangangehalt der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante blieb unter diesen Wachstumsbedingungen nahezu konstant. Unter Zusatz von 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  wurde in den Zellen der lag-Phase beider Stämme ein ähnlicher Mangangehalt festgestellt, der jedoch in den Zellen des Wildtyps im Verlaufe des Wachstums abnahm und in den Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante konstant blieb. Bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  war zu Beginn des Wachstums der Mangangehalt beider Stämme gleich, der bis zur stationären Phase um das 8-fache in den Wildtyp-Zellen zunahm und in den Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante dagegen nahezu konstant blieb.

**Tab. 7: Vergleich des Mangangehaltes in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und im *E. coli* Wildtyp innerhalb verschiedener Wachstumsphasen und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen**

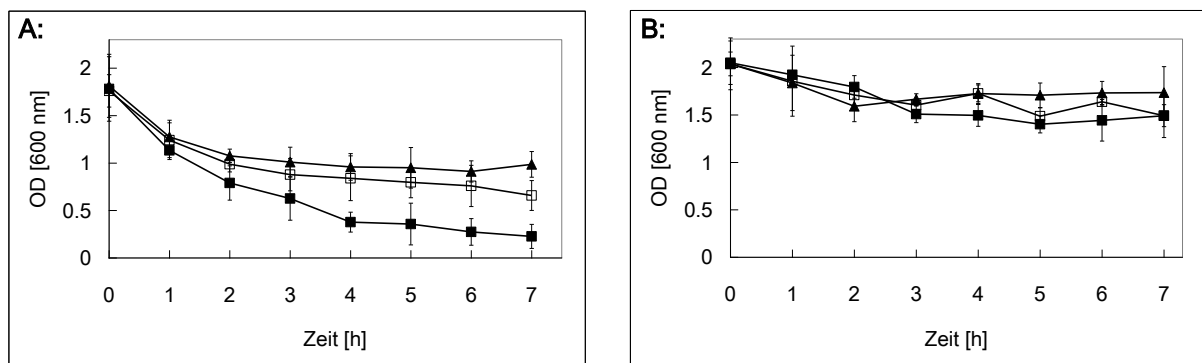
Wachstums-Phase Phase	lag-Phase		exponentielle Phase		stationäre Phase	
	W3110	ECA458 <sup>1</sup>	W3110	ECA458 <sup>1</sup>	W3110	ECA458 <sup>1</sup>
Mediumzusatz	[ng Mn/10 <sup>8</sup> Zellen]		[ng Mn/10 <sup>8</sup> Zellen]		[ng Mn/10 <sup>8</sup> Zellen]	
ohne	0.6±0.1	0.17±0.04	0.6±0.2	0.3±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1
2.5 $\mu\text{M}$ DIP	0.5±0.04	0.2±0.04	0.4±0.03	0.2±0.1	0.2±0.2	0.3±0.1
10 $\mu\text{M}$ $\text{FeSO}_4$	0.5±0.1	0.4±0.2	0.3±0.01	0.3±0.04	0.1±0.01	0.3±0.1
10 $\mu\text{M}$ $\text{MnCl}_2$	0.6±0.1	0.6±0.1	1.2±0.1	0.5±0.1	3.8±0.3	0.8±0.1
10 $\mu\text{M}$ $\text{FeSO}_4$ / 10 $\mu\text{M}$ $\text{MnCl}_2$	2.3±0.5	2.4±0.3	1.4±0.01	0.9±0.2	2.9±2.9	0.7±0.1

<sup>1</sup>ECA458 =  $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$

Wurden jedoch dem Medium beide Metalle hinzugeben, so wiesen die Zellen beider Stämme in der lag-Phase einen 4-fach höheren Mangangehalt auf, als Zellen derselben Wachstumsphase, die nur mit Mangan inkubiert wurden. Dieser Mangangehalt blieb bis zur stationären Phase in Wildtyp-Zellen nahezu konstant, wohingegen die Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in der stationären Phase einen 4-fach geringeren Mangangehalt aufwiesen als in der lag-Phase.

### 3.2.3. Mangan verleiht der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber Trockenstress

In Daly *et al.* (2004) wurde nachgewiesen, dass extreme Resistenz gegenüber Ionisierender Strahlung mit einem hohen Mangangehalt in *Deinococcus radiodurans* korreliert. *D. radiodurans* zeichnet sich nicht nur durch seine hohe Resistenz gegenüber Ionisierender Strahlung sondern auch durch seine hohe Resistenz gegenüber Trockenstress aus (Mattimore und Battista, 1996; Fredrickson *et al.*, 2008). Dadurch, dass Ionisierende Strahlung und Trockenstress ähnliche toxische Auswirkungen auf den Mikroorganismus haben, wurde in folgenden Experimenten der Einfluss von Mangan bzw. Eisen auf die Trockenstress-Resistenz der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp W3110 untersucht. Dazu wurden die Kulturen beider Stämme jeweils ohne Zusatz, mit Mangan- oder Eisenzusatz inkubiert. Um Trockenstress zu induzieren wurden diese Kulturen auf sterile Filterblättchen gegeben. Nach bestimmten Inkubationszeiten wurden diese Filterblättchen in Medium überführt und die Optische Dichte der Kulturen nach 16-stündigem Wachstum bestimmt. In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante sensibler gegenüber Trockenstress ist als der *E. coli* Wildtyp.



**Abb. 16: Eisen vermindert die Resistenz der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante gegenüber Trockenstress, aber nicht vom Wildtyp *E. coli* W3110**

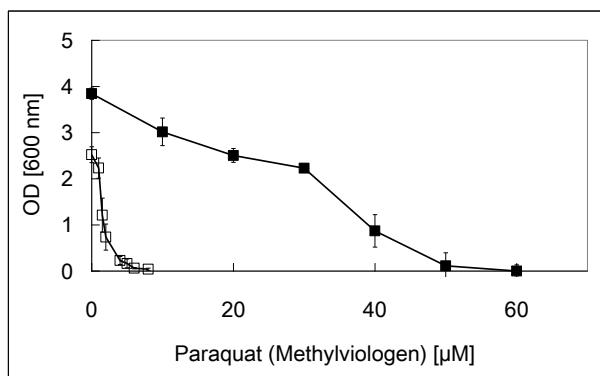
LB-Übernachtskulturen wurden 1:400 in Tris-MM verdünnt und ohne Zusatz (□), mit 10 µM MnCl<sub>2</sub> (▲) oder mit 10 µM FeCl<sub>3</sub> (■) für 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zügig in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> zweimal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die Kulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (A) und des *E. coli* Wildtyps (B) wurden so verdünnt, dass in 5 µl Suspension 10<sup>8</sup> Zellen enthalten waren. 10<sup>8</sup> Zellen/5 µl der Kulturen wurden auf sterile Filterblättchen gegeben und für unterschiedlich lange Zeiträume auf den Filtern inkubiert (1 bis 7 h). Anschließend wurden die Filter in 4 ml LB-Medium gegeben. Für den Zeitpunkt „0“ wurden 5 µl der Zellsuspension auf ein Filterblättchen getropft und sofort in 4 ml LB-Medium überführt. Die LB-Kulturen wurden für 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Optische Dichte bei 600 nm ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Unabhängig von den Anzuchtbedingungen resultierte eine 1-stündige Inkubation der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante auf dem Filterblättchen in einer verminderten Lebendzellzahl (Abb. 16A). Im Gegensatz zum *E. coli* Wildtyp, hier nahm die Lebendzellzahl nur geringfügig ab und änderte sich kaum bei andauerndem Trockenstress (Abb. 16B). Auch die Anzucht der Kulturen mit Mangan oder Eisen beeinflusste nicht die Resistenz gegenüber Trockenstress im *E. coli* Wildtyp. Dagegen konnte die Trockenstress-Resistenz der Eisen/Mangan-Aufnahme-

Mutante durch vorherige Inkubation der Kulturen mit Mangan bzw. Eisen beeinflusst werden. Wurden die Zellen mit  $\text{MnCl}_2$  inkubiert, so resultierte dies in einer verstärkten Resistenz gegenüber Trockenstress. Wurden jedoch die Zellen mit  $\text{FeCl}_3$  angezogen, so war die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante sensitiver gegenüber Trockenstress.

### 3.2.4. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist sensitiver gegenüber oxidativem Stress als *E. coli* Wildtyp W3110

Paraquat (Methylviologen) regeneriert durch univalente Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff Superoxid-Anionen im Cytoplasma von Zellen und steigert somit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Hassan und Fridovich, 1977; Fridovich, 1986a; Imlay, 2008). Durch Zugabe von Paraquat zum Medium können oxidative Stressbedingungen induziert werden, so dass die Resistenz gegenüber Paraquat Rückschlüsse über die Resistenz gegenüber oxidativem Stress zulässt. In Abbildung 17 ist das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp W3110 in Anwesenheit von Paraquat dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass schon geringe Konzentrationen von Paraquat das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante inhibierten. Unter Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  Paraquat zum Medium konnte kaum noch ein Wachstum festgestellt werden. Im Gegensatz dazu beeinflusste der Zusatz von 30  $\mu\text{M}$  Paraquat das Wachstum des *E. coli* Wildtypstammes kaum und erreichte eine Optische Dichte [OD<sub>600 nm</sub>] von 2.2. Somit scheint die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante deutlich sensitiver gegenüber oxidativem Stress zu sein als *E. coli* Wildtyp W3110.

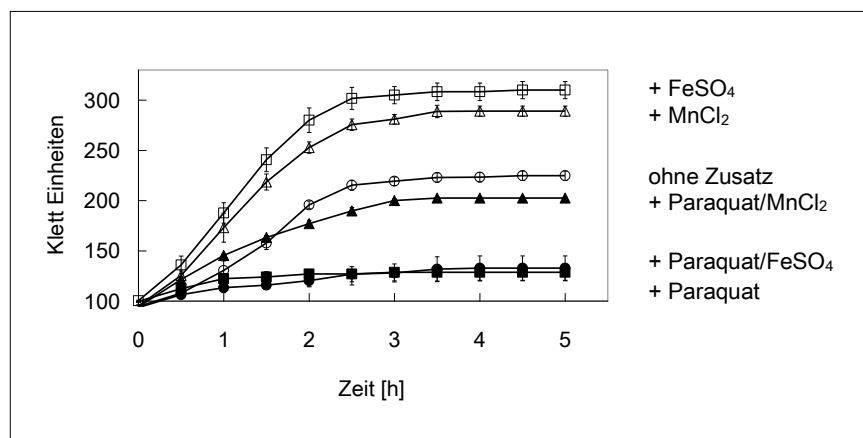


**Abb. 17: Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist sensitiver gegenüber oxidativem Stress als *E. coli* Wildtyp**  
Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Die Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ( $\square$ ) und des *E. coli* Wildtyps W3110 ( $\blacksquare$ ) wurden 1:400 in Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS und steigenden Paraquat-Konzentrationen verdünnt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Optische Dichte bei 600 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

#### 3.2.4.1. Mangan schützt die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vor oxidativem Stress

Im vorangegangenen Experiment wurde beobachtet, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante extrem sensitiv gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress ist. Kann eine Anzucht der Zellen mit Mangan oder Eisen diese Sensitivität gegenüber Paraquat und somit gegenüber oxidativem Stress vermindern und einen Schutz gegenüber reaktiver Sauerstoffverbindungen bieten? Abbildung 18 zeigt, dass der Zusatz von Paraquat das weitere Wachstum der Kulturen hemmte. Jedoch führte eine vorherige Inkubation der Zellen mit  $\text{MnCl}_2$  zu einer deutlichen Steigerung der Resistenz gegenüber Paraquat. Das Wachstum dieser Kultur ähnelte dem

Wachstum der Kultur, die ohne Zusatz und ohne Paraquat inkubiert wurde. Dabei verdoppelte sich die Zellzahl bis zum Erreichen der stationären Phase. Eine Inkubation der Vorkulturen mit  $\text{FeSO}_4$  veränderte nicht die Sensitivität der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante gegenüber Paraquat, hier konnte nach Zugabe von Paraquat kein Wachstum beobachtet werden. Diese Kultur verhielt sich genauso wie die Kultur, die ohne Zusätze zuvor inkubiert wurde. Wurde zu den Kulturen, die zuvor mit Mangan oder Eisen inkubiert wurden, keine Paraquat hinzu gegeben, so konnten die Ergebnisse der zeitabhängigen Wachstumsexperimente bestätigt werden (Abb. 15), denn ein Zusatz dieser Metalle verbesserte das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mangan, nicht Eisen, die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vor Paraquat-induziertem oxidativem Stress schützen kann.



**Abb. 18: Wachstum in Anwesenheit von Mangan erhöht die Resistenz gegenüber Paraquat-vermitteltem oxidativem Stress der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante**

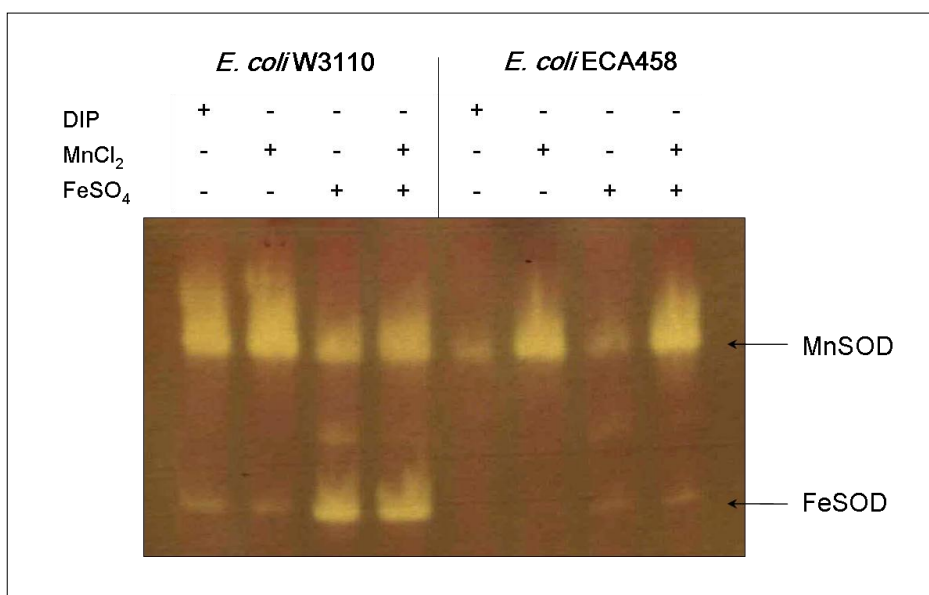
Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Die Mittelkulturen wurden 1:400 in Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS verdünnt und mit  $10 \mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (Vierecke), mit  $10 \mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  (Dreiecke) oder ohne Zusatz (Kreise) inkubiert. Das Zellwachstum erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  bis zum Erreichen von 100 Klett-Einheiten. Die Kulturen wurden gewaschen, auf dieselbe Zelldichte eingestellt und in zwei Ansätze aufgeteilt. Zu einem Ansatz wurde  $150 \mu\text{M}$  Paraquat hinzugegeben (volle Symbole), der andere blieb unbehandelt (leere Symbole). Das weitere Wachstum wurde mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

### 3.2.4.2. Die Manganhaltige Superoxid-Dismutase SodA scheint für den aeroben Metabolismus der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante essenziell zu sein

*E. coli* besitzt drei verschiedene Superoxid-Dismutasen, die sich u. a. in ihren Kofaktoren unterscheiden. Die manganhaltige (SodA)- und die eisenhaltige (SodB)-Superoxid-Dismutase sind im Cytoplasma lokalisiert, wohingegen SodC, die kupfer- und zinkhaltige Superoxid-Dismutase, im Periplasma lokalisiert ist (Fridovich, 1995; Imlay und Imlay, 1996; Miller, 2004). Die Superoxid-Dismutasen, insbesondere die cytoplasmatischen Enzyme SodA und SodB, übernehmen in *E. coli* eine wichtige Funktion im Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies.

Um zu erörtern, ob das durch Mangan hervorgerufene, verbesserte Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante mit einer erhöhten SodA-Aktivität im Zusammenhang steht, wurden die Superoxid-Dismutasen-Aktivitäten in Kulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des *E. coli* Wildtyps unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Stammte die

Proteinfraktion vom *E. coli* Wildtyp, der in Anwesenheit von DIP oder  $\text{MnCl}_2$  inkubiert worden war, so konnten große Mengen aktiver MnSOD (SodA) und nur geringe Mengen aktiver FeSOD (SodB) nachgewiesen werden (Abb. 19). Wurde der *E. coli* Wildtyp W3110 mit Eisen oder mit Eisen und Mangan inkubiert, so konnten ähnliche Aktivitäten von SodA und SodB beobachtet werden, wobei die SodA-Aktivität, im Vergleich zur Anzucht mit Mangan bzw. DIP, ab- und die SodB-Aktivität zunahm. Unter Eisenlimitation konnten in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nur sehr geringe SodA-Aktivitäten und keine SodB-Aktivitäten nachgewiesen werden.

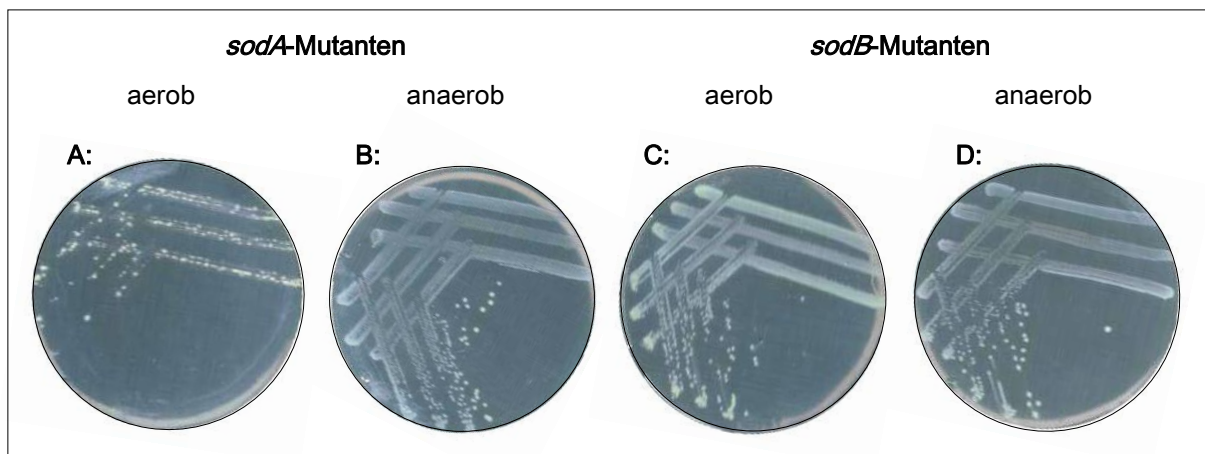


**Abb. 19: Die SodA-Aktivität der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante kann durch Manganzugabe stark gesteigert werden**  
Die Anzucht und Inkubation der *E. coli* Stämme erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Lösliche Proteinfraktionen wurden aus *E. coli* Wildtyp- und ECA458-Kultur gewonnen, die mit 2.5  $\mu\text{M}$  DIP, 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  oder mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  inkubiert wurden. Diese Proteinfraktionen wurden in einer 12.5%igen Nativen PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min im Dunkeln in 12.5 mg Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5 mg Riboflavin, gelöst in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , inkubiert. Die Radikalreaktion wurde durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  TEMED gestartet. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel dreier Wiederholungen des Experimentes.

Durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  zum Medium konnte eine gesteigerte SodA-Aktivität in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante beobachtet werden, jedoch keine SodB-Aktivität. Durch Inkubation der Kultur mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  konnte SodB, aber auch SodA, anhand der Aktivitätsfärbung nachgewiesen werden. Inkubierte man die Kulturen mit beiden Metallen, so konnten beide Superoxid-Dismutasen detektiert werden, dabei überwiegte die SodA-Aktivität im Vergleich zur SodB-Aktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (ECA458) nicht mehr in der Lage ist, genauso viel aktive Superoxid-Dismutasen zu bilden wie *E. coli* Wildtyp, jedoch kann durch Zugabe des entsprechenden Metall-Kofaktors die Aktivität erhöht werden. Unter diesen Bedingungen konnten vergleichbare Aktivitäten der SodA in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und im Wildtyp beobachtet werden. Die SodB-Aktivität konnte zwar gesteigert werden, erreichte aber nicht die SodB-Aktivität des Wildtyps. Die Ergebnisse des Zymogramms lassen die Notwendigkeit der manganhaltigen

Superoxid-Dismutase zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vermuten.

Die besondere Rolle von SodA in dieser Mutante wurde durch weiterführende Experimente deutlich. So konnte eine zusätzliche Deletion von *sodA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nur unter anaeroben Bedingungen erfolgreich erzielt werden (Abb. 20B). Wurden diese Deletionsmutanten (Abb. 20A) aerob inkubiert, so konnte kein homogenes Wachstum, sondern große und kleine Koloniemorphologien, beobachtet werden. Das Wachstum dieser Deletionsmutante [ECA585 ( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta sodA::kan$ )] schien unter aeroben Bedingungen stark beeinträchtigt zu sein. Im Gegensatz dazu konnte im *E. coli* Wildtyp diese Deletionsmutante unter aeroben Bedingungen ohne Probleme konstruiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 20: SodA scheint unter aeroben Wachstumsbedingungen in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante essenziell zu sein**

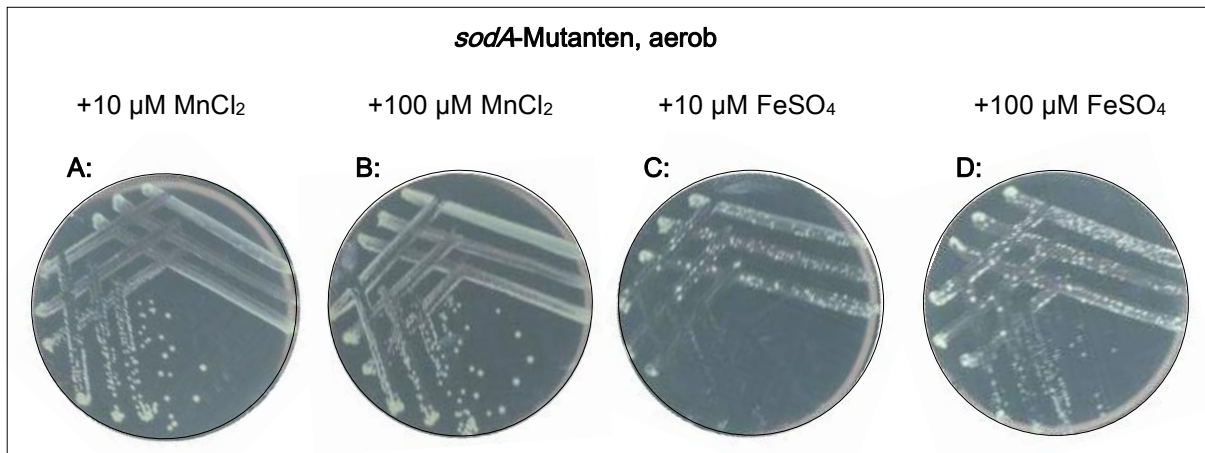
Nach zusätzlicher Deletion von *sodA* bzw. *sodB* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante wurde der *E. coli* Stamm ECA 585 ( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta sodA::kan$ ) unter Eisenlimitation aerob (A) und anaerob (B) inkubiert. Das gleiche Experiment wurde mit dem *E. coli* Stamm ECA586 ( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta sodB::kan$ ) aerob (C) oder anaerob (D) durchgeführt. Anaerobe Platten wurden bei 37°C für zwei Tage und aerobe bei 37°C für einen Tag inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel dreier Wiederholungen des Experimentes.

Eine Deletion des Gens der eisenabhängigen Superoxid-Dismutase SodB in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante war sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Wachstumsbedingungen möglich und wurde nach erneuter aerober (Abb. 20C) bzw. anaerober (Abb. 20D) Inkubation nicht beeinflusst. Dies konnte ebenfalls für die Deletion von *sodB* in *E. coli* W3110 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigen die Notwendigkeit der manganhaltigen Superoxid-Dismutase SodA in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante unter aeroben Bedingungen.

In einem weiterführenden Experiment wurde untersucht, ob ein Zusatz von Mangan nicht doch das Wachstum einer *sodA* Deletionsmutante unter aeroben Bedingungen ermöglicht. Wie in Abbildung 21A und B gezeigt werden kann, erlaubt bereits die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  ein aerobes Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die zusätzlich in *sodA* deletiert wurde.



Eisen dagegen ermöglichte nicht das Wachstum dieser Mutante, auch eine Erhöhung der Konzentration auf 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  führte nicht zum aeroben Wachstum dieses *E. coli* Deletionsstammes (Abb. 21C und D).

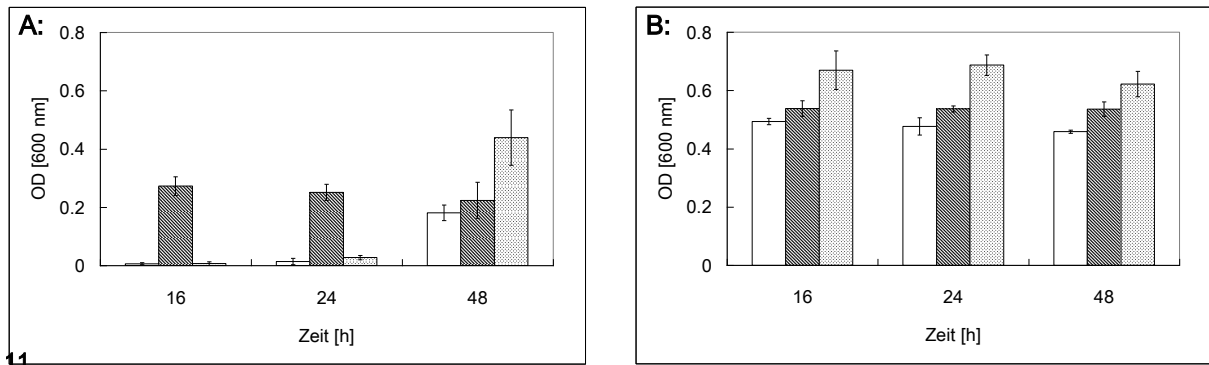


**Abb. 21: Mangan ermöglicht das aerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante mit zusätzlicher *sodA* Deletion**

Nach zusätzlicher Deletion von *sodA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante wurde der *E. coli* Stamm ECA 585 ( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta sodA::kan$ ) unter Eisenlimitation aerob in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  (A), 100  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  (B), 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (C) oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (D) über Nacht bei 37°C inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel dreier Wiederholungen des Experimentes.

### 3.2.5. Auch das anaerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante kann durch Mangan verbessert werden

In aeroben zeitabhängigen Wachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante durch Zugabe von Mangan erheblich verbessert werden konnte. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt nur unter aeroben Wachstumsbedingungen auftritt, wurden anaerobe Endpunktbestimmungen mit der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und dem *E. coli* Wildtypstamm durchgeführt. Nahezu anaerobe Wachstumsbedingungen wurden erzielt, indem als Kohlenstoffquelle Glucose im Medium verwendet und die *E. coli* Stämme als *deep cultures* kultiviert wurden. Als Medienzusätze dienten 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  oder 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ . Analog zu den zeitabhängigen Wachstumsexperimenten wurden auch hier Eisen-Mangelbedingungen geschaffen, indem Tris-MM ohne Eisen und mit desferriertem Casaminsäurehydrolysat verwendet wurde. Das Wachstum der verwendeten *E. coli* Stämme wurden nach 16, 24 und 48 h als Optische Dichte ermittelt. Wie in Abbildung 22A ersichtlich ist, wurde ebenfalls das anaerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante unter Zusatz von Mangan erheblich verbessert. Mit Mangan ist bereits nach 16 h die maximale Optische Dichte [OD 600 nm] von ca. 0.25 der Zellen erreicht. Wurden die Kulturen jedoch ohne Mediumzusatz angezogen, so wurde eine vergleichbare Optische Dichte erst nach 48 h erreicht. Unter Zusatz von  $\text{FeSO}_4$  im Medium erzielte die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante eine zwar weitaus höhere Optische Dichte, jedoch erst nach 48 h. Nach 16 und 24 h wurde das Wachstum unter Zusatz von Eisen kaum positiv beeinflusst.



**Abb. 22: Anaerobe Endpunktbestimmungen unter Eisen-Mangelbedingungen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 und des *E. coli* Wildtyps W3110 in Anwesenheit von Mangan oder Eisen**

Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Die Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (A) und des *E. coli* Wildtyps W3110 (B) wurden 1:400 in 16 ml Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS und mit 0.2 % Glucose verdünnt und ohne Zusatz (□), mit 10 µM MnCl<sub>2</sub> (▨) oder mit 10 µM FeSO<sub>4</sub> (▩) inkubiert. Anaerobe Milieubedingungen wurden erreicht, indem Glucose als C-Quelle und 15 ml Kulturröhrchen mit festen Schraubverschlüssen als Anzuchtgefäße verwendet wurden. Das Zellwachstum erfolgte bei 37°C für 16, 24 und 48 h. Anschließend wurde die Zelldichte als OD [600 nm] ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

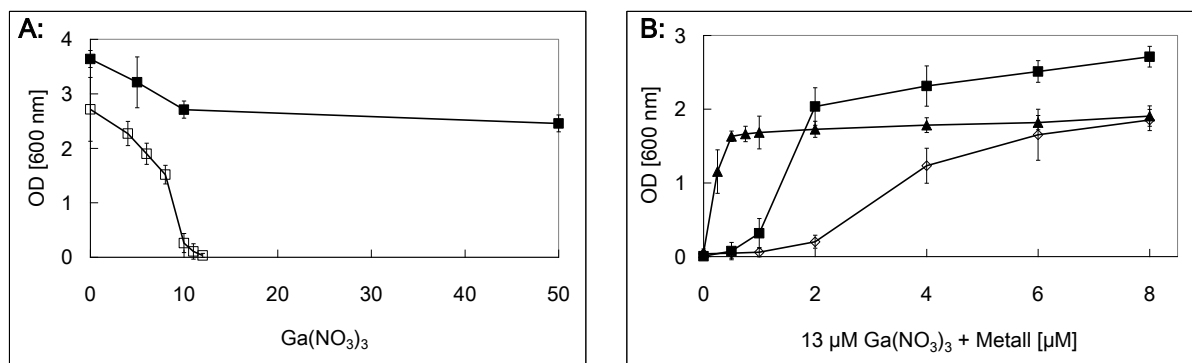
Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass nicht nur das aerobe Wachstum, sondern ebenfalls das anaerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante durch Zugabe von Mangan erheblich verbessert werden konnte. Dagegen wurde das anaerobe Wachstum des *E. coli* Wildtypstammes W3110 durch Zusatz von MnCl<sub>2</sub> oder FeSO<sub>4</sub> nicht beeinflusst (Abb. 22B). Vermutlich spielt unter diesen Bedingungen Mangan eine wesentliche Rolle in der Stressbewältigung.

### 3.2.6. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist sensitiver gegenüber dem Fe(III)-Antagonist Gallium als *E. coli* Wildtyp W3110

Durch den Einsatz von Gallium kann extreme Eisenlimitation simuliert werden (Kaneko *et al.*, 2007). Was geschieht, wenn Zellen, die ständig Eisenmangel ausgesetzt sind, wie die der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, in Anwesenheit von Gallium angezogen werden? Um dies zu untersuchen, wurde die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) der Mutante und des *E. coli* Wildtyps in Flüssigkulturen bestimmt.

In Abbildung 23A ist zu erkennen, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Wachstums-Endpunktbestimmungen sensitiver gegenüber Gallium war als der Wildtyp und eine MIC von 13 µM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> besaß. Die genaue Minimale Inhibitor-Konzentration für *E. coli* Wildtyp konnte nicht bestimmt werden, da Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> in hohen Konzentrationen in Tris-MM präzipitierte. Die MIC liegt jedoch jenseits von 200 µM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Um zu untersuchen, ob durch Zugabe von Mangan oder Eisen die Wachstums-Inhibierung durch Gallium wieder aufgehoben werden kann, wurden Wachstums-Endpunktbestimmungen in Anwesenheit von 13 µM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> und gleichzeitiger Titration steigender Konzentrationen von MnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> oder FeCl<sub>3</sub> (Abb. 23B) durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass schon geringe MnCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (0.25 µM) zum Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Gegenwart von Gallium genügte. Wurde

Eisen hinzu titriert, musste 4-fach höhere Konzentrationen an  $\text{FeSO}_4$  bzw. 8-fach mehr  $\text{FeCl}_3$  eingesetzt werden, um ein ähnliches Wachstumsverhalten der *E. coli* Mutante wie in Gegenwart von Gallium und  $\text{MnCl}_2$  erzielen zu können. Interessanterweise förderte die Zugabe höherer Konzentrationen von  $\text{FeSO}_4$ , jedoch nicht von  $\text{MnCl}_2$ , das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, wodurch ansteigende Optische Dichten nach 24-stündiger Inkubation erzielt wurden.



**Abb. 23: Gallium inhibiert das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante stärker als das des Wildtyps; sowohl Eisen- als auch Manganzugabe kann die Wachstums-Inhibierung durch Gallium aufheben**

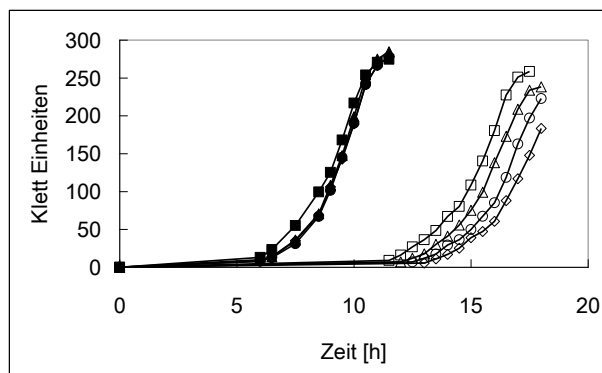
Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben jedoch in Tris-MM. Die Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (□) und des *E. coli* Wildtyps W3110 (■) wurden 1:400 in Tris-MM und steigenden  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -Konzentrationen verdünnt (A). In (B) wurde die Mittelkultur der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante 1:400 in Tris-MM mit 13  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  und steigenden Konzentrationen von  $\text{MnCl}_2$  (▲),  $\text{FeSO}_4$  (■) oder  $\text{FeCl}_3$  (◇) verdünnt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung der OD [600 nm]. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Als Kontrolle wurden Wachstums-Endpunktbestimmungen in Anwesenheit von 13  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  und steigenden Konzentrationen von  $\text{ZnCl}_2$  durchgeführt. Durch Zink-Zugabe konnte jedoch kein Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl Mangan als auch Eisen konnten im unterschiedlichen Maße spezifisch die Wachstums-Inhibierung durch Gallium wieder aufheben. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Zusammenspiel von Gallium und Eisen-Homöostase komplexer ist als bisher angenommen.

### 3.2.6.1. Gallium verringert nicht den intrazellulären Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des *E. coli* Wildtyps

Weshalb inhibiert Gallium das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante? Blockiert es die noch vorhandenen, unbekanntenen Eisen-Aufnahme-Systeme und verstärkt so Eisenlimitation, so wie es für *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen wurde (Kaneko *et al.*, 2007)? Oder wirkt Gallium als Fe-Substituent vorwiegend intrazellulär? Um dies zu untersuchen, wurde der intrazelluläre Gallium- und Eisengehalt von Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des *E. coli* Wildtyps, die mit verschiedenen Gallium-Konzentrationen inkubiert wurden, bestimmt. Dazu wurden Gallium-Konzentrationen gewählt, in deren Anwesenheit noch Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu beobachten war. In Abbildung 24 ist das Wachstum der

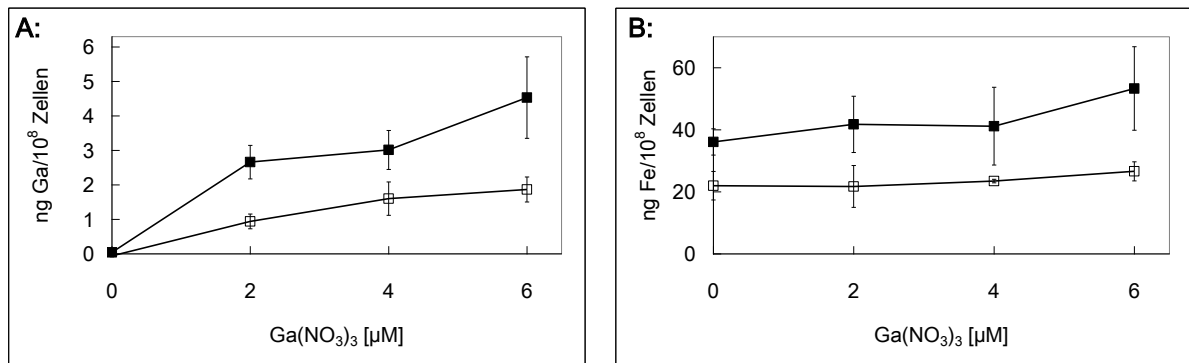
Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des *E. coli* Wildtyps in Tris-MM ohne Gallium und in Anwesenheit von 2, 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  gezeigt.



**Abb. 24: Bereits geringe Gallium-Konzentrationen hemmen das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante**

Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 23 beschrieben. Die Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (leere Symbole) und des *E. coli* Wildtyps (volle Symbole) wurden 1:400 in 10 ml Tris-MM verdünnt und ohne Zusatz ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ), mit 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ), mit 4  $\mu\text{M}$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  ( $\diamond$ ;  $\blacklozenge$ ) inkubiert. Das Zellwachstum erfolgte bei 37°C und wurde kontinuierlich bis zum Erreichen der stationären Phase mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Wie schon vorangegangene Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, ist die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante gegenüber Gallium sensitiver als der *E. coli* Wildtyp. Schon die Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  verminderten das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. In Gegenwart von 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  wurde das Wachstum zwar zunehmend vermindert, erfolgte jedoch noch. Bei diesen Konzentrationen sollte sich also Galliumstress gut untersuchen lassen. Das Wachstum des *E. coli* Wildtyps wurde in Anwesenheit dieser Gallium-Konzentrationen nicht beeinflusst. Zur Bestimmung des intrazellulären Gallium- bzw. Eisengehaltes wurden stationäre Zellen beider *E. coli* Stämme, deren Wachstum ohne Zusatz und mit 2, 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  erfolgte, geerntet, gewaschen und der Metallgehalt in  $10^8$  Zellen in der *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS) bestimmt. In Abbildung 25A ist ersichtlich, dass sowohl in *E. coli* Wildtyp-Zellen als auch in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante die intrazelluläre Gallium-Konzentration zunimmt, wenn diese mit steigenden Gallium-Konzentrationen inkubiert wurden. Jedoch war der intrazelluläre Galliumgehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante um ca. ein Drittel geringer als in *E. coli* Wildtyp-Zellen. Darüber hinaus veränderte sich der intrazelluläre Galliumgehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die mit 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  inkubiert wurden, nur wenig. Hier wurden ca. 1.6 und 1.86 ng Ga/ $10^8$  Zellen nachgewiesen. In Zellen des *E. coli* Wildtyps dagegen konnte eine eindeutige Erhöhung des Galliumgehaltes unter diesen Bedingungen festgestellt werden, hier betrug der intrazelluläre Galliumgehalt in  $10^8$  Zellen ca. 3 und 4.5 ng. Da in Zellen des *E. coli* Wildtyps mehr Gallium nachgewiesen wurde als in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, wird die Annahme bestärkt, dass Gallium über Eisen-Aufnahme-Systeme in die Zelle gelangen könnte. Um zu untersuchen, ob Gallium die Eisen-Aufnahme beeinflusst, wurde ebenfalls der intrazelluläre Eisengehalt dieser Zellen bestimmt. Dabei wurden vorangegangene Ergebnisse bestätigt, denn der intrazelluläre Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante war stets geringer als der Eisengehalt in Zellen des *E. coli* Wildtyps (Abb. 25B).



**Abb. 25: Gallium beeinflusst nicht den intrazellulären Eisengehalt stationärer Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante**

Nach erfolgtem Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (□) und des *E. coli* Wildtyps (■) in Gegenwart von 0, 2, 4 oder 6 μM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> wurden die Kulturen in der stationären Phase geerntet, gewaschen und von 10<sup>8</sup> Zellen der (A) intrazelluläre Galliumgehalt und (B) intrazelluläre Eisengehalt durch ICP-MS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

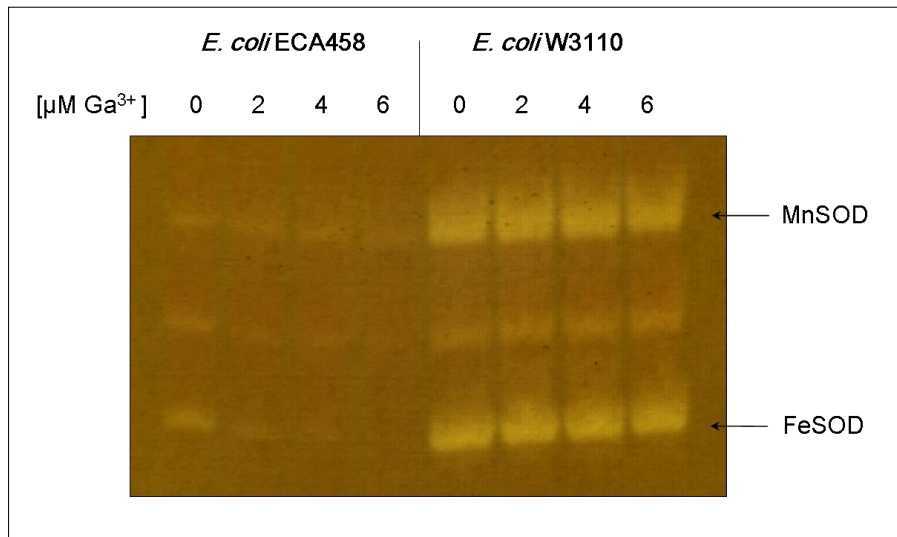
Zudem beeinflusste eine Inkubation mit Gallium den intrazellulären Eisengehalt in stationären Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nicht und betrug ca. 22 ng Fe/10<sup>8</sup> Zellen. Dagegen wurde in Anwesenheit von 6 μM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> in Zellen des *E. coli* Wildtyps mit etwa 53 ng ein um ca. die Hälfte erhöhter Eisengehalt festgestellt als in Zellen, die ohne Gallium inkubiert wurden, hier wurden ca. 36 ng Fe/10<sup>8</sup> Zellen ermittelt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die durch Gallium hervorgerufene Wachstums-Inhibition der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nicht durch eine verminderte Eisen-Aufnahme verursacht wird. Jedoch scheint es einen Zusammenhang zwischen einem verminderten intrazellulären Eisengehalt und erhöhter Sensitivität gegenüber Gallium zu geben.

### 3.2.6.2. Gallium führt zu einer verminderten FeSOD (SodB)-Aktivität in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante

In Beriault *et al.* (2007) wurde erstmalig Gallium-induzierter oxidativer Stress in *Pseudomonas fluoreszenz* beschrieben. Um zu untersuchen, ob die wachstumsinhibierende Wirkung von Gallium in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante durch oxidativen Stress verursacht wird, wurde die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Tris-MM ohne Gallium bzw. mit 2, 4 oder 6 μM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> bis 100 Klett inkubiert, anschließend lösliche Proteinfractionen präpariert und die SOD-Aktivitäten im Zymogramm untersucht. Wie in Abbildung 18, konnten auch hier im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp nur geringe Mengen aktiver Superoxid-Dismutasen in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante beobachtet werden (Abb. 26). Des Weiteren ist bemerkenswert, dass in Proteinfractionen von Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die mit 4 oder 6 μM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> inkubiert wurden, kaum noch aktive FeSOD (SodB) nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz dazu wurden ähnliche, jedoch geringe MnSOD (SodA)-Aktivitäten in jeder Proteinfractionen beobachtet. In Zellen des *E. coli* Wildtyps konnten ähnliche SOD-Aktivitäten nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob *E. coli* Wildtyp-Zellen mit oder ohne Gallium inkubiert wurden.



**Abb. 26: Gallium führt zu einer verringerten SodB-Aktivität in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, jedoch nicht in *E. coli* Wildtyp-Zellen**

Die Anzucht und die Inkubation der *E. coli* Stämme erfolgte wie unter Abb. 22 beschrieben bis 100 Klett-Einheiten. Lösliche Proteinfractionen wurden aus *E. coli* ECA458- bzw. Wildtyp-Kultur gewonnen, die ohne Zusatz, mit 2, 4 oder 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  inkubiert wurden und in einer 12.5%ige Nativen PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde 20 min im Dunkeln in 12.5 mg NBT und 5 mg Riboflavin, gelöst in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , inkubiert. Die Radikalreaktion wurde durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  TEMED gestartet. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel dreier Wiederholungen des Experimentes.

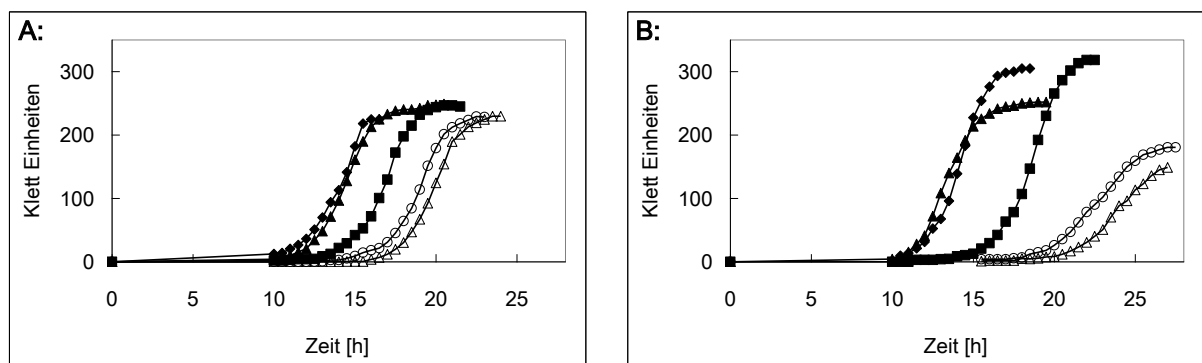
Diese Ergebnisse zeigen, dass steigende Gallium-Konzentrationen in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu einer verminderten und letztendlich, in Anwesenheit von 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , zum Verlust einer aktiven SodB führte. Die Folgeerscheinung ist wahrscheinlich zunehmender oxidativer Stress in diesen Zellen. Dies könnte eine mögliche Ursache für das inhibierte Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von Gallium darstellen.

### 3.2.7. PitA ist vermutlich ein weiterer unspezifischer Eisen-Transporter im *E. coli* Stamm ECA458( $\Delta\text{fecA-E}$ $\Delta\text{feoABC}$ $\Delta\text{mntH}$ $\Delta\text{zupT}$ $\Delta\text{entC}$ )

#### 3.2.7.1. Die Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verursacht vermindertes Wachstum unter Eisenlimitation

Alle bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, der alle, unter diesen Wachstumsbedingungen relevanten, Eisen- und Mangan-Aufnahme-Systeme fehlen, noch in der Lage ist, Eisen und Mangan aufzunehmen. Aber welche zusätzlichen Transporter sind für die Eisen- bzw. Mangan-Aufnahme im *E. coli* Stamm ECA458 verantwortlich? Um diese Frage zu erörtern, wurden Gene potentieller Kandidaten, die für eine Metall-Aufnahme verantwortlich sein könnten, zusätzlich deletiert und in weiterführenden Experimenten der Einfluss dieser Deletionen untersucht. Zu den potentiellen Kandidaten zählten CorA und PitA. Würden diese Transporter den Eisen- bzw. Mangan-Transport in der *E. coli* Deletionsmutante ECA458 vermitteln, so würde eine zusätzliche Deletion von *pitA* oder *corA* eine Verminderung des Wachstums unter Eisenlimitation verursachen. Diese Deletionsmutanten ECA588( $\Delta\text{fecA-E}$

$\Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta pitA::cat$ ) und ECA484( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta corA::cat$ ) wurden in zeitabhängigen Wachstumsexperimenten unter Eisen-Mangelbedingungen untersucht. Dabei zeigte die zusätzliche Deletion von *corA* keinen Einfluss auf das Wachstum der Kulturen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die zusätzliche Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu einem stark verminderten Wachstum. Dabei trat die Deletionsmutante ECA588 etwa fünf Stunden später als die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in die exponentielle Phase ein (Abb. 27). Das Wachstum wurde durch Zugabe von 2.5  $\mu\text{M}$  DIP zunehmend verschlechtert. Zwar wurde das Wachstum dieser *pitA* Deletionsmutante durch Zusatz von 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  zum Medium verbessert, jedoch nicht im selben Maße wie das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante unter diesen Bedingungen. Auffallend war jedoch, dass die *pitA* Deletionsmutante in der stationären Phase höhere Zelldichten erzielte als der Stamm ECA458. Bereits 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  führten wie im Stamm ECA458 zu einer erheblichen Verbesserung des Wachstums des *pitA* Deletionsstammes und zu vergleichbaren Zelldichten. Wurden beide Metalle, Mangan und Eisen, zum Medium hinzugefügt, so verbesserte sich das Wachstum kaum, lediglich die Zelldichten in den stationären Phasen waren unter dieser Bedingung höher als die Zelldichten der Kulturen, die nur mit Mangan inkubiert wurden (Abb. 27B). Somit scheint PitA nicht für die Mangan-Aufnahme in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verantwortlich zu sein. Jedoch deuten die Daten darauf hin, dass PitA an der Eisen-Aufnahme im *E. coli* Deletionsstamm ECA458 beteiligt sein könnte. Trotz Deletion von *pitA* konnte das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 in Anwesenheit von Eisen verbessert werden. Dies lässt auf das Vorhandensein mindestens eines weiteren unbekanntem Eisen-Transporters vermuten.



**Abb. 27: Einfluss einer zusätzlichen Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante unter Eisen-Mangelbedingungen in Anwesenheit von Mangan und Eisen**

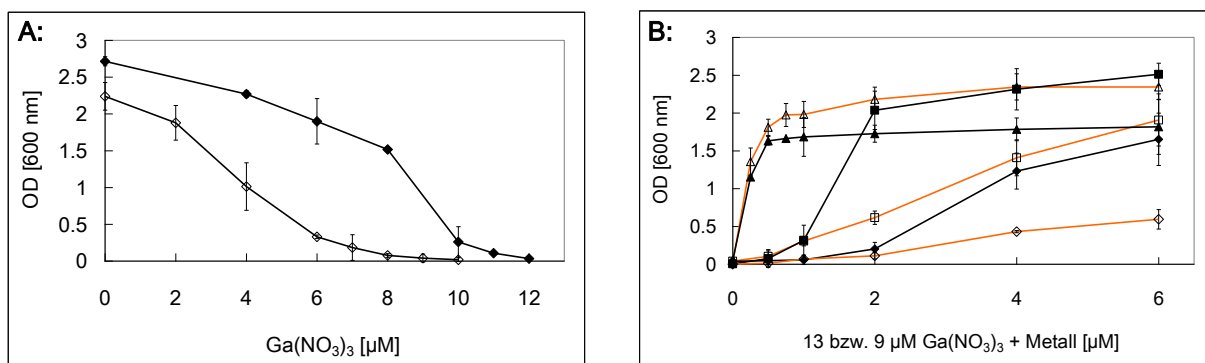
Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Die Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (A) und Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante mit zusätzlicher *pitA* Deletion (B) wurden 1:400 in 10 ml Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS verdünnt und ohne Zusatz ( $\circ$ ), mit 2.5  $\mu\text{M}$  2,2-Dipyridyl ( $\Delta$ ), mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  ( $\blacksquare$ ), mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  ( $\blacktriangle$ ) oder mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  ( $\blacklozenge$ ) inkubiert. Das Zellwachstum erfolgte bei 37°C und wurde kontinuierlich bis zum Erreichen der stationären Phase mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

### 3.2.7.2. Die Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante führt zur erhöhten Sensitivität gegenüber dem Fe(III)-Antagonisten Gallium

Da Gallium Eisenlimitation verstärkt, wurde untersucht, ob die Abwesenheit von PitA im Stamm ECA588 einen negativen Einfluss auf das Wachstum in Anwesenheit von Gallium hat. Hierzu wurde im Vergleich zur Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante die Minimale Inhibitor-Konzentration für Galliumnitrat für diesen *E. coli* Deletionsstamm in Wachstums-Endpunktbestimmungen bestimmt. Abbildung 28A zeigt, dass der Deletionsstamm ECA588( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mnth \Delta zupT \Delta entC \Delta pitA::cat$ ) eine erhöhte Sensitivität gegenüber Galliumnitrat aufwies als die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Bereits 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  führten zu einem um die Hälfte vermindertem Wachstum. Für eine vergleichbare starke Hemmung des Wachstums waren im PitA positiven Stamm ECA458 etwa die doppelte Konzentration, ca. 8  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , nötig. Demzufolge führt eine zusätzliche Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Gallium. Diese unterschiedliche Gallium-Sensitivität wird ebenfalls durch die verschiedenen Minimalen Inhibitor-Konzentrationen deutlich. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 besitzt eine MIC von 13  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , wohingegen die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die zusätzlich in *pitA* deletiert ist, eine MIC von nur 9  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  besitzt.

Weiterführend wurde in Wachstums-Endpunktbestimmungen untersucht, inwiefern durch Zugabe von  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  oder  $\text{FeCl}_3$  das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 in Anwesenheit von 9  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  wiederhergestellt werden konnte (Abb. 28B).

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Wachstums-Endpunktbestimmung der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 in Gegenwart von Gallium, führten auch hier schon geringe Konzentrationen von  $\text{MnCl}_2$  im Medium zum Wachstum des *E. coli pitA* Deletionsstammes.



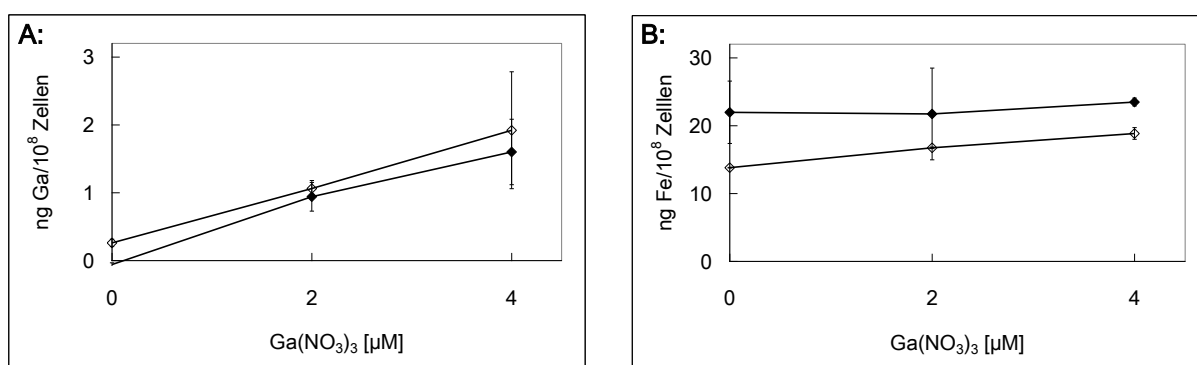
**Abb. 28: Wachstumsverhalten der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des Stammes ECA588( $\Delta pitA$ ) in Anwesenheit vom Fe(III)-Antagonisten  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  und Aufhebung des inhibitorischen Ga-Effekts durch Metall-Titrering**

Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 23 beschrieben. Die Mittelkulturen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (◆) und des *E. coli* Stammes ECA588 (◇) wurden 1:400 in 4 ml Tris-MM und steigenden  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  Konzentrationen verdünnt (A). In (B) wurde die Mittelkultur der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (volle Symbole) und des *E. coli* Stammes ECA588 (leere Symbole) in 4 ml Tris-MM mit 13  $\mu\text{M}$  bzw. 9  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  und steigenden Konzentrationen von  $\text{MnCl}_2$  (▲, △),  $\text{FeSO}_4$  (■, □) oder  $\text{FeCl}_3$  (◆, ◇) verdünnt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung der OD [600 nm]. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.



Jedoch mussten höhere Konzentrationen von  $\text{FeSO}_4$  zum Medium hinzugefügt werden, um ein verbessertes Wachstum zu erreichen. In Anwesenheit von  $2 \mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  konnte gerade eine Zelldichte OD [600 nm] von 0.6 festgestellt werden, wohingegen die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458 eine Zelldichte von 2 erreichte. Ähnliches konnte in Anwesenheit von  $\text{FeCl}_3$  beobachtet werden. Der Zusatz von  $6 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  zum Medium verbesserte zwar das Wachstum des *pitA* Deletionsstammes ECA588, jedoch war im Vergleich zur Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante die Optische Dichte um das 3-fache vermindert. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PitA unter diesen Bedingungen Eisen transportiert. An der Mangan-Aufnahme scheint PitA jedoch nicht beteiligt zu sein.

Die Bestimmung des intrazellulären Gallium- und Eisengehaltes durch ICP-MS sollte einen Aufschluss darüber geben, weshalb durch Deletion von *pitA* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Gallium in Wachstums-Endpunktbestimmungen beobachtet wurde. Dazu wurde die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und der *E. coli* Stamm mit zusätzlicher *pitA* Deletion (ECA588) in Tris-MM ohne Zusatz und mit 2 oder  $4 \mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  inkubiert, Zellen der stationären Phase geerntet, gewaschen und der Gallium- und Eisengehalt von  $10^8$  Zellen bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 29A veranschaulichen, dass ähnliche Mengen von Gallium in stationären Zellen beider Stämme vorhanden war, jeweils abhängig von der Gallium-Konzentration im Medium. Demnach wurde mehr Gallium in solchen Zellen beider Stämme nachgewiesen, deren Wachstum in Gegenwart von  $4 \mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  stattfand als in Zellen, die ohne Gallium inkubiert wurden. Dies zeigt, dass sowohl die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante als auch der *E. coli* Stamm mit zusätzlicher *pitA* Deletion (ECA588) ähnliche Mengen an Gallium akkumulierten. Wie bereits in vorangegangenen Versuchen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wurde der intrazelluläre Eisengehalt der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante durch Anwesenheit von Gallium nicht beeinflusst. Dies konnte ebenfalls für den Deletionsstamm ECA588 beobachtet werden.



**Abb. 29: Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Gallium korreliert vermutlich mit einer verminderten Eisen-Aufnahme, verursacht durch die Deletion von *pitA***

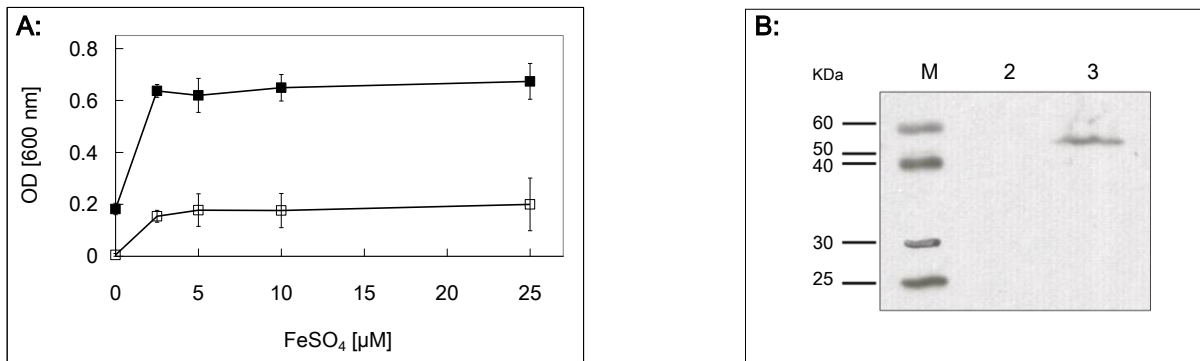
Nach erfolgtem Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (♦) und des Deletionsstammes ECA588 (◇) in Gegenwart von 0, 2, oder  $4 \mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  wurden die Kulturen in der stationären Phase geerntet, gewaschen und von  $10^8$  Zellen der (A) intrazelluläre Galliumgehalt und (B) intrazelluläre Eisengehalt durch ICP-MS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Jedoch wurde in stationären Zellen des Deletionsstammes ECA588 unter allen Wachstumsbedingungen ein niedrigerer Eisengehalt nachgewiesen als in stationären Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (Abb. 29B). Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Phosphat-Aufnahme-System PitA unspezifisch Eisen in das Cytoplasma transportiert. Ferner deuten die Daten darauf hin, dass eine *pitA* Deletion erhöhte Sensitivität gegenüber Gallium verursacht, die mit einem verminderten intrazellulären Eisengehalt korreliert.

### 3.2.7.3. Die Expression von *pitA* in *trans* im Deletionsstamm ECA588 führt zum verbesserten Wachstum unter Eisenlimitation

Um weitere Hinweise zu erhalten, ob PitA als *low affinity* Phosphat-Aufnahme-System für die unspezifische Eisen-Aufnahme in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verantwortlich sein könnte, wurde untersucht, ob das Wachstumsdefizit, verursacht durch zusätzliche Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, durch eine Komplementation von *pitA* in *trans* wieder aufgehoben werden kann. Dazu wurde *pitA* in den Expressionsvektor pASK-IBA3 so kloniert, dass die Expression von *pitA* unter der Kontrolle des *tetAp* Promotors stand, sodass die Expression von *pitA* durch AHT induziert werden konnte. Jedoch hemmte AHT das Wachstum dieses *E. coli* Stammes auf unbekannte Weise, so dass auf eine Induktion mit AHT verzichtet werden musste. Um dennoch eine Komplementation von *pitA* in *trans* erzielen zu können, wurde *pitA* mit zugehöriger Promotorregion in den Expressionsvektor pASK-IBA3<sup>+</sup> kloniert, um eine konstitutive Expression zu ermöglichen (Harris *et al.*, 2001). Der Deletionsstamm ECA588 wurde mit dem so konstruierten Plasmid pECD1096(pASK-IBA3<sup>+</sup>::*pitA*<sub>Prom.</sub>) transformiert und das Wachstum dieses *E. coli* Stammes unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Als Negativkontrolle diente dabei der Deletionsstamm ECA588 mit Leervektor. In Abbildung 30A wird deutlich, dass der Deletionsstamm ECA588 mit *pitA* in *trans* gegenüber der Negativkontrolle ein verbessertes Wachstum unter Eisenlimitation aufwies. Nach 20-stündigem Wachstum unter Eisenlimitation erreichte der Deletionsstamm, der *pitA* in *trans* exprimierte, eine Optische Dichte [OD 600 nm] von ca. 0.2, wohingegen der Kontrollstamm kaum Wachstum zeigte. Durch Zugabe von 2.5 µM FeSO<sub>4</sub> zum Medium konnte zwar das Wachstum beider *E. coli* Stämme verbessert werden, jedoch war die Optische Dichte [OD 600 nm] von ca. 0.6 des *E. coli* Deletionsstammes mit *pitA* in *trans* um das 4-fache höher als die Optische Dichte der Negativkontrolle.

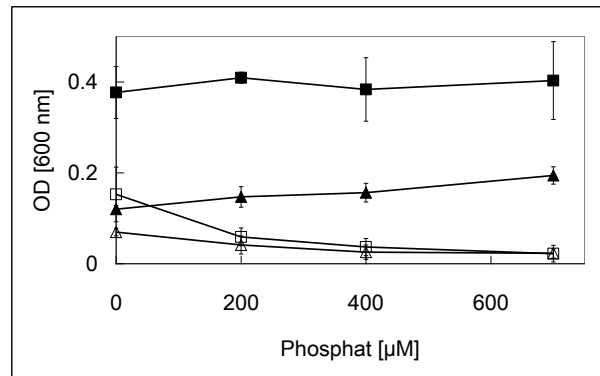
Durch Zugabe höherer Konzentration von FeSO<sub>4</sub> konnte jedoch das Wachstum sowohl der Positiv- als auch der Negativkontrolle nicht gesteigert werden. Um zu zeigen, dass das PitA-Protein in den Mutantenzellen synthetisiert wurde, wurde PitA als *Strep-tag*®II Fusionsprotein in der Membranfraktion des Deletionsstammes ECA588 mit *pitA* in *trans* exprimierte, durch Immunoblot nachgewiesen (Abb. 30B).



**Abb. 30: Komplementation von *pitA* in *trans* im Deletionsstamm ECA588 führt zu einem verbesserten Wachstum in Anwesenheit von Eisen**

Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben, jedoch mit Ampicillin. (A) Die Mittelkulturen des Deletionsstammes ECA588 mit Leervektor (□) und mit *pitA* in *trans* (■) wurden 1:400 in 4 ml Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS verdünnt und mit steigenden FeSO<sub>4</sub>-Konzentrationen versetzt. Nach 20-stündigem Wachstum bei 37°C wurde die Optische Dichte [OD 600 nm] bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen. (B:) Die Kulturen wurden 1:400 in 100 ml Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS verdünnt bis 100 Klett bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden Membranfraktionen gewonnen und 50 µg Membran des Deletionsstammes ECA588 mit Leervektor (2) bzw. mit *pitA* in *trans* (3) in einer 12.5%igen SDS-PAGE aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch Bindung des *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugates an das Fusionsprotein. Zur Größenbestimmung wurde der *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*, MBI Fermentas, (St. Leon-Rot) (Spur M) verwendet.

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass durch PitA Metalle in Form von Metall-Phosphat-Komplexen in die Zelle gelangen (van Veen *et al.*, 1994). Demzufolge könnte PitA vermutlich Eisen in Form von Eisen-Phosphat-Komplexen transportieren. Um zu erörtern, inwieweit die Phosphat-Konzentration den PitA-vermittelten Eisen-Transport beeinflusst, wurde das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 mit *pitA* in *trans* und zugehöriger Negativkontrolle sowohl in An- und Abwesenheit von Phosphat als auch in An- und Abwesenheit von Eisen untersucht. Dazu wurden in Wachstums-Endpunktbestimmungen phosphatfreies Tris-MM und phosphatfreies Tris-MM ohne Eisen und mit desferriertem CAS verwendet und steigende Phosphat-Konzentrationen zum Medium hinzugegeben. In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass der Deletionsstamm ECA588 mit *pitA* in *trans* sowohl in phosphatfreiem Tris-MM als auch in phosphatfreiem Tris-MM ohne Eisen und mit desferriertem CAS verbessertes Wachstum aufwies als die zugehörige Negativkontrolle. Des Weiteren war zu beobachten, dass in Anwesenheit von Eisen der Deletionsstamm mit *pitA* in *trans* nach 20-stündiger Inkubation eine höhere Optische Dichte erzielte als unter Eisenlimitation. Die Zelldichte blieb jedoch in Anwesenheit steigender Phosphat-Konzentrationen unverändert. Erfolgte dagegen das Wachstum dieses *E. coli* Stammes mit *pitA* in *trans* in phosphatfreiem Medium unter Eisenlimitation, so war das Wachstum in Anwesenheit von 700 µM Phosphat um ca. das Doppelte erhöht.



**Abb. 31: Der PitA-vermittelte Eisen-Transport ist weitgehend unabhängig von der Phosphat-Konzentration im Medium**

Die Anzucht der Vor- und Mittelkulturen erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben, jedoch in phosphatfreiem Tris-MM als auch in phosphatfreiem Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS und mit Ampicillin. Die Mittelkulturen des Deletionsstammes ECA588 mit Leervektor (leer Symbole) und mit *pitA* in *trans* (volle Symbole) wurden erneut 1:400 in 4 ml phosphatfreiem Tris-MM (■, □) bzw. phosphatfreiem Tris-MM ohne Eisen, mit desferriertem CAS (▲, △) verdünnt und mit steigenden Phosphat-Konzentrationen versetzt. Nach 20-stündigem Wachstum bei 37°C wurde die Optische Dichte [OD 600 nm] bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Interessanterweise wurde das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 mit Leervektor auf eine andere Art und Weise durch Phosphat beeinflusst. Sowohl in Anwesenheit von Eisen als auch unter Eisenlimitation führte die Zugabe steigender Phosphat-Konzentrationen zum Medium zu einem verringerten Wachstum. Vermutlich wurde durch die Anwesenheit von Phosphat als Kationen-Chelator im Medium Eisenlimitation verstärkt, da dieser PitA-negative Stamm, nicht in der Lage war, Eisen-Phosphat-Komplexe aufzunehmen und Phosphat in diesem Fall die Konzentration an freiem Eisen zunehmend verringerte. Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PitA in der Lage ist, Eisen zu transportieren. Für diesen Prozess scheinen sehr geringe Phosphat-Konzentrationen ausreichend zu sein.

## 4. Diskussion

### 4.1. Charakterisierung des bakteriellen ZIP-Transporters ZupT

#### 4.1.1. ZupT, ein ZIP-Transporter mit breitem Substratspektrum

Die Familie der ZIP-Transporter gewährleistet in verschiedenen Organismen, dort lokalisiert in verschiedenen Kompartimenten, den Transport essenzieller Metalle. Einer der Namensgeber der ZIP-Transporter-Familie, IRT1 in *A. thaliana*, ist für die Eisen-Versorgung unter Eisenlimitation verantwortlich und wird ausschließlich in Wurzelzellen exprimiert (Eide *et al.*, 1996; Connolly *et al.*, 2002). Neben Eisen zählen auch Zink, Mangan und Cadmium zum Substratspektrum (Korshunova *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2000) von IRT1. Die Hauptaufgabe von IRT1 scheint jedoch die Eisen-Versorgung der pflanzlichen Zellen unter Eisen-Mangelbedingungen zu sein (Eide *et al.*, 1996). Die Zink-Versorgung in *A. thaliana* übernehmen die ZIP-Transporter Zip1-3, die ebenfalls in der Wurzel exprimiert werden. *ZRT1*, der zweite Namensgeber der ZIP-Familie, codiert für das *high affinity* Zn<sup>2+</sup>-Aufnahme-System in *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao und Eide, 1996a). Zusammen mit *ZRT2*, dem *low affinity* Zn<sup>2+</sup>-Aufnahme-System (Zhao und Eide, 1996b), sichert es die Zink-Aufnahme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. IRT1 unterscheidet sich insofern von *ZRT1* und *ZRT2*, dass das Substratspektrum nicht nur auf Zink beschränkt ist. Humane ZIP-Transporter, wie hZIP1 und hZIP2, gewährleisten die Zink-Aufnahme in unterschiedlichen Zelltypen des menschlichen Organismus. Das hZIP1 Protein wird, im Gegensatz zum hZIP2 Protein, das nur im Gewebe der Prostata und der Gebärmutter vorkommt, ubiquitär in verschiedenen Zelltypen exprimiert. Somit scheint es das primäre Zink-Aufnahme-System in verschiedenen Gewebearten darzustellen (Gaither und Eide, 2000; Gaither und Eide, 2001b). Für das hZIP2-Protein wurde anhand von Kompetitionsstudien neben Zink auch Eisen, Cadmium, Kupfer, Cobalt und Mangan als Substrate identifiziert (Gaither und Eide, 2000). ZIP14 und ZIP8 sind weitere Beispiele für eukaryotische ZIP-Transporter, deren Substratspektrum nicht nur auf ein Metall beschränkt ist. So ist das in der Maus vorkommende ZIP8-Protein in der Lage, neben dem unphysiologischen Metall Cadmium, auch Mangan und Zink zu transportieren (He *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Ähnliches wurde für den ZIP14-vermittelten Metall-Transport nachgewiesen, neben Cadmium sind Zink, Mangan und Kupfer Substrate von ZIP14 (Girijashanker *et al.*, 2008). Anhand dieser wenigen Beispiele wird ersichtlich, dass viele ZIP-Transporter ein breites Substratspektrum besitzen.

Wie viele andere Transporter dieser Protein-Familie ist der bakterielle ZIP-Transporter ZupT ebenfalls in der Lage, verschiedene Metalle zu transportieren. Das Substratspektrum umfasst die Übergangsmetalle Zink, Cobalt, Eisen (Grass *et al.*, 2002; Grass *et al.*, 2005), aber auch Mangan, Cadmium und vermutlich Kupfer und Nickel (Abb. 5 und 10).

Zur Untersuchung des Substratspektrums von ZupT und zur weiteren Quantifizierung der ZupT-Transport-Kinetik für verschiedene Metalle wurden Metall-spezifische Deletionsstämme kons-

truiert und verwendet. Ziel war es, solche *E. coli* Stämme zu konstruieren und zu verwenden, die in allen, für ein jeweiliges Metall spezifischen, Aufnahme- und Efflux-Systeme deletiert sind. So wurden für einen Cd<sup>2+</sup>-spezifischen *E. coli* Stamm neben *zupT* die Gene für das Mn<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup>-Aufnahme-System MntH (Chaloupka *et al.*, 2005), für das periplasmatische Cd<sup>2+</sup>-bindende Protein YodA (ZinT) (Puskarova *et al.*, 2002; Kershaw *et al.*, 2007) und für die Zn<sup>2+</sup>-und Cd<sup>2+</sup>-transportierende P-Typ ATPase ZntA deletiert (Rensing *et al.*, 1997). Zur Untersuchung der Cobalt-Aufnahme wurden neben *zupT* die Gene für CorA als Cobalt-Aufnahme-System (Silver, 1969; Hmiel *et al.*, 1986) und RcnA als Cobalt-Efflux-System deletiert (Rodrigue *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2007). Zur Untersuchung der Zink-Aufnahme unter Zink-Mangelbedingungen, erzielt durch TPEN (Outten und O'Halloran, 2001), wurde ein *E. coli* Stamm verwendet, der neben *zupT* auch in *znuABC*, das für ein hochaffines Zink-Aufnahme-System in *E. coli* codiert (Patzner und Hantke, 1998), deletiert wurde. Für radioaktive Aufnahmeexperimente wurde ein Zink-spezifischer Deletionsstamm verwendet, der neben *zupT* in Genen aller anderen bekannten Zink-Aufnahme- und Efflux-Systemen deletiert wurde: *znuABC* (Patzner und Hantke, 1998), *zitB* (Grass *et al.*, 2001), *zntA* (Rensing *et al.*, 1997) und *zntB* (Worlock und Smith, 2002). Für die Untersuchung der Eisen-Aufnahme wurde ein Deletionsstamm konstruiert, der neben *zupT* in allen, für das Wachstum in Tris-MM relevanten Eisen-Aufnahme-Systemen in *E. coli* K12 deletiert wurde: dem Fe-Citrat-Aufnahme-System FecA-E (Hussein *et al.*, 1981; Zimmermann *et al.*, 1984; Ferguson *et al.*, 2002; Enz *et al.*, 2003), dem Me<sup>2+</sup>-Transporter MntH (Makui *et al.*, 2000), dem Fe(II)-Aufnahme-System FeoABC (Kammler *et al.*, 1993) und der Isochorismat-Synthase EntC (Tummuru *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1990). Da ebenfalls in diesem Deletionsstamm das Gen des bisher einzigen bekannten Mn<sup>2+</sup>-Aufnahme-Systems MntH deletiert wurde, war auch dieser zur Untersuchung des Mangan-Transportes geeignet. Die Verwendung solcher Deletionsstäme hatte den Vorteil, dass z. B. in Transportstudien die Substratspezifität von ZupT ohne auftretende Interferenzen mit anderen Metall-Transport-Systemen untersucht werden konnte. Diese Deletionsstäme sind nicht nur für Untersuchungen zum Metall-Transport von ZupT, sondern auch für Untersuchungen anderer Metall-Transporter geeignet und wurden somit innerhalb unserer und von internationalen Arbeitsgruppen verwendet.

#### 4.1.2. Ist ZupT vorrangig ein Zink-Transporter?

Besitzt ein ZIP-Transporter ein breites Substratspektrum, so stellt sich die Frage, welche Metalle bevorzugt transportiert werden. Die Ergebnisse der Kompetitionsstudien und der Transport-Kinetiken von ZupT konnten erste Hinweise zur Beantwortung dieser Fragen geben.

In anderen Arbeiten wurden durch retrovirale Infektion fötaler Maus-Fibroblasten Kulturen mit Zip8-cDNA die Transportkinetiken von ZIP8 für Cadmium und für Mangan bestimmt. Dabei besitzt ZIP8 für Mangan ein  $K_m$  von 2.2  $\mu\text{M}$  und  $v_{\text{max}}$  von 73.8 pmol/min/mg Protein und für Cadmium ein  $K_m$  von 0.62  $\mu\text{M}$  und  $v_{\text{max}}$  92.1 pmol/min/mg Protein (He *et al.*, 2006). Kompetitionsstudien zeigen zusätzlich, dass der ZIP8-vermittelte Cd<sup>2+</sup>-Transport durch verschiedene Metalle

gehemmt werden kann. Folgende Reihenfolge aller Metalle hinsichtlich des inhibitorischen Effekts auf den ZIP8-vermittelten  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport können festgestellt werden:  $\text{Mn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} = \text{Cu}^{2+} = \text{Zn}^{2+} = \text{Cs}^{2+}$ . Sowohl Cobalt als auch Eisen und Nickel hemmen diesen Transport nicht. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass in *Xenopus* Oocyten der  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport durch ZIP8 sehr effizient durch Zink, jedoch nicht durch Mangan gehemmt wird (Liu *et al.*, 2008). In dieser Veröffentlichung wird ein ähnlicher Wert der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m = 0.48 \mu\text{M}$ ) für den Cadmium-Transport beschrieben. Auch Zink scheint für ZIP8 ein attraktives Substrat zu sein, die Michaelis-Menten-Konstante beträgt  $0.26 \mu\text{M}$  und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für den Zink-Transport  $1.8 \text{ pmol/Oocyte/h}$ , dagegen für den  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport  $1 \text{ pmol/Oocyte/h}$  (Liu *et al.*, 2008). Beide Veröffentlichungen zeigen, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Die Unterschiede der Absolutwerte der einzelnen Parameter resultieren wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Zellsystemen, die dabei verwendet wurden (Liu *et al.*, 2008).

Eine Veröffentlichung über einen weiteren eukaryotischen ZIP-Transporter, ZIP14, verschafft Klarheit über den kontrovers diskutierten Mangan- oder Zink-Transport. Hier wird zum einen gezeigt, dass ZIP14 eine stärkere Affinität zu Cadmium als zu Mangan aufweist, was die Ergebnisse der ersten Veröffentlichung bestätigen und zum anderen, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport sehr effektiv durch geringe Konzentrationen an Zink, aber auch durch höhere Konzentrationen an  $\text{MnCl}_2$  und  $\text{CuCl}_2$  gehemmt wird (Girijashanker *et al.*, 2008). Eisen hemmt auch hier den Transport nicht. Fasst man die Ergebnisse dieser Veröffentlichungen zusammen, so sind Zink und Cadmium sehr gute Substrate dieser ZIP-Transporter, aber auch Mangan und vermutlich Kupfer können mit guter Effizienz transportiert werden.

Auch IRT1, einer der ersten identifizierten ZIP-Transporter aus *A. thaliana*, der ursprünglich als Eisen-Transporter identifiziert wurde (Eide *et al.*, 1996), besitzt ein breites Substratspektrum (Korshunova *et al.*, 1999). Zunächst wurde angenommen, dass IRT1 nur ausschließlich  $\text{Fe(II)}$  transportiert (Eide *et al.*, 1996). Darüber hinaus wird die Expression von *IRT1* nur durch Eisenlimitation induziert. Jedoch kann die Expression von *IRT1* die Deletion von *smf1*, einem *high affinity manganese uptake system* in *S. cerevisiae*, komplementieren, was somit auf einen Mangan-Transport hinweist. Der  $\text{Mn}^{2+}$ -Transport durch IRT1 kann durch 50-fachen Überschuss divalenter Kationen wie Zink und Cadmium effizient gehemmt werden. Auch der Einsatz von Eisen(II) und Kupfer resultiert, wenn auch nicht im gleichen Maße wie Zink und Cadmium, in einem verminderten  $\text{Mn}^{2+}$ -Transport (Korshunova *et al.*, 1999). Cobalt und Eisen(III) hemmen dagegen den  $\text{Mn}^{2+}$ -Transport nicht. Die Expression von *IRT1* kann ebenfalls Zink-Mangel, resultierend durch Deletion der Gene für die Zink-Aufnahme-Systeme *ZRT1* und *ZRT2* in *S. cerevisiae*, komplementieren. Auch der Zink-Transport kann durch Cobalt, Cadmium, Eisen(III) aber auch durch Kupfer und Mangan gehemmt werden. Dagegen führt Eisen(II) sogar zu einem vermehrten Zink-Transport (Korshunova *et al.*, 1999). Untersuchungen zur Transport-Kinetik lassen vermuten, dass durch IRT1 Zink effektiver als Mangan transportiert wird. Ein möglicher  $\text{Cu}^{2+}$ -Transport durch IRT1 wird kontrovers diskutiert, da die Expression von *IRT1* das

Wachstumsdefizit, hervorgerufen durch Mutation in *ctr1* (*copper transporter 1*) (Dancis *et al.*, 1994), nicht kompensieren kann.

Auch der Zink-Transport durch ZupT konnte in Gegenwart divalenter Kationen inhibiert werden (Abb. 10). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit bestimmt, ab welcher minimalen Konzentration das inhibierende Metall den Zink-Transport hemmte (Abb. 10A). So wurde der  $Zn^{2+}$ -Transport durch ZupT schon in Gegenwart äquimolarer Mengen an  $CdCl_2$  stark gehemmt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Veröffentlichungen; der  $Cd^{2+}$ -Transport, vermittelt durch ZIP8 oder ZIP14, konnte in Gegenwart von Zink stark gehemmt werden (Girijashanker *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Jedoch wurde nicht beschrieben, ob äquimolare Konzentrationen genügten, um den  $Cd^{2+}$ -Transport zu hemmen. Des Weiteren konnte ein stark verringerter Zink-Transport, vermittelt durch ZupT, in Gegenwart von Kupfer beobachtet werden. Schon der Einsatz eines 5-fachen Überschusses resultierte in einem stark verminderten  $Zn^{2+}$ -Transport. Somit scheint Kupfer ein weiteres attraktives Substrat für ZupT darzustellen. Auch die ZIP-Transporter ZIP8, ZIP14 und IRT1 scheinen Kupfer transportieren zu können (Korshunova *et al.*, 1999; Girijashanker *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Wurden divalente Kationen wie Mangan, Cobalt und Nickel im 50-fachen Überschuss im radioaktiven Zink-Aufnahmeexperiment eingesetzt, so wurde auch hier der Zink-Transport eindeutig gehemmt. Fasst man die Resultate der Kompetitionsstudien zusammen, so scheint ZupT die Substrate mit folgender Präferenz zu transportieren:  $Zn/Cd > Cu > Mn/Co/(Ni)$ . Überraschenderweise konnte der Zink-Transport, vermittelt durch ZupT, nicht durch Eisen(II) gehemmt werden, obwohl eindeutig bewiesen werden konnte, dass Eisen(II) zum Substratspektrum von ZupT gehört (Abb. 5C). Im Gegenteil, der Zink-Transport wurde sogar in Anwesenheit von 100  $\mu M$  Fe(II) gesteigert. Ein ähnliches Ergebnis beschrieben die Autoren, die den  $Cd^{2+}$ -Transport, vermittelt durch ZIP8 und ZIP14, in Anwesenheit von Eisen, untersuchten (He *et al.*, 2006; Girijashanker *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Auch der Zink-Transport durch IRT1 kann durch Eisen nicht inhibiert werden, im Gegenteil, er wird sogar gesteigert (Korshunova *et al.*, 1999). Die Autoren begründen dies in einem möglichen Ko-Transport beider Metalle oder, dass Fe(II) den  $Zn^{2+}$ -Transport allosterisch regulieren könnte. Ein möglicher Ko-Transport beider Metalle würde jedoch nicht erklären, dass der ZupT- oder auch IRT1-vermittelte  $Zn^{2+}$ -Transport durch Fe(II) gesteigert werden konnte. Auf der anderen Seite würde eine allosterische Regulation des ZupT-vermittelten  $Zn^{2+}$ -Transportes durch Fe(II) ebenfalls bedeuten, dass in einem umgekehrten Experiment der Fe(II)-Transport durch Zink gehemmt werden könnte. Dies wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt, ein 50-facher Überschuss an  $ZnCl_2$  verringerte nicht die Fe(II)-Aufnahme durch ZupT (Daten nicht gezeigt). Somit scheint ein möglicher Ko-Transport von Zink und Eisen(II) eine bessere Erklärung für die aufgeführten Resultate zu sein. Zur eindeutigen Klärung dieser Frage könnten weiterführende Experimente, z. B. die Bestimmung der Transport-Kinetik in Anwesenheit beider Substrate, einen wichtigen Beitrag leisten.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der  $Zn^{2+}$ -,  $Mn^{2+}$ - und  $Co^{2+}$ -Transport durch ZupT der Michaelis-Menten-Kinetik folgte (Abb. 9). Betrachtet man nun die



einzelnen kinetischen Parameter, so stellt man fest, dass die Affinität von ZupT zu den einzelnen Substraten ähnlich ist. Jedoch ist der  $K_m$  für Zink kleiner und  $v_{max}$  für Zink größer als für Cobalt und Mangan. Wenn diese Unterschiede signifikant sind, bindet ZupT Zink vermutlich mit höherer Affinität und transportiert es effektiver in das Cytoplasma als Cobalt und Mangan. Auch die kinetischen Parameter des  $Co^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -Transportes zeigen nur geringe Unterschiede. Möglicherweise wird zwar Mangan mit niedriger Affinität durch ZupT gebunden, jedoch geht der  $Mn^{2+}$ -Transport effektiver vonstatten als der  $Co^{2+}$ -Transport. Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Wettbewerbsstudien zu stehen. Wenn jedoch ZupT Zink, Cobalt und Mangan mit ähnlicher Effektivität transportiert, so ist es verwunderlich, dass der Zink-Transport von ZupT erst bei einem 50-fachen Überschuss an Cobalt oder Mangan eindeutig gehemmt werden konnte. Scheinen regulatorische Prozesse im Metall-Transport von ZupT beteiligt zu sein? Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten einen scheinbaren Widerspruch zwischen Transport-Kinetik und Wettbewerbsstudien. In Korshunova *et al.* (1998) wird gezeigt, dass Zink mit höherer Affinität gebunden und effektiver durch IRT1 transportiert wird als Mangan. Allerdings konnte auch hier der Zink-Transport in keinsten Weise durch Mangan gehemmt werden. Dadurch, dass die Transport-Kinetik für Zink nur bei einem niedrigen pH-Wert (pH 4.2) ermittelt werden konnte, wurde dieses Resultat mit einer pH-abhängigen Ionenselektivität erklärt. Jedoch wurde der Mangan-Transport bei einem pH-Wert von 6.5 durch Zink inhibiert. Somit kann nicht eindeutig geklärt werden, weshalb der Zink-Transport durch Mangan nicht gehemmt wurde, obwohl dies eindeutig ein Substrat von IRT1 ist. Es ist möglich, dass eine allosterische Regulation im Metall-Transport von ZupT, aber auch von anderen ZIP-Transportern, eine Rolle spielt. Somit kann man in diesem Fall vermutlich nicht von Konkurrenz sprechen, denn eine Konkurrenz im engeren Sinne scheint hier nicht vorzuliegen, da ein kompetitiver Inhibitor die Substratbindung und somit den Transport verhindert.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Substrate der hier exemplarisch aufgeführten ZIP-Transporter und von ZupT mit ähnlicher Präferenz transportiert werden.

#### 4.1.3. Der ZupT-Transport wird vermutlich durch *proton-motive force* energetisiert

Bisher wurde noch nicht eindeutig geklärt, welche Energiequelle für den ZIP-vermittelten Metall-Transport genutzt wird. Erstmals wurde für den humanen ZIP-Transporter hZIP2 ein Zusammenhang zwischen Hydrogencarbonat und dem Metall-Transport beschrieben (Gaither und Eide, 2000). Dabei wird ausgeschlossen, dass der Metall-Transport durch *proton-motive force*, d. h. weder durch  $\Delta pH$  noch durch  $\Delta \psi$  energetisiert wird. Dennoch besteht eine pH-Wert-Abhängigkeit des  $Zn^{2+}$ -Transportes durch hZIP2, dabei resultiert ein steigender pH-Wert in einer erhöhten Zink-Aufnahmerate. Weil der  $Zn^{2+}$ -Transport durch Hydrogencarbonat stimuliert werden kann, wird diese pH-Wert-Abhängigkeit des  $Zn^{2+}$ -Transportes damit begründet, dass die Konzentration von Hydrogencarbonat durch den pH-Wert beeinflusst wird. Der  $Cd^{2+}$ -Transport durch den in Säugertieren vorkommenden ZIP-Transporter ZIP8 dagegen erfolgt energieabhängig, jedoch unab-

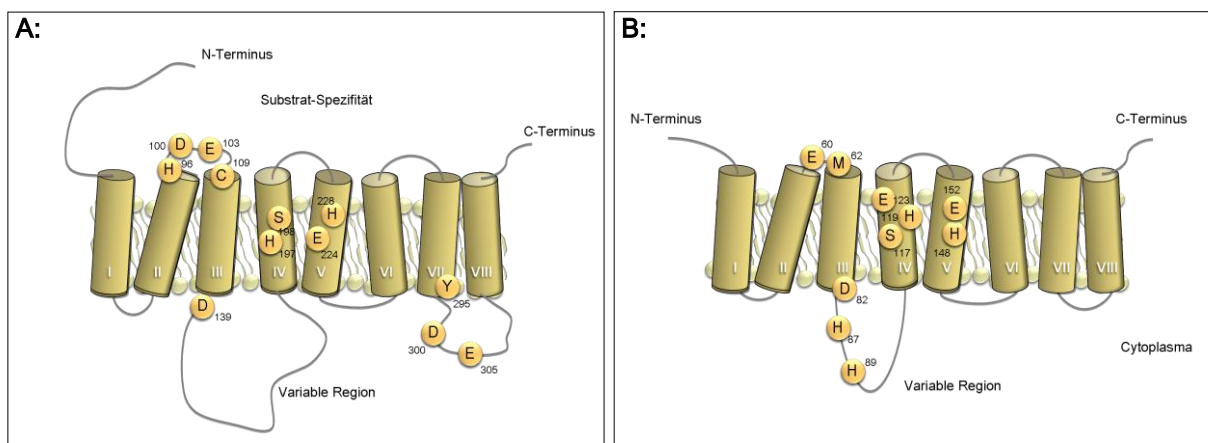
hängig von  $K^+$ -,  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen (He *et al.*, 2006). Darüber hinaus zeigt der  $Cd^{2+}$ -Transport eine pH-Wert-Abhängigkeit, wobei ein maximaler  $Cd^{2+}$ -Transport bei pH 7.5 stattfand. Somit wurde ausgeschlossen, dass Protonen die Antriebskraft für den  $Cd^{2+}$ -Transport durch ZIP8 sein könnten. Des Weiteren wird der  $Cd^{2+}$ -Transport durch Hydrogencarbonat stimuliert, was die Hypothese stützt, dass es sich bei ZIP8, ebenso wie bei hZIP2, um einen  $HCO_3^-$ /Metall-Symporter handelt. Ähnliche Ergebnisse wurden für den ZIP14-vermittelten  $Cd^{2+}$ -Transport beobachtet (Girijashanker *et al.*, 2008): energieabhängig, jedoch unabhängig von  $K^+$ -,  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen, optimaler  $Cd^{2+}$ -Transport bei externem pH Wert von 7.5 und eine Steigerung des  $Cd^{2+}$ -Transportes in Anwesenheit von Hydrogencarbonat.

Um Hinweise zu erhalten, welche Energiequelle den ZupT-vermittelten Metall-Transport vorantreiben könnte, wurden radioaktive Cobalt-Aufnahmeexperimente in Anwesenheit der Protonophoren FCCP und CCCP und dem ATPase Inhibitor Orthovanadat durchgeführt. Dadurch, dass beide Protonophoren den  $Co^{2+}$ -Transport inhibierten (Abb. 7), liegt die Vermutung nahe, dass der Metall-Transport durch die *proton-motive force* energetisiert werden könnte. Um zu differenzieren, ob  $\Delta pH$  oder  $\Delta \psi$  den Transport energetisieren, wurden die Aufnahmeexperimente bei verschiedenen externen pH-Werten durchgeführt. Sollte der Metall-Transport im Symport mit Protonen erfolgen, wie z. B. im Falle von MntH, (Makui *et al.*, 2000; Courville *et al.*, 2008), so sollte ein maximaler  $Zn^{2+}$ -Transport bei niedrigem pH-Wert erfolgen, da dann die externe Protonen-Konzentration am höchsten ist. Jedoch wurde hier, wie es auch für andere ZIP-Transporter festgestellt wurde, der umgekehrte Fall beobachtet, der ZupT-vermittelte  $Zn^{2+}$ -Transport verstärkte sich bei steigendem externen pH-Wert und erreichte bei physiologischem pH-Wert das Maximum (Abb. 8). Dies könnte jedoch verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte sich die Affinität zum Substrat ( $K_m$ ) bei steigendem pH-Wert erhöhen und zum anderen könnte die Transporteffizienz, d. h.  $v_{max}$  unter diesen Bedingungen verbessert werden. Kinetische Transportstudien in Anwesenheit verschiedener pH-Werte würden eine Antwort auf diese Frage geben. Solche Transportstudien wurden in ganzen Zellen, die *mntH* exprimierten, durchgeführt (Courville *et al.*, 2008). Hier wurde gezeigt, dass die Affinität zu Cadmium mit niedrigerem pH-Wert steigt, jedoch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem externen pH-Wert zunimmt. Vermutlich wird der Zustand des Proteins, d. h. die Protonierung verschiedener Aminosäuren und somit der Transport selber durch unterschiedliche pH-Werte beeinflusst. Würde dies auch für den ZupT-vermittelten  $Zn^{2+}$ -Transport zutreffen, könnte es eine Erklärung dafür sein, weshalb der  $Zn^{2+}$ -Transport durch ZupT bei steigendem pH-Wert zunahm. Diese pH-Wert-Abhängigkeit des ZupT-vermittelten Transportes wurde ebenfalls für den Cobalt- und Mangan-Transport beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine Zunahme des ZupT-vermittelten Metall-Transportes ist somit eindeutig auf den zunehmenden pH-Wert zurückzuführen. Weitere Ergebnisse einiger Experimente unterstützen die Hypothese des protonen-abhängigen Metall-Transportes durch ZupT. Eine Zugabe von  $K^+$ -,  $Na^+$ -,  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -,  $Cl^-$ - und  $HCO_3^-$ -Ionen hatten keinen Einfluss auf Metall-Aufnahmeexperimente. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen hinsichtlich des Transportes von hZIP2, ZIP8 und ZIP14, scheint der ZupT-vermittelte

Transport nicht durch Hydrogencarbonat stimuliert zu werden. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Metall-Transport von ZupT durch *proton-motive force* energetisiert werden könnte und dabei vermutlich Protonen eine wichtige Rolle spielen.

#### 4.1.4. Spezifische Aminosäure-Reste in der TMH IV und V sind wichtig für den Metall-Transport durch ZupT

Die meisten ZIP-Transporter besitzen vermutlich acht transmembrane Helices, dabei sind der C- und N-Terminus extracytoplasmatisch lokalisiert. Betrachtet man die Aminosäure-Sequenzen einzelner ZIP-Transporter, so ist auffällig, dass besonders in den transmembranen Helices IV und V viele konservierte Aminosäure-Reste vorhanden sind. Bisher ist jedoch wenig über den genauen ZIP-vermittelten Transport-Mechanismus der Metalle bekannt. Einen Ansatzpunkt zur Untersuchung des Transport-Mechanismus durch ZIP-Proteine bietet die Mutagenese von Aminosäure-Resten. Der erste identifizierte ZIP-Transporter IRT1 besitzt ein breites Substrat-spektrum und ist somit ein ideales Modell-System, um spezifische Aminosäuren, die in der Metall-Bindung und im Transport involviert sein könnten, zu identifizieren. Hierfür wurden im extracytoplasmatischen *loop* zwischen transmembraner Helix II und III putative metallbindende Aminosäuren mutiert. Die Mutanten-Proteine wurden hinsichtlich des  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Transportes untersucht und festgestellt, dass eine Mutation des Aspartates an Position 100 in IRT1 zum Verlust der  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Transport-Aktivität führt und das darüber hinaus das Mutanten-Protein IRT1 E<sub>103</sub>A nicht mehr in der Lage ist,  $\text{Zn}^{2+}$  zu transportieren (Rogers *et al.*, 2000). Somit wird vermutet, dass dieser extracytoplasmatische *loop* in IRT1 für die Substrat-spezifität verantwortlich sein könnte. In Anlehnung an dieser Veröffentlichung wurden ebenfalls im ersten bakteriellen ZIP-Transporter ZupT Aminosäuren mutiert (Abb. 32), die in der Metall-Bindung und/oder im Transport involviert sein könnten.



**Abb. 32.: Vergleich der durch gerichtete Mutagenese ausgetauschten Aminosäure-Reste in den ZIP-Transportern IRT1 aus *A. thaliana* und ZupT aus *E. coli***

Dargestellt sind die putativen Topologie-Modelle der beiden ZIP-Transporter IRT1 aus *A. thaliana* (A) und ZupT aus *E. coli* (B). Ferner sind die Aminosäuren mit Positionsangabe gekennzeichnet, die in Rogers *et al.* (2000) in IRT1 und in der vorliegenden Arbeit in ZupT durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden.

Um zu untersuchen, ob bestimmte Aminosäuren im extracytoplasmatischen *loop* im ZupT-Protein, genauso wie in IRT1, für die Substratspezifität verantwortlich sein könnten, wurde das Glutamat an Position 60 mutiert. Diese Mutation resultierte in einem verminderten  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport. Dagegen schien der  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport in Wachstums-Endpunktbestimmungen im Vergleich zum Wildtyp-Protein unverändert (Tab. 5). Transportstudien konnten diese Ergebnisse weder bestätigen noch widerlegen, da das Mutanten-Protein nicht in der Membran nachgewiesen werden konnte (Abb. 14). Dies scheint jedoch durch die hohe Expressionsrate des Mutanten-Proteins, codiert auf einem *high-copy* Plasmid, und der Toxizität zustande zu kommen, da offensichtlich die Expression von *zupT* E<sub>60D</sub>, codiert auf einem *low-copy* Plasmid, den Einbau des Proteins in der Membran nicht beeinflusste, da ein wildtypähnlicher  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport in Wachstums-Endpunktbestimmungen beobachtet werden konnte.

Wurde jedoch das Methionin an Position 62 in Alanin mutiert, so führte dies nicht zu einem Funktionsverlust des Metall-Transportes dieses Mutanten-Proteins, im Gegenteil, es konnte sogar ein leicht gesteigerter  $\text{Co}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport beobachtet werden. Somit scheint nur das Glutamat in dem periplasmatischen *loop* zwischen TMH II und III im ZupT-Protein eine wichtige Rolle im  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Transport und somit eine Funktion hinsichtlich der Substratspezifität zu übernehmen.

Es ist bekannt, dass besonders in TMH IV und V viele konservierte Aminosäure-Reste innerhalb der Transporter der ZIP-Familie auftreten. Auch in IRT1 wurden konservierte Aminosäure-Reste mutiert und die Mutanten-Proteine auf ihre Transport-Fähigkeit hinsichtlich der  $\text{Mn}^{2+}$ -,  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}$ -Aufnahme untersucht. Dabei wird festgestellt, dass eine Mutation des Histidins oder des Serins an Position 197 oder 198 im IRT1-Protein (Abb. 32) in TMH IV zu einem kompletten Verlust des Metall-Transportes führt (Rogers *et al.*, 2000). Zum gleichen Resultat führen Mutationen des Glutamates oder des Histidins an Position 224 und 228 in IRT1. Durch diese Ergebnisse und durch den hohen Konservierungsgrad dieser Aminosäuren innerhalb verschiedener ZIP-Transporter wurde die Annahme verstärkt, dass diese Aminosäure-Reste in TMH IV und V putative Metall-Liganden sind und für den Metall-Transport essenziell sind. Die Mutationen analoger Aminosäure-Reste in ZupT führten zu einem ähnlichen Ergebnis (Tab. 5). Hier wurde, im Gegensatz zu Rogers *et al.* (2000) das Serin, welches in ZupT vor dem Histidin an Position 119 lokalisiert ist, gegen ein Valin ausgetauscht. Dies resultierte in einem kompletten Verlust der  $\text{Mn}^{2+}$ -Transport-Fähigkeit, aber der  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Cd}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Transport ist durch diese Mutation nicht beeinflusst worden (Abb. 13). Allerdings war der  $\text{Co}^{2+}$ -Transport um die Hälfte vermindert. Dieses Serin ist offensichtlich für die Bindung und/oder für den Transport des Mangans essenziell. Es ist möglich, dass eine Mutation des Serins, genauso wie die des Glutamats an Position 60, die kinetischen Parameter des  $\text{Co}^{2+}$ -Transportes verändert. Sowohl die Affinität zum Cobalt und/oder die Transporteffizienz des Cobalts könnten durch Austausch des Serins vermindert worden sein. Untersuchungen zur Transport-Kinetik dieser ZupT Mutanten könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Der Austausch des benachbarten Histidins an Position 119 gegen ein Arginin resultierte in einem drastischen Verlust der Metall-Transport-Aktivität. Es konnte noch lediglich ein verminderter  $Zn^{2+}$ -Transport beobachtet werden und in radioaktiven Aufnahmeexperimenten ein  $Cd^{2+}$ -Transport. Auch dieses Histidin, genauso wie in IRT1, scheint für den  $Co^{2+}$ -,  $Mn^{2+}$ - und  $Fe^{2+}$ -Transport essenziell zu sein. Dadurch, dass dieses Histidin an Position 119 gegen eine andere, ebenfalls basische Aminosäure, ausgetauscht wurde, scheint hauptsächlich die Struktur des Histidins an Position 119 für den Transport wichtig zu sein.

Die Mutation einer weiteren konservierten Aminosäure, dem Glutamat an Position 123 im ZupT-Protein, in TMH IV, resultierte ebenfalls in einem nahezu kompletten Funktionsverlust dieses Mutanten-Proteins. Lediglich ein stark eingeschränkter  $Cd^{2+}$ -Transport konnte für diese Mutante beobachtet werden. Die Mutation erfolgte durch Austausch dieses Glutamats in sowohl ein Aspartat als auch in ein Alanin. Daraus könnte man schließen, dass nicht nur die Ladung des Glutamates an Position 123 für den Metall-Transport wichtig zu sein scheint. Jedoch scheint die ZupT-Mutante  $E_{123}A$ , im Gegensatz zur ZupT-Mutante  $E_{123}D$ , noch in der Lage zu sein, wenn auch stark eingeschränkt, Zink zu transportieren. Was ebenfalls darauf hindeutet, dass vielmehr strukturelle Eigenschaften an dieser Stelle den Metall-Transport bestimmen, da Alanin nicht zu den Aminosäuren zählt, die Metalle bevorzugt binden (Karin und Zhu, 1997; Shimazaki *et al.*, 2009).

Auch die Ergebnisse der Wachstums-Endpunktbestimmung mit der ZupT-Mutante  $H_{148}R$  bestätigen den essenziellen Charakter dieser Aminosäure für den ZupT-vermittelten Metall-Transport (Tab. 5). Denn das ZupT Mutanten-Protein  $H_{148}R$  war kaum noch in der Lage, Metalle zu transportieren. Dies wurde ebenfalls für die IRT1-Mutante beschrieben, die in analoger Aminosäure mutiert wurde (Rogers *et al.*, 2000). Radioaktive Aufnahmeexperimente konnten auch hier die Ergebnisse der Wachstums-Endpunktbestimmungen weder bestätigen noch widerlegen, da vermutlich die hohe Expressionsrate des Mutanten-Proteins einen Einbau in die Membran nicht begünstigte. Jedoch scheint die Expression von *zupT*  $H_{148}R$ , codiert auf einem *low copy* Plasmid, zu einer funktionalen ZupT-Mutante zu führen, da ein Zink-Transport, wenn auch stark eingeschränkt, nachgewiesen werden konnte (Tab. 5). Somit scheinen die Ergebnisse der Wachstums-Endpunktbestimmungen auf die Mutation in ZupT zurückzuführen zu sein.

Der Glutamat-Rest an Position 152 in der TMH V von ZupT wurde ebenfalls in ein Aspartat und Alanin ausgetauscht. Dies resultierte jedoch nicht in einem kompletten Funktionsverlust, im Falle des Mutanten-Proteins ZupT  $E_{152}D$  konnte kein  $Mn^{2+}$ - und  $Zn^{2+}$ -Transport beobachtet werden, Cobalt, Eisen und Cadmium wurden, jedoch eingeschränkt, transportiert. Ein Austausch dieses Glutamates gegen ein Alanin resultierte in einem vollständigen  $Zn^{2+}$ - und  $Cd^{2+}$ -Transport, der  $Co^{2+}$ - und  $Fe^{2+}$ -Transport dagegen wurde zunehmend vermindert. Es ist in diesem Falle möglich, dass Alanin, als hydrophobe Aminosäure, den Transport für Zink und Cadmium im ZupT-Protein mehr unterstützt als Aspartat, genauso wie es für die ZupT-Mutante  $E_{123}A/D$  beobachtet wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die konservierten Aminosäure-Reste in TMH IV und V:  $H_{119}$ ,  $E_{123}$  und  $H_{148}$  für die Metallbindung und/oder für die Struktur von ZupT essenziell

sind. Dabei scheint nicht nur die Ladung dieser Aminosäuren eine wichtige Rolle für den Transport zu spielen. Interessant sind daneben der Serin-Rest an Position 117, der Glutamat-Rest an Position 60 und 152, die nicht nur für den Metall-Transport notwendig zu sein scheinen, sondern auch vermutlich zur Substratspezifität beitragen. Wie schon in Rogers *et al.* (2000) vermutet, könnten TMH IV und V einen Kanal bilden, wobei die Substratbindung während des Metall-Transportes durch diese exponierten Aminosäuren erfolgen könnte. Für den IRT1-vermittelten Metall-Transport wurde eine Beteiligung weitere, im cytoplasmatischen *loop* zwischen TMH VII und VIII (Abb. 32) lokalisierten Aminosäure-Reste, nicht bestätigt.

#### 4.1.5. Welche Rolle spielen die Histidin-Reste in der „Variablen Region“ im ZupT-vermittelten Metall-Transport?

Ein weiteres Merkmal, das alle bekannten ZIP-Transporter teilen, ist das Vorhandensein einer cytoplasmatischen „Variablen Region“ (Guerinot, 2000). Sowohl der Konservierungsgrad innerhalb der Sequenz als auch die Länge dieses *loops* variieren sehr stark innerhalb der ZIP-Familie. Eine eindeutige Funktion konnte bisher nicht zugeordnet werden, jedoch wird vermutet, dass die „Variable Region“ am Metall-Transport beteiligt ist und eine putative Metall-Bindestelle darstellen könnte (Eide *et al.*, 1996). Eine Publikation beschreibt die Notwendigkeit zweier Histidine im cytoplasmatischen *loop* des humanen ZIP-Transporters hZIP1 für den Zn<sup>2+</sup>-Transport (Milon *et al.*, 2006). Dadurch, dass diese Mutanten-Proteine dennoch in der Lage sind, wenn auch verringert, Zink zu transportieren, wird vermutet, dass beide Histidine zusammen mit einem Aspartat-Rest, ebenfalls lokalisiert in der „Variablen Region“, zur räumlichen Koordinierung während der Zn<sup>2+</sup>-Aufnahme einen wichtigen Beitrag leisten. Vermutlich ist der cytoplasmatische *loop* für die ternäre Struktur des Transporters und somit für die räumliche Nähe der Histidine zur TMH IV wichtig. Durch weitere Experimente wird angenommen, dass der cytoplasmatische *loop* von hZIP1 eine Art „*reentrant loop*“ darstellen könnte, der von der Innenseite her in die Membran eintaucht, diese jedoch nicht durchspannt und somit zum Metall-Transport/Bindung beiträgt.

Untersuchungen zu den ZIP-Transportern TjZNT1 und TjZNT2 aus dem Nickel-hyperakkumulierenden Hellerkraut *Thlaspi japonicum* zeigen, dass beide ZIP-Transporter zwei histidinreiche Regionen (HRD) im Cytoplasma aufweisen (Nishida *et al.*, 2008). Eine Deletion der ersten HRD verändert nicht die Zn<sup>2+</sup>-Transport-Eigenschaft von TjZNT1, jedoch resultiert die Deletion der zweiten HRD in einem verringerten Zn<sup>2+</sup>-Transport, der Cd<sup>2+</sup>-Transport dagegen wird kaum verändert. Auch hier wird postuliert, dass die histidinreiche Region eine wichtige Funktion in der Substratspezifität übernehmen könnte.

Dagegen konnte für den humanen ZIP-Transporter hZIP4 gezeigt werden, dass die histidinreiche Region essenziell für die posttranslationale Regulation von hZIP4 ist und damit zum Schutz vor toxischen cytoplasmatischen Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen beiträgt (Mao *et al.*, 2007). Denn diese histidinreiche Domäne von hZIP4 ist für den Ubiquitin-abhängigen Abbau des Proteins notwendig (Mao *et al.*, 2007).

In *S. cerevisiae* wird diese Funktion nicht durch die Histidin-Reste in der „Variable Region“ von ZRT1 vermittelt. Eine Mutation dieser Aminosäure-Reste führte lediglich zu einer verminderten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit des Zink-Transportes. Die posttranslationale Inaktivierung von ZRT1 als schnelle Antwort auf das Vorhandensein hoher Zink-Konzentrationen im Cytoplasma wird durch eine potentielle *metal response domain* (MRD) vermittelt (Gitan *et al.*, 2003). Dieses Sequenzmotiv (DATSMDV) ist neben der histidinreichen Sequenz im cytoplasmatischen *loop* lokalisiert. Wie jedoch der Abbau durch diese Sequenz vermittelt wird, ist bisher noch unklar. Dabei könnte eine Zink-Bindung an der MRD oder auch die Interaktion mit einem cytosolischen Protein die Ubiquitinierung und somit den Abbau von ZRT1 induzieren.

Abgeleitet von diesen Ergebnissen wird die Regulation der Expression von *IRT1* aus *A. thaliana* von mehreren Autoren diskutiert. Es ist bekannt, dass unter Eisen-Mangelbedingungen die Expression von *IRT1* induziert wird, dabei übernimmt FIT (*FER-like iron deficiency-induced transcription factor*) eine Schlüsselfunktion (Colangelo und Guerinot, 2004; Bauer *et al.*, 2007). Wie jedoch eine schnelle Antwort auf Eisen-Überschuss erfolgt, ist bisher unbekannt. Dabei wird ebenso eine Beteiligung der Histidin-Reste in der „Variablen Region“ in Betracht gezogen. Durch Isothermale Titrationskalorimetrie wurde die Affinität verschiedener Metalle zu einem künstlichen Peptid bestimmt, dessen Aminosäure-Sequenz identisch mit der der „Variablen Region“ war. Die Autoren zeigen, dass diese histidinreiche Region sehr niedrige Bindungs-Affinitäten zu den typischen *IRT1*-Substraten, außer zu Fe(III), aufweist (Grossoehme *et al.*, 2006). Folglich wird vermutet, dass die Bindung von intrazellulärem Fe(III) einen Eisen-Überschuss signalisiert und somit die Eisen-Aufnahme indirekt reguliert werden könnte (Grossoehme *et al.*, 2006).

Vermutlich übernimmt die „Variable Region“ in verschiedenen ZIP-Transportern verschiedene Funktionen. So scheint in Eukaryoten die histidinreiche Region zum einen in der posttranslationalen Regulation des ZIP-Transportes und zum anderen im Metall-Transport an sich involviert zu sein. Welche Funktion könnte jedoch die histidinreiche Region in Prokaryoten übernehmen; eine regulatorische oder funktionelle?

Zum jetzigen Zeitpunkt ist *ZupT* als einziger bakterieller Vertreter der ZIP-Familie charakterisiert worden. Ein weiterer putativer bakterieller ZIP-Transporter wurde kürzlich im Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* durch Genom-Analysen identifiziert (Hudek *et al.*, 2009). Im metall-resistenten Bakterium *Cupriavidus metallidurans* existiert ebenfalls ein putativer ZIP-Transporter (Voigt, 2008; Scherer, persönl. Mitteilung). Im Gegensatz zu *zupT* aus *E. coli* erfolgt die Genexpression dieser ZIP-Transporter nicht konstitutiv, sondern wird je nach Metall-Verfügbarkeit reguliert (Hudek *et al.*, 2009; Voigt, 2008; Scherer, persönl. Mitteilung). Vergleicht man die AS-Sequenzen dieser bakteriellen ZIP-Transporter, so stellt man fest, dass in der „Variablen Region“ vom ZIP-Transporter aus *C. metallidurans* CH34 sehr viele Histidin-Reste vorhanden sind, wohingegen die beiden anderen ZIP-Transporter, aus *E. coli* und *N. punctiforme*, nur sehr wenige Histidin-Reste in dieser Region aufweisen (Abb. 33).

<i>C. metallidurans</i> CH34	EKISLLR <b>HS</b> HHHEGDG <b>HHHHHGH</b> DREEA
<i>E. coli</i>	DRM----LP <b>HAHP</b> QDLMQKSVQPLPKSI
<i>N. punctiforme</i>	NWFLSYQGA <b>KHR</b> KRSGEQQ---PSEEN
	: : . : . : :

**Abb. 33: Sequenz-Alignment der „Variablen Region“ der bakteriellen ZIP-Transporter**

Dargestellt ist ein *Alignment* der „Variablen Region“ der bakteriellen ZIP-Transporter aus *C. metallidurans*, *E. coli* und *N. punctiforme*. Identische (\*) und ähnliche ( . und :) AS sind unterhalb der Sequenz gekennzeichnet. **Fett** sind die Histidin-Reste des cytoplasmatischen *loops* bzw. der „Variablen Region“ gekennzeichnet.

Aufgrund des sehr geringen Konservierungsgrades der Aminosäuren in der „Variablen Region“ innerhalb der bakteriellen ZIP-Transporter liegt die Vermutung nahe, dass die Anzahl der Histidin-Reste eine spezifische Anpassung je nach Bakterium sein könnten. *C. metallidurans* besitzt, im Gegensatz zu *E. coli*, kein weiteres Zink-Aufnahme-System wie z. B. das hochaffine ZnuABC-System (Pater und Hantke, 1998). ZupT scheint das essenzielle Zink-Aufnahme-System in *C. metallidurans* darzustellen (Voigt, 2008; Scherer, persönl. Mitteilung), sodass der Zink-Transport, genau den Milieubedingungen entsprechend, reguliert werden muss. Somit ist es von enormer Bedeutung, den Metall-Einstrom schnellstmöglich zu kontrollieren. So könnte eine Metall-Bindung an die Histidin-Reste in der „Variablen Region“ ein indirekter Hinweis für die Metall-Verfügbarkeit im Cytoplasma darstellen. Sind die Bindungen besetzt, so ist der Metall-Transport schnell gesättigt und der Metall-Einstrom wird verringert. Auf diese Art und Weise könnte indirekt der Metall-Transport als solches in *C. metallidurans* reguliert werden.

Dagegen ist sowohl in *E. coli* als auch in *N. punctiforme* das hochaffine Zink-Aufnahme-System ZnuABC vorhanden und sichert somit die Zink-Versorgung. In der „Variablen Region“ des ZIP-Transporters aus *N. punctiforme* ist lediglich ein Histidin-Rest vorhanden. Dennoch ist dieser ZIP-Transporter vermutlich in der Lage, Zink zu transportieren. In ZupT aus *E. coli* sind zwei Histidin-Reste in der „Variablen Region“ vorhanden. Ein Austausch jeweils beider Histidin-Reste in Arginin veränderte nicht die Transport-Eigenschaft von ZupT (Tab. 5). Wurde jedoch das Histidin an Position 87 im ZupT-Protein gegen ein Alanin ausgetauscht, konnte diese Mutante nicht mehr in der Membran nachgewiesen werden. In Wachstums-Endpunktbestimmungen konnte dagegen sogar eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein beobachtet werden. Vermutlich wurde durch die Überexpression dieser ZupT-Mutanten ein zu hoher Metall-Einstrom bewirkt und dadurch dieses Mutanten-Protein abgebaut. Wurde jedoch das zweite Histidin an Position 89 gegen ein Alanin ausgetauscht, so konnte durch diese ZupT-Mutante kein Cobalt und Eisen transportiert werden, der Zink- und Mangan-Transport wurde ebenfalls beeinträchtigt. Die Isotopen-Aufnahmeexperimente zeigten dagegen Wildtyp-Transporteigenschaften hinsichtlich dieser Metalle, jedoch lassen sich aus den Aufnahmeexperimenten keine Rückschlüsse auf einen veränderten  $K_m$ -Wert oder einer veränderten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ziehen. Das Histidin an Position 89 ist, im Gegensatz zum Histidin an Position 87 im ZupT-Protein, essenziell für den Cobalt-, Eisen- und Zink-Transport. Jedoch scheint der Imidazol-Ring dieser Aminosäure nicht für den Metall-Transport notwendig zu sein, denn ein Arginin an dieser Position ermöglichte



ebenfalls einen Metall-Transport. Dennoch lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Histidin an Position 87 im ZupT-Protein wichtig für die Substratspezifität sein könnte und eher regulatorische Funktionen übernehmen könnte.

## 4.2. Das Zusammenspiel von Eisen- und Mangan-Homöostase in einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante

Das Wachstum einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante konnte erheblich durch Anwesenheit von Mangan verbessert werden (Abb. 15). Wieso wurde das Wachstum durch Mangan so stark gefördert? Wie wichtig Mangan sein kann, belegen einige Mikroorganismen, wie z. B. *Lactobacillus plantarum* oder auch *Borellia burgdorferi*, deren Metabolismus offenbar nicht von Eisen, jedoch von Mangan abhängig ist (Archibald und Duong, 1984; Archibald, 1986; Posey und Gherardini, 2000). Im Bakterium *Deinococcus radiodurans* korreliert eine hohe Konzentration an intrazellulärem Mangan mit extremer Strahlenresistenz (Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2007; Daly, 2009). Auch für die Virulenzeigenschaften von *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* scheint Mangan eine wichtige Rolle zu spielen, denn eine Deletion von *mntH* und *sitABCD*, beide codieren für hoch affine  $Mn^{2+}$ -Aufnahme-Systeme, führten zu einer verringerten Pathogenität (Boyer *et al.*, 2002; Kehres *et al.*, 2002; Papp-Wallace *et al.*, 2006). Ferner übernimmt Mangan in der Sporulation vom Gram positiven Bakterium *Bacillus subtilis* eine entscheidende Funktion (Que und Helmann, 2000).

Welche Rolle spielt Mangan im Metabolismus von *E. coli*? Vergleicht man die Anzahl jener Enzyme, die Metalle wie Eisen, Cobalt oder auch Zink als Kofaktor nutzen, so scheinen manganabhängige Enzyme in der Minderheit vorzukommen (Kehres und Maguire, 2003). Wichtige manganhaltige Enzyme in *E. coli* sind z. B. die Kofaktor-abhängige Phosphoglucerasat-Mutase, ein Enzym der Glycolyse (Fraser *et al.*, 1999), die manganabhängige Fruktose 1.6-bisphosphatase, ein wichtiges Enzym der Gluconeogenese (Donahue *et al.*, 2000) und die Serin/Threonin Protein Phosphatasen PrpA/B, die u. a. zusammen mit dem Zwei-Komponenten-System CpxAR an der Stress-Antwort auf falsch gefaltete Proteine beteiligt sind (Missiakas und Raina, 1997; Shi *et al.*, 2001; Kehres und Maguire, 2003). Mangan übernimmt ebenso in anderen regulatorischen Prozessen wie in der „stringent response“ eine wichtige Funktion, denn als Kofaktor der ppGpp 3'-Pyrophosphohydrolase SpoT gewährleistet es die Hydrolase-Aktivität (Johnson *et al.*, 1979; Xiao *et al.*, 1991), so dass Stoffwechselprozesse je nach Wachstumsbedingungen angepasst werden können.

Interessanterweise gibt es enzymatische Reaktionen, in denen sowohl Eisen als auch Mangan als Kofaktor beteiligt sein können. So existieren in *E. coli*, neben der periplasmatischen kupfer- und zinkhaltigen Superoxid-Dismutase, zwei verschiedene cytoplasmatische Superoxid-Dismutasen, eine manganabhängige und eine eisenabhängige, wobei beide zwar die gleiche Reaktion katalysieren, jedoch in verschiedenen Wachstumsphasen unter verschiedenen Bedingungen aktiv sind. Darüber hinaus katalysieren in *E. coli* unter aeroben Wachstums-

bedingungen zwei Ribonukleotid-Reduktasen die Reduktion von 2'-Hydroxylgruppen von Nukleotiden. Die zur Klasse Ia zugehörige NrdAB besitzt als Kofaktor Eisen, wohingegen die zur Klasse Ib zugehörige NrdEF Mangan als Kofaktor nutzt (Atta *et al.*, 1992). Die Hauptaufgabe hinsichtlich der DNA-Synthese übernimmt die Ribonukleotid-Reduktase NrdAB, die manganabhängige Ribonukleotid-Reduktase NrdEF spielt eher eine untergeordnete Rolle und übernimmt vermutlich eine wichtige Funktion unter oxidativen Stressbedingungen (Jordan und Reichard, 1998; Monje-Casas *et al.*, 2001). Interessanterweise ist in der Promotorregion vom *nrdHIEF* Operon, das für die manganabhängige Ribonukleotid-Reduktase codiert, eine Fur-Box vorhanden, sodass die Expression von *nrdHIEF* durch Fur reguliert wird (Vassinova und Kozyrev, 2000; McHugh *et al.*, 2003). (Keele *et al.*, 1970; Yost und Fridovich, 1973; Stallings *et al.*, 1984; Fridovich, 1995). Warum existieren Isoformen eines Enzyms und warum wird Mangan und nicht andere typische Metallo-Kofaktoren genutzt?

Es scheint, dass sich Eisen- und Mangan-Homöostase in *E. coli* gegenseitig beeinflussen und somit nicht streng abgrenzbar sind. Dies wird auch am Beispiel der Regulation von *mntH* deutlich. Dieses Gen wird sowohl in Anwesenheit von Mangan durch den Transkriptions-Regulator MntR, als auch in Gegenwart von Eisen durch den Transkriptions-Regulator Fur reguliert. OxyR induziert ebenfalls die Expression von *mntH* unter oxidativen Stress in *E. coli* (Kehres *et al.*, 2000; Patzer und Hantke, 2001). In vorangegangenen Arbeiten wurden ein Zusammenhang zwischen Mangan und dem damit verbundenen Schutz vor oxidativem Stress beschrieben (Horsburgh *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2007; Anjem *et al.*, 2009). Würde jedoch Mangan nur eine wichtige Rolle zum Schutz vor oxidativem Stress spielen, wieso wird dann die Expression von *mntH* zusätzlich durch MntR und Fur reguliert?

Welche Funktion übernimmt Mangan in einem *E. coli* Stamm, in dem alle, für das Wachstum in Minimalmedium relevanten, Eisen- und Mangan-Aufnahme-Systeme deletiert sind? Diese zentrale Frage gilt es in der vorliegenden Arbeit zu erörtern.

#### **4.2.1. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist dennoch in der Lage, Eisen und Mangan aufzunehmen**

Das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränkt. Dennoch konnte das Wachstum durch Zusatz von Mangan oder Eisen gefördert werden (Abb. 15). Wie und in welchen Mengen werden jedoch diese Metalle vom Deletionsstamm aufgenommen, da doch alle bisher bekannten Aufnahme-Systeme deletiert sind? Diese *E. coli* Mutante verfügt weder über Fe(III)/Fe(II)-Aufnahme-Systeme noch über den bisher einzig bekannten Mn<sup>2+</sup>-Transporter in *E. coli* MntH (Makui *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der Atom-Absorptions-Spektroskopie zeigten, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante dennoch in der Lage ist, Eisen oder Mangan aufzunehmen (Tab. 6 und 7). Demzufolge scheint ein unbekanntes Transport-System für die Metall-Aufnahme verantwortlich zu sein.

Untersuchungen zur Mangan-Aufnahme in einer  $\Delta mntH \Delta sitABCD$  Doppelmutante in *S. enterica Typhimurium* zeigten ebenfalls, dass neben diesen beiden Systemen noch ein unbekanntes Transport-System für die  $Mn^{2+}$ -Aufnahme existieren muss (Kehres und Maguire, 2003). Auch in einer kürzlich erschienen Arbeit wird festgestellt, dass neben MntH in *E. coli* ein weiteres  $Mn^{2+}$ -Transport-System vorhanden sein muss (Anjem *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ZupT, der erste bakterielle ZIP-Transporter, ein breites Substratspektrum besitzt und somit auch die Mangan-Aufnahme in *E. coli* gewährleisten kann. ZupT könnte der gesuchte Mangan-Transporter in einer *mntH* bzw. *mntH sitABCD* Mutante in *E. coli* bzw. *S. enterica Typhimurium* sein. Dennoch muss noch ein weiteres Aufnahme-System in *E. coli* existieren, da die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die ebenfalls in *zupT* deletiert ist, immer noch Mangan und Eisen aufnehmen kann.

In Anwesenheit von Eisen konnte in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in den Zellen der lag-Phase ähnliche Menge an Eisen wie im Wildtyp nachgewiesen werden. Wurde jedoch die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante mit Eisen und Mangan inkubiert, so führte dies zu einer Abnahme des intrazellulären Eisengehaltes. Dagegen beeinflusste der Zusatz von Mangan nicht den Eisengehalt der Wildtyp-Zellen. Betrachtet man dazu den Mangangehalt in denselben Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, so konnte nur in Anwesenheit von Eisen und Mangan im Medium ein hoher Mangangehalt in den Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte womöglich ein Hinweis auf einen unbekanntem Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante sein, der sowohl für die Eisen- als auch für die Mangan-Aufnahme verantwortlich sein könnte. Jedoch scheint dieser nur in Anwesenheit von Eisen einen effizienten  $Mn^{2+}$ -Transport vermitteln zu können, denn eine Anzucht der Zellen nur mit Mangan resultierte nicht in einer so hohen intrazellulären Mangan-Konzentration.

Es ist auffällig, dass der Mangangehalt unter diesen Bedingungen in den Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante während des Wachstums abnahm, jedoch nicht im Wildtyp und auch nicht in den Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die nur mit Mangan inkubiert wurden. Vermutlich stand während des Wachstums nicht genügend Eisen zur Verfügung, um so den putativen Transporter zur  $Mn^{2+}$ -Aufnahme zu stimulieren. Die Abnahme der intrazellulären Mangan-Konzentration kann jedoch nicht die Folgeerscheinung eines limitierender Mangangehaltes während des Wachstums sein, denn der geringe intrazelluläre Mangangehalt aller Zellen der lag-Phase (bis zu 73 ng Mangan/  $2.7 \cdot 10^9$  Zellen) umfasst gerade bis zu 0.27 % des im Medium verfügbaren Mangans (ca. 27  $\mu$ g in 50 ml Medium).

Die Ergebnisse zeigen weiterhin deutlich, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in der Mangan-Aufnahme stark eingeschränkt war. Das spiegelt wider, dass MntH aber auch ZupT den Mangan-Transport in *E. coli* übernehmen (Abb. 5D) (Kehres *et al.*, 2000; Makui *et al.*, 2000; Anjem *et al.*, 2009). Das MntH einen Großteil der Mangan-Aufnahme in *E. coli* gewährleistet, wurde ebenfalls von Anjem *et al.* (2009) beobachtet, denn eine *mntH* Mutante akkumuliert weniger Mangan als der Wildtyp. Eine leichte basale Aktivität scheint der unbekanntem Transporter auch ohne Anwesenheit von Eisen zu besitzen, denn es konnte

mehr Mangan in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nachgewiesen werden, die mit Mangan inkubiert wurden als in Zellen, die ohne Zusatz inkubiert wurden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass noch weitere unbekannte  $Mn^{2+}$ -Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante existieren. Letztendlich wurde in den Zellen der stationären Phase genauso viel Mangan nachgewiesen wie in den Zellen der stationären Phase, die mit Eisen und Mangan inkubiert wurden.

In wachsenden Zellen des Wildtyps konnte in Anwesenheit von Mangan im Medium eine gesteigerte Akkumulation von Mangan festgestellt werden. Auch andere Arbeitsgruppen stellten fest, dass der Mangangehalt in der stationären Phase des Wachstums am höchsten zu sein scheint. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der positiven Regulation der Expression von *mntH* durch OxyR. In aeroben Stoffwechselprozessen entstehen reaktive Sauerstoffspezies, deren Akkumulation z. B. durch manganhaltige Enzyme wie Superoxid-Dismutase SodA und Katalase-Peroxidase KatG verhindert wird (Keele *et al.*, 1970; Fridovich, 1986b; Fridovich, 1995; Singh *et al.*, 2004). Dennoch ist die oxidative Stresssituation in der stationären Phase in *E. coli* besonders ausgeprägt (Dukan und Nystrom, 1999; Noor *et al.*, 2009), sodass OxyR z. B. die Expression von *mntH* induziert und somit die Aufnahme von Mangan gewährleistet (Kehres *et al.*, 2000; Kehres *et al.*, 2002; Imlay, 2008; Anjem *et al.*, 2009). Womöglich konnte aus diesem Grund in wachsenden *E. coli* Wildtyp Zellen eine Zunahme der intrazellulären Mangan-Konzentration beobachtet werden. Wurden jedoch die Wildtyp-Zellen ohne Mangan inkubiert, so nahm der Mangangehalt während des Wachstums ab. Dies kann nur durch eine verminderte Mangan-Aufnahme verursacht worden sein, denn Mangan im Medium war nicht limitierend. War die Transport-Aktivität von MntH herabgesetzt oder wurde die Expression reprimiert? Letzteres ist eher unwahrscheinlich, da beide Repressoren, MntR und Fur, nur unter Mangan- bzw. Eisenüberschuss aktiv sind (Que und Helmann, 2000; Patzer und Hantke, 2001; Braun, 2003; Papp-Wallace und Maguire, 2006; Braun und Hantke, 2007; Lee und Helmann, 2007). Auch andere Autoren zeigen, dass während des Wachstums ohne externe Mangan-Zugabe der intrazelluläre Mangangehalt abnimmt (Medicis *et al.*, 1986; Kehres und Maguire, 2003), weshalb, das steht immer noch offen. Der Mangangehalt der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante bleibt jedoch nahezu konstant und nimmt während des Wachstums, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht ab. Scheint Mangan in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante doch eine andere Rolle als im *E. coli* Wildtyp zu spielen?

Interessanterweise war der intrazelluläre Eisengehalt in wachsenden Zellen beider Stämme viel höher als der Mangangehalt in diesen Zellen, was mit Ergebnissen aus Outten und O'Halloran, (2001) und Anjem *et al.* (2009) im Einklang steht. In diesen Veröffentlichungen wird gezeigt, dass *E. coli* Zellen der stationären Phase sogar bis zu 100-fach mehr Eisen als Mangan akkumulierten. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in *E. coli* Wildtyp-Zellen nur eine bis zu 28-fach höhere Eisen-Akkumulation festgestellt werden. Es kann ausgeschlossen werden, dass der unterschiedliche intrazelluläre Eisengehalt durch andere Kultivierungsbedingungen zustande kam, denn das hier verwendete Medium wies einen ähnlichen Eisen (2  $\mu$ M)- bzw. Mangangehalt

(0.2  $\mu\text{M}$ ) auf wie das Medium, welches in Outten und O'Halloran, (2001) verwendet wurde. Im Gegensatz dazu entspricht der intrazelluläre Mangengehalt von Wildtyp-Zellen der stationären Phase ungefähr dem, der in Outten und O'Halloran, (2001) bzw. in Anjem *et al.* (2009) ermittelt wurde.

Wurden die Kulturen mit Eisen inkubiert, so war besonders auffällig, dass der Eisengehalt im Verlaufe des Wachstums stark abnahm. Diese Beobachtungen wurden schon 1981 von Hartmann und Braun gemacht. Hier wurde gezeigt, dass das exponentielle Wachstum und die Eisen-Aufnahme von Kulturen, die mit Eisen und Citrat inkubiert wurden, ausgewogen waren. Wurde das Eisen im Medium aufgebraucht, so sank der Eisengehalt dieser Kulturen, obwohl noch Wachstum erfolgte (Hartmann und Braun, 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine starke Abnahme des intrazellulären Eisengehaltes beider Stämme im Verlaufe des gesamten Wachstums festgestellt. Die vorherige Inkubation der Kulturen in Minimalmedium, in eisenfreiem Minimalmedium und erneut in eisenfreiem Minimalmedium führte vermutlich zur extremen Eisenlimitation in den Zellen. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Eisen zum Medium konnte dies kurzzeitig aufgehoben werden. Berechnet man die Menge an Eisen, die im Medium verfügbar war (ca. 30  $\mu\text{g}/50\text{ ml}$  Medium) und vergleicht dies mit dem intrazellulären Eisengehalt aller Zellen in einer 50 ml Kultur der lag-Phase (bis zu 24.3  $\mu\text{g}$  Eisen in Zellen des Wildtyps und bis zu 19  $\mu\text{g}$  Eisen in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante), so stellt man fest, dass ein hoher Prozentsatz an verfügbarem Eisen aus der extrazellulären Umgebung von diesen Zellen akkumuliert wurde. Im Verlaufe des exponentiellen Wachstums nahm der intrazelluläre Eisengehalt in den Zellen ab, da vermutlich nicht mehr genügend Eisen aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen werden konnte.

Es besteht jedoch ebenso die Möglichkeit, dass die Abnahme des intrazellulären Eisengehaltes in Zellen des Wildtyps durch verminderte Eisen-Aufnahme resultierte. Eine verminderte Eisen-Aufnahme setzt einen aktiven Fur- $\text{Fe}^{2+}$ -Repressor voraus (Hantke, 2001; Andrews *et al.*, 2003; Braun, 2003; Braun und Hantke, 2007). Das Fur als Repressor in Wildtyp-Zellen der exponentiellen Phase fungierte, beweisen die beobachteten SodB-Aktivitäten (Abb. 19). Auch in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante konnte unter diesen Bedingungen aktive SodB nachgewiesen werden, zwar war diese weitaus geringer als die SodB-Aktivität in Wildtyp-Zellen, dennoch zeigt es, dass Fur als Repressor in der exponentiellen Phase vorgelegen haben muss.

Um jedoch die genaue Ursache für die Abnahme des intrazellulären Eisengehaltes zu erörtern, sind weiterführende Experimente notwendig. Würde z. B. ein Wachstum in Gegenwart höherer Eisen-Konzentrationen nicht zu einer Abnahme des intrazellulären Eisengehaltes führen, so wäre dies ein Hinweis darauf, dass die Abnahme der intrazellulären Eisen-Konzentration durch den limitierenden Eisengehalt im Medium hervorgerufen wurde. Des Weiteren würden Gen-expressionsstudien von Eisen-Aufnahme-Systemen während allen Wachstumsphasen wertvolle Hinweise über den „Fur-Status“ der Zellen liefern.

Betrachtet man nun den Eisengehalt der Zellen, die mit dem Eisen-Chelator DIP inkubiert wurden, so stellt man fest, dass nur der intrazelluläre Eisengehalt des Wildtyps, nicht jedoch der

der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, beeinflusst wurde. In der exponentiellen Phase wurde in Zellen des Wildtyps, die mit DIP inkubiert wurden, ein höherer Eisengehalt nachgewiesen als in Zellen der lag-Phase. Eine Erhöhung des Eisengehaltes in den Wildtyp-Zellen konnte womöglich eine Antwort auf die verstärkte Eisenlimitation durch DIP sein. Jedoch kann dies nicht durch eine Fur-Derepression hervorgerufen worden sein, denn in Wildtyp-Zellen der exponentiellen Phase wurde aktive SodB nachgewiesen.

Obwohl das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante stark eingeschränkt war, konnten unter Umständen, ähnliche Mengen an Eisen und Mangan wie im Wildtyp aufgenommen werden. Es scheint, dass das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nur dann erfolgen konnte, wenn eine bestimmte minimale intrazelluläre Eisen- und/oder Mangan-Konzentration erreicht wurde. Dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante aufgrund der deletierten Aufnahme-Systeme mehr Zeit dafür in Anspruch nahm als *E. coli* Wildtyp, beweisen die langen lag-Phasen im Wachstum (Abb. 15). Zudem muss in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante noch mindestens ein unbekannter Transporter vorhanden sein, der die Eisen- bzw. Mangan-Aufnahme gewährleistet und somit ein Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante erlaubt.

#### **4.2.2. Mangan schützt vermutlich vor Protein-Oxidation, verursacht durch Trockenstress**

Zunächst wurde angenommen, dass die Fähigkeit zur extremen Strahlenresistenz von *D. radiodurans* auf besondere DNA-Reparaturmechanismen basierte (Daly *et al.*, 1994; Minton und Daly, 1995; Makarova *et al.*, 2001). In den letzten Jahren wurden jedoch neue Zusammenhänge zwischen der extremen Strahlenresistenz vom Bakterium *D. radiodurans* und dem hohen intrazellulären Mangangehalt beobachtet (Daly *et al.*, 2004). Dabei weisen strahlenresistente Zellen einen 300-fach höheren Mangangehalt und einen zwei Drittel geringeren Eisengehalt auf als sensitive Zellen, wie z. B. *E. coli*. Das Wachstum in Anwesenheit von Mangan wird nicht nur verbessert, sondern ist Voraussetzung für eine extreme Strahlenresistenz (Daly *et al.*, 2007; Daly, 2009). Wird die Mangan-Aufnahme unterbunden, so resultiert dies in einer verminderten Resistenz gegenüber Strahlung, was sich in einer erhöhten Proteinoxidation widerspiegelt (Daly *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2007).

Auffällig ist, dass viele strahlenresistente Bakterien auch trockenstressresistent sind. So ist z. B. *D. radiodurans* in der Lage, sechs Wochen Trockenstress zu überstehen (Fredrickson *et al.*, 2008). Auch hier schützt Mangan die Proteine vor trockenstress-induzierter Oxidation. Sowohl Strahlen- als auch Trockenstress erzeugt reaktive Sauerstoffspezies, die direkt Proteine oxidieren können und indirekt durch Fenton-Reaktion die DNA schädigen (Daly und Myles, 2009). Wie jedoch reaktive Sauerstoffspezies durch Dehydratisierung genau entstehen, ist bisher noch unbekannt. Es wird vermutet, dass durch Wasserverlust die intrazelluläre Ionen-Konzentration zunimmt und dadurch womöglich die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erhöht wird (Pereira Ede *et al.*, 2003; Franca *et al.*, 2007). In der Tat kann die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante

ebenfalls durch Mangan vor Trockenstress geschützt werden (Abb. 16A). Wurden die Zellen vor der Trockenstresseinwirkung ohne Mangan inkubiert, so überlebten weniger Zellen den Trockenstress als Zellen, die zuvor mit Mangan inkubiert wurden. Die Unterschiede in der Überlebensrate resultierten durch Trockenstress-verursachten Zelltod und nicht durch verbessertes Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante durch Mangan. Denn die Zellen wurden nach Trockenstress-Exposition in Vollmedium inkubiert, um Eisenlimitation und Wachstumsförderung durch Mangan zu vermeiden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in der Lage ist, Mangan aufzunehmen, das dann vor Trockenstress schützt. Vermutlich schützt Mangan vor Trockenstress-induzierter Proteinoxidation, wie auch in *D. radiodurans*.

Wurde die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zuvor mit Eisen inkubiert, so waren die Zellen sensitiver gegenüber Trockenstress als die Zellen, die ohne Zusatz inkubiert wurden. Wie die Ergebnisse zeigten, wies die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante einen höheren Eisengehalt auf, wenn sie mit Eisen kultiviert wurde (Tab. 6). Wurden die Zellen zusätzlich Trockenstress ausgesetzt, so wurden vermutlich durch Anwesenheit von Fe(II)-Ionen im Cytoplasma mehr reaktive Sauerstoffspezies gebildet. Eisen kann in der Fenton-Reaktion gefährliche Hydroxylradikale regenerieren, die dann direkt DNA, Proteine und Lipide schädigen (Imlay *et al.*, 1988; Imlay und Linn, 1988; Fridovich, 1995; Imlay, 2003; Imlay, 2008). Je mehr Eisen in den Zellen vorliegt, umso mehr Eisen könnte zusammen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Fenton-Reaktion katalysieren. Zusätzlich können reaktive Sauerstoffspezies wie O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die aktiven Zentren von Dehydratasen penetrieren und so durch Oxidation der Fe-S-Cluster die Inaktivierung dieser Enzyme verursachen (Imlay, 2008).

Mangan dagegen geht keine Fenton-Reaktion ein und verstärkt somit nicht den oxidativen Stress. Dies könnte erklären, weshalb unter diesen Bedingungen die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante sensitiver gegenüber Trockenstress ist. Jedoch scheint dies nicht die einzige Ursache für die verminderte Resistenz gegenüber Trockenstress zu sein, denn Wildtyp-Zellen, die zuvor in Gegenwart von Eisen inkubiert wurden, zeigten keine verminderte Resistenz gegenüber Trockenstress (Abb. 16B).

### 4.2.3. Mangan fördert die SodA-Aktivität

Enzyme wie die Superoxid-Dismutasen, Katalasen oder Peroxidasen vermeiden die Anhäufung toxischer Sauerstoffspezies, die während des aeroben Metabolismus entstehen (Imlay *et al.*, 1988; Imlay und Linn, 1988; Fridovich, 1995; Imlay, 2003; Imlay, 2008).

In *E. coli* existieren drei Superoxid-Dismutasen. Zwei, SodA und SodB, sind im Cytoplasma lokalisiert und SodC im Periplasma. Für die SodA-Aktivität ist Mangan essenziell, wohingegen SodB Eisen und SodC Kupfer und Zink als Kofaktor besitzen (Keele *et al.*, 1970; Yost und Fridovich, 1973; Touati *et al.*, 1995; Benov *et al.*, 1996; Imlay und Imlay, 1996). Die Hauptaufgabe hinsichtlich der Disproportionierung von Superoxid-Anionen in *E. coli* scheinen die

beiden cytoplasmatischen Superoxid-Dismutasen zu übernehmen, denn eine Deletion in beiden Superoxid-Dismutasen führt nicht nur zu einem verminderten Wachstum sondern auch zu einer erhöhten Mutationsrate unter aeroben Wachstumsbedingungen (Farr *et al.*, 1986). Dagegen zeigen *sodC* Mutanten in *E. coli* und in *Salmonella Typhimurium* keine erhöhte Sensitivität gegenüber Superoxid (Gort *et al.*, 1999).

Die Transkription von *sodC* wird durch das RpoS Regulon in der stationären Phase induziert und durch Fnr (*fumarate nitrate reductase*) unter anaeroben Wachstumsbedingungen reprimiert (Benov und Fridovich, 1994; Imlay und Imlay, 1996; Gort *et al.*, 1999). Die Expression von *sodA* steht unter der Kontrolle von sechs Transkriptionsregulatoren; SoxRS-Regulon (*oxidative response*), Arc (*aerobic regulation control*), IHF (*integration host factor*), Fur (*ferric iron regulator*) und Fnr (*fumarate nitrate reductase*) (Compan und Touati, 1993). Dabei wird *sodA* unter oxidativen Stress exprimiert, jedoch u. a. durch Eisenüberschuss und durch anaerobes Wachstum reprimiert (Compan und Touati, 1993). Die Expression von *sodB* scheint weniger komplex zu sein, sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen findet die Expression in Abhängigkeit von der Eisenverfügbarkeit statt. Die *sodB* Expression wird indirekt durch Fur aktiviert (Dubrac und Touati, 2000; Dubrac und Touati, 2002). Ist genügend Eisen in der Zelle vorhanden, so reprimiert Fur-Fe<sup>2+</sup> die Expression einer kleinen regulatorischen RNA *ryhB*, die sonst die *sodB* mRNA binden und letztendlich die Translation verhindern würde (Masse´ und Gottesman, 2002; Masse´ *et al.*, 2005). Dadurch, dass die Regulation von SodA so komplex ist, lässt sich schwer eine Aussage darüber treffen, welche Superoxid-Dismutase die Hauptaufgabe während des Wachstums in *E. coli* übernimmt, dies ist sehr von den Wachstumsbedingungen abhängig. Welche Superoxid-Dismutasen sind unter verschiedenen Wachstumsbedingungen im *E. coli* Wildtyp und einer Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante aktiv?

In der vorliegenden Arbeit wurde die SOD-Aktivität von Zellen der exponentiellen Phase unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass unter Eisenlimitation in Wildtyp-Zellen die SodA-Aktivität viel höher ist als die SodB-Aktivität (Abb. 19). Da Fur als Repressor unter Eisenlimitation nicht aktiv ist, wird die Expression von *sodA* nicht reprimiert, jedoch die von *sodB*. Dies erscheint ökonomisch, da Eisen als Kofaktor der SodB nicht im Überschuss vorhanden ist. Wird jedoch Eisen zum Medium hinzugegeben, so nimmt die SodA-Aktivität in Wildtyp-Zellen ab und die SodB-Aktivität zu. Vermutlich ist Fur durch Bindung von Eisen unter diesen Bedingungen aktiv und reprimiert so die Expression von *sodA*, induziert jedoch indirekt die Expression von *sodB*. Die dennoch vorhandene SodA-Aktivität in Wildtyp-Zellen beweist, dass trotz Eisenüberschuss die Expression von *sodA* stattfand, wahrscheinlich aktiviert durch das SoxRS Regulon.

Es scheint ebenfalls möglich, dass Eisen Mangan aus dem aktiven Zentrum der manganhaltigen Superoxid-Dismutase verdrängt und somit die Aktivität von SodA vermindert. Dass SodA Eisen im aktiven Zentrum binden kann, wurde bereits in vielen vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Beyer *et al.*, 1991; Whittaker, 2003; Culotta *et al.*, 2006; Whittaker, 2009). Aus einer areob wachsenden *E. coli* Kultur wurden drei Formen der manganabhängigen SOD isoliert: Mn<sub>2</sub>-



MnSOD, Mn,Fe-MnSOD, and Fe<sub>2</sub>-MnSOD (Beyer *et al.*,1991). Die verschiedenen Mangan-Superoxid-Dismutasen unterscheiden sich kaum in ihrer Konformation, jedoch in ihrer katalytischen Aktivität. Durch Bindung eines Eisenatoms im aktiven Zentrum der MnSOD, nimmt das Redoxpotential ab und eine Disproportionierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> kann nicht mehr katalysiert werden (Beyer *et al.*, 1991; Vance und Miller, 1998). Die eigentliche Bindung ist abhängig von der Verfügbarkeit des jeweiligen Metalls. Das scheint in *E. coli* einen weiteren Regulationsmechanismus der beiden Superoxid-Dismutasen-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Mangan- bzw. Eisenverfügbarkeit darzustellen (Culotta *et al.*, 2006).

Dies würde weiterhin erklären, weshalb die SodA-Aktivität in Wildtyp-Zellen wieder zunimmt, wenn beide Metalle während des Wachstums vorhanden waren. Der „Fur-Status“ in diesen Zellen muss der gleiche gewesen sein wie in Zellen, die nur mit Eisen inkubiert wurden. Denn würde Fur-Fe<sup>2+</sup> nicht mehr als Repressor aktiv sein, so würde *ryhB* transkribiert werden und so die Translation der *sodB* mRNA unterbinden. Dies würde sich im Verlust der SodB-Aktivität widerspiegeln, was jedoch nicht beobachtet wurde.

Die einzige plausible Erklärung scheint zu sein, dass Mangan im Überschuss um Bindestellen im aktiven Zentrum mit dem Eisen konkurriert. Daraus resultiert eine leichte Zunahme der SodA-Aktivität im Vergleich zur SodA-Aktivität von Wildtyp-Zellen, die nur mit Eisen inkubiert wurden. Jedoch erreicht die Aktivität nicht die SodA-Aktivität der Zellen, die ohne Eisen inkubiert wurden. Das heißt, sobald Eisen intrazellulär vorhanden ist, führt dies zu einer aktiven SodB. Dass Eisen in den Wildtyp-Zellen unter diesen Bedingungen intrazellulär vorlag, beweisen die Ergebnisse der Atom-Absorptions-Spektroskopie (Tab. 6).

Unter Eisenlimitation wurden in den Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante dagegen nur sehr geringe SodA-Aktivitäten und keine SodB-Aktivitäten beobachtet. Dies bestätigt vorangegangene Ergebnisse, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter diesen Wachstumsbedingungen einen niedrigeren Mangan- und Eisengehalt aufwies. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten eine niedrigere SodA-Aktivität in einer *sodB mntH* Doppelmutante (Anjem *et al.*, 2009). Dennoch konnte die SodA-Aktivität durch Zugabe von Mangan in den Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante stark gesteigert werden (Abb. 19). Ebenso wie andere Arbeitsgruppen zeigten, dass durch Mangan die SodA-Aktivität gefördert werden kann (Pugh *et al.*, 1984; Al-Maghrebi *et al.*, 2002; Anjem *et al.*, 2009). Somit musste Mangan in die Zellen durch ein unbekanntes Aufnahme-System transportiert worden sein, was durch die Bestimmung des intrazellulären Mangangehaltes bestätigt wurde (Tab. 7).

Die Inkubation der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Medium mit Eisen führte zu einer Abnahme der SodA-Aktivität und zu einer Zunahme der SodB-Aktivität, die jedoch insgesamt sehr gering war. Die Ergebnisse der Atom-Absorptions-Spektroskopie zeigten, dass in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante unter diesen Wachstumsbedingungen intrazellulär Eisen vorlag, jedoch geringere Mengen als in Zellen des Wildtyps. Offensichtlich reichte der intrazelluläre Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante nicht aus, um große Mengen aktiver SodB zu bilden. Jedoch genügte die intrazelluläre Eisen-Konzentration für die

Aktivierung des Fur-Repressors, was zu einer Expression von *sodB* führte. Dies würde ebenfalls die Abnahme der SodA-Aktivität erklären.

Wurde die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit beider Metalle inkubiert, so konnte wiederum eine hohe SodA-Aktivität und eine geringe SodB-Aktivität beobachtet werden. Diese SodA-Aktivität unterschied sich nicht von der SodA-Aktivität derjenigen Zellen, die nur mit Mangan inkubiert wurden. In diesem Fall scheinen die Eisen-Atome nicht um Bindstellen in der MnSOD zu konkurrieren, was in Wildtyp-Zellen der Fall war. Dies spricht dafür, dass die intrazelluläre Eisen-Konzentration nicht hoch genug war, um mit den Mangan-Atomen im aktiven Zentrum der SodA zu konkurrieren. Um jedoch genauere Aussagen treffen zu können, müsste das Expressionsniveau von *sodA* und *sodB* in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante und des *E. coli* Wildtyps unter diesen Wachstumsbedingungen untersucht werden.

Vermutlich ist die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante aufgrund der geringen SOD-Aktivitäten extrem sensitiv gegenüber oxidativem Stress, was Wachstumsexperimente in Anwesenheit von Paraquat bestätigen (Abb. 17).

In *E. coli* wird Paraquat schnell reduziert, das daraus entstehende Paraquat-Radikal reagiert mit Sauerstoff und regeneriert so toxisches Superoxid-Anion (Hassan und Fridovich, 1979). Somit initiiert Paraquat oxidativen Stress. Die durch Paraquat regenerierten toxischen Sauerstoffspezies führen zur Aktivierung des SoxRS-Regulons. Das konstitutiv exprimierte SoxR besitzt ein Fe-S-Cluster, das in Anwesenheit von  $O_2^-$  oxidiert wird. Dadurch verändert sich die Konformation dieses Homodimers, das nun als starker Transkriptions-Faktor wirkt und so die Expression von *soxS* induziert. SoxS wiederum ist ein Transkriptions-Faktor vieler Gene und aktiviert die Expression von z. B. *fur*, *acnA*, *tolC*, *fumC* und *sodA* (Demple *et al.*, 1999; Storz und Imlay, 1999; Touati, 2000b; Imlay, 2003). Bereits in vorangegangenen Arbeiten wird eine Induktion der *sodA* Expression in Anwesenheit von Paraquat beschrieben (Liochev und Fridovich, 1991).

Fand das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von Mangan statt, so war dieser resistenter gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress (Abb. 18), vermutlich durch Zunahme der SodA-Aktivität in Gegenwart von Mangan. Fand das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von Eisen statt, so schützten vermutlich die Superoxid-Dismutasen nicht im gleichen Maße vor Paraquat-induziertem oxidativen Stress wie es unter Mangan-Zugabe der Fall war. Außerdem verstärkt wahrscheinlich Eisen als redoxaktives Metall die toxische Wirkung von Paraquat, was ebenfalls in früheren Arbeiten gezeigt wurde (Korbashi *et al.*, 1986).

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass SodA im Schutz vor oxidativem Stress in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante die Hauptaufgabe übernimmt. Schon in Kargalioglu und Imlay (1994) wird die Notwendigkeit der MnSOD unter aeroben Wachstumsbedingungen in *E. coli* beschrieben. Aber ist sie in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante essenziell? Zur Beantwortung dieser Frage wurde in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante versucht, zusätzlich *sodA* zu deletieren. Dies war jedoch unter aeroben Bedingungen nicht möglich (Abb. 20A, B). Im Gegensatz dazu konnte im *E. coli* Wildtyp diese Deletionsmutante unter aeroben Bedingungen

ohne Probleme konstruiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine *sodB* Deletion war in beiden *E. coli* Stämmen unter aeroben Bedingungen möglich (Abb. 20C, D).

Ähnliche Ergebnisse wurden in vorherigen Arbeiten beschrieben, in denen *sodA sodB* Doppelmutanten nicht mehr in der Lage waren, aerob im Minimal-Medium zu wachsen (Carlioz und Touati, 1986). Dies lässt vermuten, dass SodA in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante den einzigen Schutz vor oxidativem Stress bietet. SodB dagegen scheint im Schutz vor Superoxid eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

#### 4.2.4. Mangan schützt direkt vor oxidativem Stress

Wurde jedoch die zusätzliche Mutation von *sodA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von Mangan durchgeführt, so war ein Wachstum dieses *E. coli* Stammes möglich (Abb. 21). Wie kann jedoch Mangan direkt vor oxidativem Stress schützen? In vielen anderen Arbeiten wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass Mangan direkt vor Superoxid und/oder Wasserstoffperoxid schützen kann (Archibald und Duong, 1984; Al-Maghrebi *et al.*, 2002; Horsburgh *et al.*, 2002; Kehres und Maguire, 2003; Daly *et al.*, 2004).

Mangan, gebunden an bestimmte Biomoleküle, kann  $O_2^-$  disproportionieren (Archibald und Fridovich, 1982). Kinetische Studien zu SodA und SodB-Aktivitäten zeigen ebenso, dass Mangan die Funktion der Superoxid-Dismutasen übernehmen könnte, wenn es in mM-Konzentration in der Zelle vorliegen würde (Gray und Carmichael, 1992). Eine *E. coli* Zelle mit intrazellulär 150  $\mu\text{M}$  Mangan könnte im Idealfall  $O_2^-$  disproportionieren, dass einer Superoxid-Dismutase-Aktivität von 108 U/ml entspräche (Anjem *et al.*, 2009). Die enzymatische Superoxid-Dismutase-Aktivität ungestresster *E. coli* Zellen ist jedoch mit 3000 U/ml um fast das 30-fache höher. Sind *E. coli* Zellen  $H_2O_2$ -Stress ausgesetzt, so beträgt die Superoxid-Dismutase-Aktivität sogar 14000 U/ml (Anjem *et al.*, 2009). Somit wird vermutet, dass Mangan keinen optimalen Schutz vor Superoxid-Anion bieten könnte (Anjem *et al.*, 2009).

Jedoch konnte nur in Anwesenheit von Mangan, nicht in Anwesenheit von Eisen, *sodA* zusätzlich in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante erfolgreich deletiert werden (Abb. 21). In Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, die mit 10  $\mu\text{M}$   $MnCl_2$  inkubiert wurden, konnte bis zu 150  $\mu\text{M}$  Mangan intrazellulär nachgewiesen werden. Könnte diese Konzentration dennoch ausreichen, um eine zusätzliche Deletion von *sodA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu erlauben oder führt eine Deletion von *sodA* zu einer gesteigerten Mangan-Aufnahme, sodass durch höhere intrazelluläre Mangan-Konzentrationen der Verlust der SodA-Aktivität kompensiert werden könnte? Dies wurde für eine *sodA sodB* Doppelmutante in *E. coli* beschrieben, die mehr Mangan als der Wildtyp akkumulierte (Al-Maghrebi *et al.*, 2002). Die Bestimmung des intrazellulären Mangangehaltes der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante mit zusätzlicher *sodA* Deletion würde diese Frage beantworten. Würde jedoch die intrazelluläre Mangan-Konzentration für eine direkte Disproportionierung von  $O_2^-$  nicht ausreichen, könnte auch Mangan für die katalytische Aktivität

eines unbekanntes Enzyms wichtig sein, das dann die Funktion der Superoxid-Dismutase übernehmen könnte und somit einen Schutz vor oxidativem Stress bieten würde.

Dass Mangan die Funktion der Superoxid-Dismutasen übernehmen könnte, beweisen Mikroorganismen wie *Lactobacillus plantarum*, der ohne Superoxid-Dismutasen auskommt, jedoch einen ungewöhnlichen hohen intrazellulären Mangangehalt von über 30 mM aufweist (Archibald und Fridovich, 1981a; Archibald und Fridovich, 1981b; Archibald und Duong, 1984). Auch das strahlenresistente Bakterium *D. radiodurans* besitzt einen hohen intrazellulären Mangangehalt (Daly *et al.*, 2004). Die in 2007 erschienene Arbeit über diesen Organismus beweist, dass Mangan die Proteine vor Oxidation schützt, die durch Strahlung verursacht wird (Daly *et al.*, 2007). *Neisseria gonorrhoeae* besitzt nur eine Superoxid-Dismutase, SodB. Dennoch korreliert der intrazelluläre Mangangehalt in *sodB* Mutanten mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress (Tseng *et al.*, 2001). Des Weiteren ist das Wachstum von *Bacillus subtilis sodA* Mutanten nur in Anwesenheit von Mangan möglich, was für eine Eliminierung von Superoxid-Anion durch Mangan spricht (Inaoka *et al.*, 1999).

Neben der Disproportionierung von Superoxid ist Mangan im Komplex mit Bicarbonat in der Lage,  $H_2O_2$  zu disproportionieren (Berlett *et al.*, 1990; Stadtman *et al.*, 1990). Jedoch wird dies in der kürzlich erschienenen Arbeit von Anjem *et al.* (2009) in Frage gestellt, da kein effektiver Abbau von  $H_2O_2$  durch Mangan beobachtet wurde. Voraussetzung für eine effiziente Disproportionierung wäre auch hier eine extrem hohe intrazelluläre Konzentration von Mangan. 150  $\mu$ M Mangan und 28 mM Bicarbonat würden die Hälfte des durch Atmungsaktivität entstehende  $H_2O_2$  innerhalb von 27 min umsetzen (Anjem *et al.*, 2009). Wenn Mangan in solch hohen intrazellulären Konzentrationen in *E. coli* vorkommt, würde jedoch diese Reaktion viel zu lange dauern, um allein einen optimalen Schutz bieten zu können. Zusammen jedoch mit der Aktivität der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase Ahp und der Katalase KatG würde die Halbwertszeit von  $H_2O_2$  nur 1.3 ms betragen (Seaver und Imlay, 2001; Anjem *et al.*, 2009).

Fand das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von 10  $\mu$ M  $MnCl_2$  statt, so wurden bis zu 150  $\mu$ M Mangan intrazellulär nachgewiesen (Tab. 7). Diese Konzentration würde ausreichen, um eine Disproportionierung von  $H_2O_2$  im Komplex mit Bicarbonat zu katalysieren. Diese Reaktion wäre zwar nicht sehr effektiv, jedoch könnte so Mangan, neben Ahp und KatG, zur  $H_2O_2$  Entgiftung beitragen. Auch dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von Mangan stark verbessert werden konnte (Abb. 15A).

#### **4.2.5. Mangan scheint auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu spielen**

Mangan schützt die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante direkt und indirekt vor oxidativem Stress. Jedoch scheint Mangan nicht nur aerob eine wichtige Funktion in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu übernehmen. Auch das anaerobe Wachstum wurde in Anwesenheit von Mangan

verbessert (Abb. 22). Seit langem ist bekannt, dass ebenfalls unter anaeroben Bedingungen Superoxid-Dismutasen exprimiert werden können, um so vor schnell auftretenden aeroben Wachstumsbedingungen gewappnet zu sein (Privalle und Fridovich 1987; Privalle *et al.*, 1989; Privalle *et al.*, 1993; Kargalioglu und Imlay, 1994; Fridovich 1995). Jedoch wird unter anaeroben Wachstumsbedingungen nur das Gen der eisenabhängigen Superoxid-Dismutase SodB exprimiert (Privalle und Fridovich, 1988; Kargalioglu und Imlay, 1994; Fridovich, 1995). Eine aktive SodA kann nur unter bestimmten anaeroben Wachstumsbedingungen, wie z. B. durch Zugabe von Diamid oder unter Eisenlimitation beobachtet werden (Privalle *et al.*, 1993; Moody und Hassan, 1984). Zwar wird unter Eisenlimitation die Expression von *sodA* nicht durch Fur-Fe<sup>2+</sup> reprimiert, jedoch durch ArcA/B (*aerobic respiration control*) (Tardat und Touati, 1991; Compan und Touati, 1993). Dazu ist es eher unwahrscheinlich, dass anaerob das SoxRS Regulon die *sodA* Expression aktiviert (Compan und Touati, 1993). Selbst wenn *sodA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante exprimiert werden würde und durch Mangan die Bildung aktiver SodA gefördert werden würde, ist es eher unwahrscheinlich, dass dadurch das Wachstum verbessert werden konnte, da unter anaeroben Bedingungen das Entstehen toxischer Sauerstoffspezies sehr limitiert ist.

Mangan scheint aus einem bisher unbekanntem anderen Grund das anaerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu verbessern. Kann möglicherweise Mangan unter Eisen-Mangelbedingungen den Platz von Eisen in einigen Enzymen einnehmen und so das aerobe oder anaerobe Wachstum unter Eisenlimitation fördern? Mangan ist im Gegensatz zum Eisen nicht redoxaktiv und kann somit keine Fenton-Reaktion eingehen. Mangan besitzt ähnliche Eigenschaften wie Eisen, so kommt Mangan ebenfalls in mehreren Oxidationszuständen vor und die Redoxpotentiale beider Metalle liegen eng beieinander (Archibald, 1986; Kehres und Maguire, 2003; Anjem *et al.*, 2009). Zwar ist Mangan ein schlechteres Reduktionsmittel als Eisen, dennoch würde dies in Komplexen mit bestimmten Liganden einige Reaktionen katalysieren können (Archibald 1986; Anjem *et al.*, 2009). Ein Paradebeispiel dafür ist *L. plantarum*, der eine Reihe manganabhängiger Enzyme besitzt so z. B. Katalase, Laktat-Dehydrogenase oder RNA-Polymerase (Archibald und Duong, 1984; Archibald 1986). In anderen Arbeiten konnte *in vitro* eine Enzymaktivität der Transketolase mit sowohl Eisen als auch mit Mangan als Kofaktor beobachtet werden (Anjem *et al.*, 2009). Wie es jedoch am Beispiel der Superoxid-Dismutasen in *E. coli* bereits beschrieben wurde, ist es nicht immer möglich, Mangan durch Eisen zu ersetzen. Dennoch kann die Möglichkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Eisenlimitation auf diesem Wege umgegangen werden könnte und somit ein Überleben unter Eisenmangel ermöglicht werden kann.

#### 4.2.6. Gallium als Fe(III)-Substituent verschärft vermutlich die indirekte Eisenlimitation und oxidativen Stress in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante

Gallium hat auf Grund seiner antitumoralen und antimikrobiellen Wirkung in den letzten Jahren besonderes Interesse in der klinischen Forschung geweckt (Straus, 2003; Chitambar, 2004; Davies *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2007). So zeigen Arbeiten mit *Pseudomonas aeruginosa*, dass Gallium sowohl das Wachstum als auch die Biofilm-Ausbildung verhindert (Kaneko *et al.*, 2007). Weshalb besitzt Gallium solch eine antimikrobielle Wirkung? Gallium und Eisen besitzen ähnliche Ionen-Radien (0.62 Å; 0.64 Å) (Chitambar und Narasimhan, 1991; Stojiljkovic *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 2008). Viele biologische Systeme können daher nicht zwischen Fe(III) und Ga(III) unterscheiden (Chitambar und Narasimhan, 1991; Kaneko *et al.*, 2007). Dadurch, dass Ga(III), im Gegensatz zum Fe(III), nicht reduziert werden kann, können so eisenabhängige metabolische Redox-Prozesse und Enzym-Aktivitäten eisenhaltiger Proteine unterbunden werden. Gallium vermindert das Wachstums verschiedener Mikroorganismen (Olayanmi *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2007, Beriault *et al.*, 2007), vermutlich die Folgeerscheinung von Protein-Fehlfunktionen. Frühere Arbeiten zeigen ebenfalls, dass Gallium zum Funktionsverlust der Ribonukleotid-Reduktase in humanen Krebszelllinien führt (Chitambar und Narasimhan 1991; Chitambar *et al.*, 1991). Darüber hinaus wurde bewiesen, dass Eisenlimitation die Sensitivität gegenüber Gallium fördert (Olayanmi *et al.*, 2000; Beriault *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2007). Dies wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachtet, denn die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ECA458( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC$ ) ist, im Gegensatz zum *E. coli* Wildtyp, extrem sensitiv gegenüber Gallium (Abb. 23). Das zeigt wiederum, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante extremer Eisenlimitation ausgesetzt ist, obwohl der intrazelluläre Eisengehalt dem anscheinend widerspricht. Aber wie vermittelt Gallium diesen toxischen Effekt? Werden Eisen-Aufnahme-Systeme durch Gallium blockiert und/oder substituiert Gallium intrazellulär Eisen und inaktiviert so metabolisch wichtige Enzyme?

##### 4.2.6.1. Wie wird Gallium in die Zelle transportiert?

In Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante wurde eindeutig Gallium nachgewiesen, wobei der intrazelluläre Galliumgehalt dieser Zellen zunahm, wenn diese mit steigenden Gallium-Konzentrationen inkubiert wurden (Abb. 25A). Jedoch wurde unter gleichen Wachstumsbedingungen in stationären Wildtyp-Zellen ein höherer Galliumgehalt nachgewiesen. *E. coli* Wildtyp und die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante unterscheiden sich nur hinsichtlich der deletierten Eisen- bzw. Mangan-Aufnahme-Systeme. Vermutlich führen die Deletionen der bekannten Aufnahme-Systeme ebenfalls zu einer verminderten Gallium-Aufnahme in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Welches System dabei an der Gallium-Aufnahme beteiligt sein könnte, kann jedoch nicht geklärt werden.

Aufgrund der Ähnlichkeit zum Fe(III) wurde bisher angenommen, dass Gallium über Siderophoren in die Zelle transportiert wird (Larson *et al.*, 1980; Emery, 1986; Hubbard *et al.*,

1986; Chitambar und Zivkovic, 1987; Atkinson *et al.*, 1998; Ardon *et al.*, 2001). In den Pathogenen *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae* oder *Neisseria meningitidis* wird Fe(III), welches zuvor durch Transferrin/Laktoferrin-Bindeprotein durch die äußere Membran transportiert wurde, durch ein spezifisches, ATP-abhängiges Fe(III)-Transportsystem FbpABC in das Cytoplasma geschleust (Anderson *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2008). Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verfügt jedoch weder über das Fec- oder FbpABC-System noch kann Enterobactin synthetisiert werden. Die einzigen Möglichkeiten der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, Fe(III) aus der extrazellulären Umgebung aufzunehmen, wären über Fe(III)-Ferrichrom-, Coprogen-, Ferrioxamin- oder Rhodotorulat-Komplexe. Diese Siderophoren sind Xenosiderophoren vom Hydroxamat-Typ und werden von vielen Pilzarten synthetisiert (Hantke, 1983; Sauer *et al.*, 1987; Haas, 2003; Winkelmann, 2007). Diese kommen jedoch unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen nicht vor. Demnach kann ein Gallium-Transport durch Siderophoren in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ausgeschlossen werden. Dies wird durch Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt, die zeigten, dass Gallium in *Pseudomonas aeruginosa* zwar die Eisen-Aufnahme vermindert, jedoch wahrscheinlich durch Verringerung der Expression der Pyoverdin-Synthese-Gene (Kaneko *et al.*, 2007) und nicht durch Blockade der Fe(III)-Transporter. Mutationen in den Biosynthese-Genen der Siderophoren Pyoverdin, Pyochelin und dem Eisen(III)-Citrat-Rezeptor verringerten nicht die Gallium-Aufnahme. Im Gegensatz dazu konnte die Zugabe von Pyoverdin und Pyochelin die Eisen-Aufnahme in Anwesenheit von Gallium steigern (Kaneko *et al.*, 2007). Diese Veröffentlichungen und der Nachweis von Gallium in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (Abb. 25A), sprechen dafür, dass auch die Gallium-Aufnahme durch weitere unbekannte Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante bewerkstelligt wird.

#### 4.2.6.2. Warum ist Gallium für die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante toxisch?

Würde Gallium nur Eisen-Transporter blockieren und so seine Toxizität nur auf diesem Wege vermitteln, so würde durch Gallium ein niedrigerer intrazellulärer Eisengehalt in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante resultieren, was jedoch nicht der Fall war (Abb. 25B). Im Gegensatz dazu nahm der intrazelluläre Eisengehalt in stationären Wildtyp-Zellen um die Hälfte zu, wenn diese mit 6  $\mu\text{M}$   $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  inkubiert wurden. In Kaneko *et al.* (2007) wird gezeigt, dass Gallium in *P. aeruginosa* zu einem veränderten Expressionmuster verschiedener Gene führt. So reprimiert Gallium die Expression der Gene für das Pyoverdin-Aufnahme-System, jedoch wurden die Gene des Pyochelins-Aufnahme-Systems induziert. Würde Gallium auch in *E. coli* Wildtyp-Zellen zu einer gesteigerten Expression von Eisen-Aufnahme-System-Genen führen, so würde dies den erhöhten Eisengehalt in Wildtyp-Zellen erklären, die mit steigenden Gallium-Konzentrationen inkubiert wurden. *E. coli* Wildtyp-Zellen sind vermutlich in der Lage, den toxischen Effekt von Gallium mit einer gesteigerten Eisen-Aufnahme zu kompensieren. Der intrazelluläre Eisengehalt scheint auch hier die Sensitivität bzw. die Resistenz gegenüber Gallium zu bestimmen. Dies steht im Einklang mit anderen Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde,

dass vorherrschende Eisenlimitation den toxischen Effekt von Gallium verstärkt (Olahanmi *et al.*, 2000; Beriault *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2007).

Gallium beeinflusste nicht den intrazellulären Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, inhibierte jedoch mit steigenden Konzentrationen zunehmend das Wachstum dieser Mutante (Abb. 24). Vermutlich entfaltet Gallium seine toxische Wirkung in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante auf anderem Wege, nicht durch verminderte Eisen-Aufnahme. Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zeichnet sich nicht nur durch verminderte Eisen-Aufnahme aus, sondern ist ebenfalls sensitiv gegenüber oxidativem Stress. Auch Gallium verursacht die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und führt zu einer erhöhten SOD-Aktivität oder anderen Antioxidanzien (Stojiljkovic *et al.*, 1999; Beriault *et al.*, 2007; Yang und Chitambar, 2008). In *P. aeruginosa* führt Gallium zu einer gesteigerten Expression u. a. von Genen der Superoxid-Dismutasen und Katalase (Kaneko *et al.*, 2007). Untersuchungen zur Superoxid-Dismutase-Aktivität in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit steigender Gallium-Konzentrationen zeigten, dass ein zunehmender intrazellulärer Galliumgehalt mit einer Abnahme aktiver FeSOD korrelierte (Abb. 26). Dadurch, dass Gallium den intrazellulären Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante jedoch nicht beeinflusste, ist es eher unwahrscheinlich, dass Gallium die Aufnahme des SodB-Kofaktors Eisen vermindert und so auf diesem Wege die Bildung aktiver FeSOD inhibierte. Vielmehr könnte Gallium Eisen als Kofaktor in der eisenhaltigen Superoxid-Dismutase (SodB) verdrängen, was zum Verlust der FeSOD-Aktivität führen würde. Auch im Wildtyp inhibiert möglicherweise Gallium die Bildung einer aktiven SodB. Jedoch ist vermutlich der Wildtyp, im Gegensatz zur Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante, in der Lage, diese Inhibierung durch eine gesteigerte Eisen-Aufnahme zu kompensieren. Wenn Gallium in der Lage ist, Eisen in SodB zu verdrängen, so liegt die Vermutung nahe, dass Gallium ebenfalls in anderen Enzymen Eisen verdrängen kann, so wie es für einige Enzyme bereits beschrieben und diskutiert wurde (Chitambar *et al.*, 1991; Kaneko *et al.*, 2007).

Der Verlust aktiver FeSOD in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante kann nicht die einzige Ursache für die wachstumshemmende Wirkung von Gallium sein, denn eine zusätzliche Deletion von *fur* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante beeinflusste nicht das Wachstum (Daten nicht gezeigt). Eine Deletion von *fur* führt zur konstitutiven Expression von *ryhB*, die die Translation der *sodB* mRNA unterbindet (Masse´ und Gottesman, 2002; Masse´ *et al.*, 2005). Dazu ist vermutlich SodA, nicht aber SodB, für das aerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante essenziell ist (Abb. 19). Daher scheint die toxische Wirkung von Gallium durch Verlust von Enzymaktivitäten und die damit verbundene indirekte Eisenlimitation oder durch oxidativen Stress zustande zu kommen.

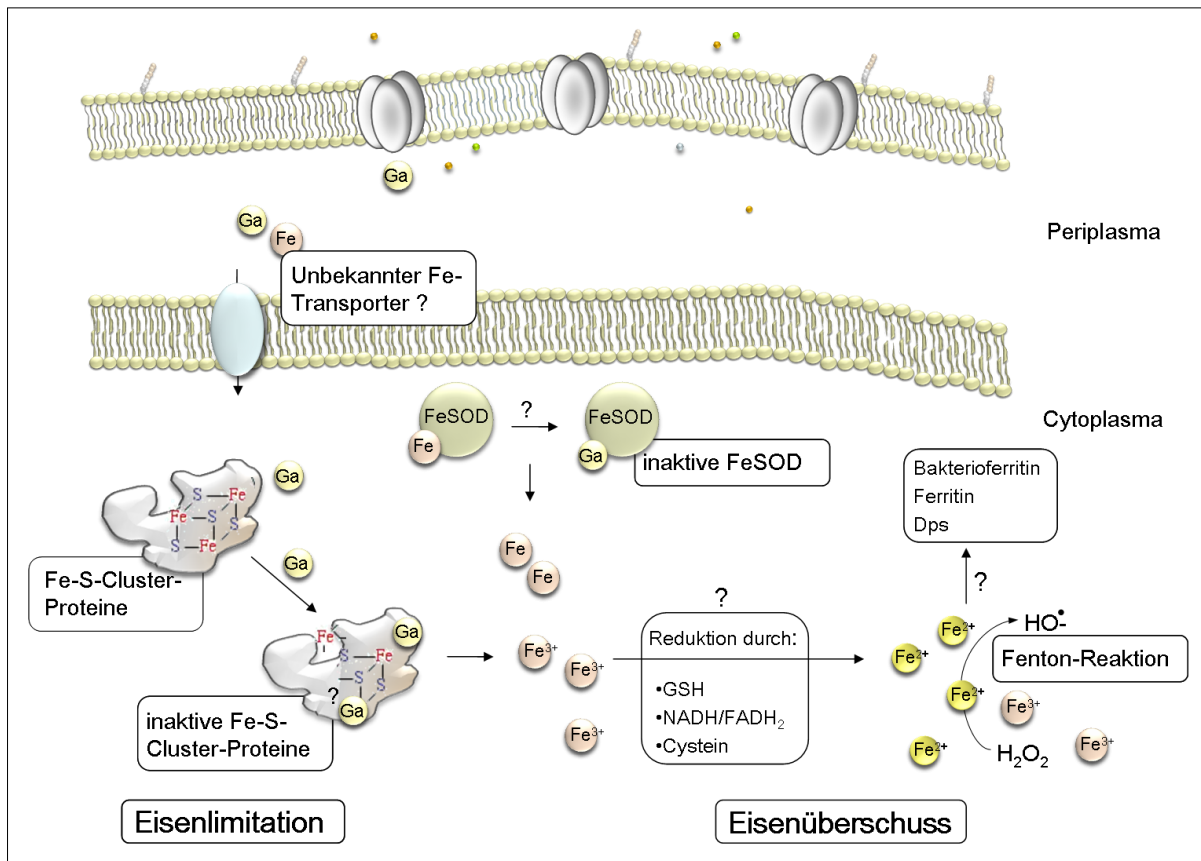
Wie jedoch Gallium zur Enzym-Inaktivität führt, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Dadurch, dass in Fe-S-Cluster Proteinen Eisen in zwei verschiedenen Oxidationszuständen vorliegt (Beinert *et al.*, 1997), könnte Gallium Fe(III) ersetzen und somit zum Verlust der Enzym-Aktivität führen. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass Gallium Enzyme wie die humane Ribonukleotid-Reduktase inhibiert, indem Gallium die Bindung des Substrates reversibel hemmt.



Durch Zugabe von Eisen kann die Enzym-Aktivität wieder hergestellt werden (Chitambar und Narasimhan, 1991; Chitambar *et al.*, 1991). Des Weiteren könnte Gallium in ähnlicher Art und Weise wie Kupfer zur Inaktivierung von Fe-S-Cluster Proteinen führen, indem Eisen freigesetzt wird (Macomber und Imlay, 2009).

Durch Zugabe von Mangan und Eisen konnte die wachstumsinhibierende Wirkung von Gallium aufgehoben werden. Dabei bewirkte schon der Zusatz von 0.25  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  zu Zellen, die durch 13  $\mu\text{M}$  Ga inhibiert worden waren, Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Eisen musste jedoch in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um den inhibitorischen Effekt von Gallium aufheben zu können. Dies könnte mehrere Ursachen haben: zum einen schützt Mangan die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante direkt vor oxidativem Stress (Abb. 21A-D) und zum anderen fördert Mangan die Bildung aktiver MnSOD (SodA) (Abb. 19). Dagegen bietet Eisen keinen direkten Schutz vor oxidativem Stress (Abb. 21A-D). Jedoch kann durch Zugabe von Eisen, die Bildung aktiver SodB in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante gefördert werden (Abb. 19). Vermutlich kann Eisen erst in höheren Konzentrationen die von Gallium verursachte Inhibierung von Proteinen aufheben und somit die enzymatische Aktivität wieder herstellen, so wie es für die reversible Hemmung der humanen Ribonukleotid-Reduktase beschrieben wird (Chitambar und Narasimhan, 1991; Chitambar *et al.*, 1991). Gleichzeitig steigt die Gefahr der Fenton-Reaktion, da Gallium vermutlich ebenfalls zur Inaktivierung von Fe-S-Cluster Proteinen führt und folglich Eisen freigesetzt werden könnte. Durch Oxidationsmittel wie Cystein (Cystein/Cystin;  $E^\circ = -250$  mV, pH 7.4), NADH (NADH/NAD<sup>+</sup>,  $E^\circ = -320$  mV, pH 7.0), FADH<sub>2</sub> (FADH<sub>2</sub>/2FAD<sup>+</sup>,  $E^\circ = -150$  mV, pH 7.4) oder Gluthation (GSSH/GSH,  $E^\circ = -264$  mV, pH 7.4) kann Fe(III) zu Fe(II) ( $E^\circ = +770$  mV, pH 7.0) reduziert werden (Rowley und Halliwell, 1982a; Rowley und Halliwell, 1982b; Coves und Fontecave, 1993; Woodmansee und Imlay, 2002; Park und Imlay, 2003), das nun in der Fenton-Reaktion gefährliche ROS regenerieren könnte (Imlay *et al.*, 1988; Imlay und Linn, 1988; Fridovich, 1995; Touati, 2000a).

Durch Gallium erfährt womöglich die Zelle gleichzeitig Eisenlimitation und Eisenüberschuss und die Eisen-Homöostase gelangt aus dem Gleichgewicht (Abb. 34). Eine andere Strategie könnte der Zelle verhelfen, Eisenlimitation zu überstehen: Nutzung von Mangan als Alternative zum Eisen. Dies könnte vielleicht weniger effektiv sein als Eisen, was die höheren Zelldichten unter Zusatz von Eisen in zeitabhängigen Wachstumsexperimenten erklären würden (Abb. 15), aber dennoch zum Überleben ausreichen würde. Dies würde auch erklären, weshalb *E. coli* einige Enzyme wie Superoxid-Dismutasen oder Ribonukleotid-Reduktasen besitzt, die Mangan oder Eisen als Kofaktor für die von ihnen enzymatisch katalysierten Reaktionen benötigen.



**Abb. 34: Modell der Wirkungsweise von Gallium auf die Eisen-Homöostase der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante**

Gallium gelangt vermutlich über ein unbekanntes Transport-System in das Cytoplasma der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Dort substituiert es möglicherweise Eisen z. B. in der eisenhaltigen Superoxid-Dismutase und in weiteren Fe-S-Cluster Proteinen. Dies führt zum Verlust von Enzym-Aktivitäten. Das freigesetzte Eisen kann durch GSSH, NADH, oder FADH<sub>2</sub> zu Fe(II) reduziert werden und zur Regeneration gefährlicher reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Fenton-Reaktion führen. Die Zelle erfährt damit gleichzeitig indirekte Eisenlimitation durch Protein-Fehlfunktionen und Eisenüberschuss, durch Freisetzung von Eisen. Damit verbunden ist die Verschärfung oxidativen Stresses. Inwiefern das überschüssige Eisen in Eisenspeicherproteinen wie z. B. dem Bakterioferritin, Dps oder Ferritin entsorgt werden kann, ist unbekannt.

#### 4.2.7. Ist PitA ein weiterer Eisen- und Mangan-Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante?

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante dennoch in der Lage ist, Eisen und Mangan aufzunehmen (Abb. 15, Tabelle 6 und 7). Ist PitA der gesuchte Eisen- bzw. Mangan-Transporter? Auch andere Autoren spekulieren, dass PitA in der Lage sein könnte, Mangan zu transportieren (Kehres und Maguire, 2003). PitA transportiert vorrangig Phosphat in Form von Metall-Phosphat-Komplexen in die Zelle (van Veen *et al.*, 1994). Folglich ist es nicht unwahrscheinlich, dass PitA auch Eisen/Mangan-Phosphat-Komplexe transportieren könnte.

Zeitabhängige Wachstumsexperimente zeigten, dass eine zusätzliche Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante das Wachstum tatsächlich zunehmend verschlechterte (Abb. 27). Phosphatmangel als Ursache für das verminderte Wachstum des Deletionsstammes ECA588( $\Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT \Delta entC \Delta pitA::cat$ ) kann vermutlich ausgeschlossen

werden, da Medium mit einem niedrigen Phosphatgehalt verwendet wurde und somit das *high affinity* Phosphat-Aufnahme-System PstSACB für die Phosphatversorgung der Zellen verantwortlich war. Das Pst (*Phosphate specific transport system*)-System ist neben dem Pit (*Inorganic phosphate transport*)-System eines der beiden Haupt-Phosphat-Aufnahme-Systeme in *E. coli* (Medveczky und Rosenberg, 1971; Willsky *et al.*, 1973; Rosenberg *et al.*, 1977; van Veen, 1997). Als Bestandteil des *pho* Regulons wird die *pst* Expression bei einer Phosphat-Konzentration unterhalb von 1 mM induziert (Willsky *et al.*, 1973; van Veen, 1997; Harris *et al.*, 2001) und versorgt somit unter Phosphat-Limitation die Zelle mit Phosphat. Daneben existieren in *E. coli* weitere Phosphat-Aufnahme-Systeme wie PitB, GlpT und UhpT. Die Expression von *pitB* erfolgt im Gegensatz zur *pitA* Expression nicht konstitutiv, sondern steht vermutlich unter der Kontrolle des *pho*-Regulon und wird bei niedrigen Phosphat-Konzentrationen reprimiert (Harris *et al.*, 2001). Der Transport von Glycerol-3-Phosphat durch GlpT und Glucose-6-Phosphat durch UhpT trägt ebenfalls zur Phosphat-Versorgung der Zelle bei, die jedoch alleine, ohne dem Pst- und Pit-System, für eine Phosphat-Versorgung nicht ausreichen würden (Hayashi *et al.*, 1964; Winkler, 1966; van Veen, 1997).

Ein weiterer Hinweis, dass der Deletionsstamm ECA588 keinem Phosphatmangel ausgesetzt war, zeigt das verbesserte Wachstum dieses Stammes in Anwesenheit von Mangan, das im selben Maße verbessert wurde wie das Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante (Abb. 27B). Im Gegensatz zum Pit-System transportiert das Pst-System keine Metall-Phosphat-Komplexe, sondern  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Luecke und Quioco, 1990; van Veen *et al.*, 1994; van Veen, 1997), sodass die Anwesenheit von Mangan keinen Einfluss auf die Pst-vermittelte Phosphat-Aufnahme ausüben sollte. Wäre Phosphatmangel die Ursache für das verminderte Wachstum des Deletionsstammes ECA588, so könnte vermutlich Mangan den Phosphatmangel nicht beseitigen und würde das Wachstum der *pitA* Mutante ECA588 nicht verbessern können. Dies war jedoch nicht der Fall. Das verbesserte Wachstum in Anwesenheit von Mangan lässt ebenfalls darauf schließen, dass PitA wahrscheinlich nicht an der Mangan-Aufnahme in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante beteiligt ist. Im Gegensatz dazu konnte zwar das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 in Anwesenheit von Eisen verbessert werden, jedoch nicht im selben Maße wie das der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PitA vermutlich am Eisen-Transport beteiligt sein könnte und darüber hinaus noch weitere unbekannte Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante existieren müssen, die die verbliebene Eisen-und/oder Mangan-Aufnahme in der *pitA* Mutante gewährleisten.

Auch zeitabhängige Wachstumsexperimente in Anwesenheit von Gallium lassen ebenso vermuten, dass PitA ein unspezifischer Eisen-Transporter sein könnte. Die zusätzliche Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Gallium (Abb. 28A). Die Bestimmung des intrazellulären Gallium- und Eisengehaltes von Zellen des Deletionsstammes ECA588, die mit Gallium inkubiert wurden, zeigten, dass ähnliche Mengen an Gallium in diesen Zellen vorlagen wie in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante

(Abb. 29A). Demzufolge scheint Gallium nicht über das Phosphat-Aufnahme-System PitA in die Zelle zu gelangen.

Wenn jedoch der Galliumgehalt in beiden Deletionsstämmen ähnlich ist, wieso wurde das Wachstum der *pitA* Mutante stärker inhibiert als das der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante? Der intrazelluläre Eisengehalt gibt Aufschluss darüber, denn dieser war in Zellen des Deletionsstammes ECA588 niedriger als der Eisengehalt in Zellen der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Folglich scheint eine zusätzliche Deletion von *pitA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante Eisenlimitation zu verschärfen und somit erhöhte Sensitivität gegenüber Gallium zu verursachen. Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, dass PitA unspezifisch Eisen in das Cytoplasma transportieren könnte.

Auch im Deletionsstamm ECA588 konnte der wachstumsinhibierende Effekt von Gallium durch Mangan- bzw. Eisenzugabe wieder aufgehoben werden. Auch hier bewirkten ähnliche Mangan-Mengen wie in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ein Wachstum des Deletionsstammes ECA588 in Gegenwart von Gallium. Dagegen musste jedoch Eisen in einer 3-fach höheren Konzentration als in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante eingesetzt werden, um das Wachstum der *pitA* Mutante im gleichen Maße wie das der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante in Anwesenheit von Gallium wieder herzustellen (Abb. 28B). Auch dies veranschaulicht, dass vermutlich durch *pitA* Deletion weniger Eisen in die Zelle gelangt und somit im Cytoplasma den inhibitorischen Effekt von Gallium verhindern könnte.

Um das verminderte Wachstum des Deletionsstammes ECA588 ohne Zweifel auf die Deletion von *pitA* zurückführen zu können, wurde *pitA* in *trans* komplementiert. In den letzten Jahren wurde die konstitutive Expression von *pitA* kontrovers diskutiert. In einer kürzlich erschienenen Publikation wird gezeigt, dass die Expression von *pitA* durch höhere Konzentrationen von Zink induziert wird (Jackson *et al.*, 2008), jedoch wurde keine phosphatabhängige *pitA* Expression beobachtet. In *Mycobacterium smegmatis* dagegen konnte eindeutig eine konstitutive Expression von *pitA* nachgewiesen werden (Gebhard *et al.*, 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine konstitutive Expression von *pitA* beobachtet werden. Durch Klonierung von *pitA* mit zugehöriger Promotorregion wurde eine konstitutive Expression von *pitA* im *E. coli* Stamm ECA588 erzielt, sodass das Wachstum des *E. coli* Stammes ECA588 mit *pitA* in *trans* verbessert werden konnte (Abb. 30A). Immunoblots bestätigten dabei das Vorhandensein von PitA in der Membran vom *E. coli* Stamm ECA588 mit *pitA* in *trans* (Abb. 30B).

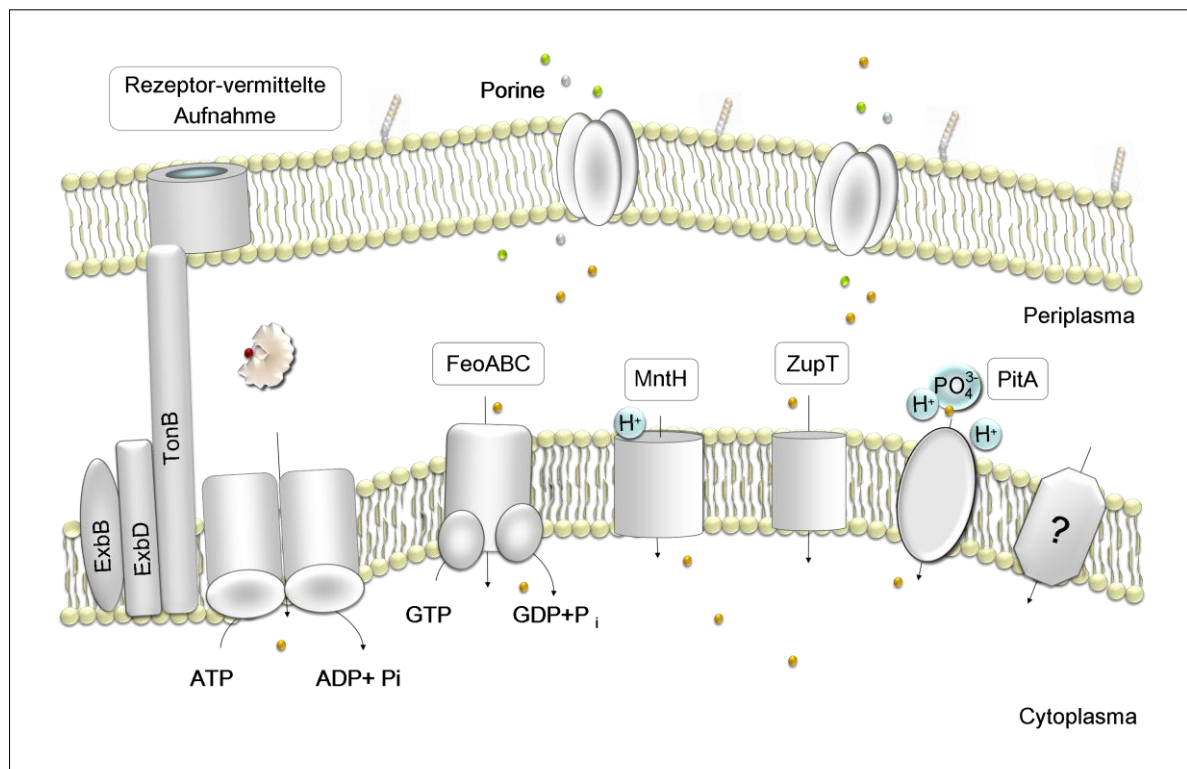
In van Veen *et al.* (1993) wird gezeigt, dass PitA Phosphat in Form von neutralen  $\text{MeHPO}_4$ -Komplexen im Symport mit Protonen transportiert. Dabei werden äquimolare Mengen an Phosphat und z. B. Calcium in das Cytoplasma transportiert (van Veen *et al.*, 1993; van Veen *et al.*, 1994). In Gegenwart von Magnesium wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport, jedoch nicht der  $\text{P}_i$ -Transport, kompetitiv inhibiert. Folglich ist der Phosphat-Transport abhängig vom Vorhandensein divalenter Metall-Kationen, wie  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  und das Substrat neutrale Metall-Hydrogenphosphat-Komplexe (Kay und Ghei, 1981; van Veen *et al.*, 1994; Beard *et al.*, 2000). Wenn PitA unspezifisch Eisen transportiert, so sollte dies in Form von Eisen-Phosphat-

Komplexen erfolgen. Um dies zu überprüfen wurden Wachstums-Endpunktbestimmungen mit dem Deletionsstamm ECA588, der *pitA* in *trans* exprimierte, und zugehöriger Negativkontrolle in Anwesenheit von Phosphat und Eisen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Stamm mit *pitA* in *trans* zwar unter allen Bedingungen ein besseres Wachstum aufwies, jedoch weitgehend unabhängig von der Phosphat-Konzentration. Das dennoch Eisen als Substrat für PitA in Frage kommt, zeigen die Daten der Wachstums-Endpunktbestimmungen in phosphatfreiem Tris-MM und in phosphatfreiem Tris-MM ohne Eisen (Abb. 31). Beide Medien unterscheiden sich nur im Eisengehalt, es sind ca.  $>5 \mu\text{M}$  Fe im Tris-MM enthalten, wohingegen weniger als  $2 \mu\text{M}$  Fe in Tris-MM ohne Eisen enthalten sind. Dies spricht dafür, dass das verbesserte Wachstum des Deletionsstammes ECA588 mit *pitA trans* durch Eisen-Aufnahme hervorgerufen wurde. Womöglich scheint der Eisen-Transport nur unabhängig von der Phosphat-Konzentration zu sein. Zwar wurde das Medium ohne Phosphat hergestellt, dennoch kann keine genaue Aussage über den exakten Phosphatgehalt im Medium getroffen werden. Vermutlich scheinen geringe Phosphat-Konzentrationen für einen Eisen-Transport ausreichend zu sein.

In anderen Arbeiten wurde bereits die Transport-Kinetik von PitA in verschiedenen Systemen untersucht. Dabei wurden verschiedene  $K_m$ -Werte von  $1.9 \mu\text{M}$ ,  $11.9 \mu\text{M}$  bis  $39 \mu\text{M}$  für den  $\text{MeHPO}_4$ -Transport bestimmt (Willsky *et al.*, 1973; Rosenberg *et al.*, 1977; van Veen *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 2001). Diese Unterschiede resultierten vermutlich aus der Verwendung verschiedener Systeme. Während z. B. in van Veen *et al.* (1994) Transportstudien mit chromosomal codiertem *pitA* durchgeführt wurden, untersuchten die Autoren in Harris *et al.* (2001) die Transport-Kinetik von *pitA* in *trans*, codiert auf einem *multicopy* Plasmid. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde *pitA* mit zugehöriger Promotorregion in ein *multicopy* Plasmid kloniert, sodass dies auch hier eine Veränderung der Transport-Kinetik zur Folge haben könnte. Geringe Phosphat-Konzentrationen könnten für einen unspezifischen Eisen-Transport ausreichen, denn durch Zugabe von Phosphat zum Medium, konnte das Wachstum in Anwesenheit von Eisen nicht gesteigert werden. Genauso wie weitere Wachstums-Endpunktbestimmungen zeigten, dass das Wachstum unter Phosphat-Überschuss zwar in Gegenwart von  $2.5 \mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  verbessert werden konnte, jedoch steigende Eisen-Konzentrationen das Wachstum nicht veränderten (Abb. 30A). Der Eisen-Phosphat-Transport schien in Anwesenheit geringer Eisen- und Phosphat-Konzentrationen gesättigt zu sein.

Betrachtet man nun das Wachstum des Deletionsstammes ECA588 mit Leervektor in An- und Abwesenheit von Phosphat, so ist auffällig, dass das Wachstum mit steigender Phosphat-Konzentration abnahm (Abb. 31). Zunächst wies die Negativkontrolle in Anwesenheit von  $>5 \mu\text{M}$  Eisen ein besseres Wachstum auf als in Tris-MM ohne Eisen und desferriertem Casaminsäurenhydrolysat. Auch dieses Ergebnis lässt auf das Vorhandensein eines weiteren unbekanntem Eisen-Transporters vermuten. Wurde jedoch dem Medium  $200 \mu\text{M}$  Phosphat hinzu gegeben, so wurde das Wachstum der Negativkontrolle beeinträchtigt. Dabei verbesserte Eisen als Zusatz zum Medium das Wachstum der Negativkontrolle nicht mehr. Die Ursache für das verminderte Wachstum des Deletionsstammes ECA588 mit Leervektor in Tris-MM könnte

verschärfte Eisenlimitation sein, die durch Phosphat hervorgerufen wurde. Dabei wurde vermutlich Eisen durch Phosphat komplexiert. Unter diesen Wachstumsbedingungen, d. h. bei niedriger Phosphat-Konzentration, ist das *high affinity* Phosphat-Aufnahme-System Pst für die Phosphat-Aufnahme verantwortlich (Medveczky und Rosenberg 1971; Willsky *et al.*, 1973; Rosenberg *et al.*, 1977; van Veen 1997). Da das Pst-System keine Metall-Phosphat-Komplexe transportiert (Luecke und Quioco, 1990; van Veen *et al.*, 1994; van Veen, 1997), ist Eisen nicht mehr für die Zelle verfügbar. Ein vermindertes Wachstum aufgrund von Phosphatmangel ist eher unwahrscheinlich, da Phosphat im Überschuss vorliegt und wahrscheinlich nur ein kleiner Teil mit Eisen und anderen Metallen komplexiert. Diese Daten insgesamt sprechen dafür, das PitA ein weiteres unspezifisches Eisen-Aufnahme-System in *E. coli* darstellt und weitere Transporter für die Eisen- und Mangan-Aufnahme in *E. coli* existieren müssen (Abb. 35).



**Abb. 35: Modell der Eisen-Aufnahme in *Escherichia coli* K12 mit PitA als zusätzliches Eisen-Aufnahme-System**

*E. coli* besitzt eine Reihe von Transport-Systemen, die die Eisen-Aufnahme gewährleisten. So werden Siderophor-Fe(III)-Komplexe durch spezifische Rezeptoren in der Membran gebunden und über einen TonB-ExxB-ExbD-energie-abhängigen Prozess in das Periplasma aufgenommen. Der weitere Transport in das Cytoplasma wird über spezifische ABC-Transporter bewerkstelligt. Den Fe(II)-Transport in das Cytoplasma katalysieren das Feo-System, verbunden mit GTP-Hydrolyse, MntH im Symport mit Protonen und ZupT vermutlich energetisiert durch *pmf*. Auch PitA transportiert vermutlich Eisen. Darüber hinaus existieren in *E. coli* noch weitere Systeme, die die Eisen-Aufnahme gewährleisten.

### 4.3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der erste bakterielle ZIP-Transporter ZupT näher charakterisiert. Neben Ermittlung des Substratspektrums von ZupT wurden Aminosäuren identifiziert, die an der Substrat-Bindung und/oder am Metall-Transport beteiligt sind. Um jedoch einen genaueren Einblick in die Funktionen der Aminosäuren bezüglich des Metall-Transportes zu gewinnen könnten kinetische Transportstudien einen wichtigen Beitrag leisten. Darüber hinaus ist die Frage hinsichtlich der Energiequelle, die den ZupT-vermittelten Transport vorantreibt, noch nicht eindeutig geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erste Hinweise über die Energiequelle, vermutlich wird der Metall-Transport durch ZupT durch *pmf* energetisiert. Dabei ist noch nicht bekannt, ob  $\Delta\text{pH}$  oder  $\Delta\psi$  für die Energetisierung des Transportes essenziell ist. Transportstudien in *right side out* Vesikeln könnten diese Frage beantworten, jedoch waren entsprechende Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich. Darüber hinaus würden kinetische Transportstudien in Gegenwart verschiedener pH-Werte wichtige Hinweise darüber geben, ob der gesteigerte Transport bei physiologischem pH-Wert, wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, durch einen niedrigeren  $K_m$ -Wert oder durch eine größere maximale Geschwindigkeit verursacht wird. Eine weiterführende biochemische Charakterisierung von ZupT als ZIP-Transporter mit breitem Substratspektrum würde sich für die Zukunft anbieten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, dass eine Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante durch Mangan-Zugabe ein stark verbessertes Wachstum aufwies. Zwar deuten die gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass Mangan vermutlich die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vor oxidativem Stress schützt, dennoch konnte nicht vollständig geklärt werden, wie Mangan zum Schutz vor oxidativem Stress beiträgt. Einen Anhaltspunkt bietet Gallium, allerdings ist bisher noch nicht eindeutig die toxische Wirkungsweise von Gallium aufgeklärt worden. Würde man den genaueren toxischen Mechanismus von Gallium kennen, könnte man womöglich erklären, weshalb Mangan die toxische Wirkung von Gallium in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vermindert. Ferner wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass PitA vermutlich in der Lage ist, Eisen-Phosphat-Komplexe zu transportieren. Bis zu diesem Zeitpunkt ist noch unklar, mit welcher Affinität die verschiedenen Metall-Hydrogenphosphat-Komplexe gebunden und mit welcher Effektivität die verschiedenen Komplexe durch PitA transportiert werden. Neben PitA muss noch mindestens ein unbekannter Transporter in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante vorhanden sein, die die verbleibende Eisen-und/oder Mangan-Aufnahme gewährleisten. Die Beantwortung dieser Fragen könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Eisen- und Mangan-Homöostase leisten.

## 5. Zusammenfassung

In Bakterien wurde bisher nur ein Vertreter der ZIP (*ZRT*, *IRT-like proteins*)-Transporter, ZupT, untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, ZupT biochemisch und physiologisch näher zu charakterisieren und Hinweise zum Transport-Mechanismus zu gewinnen.

Untersuchungen zum Mangan- bzw. Eisen-Transport von ZupT zeigten, dass ein *E. coli* Stamm, dem alle, für das Wachstum in definiertem Medium relevanten Eisen- und Mangan-Aufnahme-Systeme (Fec, Feo, MntH, ZupT und Enterobactin) fehlen, dennoch in der Lage war, zu wachsen. Darüber hinaus konnte das Wachstum dieses *E. coli* Deletionsstammes durch Zugabe von Mangan erheblich verbessert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, weshalb Mangan das Wachstum dieser Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante verbessert, welche unbekannten Transporter die verbliebene Mangan- bzw. Eisen-Aufnahme in diesem *E. coli* Stamm gewährleisten und den Zusammenhang zwischen Eisen- und Mangan-Homöostase in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante näher zu charakterisieren.

- 1) ZupT ist ein ZIP-Transporter mit breitem Substratspektrum und transportiert zweiwertige Metall-Kationen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ . Wettbewerbsstudien lassen vermuten, dass ebenfalls  $Cu^{2+}$  und  $Ni^{2+}$  zum Substratspektrum von ZupT gehören. ZupT scheint die Substrate mit folgender Präferenz zu transportieren:  $Zn/Cd > Cu > Mn/Co/(Ni)$ .
- 2) Der Metall-Transport, vermittelt durch ZupT, wird vermutlich durch *proton-motive force* energetisiert.
- 3) Die konservierten Histidin-Reste an Position 119 und 123 und der Glutamat-Rest an Position 148 in der TMH IV und TMH V von ZupT sind für den Metall-Transport essenziell. Darüber hinaus scheint nur das Histidin an Position 89 in der „Variablen Region“ für den ZupT-vermittelten Transport eine wichtige Rolle zu spielen. Genauso wie dieses Histidin, ist vermutlich das S<sub>117</sub>, E<sub>152</sub> oder E<sub>60</sub> an der Vermittlung der Substratspezifität von ZupT beteiligt.
- 4) Durch Verwendung des *Bac-to-Bac*<sup>®</sup> *Baculovirus Expression System* konnte die Ausbeute an gereinigtem ZupT im Vergleich zur Expression in *E. coli* BL21(pLys) um das 20-fache gesteigert werden.
- 5) Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante kann trotz Deletion aller, für das Wachstum in Minimalmedium relevanter Eisen- und Mangan-Aufnahme-Systeme erhebliche Mengen an Eisen und Mangan akkumulieren.
- 6) Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist im Gegensatz zum *E. coli* Wildtyp sensitiver gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress und gegenüber Trockenstress. Mangan schützt, im Gegensatz zum Eisen, die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante sowohl vor Paraquat-induziertem oxidativen Stress als auch vor Trockenstress.



- 7) Mangan fördert die Bildung aktiver SodA in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante. Durch Zugabe von Eisen kann jedoch kaum SodB-Aktivität gesteigert werden. SodA scheint, im Gegensatz zur SodB, für den aeroben Metabolismus der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante essenziell zu sein. Eine Deletion von *sodA* in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante war nur in Anwesenheit von Mangan aerob durchführbar.
- 8) Mangan scheint nicht nur zum Schutz vor oxidativem Stress in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante zu dienen, denn auch das anaerobe Wachstum der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante konnte in Gegenwart von Mangan verbessert werden.
- 9) Die Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante ist im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp sensitiver gegenüber dem Fe(III)-Substituent Gallium. Jedoch können bereits geringe Mengen an Mangan die wachstumsinhibierende Wirkung von Gallium verhindern. Der intrazelluläre Eisen-gehalt der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante wurde durch Gallium nicht beeinflusst, jedoch hemmt Gallium die SodB-Aktivität in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante.
- 10) Das anorganische Phosphat-Aufnahme-System PitA gewährleistet vermutlich in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante den Eisen-, jedoch nicht den Mangan-Transport. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass noch zusätzliche Transport-Systeme in der Eisen/Mangan-Aufnahme-Mutante existieren müssen, die die Mangan- und Eisen-Aufnahme gewährleisten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest und S. C. Andrews (1999). "Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient." *J Bacteriol* 181: 1415-28.
- Adair, W. S. und K. E. Apt (1990). "Cell wall regeneration in *Chlamydomonas*: accumulation of mRNAs encoding cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7355-9.
- Akada, R. (1994). "Quick-check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids." *Biotechniques* 17: 58.
- al-Aoukaty, A., V. D. Appanna und H. Falter (1992). "Gallium toxicity and adaptation in *Pseudomonas fluorescens*." *FEMS Microbiol Lett* 71: 265-72.
- Al-Maghrebi, M., I. Fridovich und L. Benov (2002). "Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*." *Arch Biochem Biophys* 402: 104-9.
- Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong und R. Kolter (1992). "A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*." *Genes Dev* 6: 2646-54.
- Anderson, D. S., P. Adhikari, A. J. Nowalk, C. Y. Chen und T. A. Mietzner (2004). "The hFbpABC transporter from *Haemophilus influenzae* functions as a binding-protein-dependent ABC transporter with high specificity and affinity for ferric iron." *J Bacteriol* 186: 6220-9.
- Anderson, D. S., P. Adhikari, K. D. Weaver, A. L. Crumbliss und T. A. Mietzner (2007). "The *Haemophilus influenzae* hFbpABC Fe<sup>3+</sup> transporter: analysis of the membrane permease and development of a gallium-based screen for mutants." *J Bacteriol* 189: 5130-41.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson und F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." *FEMS Microbiol Rev* 27: 215-37.
- Angerer, A., B. Klupp und V. Braun (1992). "Iron transport systems of *Serratia marcescens*." *J Bacteriol* 174: 1378-87.
- Anjem, A., S. Varghese und J. A. Imlay (2009). "Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 72: 844-58.
- Archibald, F. (1986). "Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria." *Crit Rev Microbiol* 13: 63-109.
- Archibald, F. S. und I. Fridovich (1981a). "Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*." *J Bacteriol* 145: 442-51.
- Archibald, F. S. und I. Fridovich (1981b). "Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria." *J Bacteriol* 146: 928-36.

- Archibald, F. S. und I. Fridovich (1982). "The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro." *Arch Biochem Biophys* 214: 452-63.
- Archibald, F. S. und M. N. Duong (1984). "Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*." *J Bacteriol* 158: 1-8.
- Ardon, O., R. Nudelman, C. Caris, J. Libman, A. Shanzer, Y. Chen und Y. Hadar (1998). "Iron uptake in *Ustilago maydis*: tracking the iron path." *J Bacteriol* 180: 2021-6.
- Ardon, O., H. Bussey, C. Philpott, D. M. Ward, S. Davis-Kaplan, S. Verroneau, B. Jiang und J. Kaplan (2001). "Identification of a *Candida albicans* ferrichrome transporter and its characterization by expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 276: 43049-55.
- Atkinson, R. A., A. L. Salah El Din, B. Kieffer, J. F. Lefevre und M. A. Abdallah (1998). "Bacterial iron transport: 1H NMR determination of the three-dimensional structure of the gallium complex of pyoverdine G4R, the peptidic siderophore of *Pseudomonas putida* G4R." *Biochemistry* 37: 15965-73.
- Atta, M., P. Nordlund, A. Aberg, H. Eklund und M. Fontecave (1992). "Substitution of manganese for iron in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. Spectroscopic and crystallographic characterization." *J Biol Chem* 267: 20682-8.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Sedman, J.A. Smith und K. Struhl. (1993). "Current protocols in molecular biology." *Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.*
- Bagg, A. und J. B. Neilands (1987). "Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation." *Microbiol Rev* 51: 509-18.
- Bauer, P., H. Q. Ling und M. L. Gueriot (2007). "FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in *Arabidopsis*." *Plant Physiol Biochem* 45: 260-1.
- Beard, S. J., R. Hashim, G. Wu, M. R. Binet, M. N. Hughes und R. K. Poole (2000). "Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* 184: 231-5.
- Beauchamp, C. und I. Fridovich (1971). "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels." *Anal Biochem* 44: 276-87.
- Beinert, H., R. H. Holm und E. Munck (1997). "Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures." *Science* 277: 653-9.
- Benov, L. T. und I. Fridovich (1994). "*Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase." *J Biol Chem* 269: 25310-4.
- Benov, L. T., W. F. Beyer, Jr., R. D. Stevens und I. Fridovich (1996). "Purification and characterization of the Cu, Zn SOD from *Escherichia coli*." *Free Radic Biol Med* 21: 117-21.
- Berriault, R., R. Hamel, D. Chenier, R. J. Mailloux, H. Joly und V. D. Appanna (2007). "The overexpression of NADPH-producing enzymes counters the oxidative stress evoked by gallium, an iron mimetic." *Biometals* 20: 165-76.

- Berlett, B. S., P. B. Chock, M. B. Yim und E. R. Stadtman (1990). "Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 389-93.
- Beyer, W., J. Imlay und I. Fridovich (1991). "Superoxide dismutases." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40: 221-53.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* 277(5331): 1453-62.
- Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros und M. F. Cellier (2002). "Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." *Infect Immun* 70: 6032-42.
- 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: 248-54.
- Braun, M., H. Killmann und V. Braun (1999). "The beta-barrel domain of FhuADelta5-160 is sufficient for TonB-dependent FhuA activities of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 33: 1037-49.
- Braun, V. und M. Braun (2002). "Active transport of iron and siderophore antibiotics." *Curr Opin Microbiol* 5: 194-201.
- Braun, V. (2003). "Iron uptake by *Escherichia coli*." *Front Biosci* 8: s1409-21.
- Braun, V. und F. Endriss (2007). "Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins." *Biomaterials* 20: 219-31.
- Braun, V. und K. Hantke (2007). Acquisition of iron by bacteria. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Berlin/Heidelberg, Springer. 6/2007: 189-219.
- Braun, V. und C. Herrmann (2007). "Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 189: 6913-8.
- Brickman, T. J. und M. A. McIntosh (1992). "Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex." *J Biol Chem* 267(17): 12350-5.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm und J. Deisenhofer (1999). "Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*." *Nat Struct Biol* 6: 56-63.
- Bullock, W. O., J.M. Fernandez und J.M. Short (1987). "XL1 Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -Galactosidase selection." *Biotechniques* 5: 376-378.
- Cabiscol, E., J. Tamarit und J. Ros (2000). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." *Int Microbiol* 3: 3-8.

- Carlioz, A. und D. Touati (1986).** "Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?" *Embo J* 5: 623-30.
- Chaloupka, R., P. Courville, F. Veyrier, B. Knudsen, T. A. Tompkins und M. F. Cellier (2005).** "Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport in vivo." *Biochemistry* 44: 726-33.
- Chitambar, C. R. (2004).** "Gallium compounds as antineoplastic agents." *Curr Opin Oncol* 16: 547-52.
- Chitambar, C. R. und J. Narasimhan (1991).** "Targeting iron-dependent DNA synthesis with gallium and transferrin-gallium." *Pathobiology* 59: 3-10.
- Chitambar, C. R., J. Narasimhan, J. Guy, D. S. Sem und W. J. O'Brien (1991).** "Inhibition of ribonucleotide reductase by gallium in murine leukemic L1210 cells." *Cancer Res* 51: 6199-201.
- Chitambar, C. R. und Z. Zivkovic (1987).** "Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: demonstration of transferrin receptor-dependent and transferrin-independent mechanisms." *Cancer Res* 47: 3929-34.
- Colangelo, E. P. und M. L. Gueriot (2004).** "The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response." *Plant Cell* 16: 3400-12.
- Coleman, J. E. (1998).** "Zinc enzymes." *Curr Opin Chem Biol* 2: 222-34.
- Compan, I. und D. Touati (1993).** "Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* 175: 1687-96.
- Connolly, E. L., J. P. Fett und M. L. Gueriot (2002).** "Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation." *Plant Cell* 14: 1347-57.
- Courville, P., R. Chaloupka, F. Veyrier und M. F. Cellier (2004).** "Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog." *J Biol Chem* 279: 3318-26.
- Courville, P., E. Urbankova, C. Rensing, R. Chaloupka, M. Quick und M. F. Cellier (2008).** "Solute carrier 11 cation symport requires distinct residues in transmembrane helices 1 and 6." *J Biol Chem* 283: 9651-8.
- Coves, J. und M. Fontecave (1993).** "Reduction and mobilization of iron by a NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 211(3): 635-41.
- Cox, M. M. und J. R. Battista (2005).** "*Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor." *Nat Rev Microbiol* 3(11): 882-92.
- Culotta, V. C., M. Yang und T. V. O'Halloran (2006).** "Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal." *Biochim Biophys Acta* 1763: 747-58.
- Daly, D. J. und P. S. Myles (2009).** "Update on the role of paravertebral blocks for thoracic surgery: are they worth it?" *Curr Opin Anaesthesiol* 22: 38-43.

- Daly, M. J. (2009). "A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*." *Nat Rev Microbiol* 7: 237-45.
- Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, R. D. Leapman, B. Lai, B. Ravel, S. M. Li, K. M. Kemner und J. K. Fredrickson (2007). "Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance." *PLoS Biol* 5: e92.
- Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M. V. Omelchenko, H. M. Kostandarithes, K. S. Makarova, L. P. Wackett, J. K. Fredrickson und D. Ghosal (2004). "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance." *Science* 306: 1025-8.
- Daly, M. J., L. Ouyang, P. Fuchs und K. W. Minton (1994). "In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*." *J Bacteriol* 176: 3508-17.
- Dancis, A., D. S. Yuan, D. Haile, C. Askwith, D. Eide, C. Moehle, J. Kaplan und R. D. Klausner (1994). "Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport." *Cell* 76: 393-402.
- Datsenko, K. A. und B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-5.
- Davies, N. P., Y. S. Rahmanto, C. R. Chitambar und D. R. Richardson (2006). "Resistance to the antineoplastic agent gallium nitrate results in marked alterations in intracellular iron and gallium trafficking: identification of novel intermediates." *J Pharmacol Exp Ther* 317: 153-62.
- De Pina, K., V. Desjardin, M. A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano und L. F. Wu (1999). "Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 181: 670-4.
- Demple, B., E. Hidalgo und H. Ding (1999). "Transcriptional regulation via redox-sensitive iron-sulphur centres in an oxidative stress response." *Biochem Soc Symp* 64: 119-28.
- Donahue, J. L., J. L. Bownas, W. G. Niehaus und T. J. Larson (2000). "Purification and characterization of *glpX*-encoded fructose 1, 6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 182: 5624-7.
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." *Nucleic Acids Res* 16: 6127-45.
- Dubrac, S. und D. Touati (2000). "Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter." *J Bacteriol* 182: 3802-8.
- Dubrac, S. und D. Touati (2002). "Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*." *Microbiology* 148: 147-56.
- Dukan, S. und T. Nystrom (1999). "Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells." *J Biol Chem* 274: 26027-32.
- Ecker, D. J., B. F. Matzanke und K. N. Raymond (1986). "Recognition and transport of ferric enterobactin in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 167: 666-73.

- Eide, D., M. Broderius, J. Fett und M. L. Guerinot (1996). "A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5624-8.
- Eide, D. J. (2001). "Functional genomics and metal metabolism." *Genome Biol* 2: REVIEWS1028.
- Eide, D. J. (2004). "The SLC39 family of metal ion transporters." *Pflugers Arch* 447: 796-800.
- Eliasson, R., E. Pontis, A. Jordan und P. Reichard (1996). "Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (NrdEF enzyme) from *Enterobacteriaceae*." *J Biol Chem* 271: 26582-7.
- Emery, T. (1986). "Exchange of iron by gallium in siderophores." *Biochemistry* 25: 4629-33.
- Eng, B. H., M. L. Guerinot, D. Eide und M. H. Saier, Jr. (1998). "Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins." *J Membr Biol* 166: 1-7.
- Eng, E. T., A. R. Jalilian, K. A. Spasov und V. M. Unger (2008). "Characterization of a novel prokaryotic GDP dissociation inhibitor domain from the G protein coupled membrane protein FeoB." *J Mol Biol* 375: 1086-97.
- Enz, S., H. Brand, C. Orellana, S. Mahren und V. Braun (2003). "Sites of interaction between the FecA and FecR signal transduction proteins of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* 185: 3745-52.
- Escolar, L., J. Perez-Martin und V. de Lorenzo (1998). "Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence." *J Mol Biol* 283(3): 537-47.
- Farr, S. B., R. D'Ari und D. Touati (1986). "Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8268-72.
- Ferguson, A. D., R. Chakraborty, B. S. Smith, L. Esser, D. van der Helm und J. Deisenhofer (2002). "Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA." *Science* 295: 1715-9.
- Franca, M. B., A. D. Panek und E. C. Eleutherio (2007). "Oxidative stress and its effects during dehydration." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 621-31.
- Fraser, H. I., M. Kvaratskhelia und M. F. White (1999). "The two analogous phosphoglycerate mutases of *Escherichia coli*." *FEBS Lett* 455: 344-8.
- Fredrickson, J. K., S. M. Li, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, M. Zhai, H. M. Sulloway, J. C. Scholten, M. G. Brown, D. L. Balkwill und M. J. Daly (2008). "Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance?" *ISME J* 2: 393-403.
- Fridovich, I. (1986a). "Biological effects of the superoxide radical." *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11.
- Fridovich, I. (1986b). "Superoxide dismutases." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58: 61-97.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.

- Gaither, L. A. und D. J. Eide (2000). "Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter." *J Biol Chem* 275: 5560-4.
- Gaither, L. A. und D. J. Eide (2001a). "Eukaryotic zinc transporters and their regulation." *Biometals* 14: 251-70.
- Gaither, L. A. und D. J. Eide (2001b). "The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells." *J Biol Chem* 276: 22258-64.
- Gebhard, S., N. Ekanayaka und G. M. Cook (2009). "The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for in vitro growth of *Mycobacterium smegmatis*." *BMC Microbiol* 9: 254.
- Girijashanker, K., L. He, M. Soleimani, J. M. Reed, H. Li, Z. Liu, B. Wang, T. P. Dalton und D. W. Nebert (2008). "*Slc39a14* gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter." *Mol Pharmacol* 73: 1413-23.
- Gitan, R. S., M. Shababi, M. Kramer und D. J. Eide (2003). "A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium." *J Biol Chem* 278: 39558-64.
- Gort, A. S., D. M. Ferber und J. A. Imlay (1999). "The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 32: 179-91.
- Graham, A. I., S. Hunt, S. L. Stokes, N. Bramall, J. Bunch, A. G. Cox, C. W. McLeod und R. K. Poole (2009). "Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins." *J Biol Chem* 284: 18377-89.
- Grass, G. (2006a). "Biometall-Homöostase in *Escherichia coli*." *Habilitationsschrift*. Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Grass, G. (2006b). "Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done." *Biometals* 19: 159-72.
- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies und C. Rensing (2001). "ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 183: 4664-7.
- Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire und C. Rensing (2005). "The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum." *J Bacteriol* 187: 1604-11.
- Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith und C. Rensing (2002). "ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 184: 864-6.
- Gray, B. und A. J. Carmichael (1992). "Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance." *Biochem J* 281: 795-802.
- Grossoehme, N. E., S. Akilesh, M. L. Guerinot und D. E. Wilcox (2006). "Metal-binding thermodynamics of the histidine-rich sequence from the metal-transport protein IRT1 of *Arabidopsis thaliana*." *Inorg Chem* 45: 8500-8.



- Grotz, N., T. Fox, E. Connolly, W. Park, M. L. Guerinot und D. Eide (1998). "Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7220-4.
- Guerinot, M. L. (2000). "The ZIP family of metal transporters." *Biochim Biophys Acta* 1465: 190-8.
- Haas, H. (2003). "Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage." *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 316-30.
- Haemig, H. A. und R. J. Brooker (2004). "Importance of conserved acidic residues in mntH, the Nramp homolog of *Escherichia coli*." *J Membr Biol* 201: 97-107.
- Hantke, K. (1981). "Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant." *Mol Gen Genet* 182: 288-92.
- Hantke, K. (1983). "Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in *Escherichia coli* K12." *Mol Gen Genet* 191: 301-6.
- Hantke, K. (1987). "Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12." *FEMS Microbiol Lett* 44: 53-57.
- Hantke, K. (1990). "Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for *E. coli*." *FEMS Microbiol Lett* 55: 5-8.
- Hantke, K. (2001). "Iron and metal regulation in bacteria." *Curr Opin Microbiol* 4: 172-7.
- Hantke, K. (2003). "Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil?" *Trends Microbiol* 11: 192-5.
- Hantke, K. (2005). "Bacterial zinc uptake and regulators." *Curr Opin Microbiol* 8: 196-202.
- Harrington, J. R., R. J. Martens, N. D. Cohen und L. R. Bernstein (2006). "Antimicrobial activity of gallium against virulent *Rhodococcus equi* in vitro and in vivo." *J Vet Pharmacol Ther* 29: 121-7.
- Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt und G. B. Cox (2001). "Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 183: 5008-14.
- Hartmann, A. und V. Braun (1981). "Iron uptake and iron limited growth of *Escherichia coli* K-12." *Arch Microbiol* 130: 353-6.
- Hassan, H. M. und I. Fridovich (1977). "Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli* Induction by methyl viologen." *J Biol Chem* 252: 7667-72.
- Hassan, H. M. und I. Fridovich (1978). "Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 253: 6445-20.
- Hassan, H. M. und I. Fridovich (1979). "Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical." *J Biol Chem* 254: 10846-52.
- Hayashi, S., J. P. Koch und E. C. Lin (1964). "Active Transport of L-Alpha-Glycerophosphate in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 239: 3098-105.
- He, L., K. Girijashanker, T. P. Dalton, J. Reed, H. Li, M. Soleimani und D. W. Nebert (2006). "ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties." *Mol Pharmacol* 70: 171-80.

- Hmiel, S. P., M. D. Snively, C. G. Miller und M. E. Maguire (1986). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene." *J Bacteriol* 168: 1444-50.
- Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, M. Karavolos und S. J. Foster (2002). "Manganese: elemental defence for a life with oxygen." *Trends Microbiol* 10: 496-501.
- Hubbard, J. A., K. B. Lewandowska, M. N. Hughes und R. K. Poole (1986). "Effects of iron-limitation of *Escherichia coli* on growth, the respiratory chains and gallium uptake." *Arch Microbiol* 146: 80-6.
- Hudek, L., L. C. Rai, D. Freestone, A. Michalczyk, M. Gibson, Y. F. Song und M. L. Ackland (2009). "Bioinformatic and expression analyses of genes mediating zinc homeostasis in *Nostoc punctiforme*." *Appl Environ Microbiol* 75: 784-91.
- Hussein, S., K. Hantke und V. Braun (1981). "Citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K-12." *Eur J Biochem* 117: 431-7.
- Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." *Annu Rev Microbiol* 57: 395-418.
- Imlay, J. A. (2008). "Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide." *Annu Rev Biochem* 77: 755-76.
- Imlay, J. A., S. M. Chin und S. Linn (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." *Science* 240: 640-2.
- Imlay, J. A. und S. Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." *Science* 240: 1302-9.
- Imlay, K. R. und J. A. Imlay (1996). "Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 178: 2564-71.
- Inaoka, T., Y. Matsumura und T. Tsuchido (1999). "SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 181: 1939-43.
- Jackson, R. J., M. R. Binet, L. J. Lee, R. Ma, A. I. Graham, C. W. McLeod und R. K. Poole (2008). "Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels." *FEMS Microbiol Lett* 289: 219-24.
- Johnson, G. S., C. R. Adler, J. J. Collins und D. Court (1979). "Role of the *spoT* gene product and manganese ion in the metabolism of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 254: 5483-7.
- Jordan, A. und P. Reichard (1998). "Ribonucleotide reductases." *Annu Rev Biochem* 67: 71-98.
- Kammler, M., C. Schon und K. Hantke (1993). "Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 175: 6212-9.
- Kaneko, Y., M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan und P. K. Singh (2007). "The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity." *J Clin Invest* 117: 877-88.
- Kargalioglu, Y. und J. A. Imlay (1994). "Importance of anaerobic superoxide dismutase synthesis in facilitating outgrowth of *Escherichia coli* upon entry into an aerobic habitat." *J Bacteriol* 176: 7653-8

- Karlin, S. und Z. Y. Zhu (1997). "Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14231-6.
- Kay, W. W. und O. K. Ghei (1981). "Inorganic cation transport and the effects on C4 dicarboxylate transport in *Bacillus subtilis*." *Can J Microbiol* 27(11): 1194-201.
- Keele, B. B., Jr., J. M. McCord und I. Fridovich (1970). "Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme." *J Biol Chem* 245: 6176-81.
- Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Slauch und M. E. Maguire (2002). "Regulation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe(2+), and Mn(2+)." *J Bacteriol* 184: 3151-8.
- Kehres, D. G. und M. E. Maguire (2003). "Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria." *FEMS Microbiol Rev* 27: 263-90.
- Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay und M. E. Maguire (2000). "The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen." *Mol Microbiol* 36: 1085-100.
- Kershaw, C. J., N. L. Brown und J. L. Hobman (2007). "Zinc dependence of *zinT* (*yodA*) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by ZinT." *Biochem Biophys Res Commun* 364(1): 66-71.
- Kobayashi, M. und S. Shimizu (1999). "Cobalt proteins." *Eur J Biochem* 261: 1-9.
- Koch, D., D. H. Nies und G. Grass (2007). "The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis." *Biometals* 20: 759-71.
- Korbashi, P., R. Kohen, J. Katzhendler und M. Chevion (1986). "Iron mediates paraquat toxicity in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 261: 12472-6.
- Korshunova, Y. O., D. Eide, W. G. Clark, M. L. Guerinot und H. B. Pakrasi (1999). "The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range." *Plant Mol Biol* 40: 37-44.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-5.
- Larson, S. M., J. S. Rasey, D. R. Allen, N. J. Nelson, Z. Grunbaum, G. D. Harp und D. L. Williams (1980). "Common pathway for tumor cell uptake of gallium-67 and iron-59 via a transferrin receptor." *J Natl Cancer Inst* 64: 41-53.
- Lee, J. W. und J. D. Helmann (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." *Biometals* 20: 485-99.
- Lin, H., M. A. Fischbach, D. R. Liu und C. T. Walsh (2005). "In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes." *J Am Chem Soc* 127: 11075-84.
- Liochev, S. I. und I. Fridovich (1991). "Effects of overproduction of superoxide dismutase on the toxicity of paraquat toward *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 266: 8747-50.

- Liu, J., N. Quinn, G. A. Berchtold und C. T. Walsh (1990). "Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate." *Biochemistry* 29: 1417-25.
- Liu, Z., H. Li, M. Soleimani, K. Girijashanker, J. M. Reed, L. He, T. P. Dalton und D. W. Nebert (2008). "Cd<sup>2+</sup> versus Zn<sup>2+</sup> uptake by the ZIP8 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking." *Biochem Biophys Res Commun* 365: 814-20.
- Luecke, H. und F. A. Quiocho (1990). "High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds." *Nature* 347: 402-6.
- Macomber, L. und J. A. Imlay (2009). "The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8344-9.
- Makarova, K. S., L. Aravind, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, K. W. Minton, E. V. Koonin und M. J. Daly (2001). "Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics." *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 44-79.
- Makarova, K. S., M. V. Omelchenko, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Lapidus, A. Copeland, E. Kim, M. Land, K. Mavrommatis, S. Pitluck, P. M. Richardson, C. Detter, T. Brettin, E. Saunders, B. Lai, B. Ravel, K. M. Kemner, Y. I. Wolf, A. Sorokin, A. V. Gerasimova, M. S. Gelfand, J. K. Fredrickson, E. V. Koonin und M. J. Daly (2007). "*Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks." *PLoS One* 2: e955.
- Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros und M. F. Cellier (2000). "Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter." *Mol Microbiol* 35: 1065-78.
- Mandel, M. und A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." *J Mol Biol* 53: 159-62.
- Manning, D. L., R. A. McClelland, J. M. Knowlden, S. Bryant, J. M. Gee, C. D. Green, J. F. Robertson, R. W. Blamey, R. L. Sutherland, C. J. Ormandy und *et al.* (1995). "Differential expression of oestrogen regulated genes in breast cancer." *Acta Oncol* 34: 641-6.
- Manning, D. L., J. F. Robertson, I. O. Ellis, C. W. Elston, R. A. McClelland, J. M. Gee, R. J. Jones, C. D. Green, P. Cannon, R. W. Blamey und *et al.* (1994). "Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with lymph node involvement." *Eur J Cancer* 30A: 675-8.
- Mao, X., B. E. Kim, F. Wang, D. J. Eide und M. J. Petris (2007). "A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity." *J Biol Chem* 282: 6992-7000.
- Marlovits, T. C., W. Haase, C. Herrmann, S. G. Aller und V. M. Unger (2002). "The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16243-8.
- Masse´, E. und S. Gottesman (2002). "A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4620-5.

- Masse', E., H. Salvail, G. Desnoyers und M. Arguin (2007). "Small RNAs controlling iron metabolism." *Curr Opin Microbiol* 10: 140-5.
- Masse', E., C. K. Vanderpool und S. Gottesman (2005). "Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 187: 6962-71.
- Mattimore, V. und J. R. Battista (1996). "Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation." *J Bacteriol* 178: 633-7.
- Matzanke, B. F., R. Bohnke, U. Mollmann, R. Reissbrodt, V. Schunemann und A. X. Trautwein (1997). "Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores." *Biometals* 10: 193-203.
- Matzanke, B. F., D. J. Ecker, T. S. Yang, B. H. Huynh, G. Muller und K. N. Raymond (1986). "*Escherichia coli* iron enterobactin uptake monitored by Mossbauer spectroscopy." *J Bacteriol* 167: 674-80.
- McGowan, S. J., H. C. Gorham und D. A. Hodgson (1993). "Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region." *Mol Microbiol* 10: 713-35.
- Medicis, E. D., J. Paquette, J. J. Gauthier und D. Shapcott (1986). "Magnesium and Manganese Content of Halophilic Bacteria." *Appl Environ Microbiol* 52: 567-573.
- Medveczky, N. und H. Rosenberg (1971). "Phosphate transport in *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* 241: 494-506.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles und F. Van Gijsegem (1985). "*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals." *J Bacteriol* 162: 328-34.
- Messner, K. R. und J. A. Imlay (2002). "Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase." *J Biol Chem* 277: 42563-71.
- Michan, C., M. Machado, G. Dorado und C. Pueyo (1999). "In vivo transcription of the *Escherichia coli* oxyR regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress." *J Bacteriol* 181: 2759-64.
- Miller, A. F. (2004). "Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills." *Curr Opin Chem Biol* 8: 162-8.
- Milon, B., Q. Wu, J. Zou, L. C. Costello und R. B. Franklin (2006). "Histidine residues in the region between transmembrane domains III and IV of hZip1 are required for zinc transport across the plasma membrane in PC-3 cells." *Biochim Biophys Acta* 1758: 1696-701.
- Minton, K. W. und M. J. Daly (1995). "A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*." *Bioessays* 17: 457-64.

- Missiakas, D. und S. Raina (1997). "Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB." *EMBO J* 16: 1670-85.
- Monje-Casas, F., J. Jurado, M. J. Prieto-Alamo, A. Holmgren und C. Pueyo (2001). "Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level in vivo." *J Biol Chem* 276: 18031-7.
- Moody, C. S. und H. M. Hassan (1984). "Anaerobic biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 259: 12821-5.
- Mosteller, R. D. und R. V. Goldstein (1975). "Unusual sensitivity of *Escherichia coli* to adenine or adenine plus histidine." *J Bacteriol* 123: 750-1.
- Navarro, C., L. F. Wu und M. A. Mandrand-Berthelot (1993). "The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel." *Mol Microbiol* 9: 1181-91.
- Neilands, J. B. (1995). "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds." *J Biol Chem* 270: 26723-6.
- Niegowski, D. und S. Eshaghi (2007). "The CorA family: structure and function revisited." *Cell Mol Life Sci* 64: 2564-74.
- Nies, D. H. (2007). "Bacterial Transition Metal Homeostasis. Molecular Microbiology of Heavy Metals." Berlin/Heidelberg, Springer. 6/2007: 117-142.
- Nikaido, H. und E. Y. Rosenberg (1990). "Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups." *J Bacteriol* 172: 1361-7.
- Nishida, S., T. Mizuno und H. Obata (2008). "Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity." *Plant Physiol Biochem* 46: 601-6.
- Noor, R., M. Murata und M. Yamada (2009). "Oxidative Stress as a Trigger for Growth Phase-Specific sigma-Dependent Cell Lysis in *Escherichia coli*." *J Mol Microbiol Biotechnol* 17: 177-87.
- Olakanmi, O., B. E. Britigan und L. S. Schlesinger (2000). "Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages." *Infect Immun* 68: 5619-27.
- Outten, C. E. und T. V. O'Halloran (2001). "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis." *Science* 292: 2488-92.
- Papp-Wallace, K. M. und M. E. Maguire (2006). "Manganese transport and the role of manganese in virulence." *Annu Rev Microbiol* 60: 187-209.
- Park, M. H., B. B. Wong und J. E. Lusk (1976). "Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: genetics and physiology." *J Bacteriol* 126: 1096-103.
- Park, S. und J. A. Imlay (2003). "High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction." *J Bacteriol* 185: 1942-50.
- Patzner, S. I. und K. Hantke (1998). "The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 28: 1199-210.

- Patzer, S. I. und K. Hantke (2000). "The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 275: 24321-32.
- Patzer, S. I. und K. Hantke (2001). "Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 183: 4806-13.
- Pereira Ede, J., A. D. Panek und E. C. Eleutherio (2003). "Protection against oxidation during dehydration of yeast." *Cell Stress Chaperones* 8: 120-4.
- Pfennig, N. (1974). "*Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of Rhodospirillaceae." *Arch Microbiol.* 100:197-206.
- Pollack, J. R. und J. B. Neilands (1970). "Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*." *Biochem Biophys Res Commun* 38: 989-92.
- Posey, J. E. und F. C. Gherardini (2000). "Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen." *Science* 288: 1651-3.
- Privalle, C. T., W. F. Beyer, Jr. und I. Fridovich (1989). "Anaerobic induction of ProMn-superoxide dismutase in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 264: 2758-63.
- Privalle, C. T. und I. Fridovich (1987). "Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2723-6.
- Privalle, C. T. und I. Fridovich (1988). "Inductions of superoxide dismutases in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. Accumulation of an inactive form of the manganese enzyme." *J Biol Chem* 263: 4274-9.
- Privalle, C. T., S. E. Kong und I. Fridovich (1993). "Induction of manganese-containing superoxide dismutase in anaerobic *Escherichia coli* by diamide and 1,10-phenanthroline: sites of transcriptional regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2310-4.
- Provence, D. L. a. R. I. C. (1981). "Gene transfer in Gram-Negative Bacteria: Generalized Transduction in *E. coli* with Phage P1. in Gerhard,P.(Ed.) *Methods for General and Molecular Bacteriology*.ASM, Washington,D.C."
- Pugh, S. Y., J. L. DiGiuseppi und I. Fridovich (1984). "Induction of superoxide dismutases in *Escherichia coli* by manganese and iron." *J Bacteriol* 160: 137-42.
- Pugsley, A. P. und P. Reeves (1976). "Iron uptake in colicin B-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* 126: 1052-62.
- Puskarova, A., P. Ferienc, J. Kormanec, D. Homerova, A. Farewell und T. Nystrom (2002). "Regulation of *yodA* encoding a novel cadmium-induced protein in *Escherichia coli*." *Microbiology* 148: 3801-11.
- Que, Q. und J. D. Helmann (2000). "Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins." *Mol Microbiol* 35: 1454-68.
- Raymond, K. N., E. A. Dertz und S. S. Kim (2003). "Enterobactin: an archetype for microbial iron transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3584-8.

- Rensing, C., B. Mitra und B. P. Rosen (1997). "The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14326-31.
- Rodrigue, A., G. Effantin und M. A. Mandrand-Berthelot (2005). "Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 187: 2912-6.
- Rogers, E. E., D. J. Eide und M. L. Gueriot (2000). "Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12356-60.
- Rosenberg, H., R. G. Gerdes und K. Chegwidden (1977). "Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 131: 505-11.
- Rowley, D. A. und B. Halliwell (1982a). "Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals from NADH and NADPH in the presence of iron salts." *FEBS Lett* 142: 39-41.
- Rowley, D. A. und B. Halliwell (1982b). "Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds." *FEBS Lett* 138: 33-6.
- Saltzman, H. A. und I. Fridovich (1973). "Editorial: Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme: superoxide dismutase." *Circulation* 48: 921-3.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition . Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Sauer, M., K. Hantke und V. Braun (1987). "Ferric-coprogen receptor FhuE of *Escherichia coli*: processing and sequence common to all TonB-dependent outer membrane receptor proteins." *J Bacteriol* 169: 2044-9.
- Sauer, M., K. Hantke und V. Braun (1990). "Sequence of the *fhuE* outer-membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants." *Mol Microbiol* 4: 427-37.
- Seaver, L. C. und J. A. Imlay (2001). "Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 183: 7182-9
- Shimazaki, Y., M. Takani und O. Yamauchi (2009). "Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties." *Dalton Trans* (38): 7854-69.
- Shi, L., D. G. Kehres und M. E. Maguire (2001). "The PPP-family protein phosphatases PrpA and PrpB of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* possess distinct biochemical properties." *J Bacteriol* 183: 7053-7.
- Silver, S. (1969). "Active transport of magnesium in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 62: 764-71
- Singh, R., B. Wiseman, T. Deemagarn, L. J. Donald, H. W. Duckworth, X. Carpena, I. Fita und P. C. Loewen (2004). "Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity." *J Biol Chem* 279: 43098-106.
- Smith, R. L., J. L. Banks, M. D. Snavely und M. E. Maguire (1993). "Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein." *J Biol Chem* 268: 14071-80.



- Spiegel-online (2004). "Bakterien stehen auf Heavy Metal." ["http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,288097,00.html"](http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,288097,00.html)
- Stadtman, E. R., B. S. Berlett und P. B. Chock (1990). "Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 384-8.
- Stallings, W. C., K. A. Patridge, R. K. Strong und M. L. Ludwig (1984). "Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs." *J Biol Chem* 259: 10695-9.
- Stephens, D. L., M. D. Choe und C. F. Earhart (1995). "*Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin." *Microbiology* 141 : 1647-54.
- Stintzi, A., C. Barnes, J. Xu und K. N. Raymond (2000). "Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10691-6.
- Stojiljkovic, I., V. Kumar und N. Srinivasan (1999). "Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria." *Mol Microbiol* 31: 429-42.
- Storz, G. und J. A. Imlay (1999). "Oxidative stress." *Curr Opin Microbiol* 2: 188-94.
- Straus, D. J. (2003). "Gallium nitrate in the treatment of lymphoma." *Semin Oncol* 30(2 Suppl 5): 25-33.
- Tardat, B. und D. Touati (1991). "Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*: Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control)." *Mol Microbiol* 5: 455-65.
- Taudte, N. (2003). "Charakterisierung des Eisen-Aufnahmesystems Feo aus *Escherichia coli*." *Diplomarbeit*. Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Taylor, K. M. und R. I. Nicholson (2003). "The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters." *Biochim Biophys Acta* 1611: 16-30.
- Touati, D. (2000a). "Iron and oxidative stress in bacteria." *Arch Biochem Biophys* 373: 1-6.
- Touati, D. (2000b). "Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*-how many ways are there to trigger soxRS response?" *Redox Rep* 5: 287-93.
- Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard und S. Despied (1995). "Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase." *J Bacteriol* 177: 2305-14.
- Tseng, H. J., Y. Srikhanta, A. G. McEwan und M. P. Jennings (2001). "Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity." *Mol Microbiol* 40: 1175-86.
- Tummuru, M. K., T. J. Brickman und M. A. McIntosh (1989). "The in vitro conversion of chorismate to isochorismate catalyzed by the *Escherichia coli* entC gene product. Evidence that EntA does not contribute to isochorismate synthase activity." *J Biol Chem* 264: 20547-51.

- van Veen, H. W. (1997). "Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms." *Antonie Van Leeuwenhoek* 72: 299-315.
- van Veen, H. W., T. Abee, G. J. Kortstee, W. N. Konings und A. J. Zehnder (1993). "Mechanism and energetics of the secondary phosphate transport system of *Acinetobacter johnsonii* 210A." *J Biol Chem* 268: 19377-83.
- van Veen, H. W., T. Abee, G. J. Kortstee, W. N. Konings und A. J. Zehnder (1994). "Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*." *Biochemistry* 33(7): 1766-70.
- Vance, C. K. und A. F. Miller (1998). "Spectroscopic comparisons of the pH dependencies of Fe-substituted (Mn)superoxide dismutase and Fe-superoxide dismutase." *Biochemistry* 37: 5518-27.
- Vassinova, N. und D. Kozyrev (2000). "A method for direct cloning of *fur*-regulated genes: identification of seven new *fur*-regulated loci in *Escherichia coli*." *Microbiology* 146 Pt 12: 3171-82.
- Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews und D. J. Kelly (2000). "Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter." *Mol Microbiol* 37: 274-86.
- Vieira, J. und J. Messing (1982). "The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers." *Gene* 19: 259-68.
- Voigt, A. (2008). "Untersuchung der Metallaufnahme in *Cupriavidus metallidurans* AE104." *Diplomarbeit*. Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Waidner, B., S. Greiner, S. Odenbreit, H. Kavermann, J. Velayudhan, F. Stahler, J. Guhl, E. Bisse, A. H. van Vliet, S. C. Andrews, J. G. Kusters, D. J. Kelly, R. Haas, M. Kist und S. Bereswill (2002). "Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization." *Infect Immun* 70: 3923-9.
- Wang, J., A. D. Budde und S. A. Leong (1989). "Analysis of ferrichrome biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*: cloning of an ornithine-N5-oxygenase gene." *J Bacteriol* 171: 2811-8.
- Wang, S. Z., Y. Chen, Z. H. Sun, Q. Zhou und S. F. Sui (2006). "*Escherichia coli* CorA periplasmic domain functions as a homotetramer to bind substrate." *J Biol Chem* 281: 26813-20.
- Weaver, K. D., J. J. Heymann, A. Mehta, P. L. Roulhac, D. S. Anderson, A. J. Nowalk, P. Adhikari, T. A. Mietzner, M. C. Fitzgerald und A. L. Crumbliss (2008). "Ga<sup>3+</sup> as a mechanistic probe in Fe<sup>3+</sup> transport: characterization of Ga<sup>3+</sup> interaction with FbpA." *J Biol Inorg Chem* 13: 887-98.
- Weber, K. und M. Osborn (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 244: 4406-12.
- Whittaker, J. W. (2003). "The irony of manganese superoxide dismutase." *Biochem Soc Trans* 31: 1318-21.

- Whittaker, J. W. (2009). "Metal uptake by manganese superoxide dismutase." *Biochim Biophys Acta* 491: 69-74.
- Willisky, G. R., R. L. Bennett und M. H. Malamy (1973). "Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation." *J Bacteriol* 113: 529-39.
- Winkelman, G. (2007). "Ecology of siderophores with special reference to the fungi." *Biometals* 20: 379-92.
- Winkler, H. H. (1966). "A hexose-phosphate transport system in *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* 117: 231-40.
- Woodmansee, A. N. und J. A. Imlay (2002). "Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron." *J Biol Chem* 277: 34055-66.
- Worlock, A. J. und R. L. Smith (2002). "ZntB is a novel Zn<sup>2+</sup> transporter in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." *J Bacteriol* 184: 4369-73.
- Yang, M. und C. R. Chitambar (2008). "Role of oxidative stress in the induction of metallothionein-2A and heme oxygenase-1 gene expression by the antineoplastic agent gallium nitrate in human lymphoma cells." *Free Radic Biol Med* 45: 763-72.
- Yost, F. J., Jr. und I. Fridovich (1973). "An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 248: 4905-8.
- Zhao, H. und D. Eide (1996a). "The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2454-8.
- Zhao, H. und D. Eide (1996b). "The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 271: 23203-10.
- Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider und G. Storz (1999). "OxyR and SoxRS regulation of *fur*." *J Bacteriol* 181: 4639-43.
- Zimmermann, L., K. Hantke und V. Braun (1984). "Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* 159: 271-7.
- Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser und M. Cashel (1991). "Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations." *J Biol Chem* 266: 5980-90.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. H. Nies für die ständig gewährte Diskussionsbereitschaft, für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sowie die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe und in internationalen Arbeitsgruppen durchführen zu können.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gregor Grass bedanken. Du hast mir nicht nur die grundlegenden Dinge im Labor beigebracht sondern auch gezeigt, wie spannend Forschung sein kann. Vielen Dank für Deine stetige Unterstützung, die keine geographischen Grenzen kennt und die vielen Ratschläge und Diskussionen, die neue Ideen in mir auslösten. Du zeigtest stets Interesse an meiner Arbeit, auch wenn das Fass oft keinen Boden hatte. Letztendlich noch ein Dankeschön für die herzliche Aufnahme in Lincoln, Nebraska, die Möglichkeit in Deiner neuen Arbeitsgruppe Erfahrungen zu sammeln und die vielen schönen, unvergesslichen Erlebnisse im Maisstaat.

Für die ICP-MS Messungen danke ich Dr. Javier Seravalli *Redox Biology Center, Biochemistry Department, University Nebraska-Lincoln* und Christophe Espirito Santo, *School of Biological Sciences, University Nebraska-Lincoln*. Thank you, Chrissi, for our joyous time together in the Prof. Nies lab and for your sincere efforts to adapt to the German way of work. I am really glad that I succeeded in passing on my experiences and skills to you even if it was hard on you at times. I deeply appreciate your warm welcome to Lincoln and the great time we had in Nebraska. Obrigada e bejinhos !

Für die Möglichkeit einen der schönsten Bundesstaaten der USA, dem *Grand Canyon State* - Arizona entdecken zu können, neue Methoden zu erlernen und somit meine wissenschaftlichen Kenntnisse zu erweitern danke ich Prof. Dr. Christopher Rensing und Sylvia.

Dir, meine Judi danke ich für Alles! Zusammen waren, sind und bleiben wir ein unschlagbares Team!

Ein ganz großes Dankeschön für die vielen aufmunternden Worte, Unterstützungen und fröhlichen Momente an manch so trüben Labortagen geht an meine Gritti.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. H. Nies (so z. B. Martin“e“, Kochi, Karola, Daniel; Kers“ch“tin und viele mehr) danke ich für das fröhliche und angenehme Arbeitsklima und die vielen hilfreichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Nicht vergessen möchte ich Jana und Wenke. Dankeschön für die gemeinsame Zeit und die vielen hilfreichen, lieben Ratschläge und Unterstützungen nicht nur im Laboralltag.

Ein großes Dankeschön geht an all meine Freunde (Ines, Silke, David, Netti, Bsdru, Stibbi und Waldi) für den moralischen Beistand und die vielen schönen, geselligen Abende, die wir zusammen verbrachten. Insbesondere ein großes Dankeschön an unserer Mädels-Gang (bestehend aus Judi, Griti, Elli, Weltenbummler Cindy und Ich), die schon während des Studiums durch dick und dünn gegangen ist. Es ist toll, dass wir uns trotz der vielen Jahre nicht aus den Augen verloren haben. Danke für die schöne gemeinsame Zeit!

Meine lieben Eltern und Jani, Euch habe ich es zu verdanken, dass ich nun fast am Ziel angekommen bin. Vielen lieben Dank für Eure Unterstützungen in allen Lebenssituationen, auch wenn sie mich manchmal über den „Großen Teich“ erreichen mussten. Ohne Euch wäre dies nicht möglich gewesen. Danke, dass ich Euch habe!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Nadine Taudte  
Geburtsdatum: 28.07.1977  
Geburtsort: Zeitz  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

09/1984-07/1991 Polytechnische Oberschule „Siegfried Jähn“, 12. POS in Zeitz  
09/1991-07/1996 Abitur am Otto-Baensch-Gymnasium in Zeitz (Note 2.3)

## Berufsausbildung

09/1996-07/1998 Ausbildung zur „Staatlich geprüften Biologisch-technischen Assistentin“  
an den Berufsbildenden Schulen Weißenfels  
Abschluss als Biologisch-technische Assistentin (Note 1.0)

## Studium

10/1998-10/2003 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
10/2002-11/2002 Diplomprüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Genetik, Immunologie,  
Biochemie und Humanbiologie  
11/2002-10/2003 Diplomarbeit zum Thema „Charakterisierung des Eisen-Aufnahme-  
Systems Feo aus *Escherichia coli*“  
Abschluss: Diplom-Biologin (Note 1.2)

## Promotion

11/2003-10/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I-  
Biowissenschaften, Institut für Biologie, Institutsbereich Mikrobiologie,  
Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie, Prof. D. H. Nies der Martin-  
Luther-Universität Halle Wittenberg  
seit 11/2009 Beendigung der Dissertationsarbeit mit dem Thema: „Eisen und Mangan:  
Wechselwirkungen und Homöostase in *Escherichia coli* mit dem  
Schwerpunkt ZupT“

Halle/Saale, März 2010

---

Nadine Taudte

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und aus benutzten Werken entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Außerdem erkläre ich, dass ich mich bisher nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Halle/Saale, März 2010

---

Nadine Taudte