

**Charakterisierung eines neuen, zweiteiligen
Eisenaufnahmesystems aus dem uropathogenen**

***Escherichia coli* Stamm F11**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Doreen Koch

geb. am 17.09.1980 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. D. H. Nies
2. Prof. G. R. Sawers
3. Prof. K. Hantke

Tag der Verteidigung: 01.11.2011

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Tabellenverzeichnis.....	V
III	Abbildungsverzeichnis	VI
IV	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Die biologische Funktion von Eisen	1
1.2	Eisen-Homöostase in <i>Escherichia coli</i>	2
1.3	Das EfeUOB-Eisenaufnahmesystem von <i>E. coli</i>	6
1.4	Vorkenntnisse über FetMP und Ziele der Arbeit	9
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	Anzucht, Induktion und Zellernte von <i>E. coli</i>	17
2.2.3	Stammhaltung.....	17
2.3	Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	18
2.3.1	Isolierung von DNA	18
2.3.1.1	Plasmid isolation mittels <i>Spin</i> Säulen	18
2.3.1.2	Isolation genomischer DNA mittels <i>Spin</i> Säulen	18
2.3.1.3	Mikroplasmidpräparation	18
2.3.2	DNA-Techniken	19
2.3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.3.2.2	DNA-Größenstandard	19
2.3.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	19
2.3.2.4	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	20
2.3.2.5	Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	20
2.3.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	20
2.3.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
2.3.3.1	Auswahl der Primer.....	21
2.3.3.2	Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.3.3.3	<i>Quik-ChangeTM Site-Directed Mutagenesis</i> -PCR.....	27
2.3.4	DNA-Transfer in <i>E. coli</i> und Selektion rekombinanter Klone.....	27
2.3.4.1	Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	27

I Inhaltsverzeichnis

2.3.4.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	28
2.3.4.3	Selektion plasmidtragender <i>E. coli</i> -Klone.....	29
2.3.4.4	Integration von <i>single-copy</i> Genen in das Chromosom von <i>E. coli</i>	29
2.3.5	DNA-Sequenzierung	30
2.3.5.1	Verwendung des <i>DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit</i>	30
2.3.5.2	Sequenzierung durch kommerzielle Anbieter	30
2.3.5.3	Auswertung der Sequenzdaten	31
2.4	Molekulargenetische Arbeiten mit RNA.....	31
2.4.1	Gesamt-RNA-Isolation.....	31
2.4.2	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA.....	32
2.4.3	DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA.....	32
2.4.4	Fomaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.4.5	<i>Reverse transcriptase</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	33
2.4.6	Sandwich-Hybridisierungs-Assay	34
2.4.6.1	Zellanzucht, Zellernte und Aufschluss.....	35
2.4.6.2	Herstellung des <i>in vitro</i> transkribierten RNA Standards.....	35
2.4.6.3	RNA-Bestimmung.....	36
2.4.6.4	<i>DIG-Labeling</i>	36
2.4.6.5	<i>Biotin-Labeling</i>	36
2.4.6.6	Sandwich-Hybridisierungs-Assay	36
2.5	Zellwachstumsversuche	38
2.5.1	Wachstumsversuche in Flüssigmedien.....	38
2.5.1.1	Messung der Zelltrübung	38
2.5.1.2	Zellanzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen	39
2.6	Enzymologische Methoden.....	40
2.6.1	Fur-Titrationsassay (FURTA).....	40
2.6.2	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	40
2.6.2.1	Zellanzucht der <i>E. coli</i> -Stämme	40
2.6.2.2	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	41
2.6.3	Reduktaseassay.....	41
2.6.3.1	Zellanzucht der <i>E. coli</i> Stämme	41
2.6.3.2	FeCl_3 Reduktaseassay.....	42
2.7	Transportstudien mit radioaktivem ^{55}Fe	42
2.7.1	Zellanzucht der <i>E. coli</i> Stämme	42
2.7.2	Aufnahmeexperiment mit radioaktivem ^{55}Fe	43
2.8	Proteinbiochemische Methoden	43
2.8.1	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen	43

I Inhaltsverzeichnis

2.8.1.1	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	44
2.8.1.2	Aufschlussmethoden	44
2.8.1.3	Membranpräparation und Solubilisierung	45
2.8.1.4	Chromatographische Methoden	45
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	46
2.8.2.1	BCA-Test	46
2.8.2.2	Bradford-Proteinbestimmung	46
2.8.2.3	Direkte Bestimmung am NanoDrop®ND-1000 Spektrophotometer	46
2.8.3	Chloroform-Methanol-Fällung	47
2.8.4	Dialyse	47
2.8.5	Konzentrieren von Proteinlösungen	48
2.8.6	Faktor Xa und Thrombin Proteaseverdau	48
2.8.6.1	Abspaltung des N-terminalen <i>Strep</i> -tag®II von der FetM-Loop-Domäne	48
2.8.6.2	Abspaltung des C-terminalen 6xHis-tag® von FetP	48
2.8.7	Elektrophoretische Methoden	49
2.8.7.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	49
2.8.7.2	Native PAGE	50
2.8.7.3	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)	52
2.8.7.4	<i>Strep</i> -tag®II Detektionssystem	52
2.8.7.5	His-tag®-Detektionssystem	53
2.8.7.6	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau	53
2.8.7.7	Far-Western-Blot	53
2.8.8	Analytik	54
2.8.8.1	Massenspektrometrie	54
2.8.8.2	<i>In-Source-Decay</i> (ISD) MALDI MS	54
2.8.8.3	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	55
2.8.8.4	Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)	55
2.8.8.5	Circulardichroismus (CD)	57
2.8.8.6	Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)	58
2.8.8.7	Modifikation von Histidinen mittels Diethylpyrocarbonat	58
3	Ergebnisse	60
3.1	Das FetMP-System ist an der Eisen-Homöostase von <i>E. coli</i> beteiligt	60
3.2	Der Eisen-Regulator Fur kontrolliert die Expression von <i>fetMP</i>	62
3.3	FetM verbessert als Eisen-Importer das Wachstum der Eisenaufnahmemutante	65
3.4	FetP bindet als Homodimer Metallionen im Periplasma	69
3.5	Welche Aminosäurereste sind an der Metallionenbindung von FetP beteiligt?	79
3.6	Handelt es sich bei FetP um eine neuartige Eisen-Reduktase?	85

I Inhaltsverzeichnis

3.7	FetM weist einen großen N-terminalen <i>Loop</i> im Periplasma auf.....	86
3.8	Die FetM- <i>Loop</i> -Domäne weist einen hohen Anteil an α -Helices auf.	88
3.9	Die <i>Loop</i> -Domäne von FetM bindet Mn^{2+} als Fe^{2+} -Analogon mit hoher Spezifität.	89
3.10	Interagiert die FetM- <i>Loop</i> -Domäne mit FetP?.....	90
4	Diskussion.....	95
4.1	FetMP als spezifisches Eisenaufnahmesystem in <i>E. coli</i>	95
4.2	Das <i>fetMP</i> Operon gehört zum Fur-Regulon.	100
4.3	Strukturanalyse von FetP.	103
4.4	FetP ist ein periplasmatisches Metallbindeprotein.....	108
4.5	Charakterisierung der Bindestellen in FetP.....	113
4.6	Welche Funktion übernimmt die N-terminale Domäne von FetM im Periplasma?.....	118
4.7	Die putative Eisenreduktase FetP nutzt vermutlich Cu^+ als Elektronendonator.	120
4.8	Ausblick.....	124
5	Zusammenfassung.....	125
6	Literaturverzeichnis.....	126

II Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide	11
Tab. 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen im Medium	17
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Pimer	21
Tab. 4: FetP liegt als stabiles Homodimer vor.	72
Tab. 5: Bis-Tris und ACES sind geeignete Puffersubstanzen für die ITC.....	74
Tab. 6: Ergebnisse der ITC-Experimente mit FetP und verschiedenen Metallionen.	78
Tab. 7: Ergebnisse der ITC-Versuche mit den FetP-Varianten in Bis-Tris.	83
Tab. 8: Ergebnisse der ITC-Versuche mit den FetP-Varianten in ACES.	84

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bekannte Eisenaufnahmemechanismen des Gram-negativen Bakteriums <i>E. coli</i>	3
Abb. 2: Topologie-Modell von EfeU aus <i>E. coli</i> Nissle 1917.	7
Abb. 3: Modell der Eisenaufnahme über das EfeUOB-System	8
Abb. 4: Anordnung der beiden Operone <i>efeUOB</i> und <i>fetMP</i> aus <i>E. coli</i> F11.....	9
Abb. 5: Das FeMP-System verbessert das Wachstum der Eisen-spezifischen Deletionsmutante.	60
Abb. 6: Putative Bindestelle für den Eisen-Regulator Fur (Fur-Box).....	62
Abb. 7: Nachweis der eisenabhängigen Regulation des <i>fetMP</i> -Operons mittels Fur-Titrationsassay ...	62
Abb. 8: Expression von <i>fetM_p-lacZ</i> in <i>E. coli</i> W3110(Δ <i>lacZYA</i>) und F11	63
Abb. 9: Eisenabhängige <i>fetMP</i> -Expression.....	64
Abb. 10: FetM ist für das Wachstum von ECA612(<i>glmS-fetMP</i>) unter Eisenmangel essentiell	65
Abb. 11: Die <i>fet</i> -Gene können einzeln exprimiert werden, liegen <i>in vivo</i> aber als Operon vor.....	66
Abb. 12: Anaerob verbessert FetMP das Wachstum der Eisenaufnahmemutante.	67
Abb. 13: FetMP dient als Eisenaufnahmesystem.....	68
Abb. 14: Vorhersage des putativen Signalpeptides von FetP.	69
Abb. 15: FetP- <i>Strep</i> -Aufreinigung	70
Abb. 16: MALDI-TOF Analyse von FetP	70
Abb. 17: FetP- <i>His</i> -Aufreinigung und Spaltung mit Thrombin	71
Abb. 18: CD-Spektren von FetP deuten auf β -Faltblattstruktur hin.....	73
Abb. 19: ITC mit CuCl ₂ bzw. MnCl ₂ und FetP in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2.....	75
Abb. 20: ITC mit MnCl ₂ bzw. ZnCl ₂ und FetP in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2.....	76
Abb. 21: Sequenz-Alignment von FetP mit homologen Proteinen.....	80
Abb. 22: Aminosäuresequenz von FetP ohne Signalpeptid.	80
Abb. 23: Testüberexpression gezielt-mutierter <i>fetP</i> -Gene.	81
Abb. 24: FetP funktioniert <i>in vivo</i> als Eisen-Reduktase.....	85
Abb. 25: Anaerob hemmt Ag(I) das verbesserte Wachstum von ECA612(<i>glmS-fetMP</i>)	86
Abb. 26: Putatives Topologie-Modell von FetM.	86
Abb. 27: FetM- <i>Strep</i> -Aufreinigung.....	87
Abb. 28: <i>In-Source-Decay</i> (ISD) MALDI-MS von FetM- <i>Strep</i>	88
Abb. 29: <i>Strep</i> -FetM _{loop} -Aufreinigung	88
Abb. 30: CD-Spektrum der FetM-Loop-Domäne	89
Abb. 31: ITC mit MnCl ₂ und der FetM-Loop-Domäne in 25 mM Bis-Tris pH 7.2.....	90
Abb. 32: Die periplasmatische FetM-Loop-Domäne interagiert <i>in vitro</i> mit FetP.....	91
Abb. 33: Spaltung von <i>Strep</i> -FetM _{loop} mit Faktor Xa	92
Abb. 34: ITC – Metallabhängige Interaktion zwischen der FetM-Loop-Domäne und FetP.....	93

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 35: Gesamtstruktur des Cu-FetP-Dimers.....	103
Abb. 36: Verschiedene Konformationen der Kupferbindstellen von FetP.....	104
Abb. 37: Eine mögliche dritte Metallbindestelle (CuC) benachbart zu CuB.....	105

IV Abkürzungsverzeichnis

<i>aacC1</i>	Gentamicin Acetyltransferase
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACES	N-(2-Acetamino)-2-amino-ethansulfonsäure
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
amp ^R	Ampicillin ^(Resistenz)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BLAST	<i>Basic Logic Alignment Tool</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAS	Casaminosäurenhydrolysat
<i>cat</i>	Chloramphenicol Aminotransferase
CDTA	trans-1.2-Diaminocyclohexan-N. N. N'.N'-tetraacetat
cm ^R	Chloramphenicol ^(Resistenz)
CP	Cytoplasma
cpm	<i>counts per million</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
d	<i>downstream</i>
DIP	2.2'-Dipyridyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fur	<i>ferric uptake regulator</i>
G	Guanin
gm ^R	Gentamicin ^(Resistenz)
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	Guanintriphosphatase

HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylat
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 ^R	Kanamycin ^(Resistenz)
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
Me	Metall
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFP	<i>membrane fusion protein</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PEG	Polyethylenglykol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PP	Periplasma
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RND	<i>Resistance Nodulation Cell Division</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N. N. N'.N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
TMH	transmembrane Helix
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u	<i>upstream</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett

VIS	<i>visible</i> (sichtbares Licht)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

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

1.1 Die biologische Funktion von Eisen

Eisen ist nach Sauerstoff, Silizium und Aluminium das meist vorkommende Element der Erdkruste und ist durch seine physikochemischen Eigenschaften für die Mehrheit der Mikroorganismen essentiell. Während es nur in einigen Fällen in großen Mengen gebraucht wird, wie beispielsweise für die Biosynthese von Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien (Schüler, 1999, Jogler und Schüler, 2009), beschränkt sich Eisen in den meisten Fällen auf seine Verwendung als Cofaktor oder Bestandteil prosthetischer Gruppen in Enzymen (Cornelis und Andrews, 2010). Dabei wird das Übergangsmetallion als Lewis-Säure von Schwefel-, Stickstoff- oder auch Sauerstoffatomen koordiniert. Die oktaedrische Komplexierung, die Größe der Bindestelle als auch die Anzahl an Stickstoff- und Schwefeldonatoren ermöglichen wahrscheinlich die Differenzierung zwischen Eisenionen und anderen Ionen der Nebengruppenelemente mit physikalisch ähnlichen Eigenschaften (Frausto da Silva und Williams, 2001, Nies, 2007). Darüber hinaus trägt die Redoxaktivität nicht nur zur Diskriminierung von Eisenionen bei, sondern spielt für die Funktion zahlreicher Eisenproteine in lebensnotwendigen Prozessen eine wesentliche Rolle. Dazu zählen Elektronentransportvorgänge in der Atmungskette und der Photosynthese zur Energiekonservierung aber auch in generellen Stoffwechselwegen wie der Stickstofffixierung und der DNA-Synthese (Jordan und Reichard, 1998). Als Cofaktor von Superoxiddismutasen, die üblicherweise SodB genannt werden (Fridovich, 1995), ist Eisen ebenfalls an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen beteiligt und wurde aufgrund seiner Bedeutung in vielen physiologischen Reaktionen neben anderen Übergangsmetallen als Biometall bezeichnet (Grass, 2006a).

Die Redoxaktivität von Eisen wirkt sich jedoch nachteilig auf dessen Bioverfügbarkeit unter aeroben Bedingungen und bei neutralem pH-Wert aus. So oxidiert Fe(II) zu Fe(III), was als starke Lewis-Säure die Hydrolyse von $\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_n$ zu Eisenhydroxid antreibt (Kosman, 2003) und somit in wässriger Lösung größtenteils unlöslich ($< 10^{-18}$ M bei pH 7.0) vorliegt (Neilands *et al.*, 1980). Zum Aufrechterhalten essentieller Lebensfunktionen sind jedoch in der Regel 10^{-7} bis 10^{-5} M Eisen notwendig (Andrews *et al.*, 2003), sodass Mikroorganismen, je nach dem Habitat in dem sie leben, eine große Anzahl verschiedener Eisenaufnahmesysteme entwickelt haben.

1.2 Eisen-Homöostase in *Escherichia coli*

In Abbildung 1 ist eine Übersicht über die bekannten Eisenaufnahmesysteme des Gamma-Proteobakteriums *E. coli* dargestellt.

Typisch ist die Synthese von hochaffinen Siderophoren ($k_a > 10^{30} \text{ M}^{-1}$) als eine Möglichkeit, um dreiwertige Eisenionen als Ferri-Siderophor-Komplex über Rezeptor-vermittelte ABC (ATP-Binding Cassette)-Transporter aufzunehmen (Byers und Arceneaux, 1998). So wird beispielsweise eisengebundenes Enterobaktin, eine Siderophore vom Catecholat-Typ (Neilands, 1995), unter anderem durch den in der äußeren Membran lokalisierten Rezeptor FepA erkannt (Hantke, 1990) und anschließend über einen TonB/ExbB/ExbD abhängigen Transport in das Periplasma gebracht, der durch das elektrochemische Potential der Zytoplasmamembran energetisiert wird (Andrews *et al.*, 2003). Im periplasmatischen Raum wird der Ferri-Siderophor-Komplex vom spezifischen Bindeprotein FepB gebunden (Stephens *et al.*, 1995) und zum ABC-Transporter geleitet, der sich aus den beiden Permeasen FepD und FepG, sowie zwei ATP-hydrolysierenden FepC-Untereinheiten zusammensetzt, die den Transport in das Zytoplasma katalysieren (Shea und McIntosh, 1991, Andrews *et al.*, 2003). Hier hydrolysiert das Fes Protein die Esterbindung des Ferri-Enterobaktin-Komplexes, wodurch Dihydroxyl-benzoyl-Serin entsteht und das dreiwertige Kation leichter freigesetzt werden kann (Brickman und McIntosh, 1992). Nach anschließender Reduktion werden die zweiwertigen Eisenionen entweder direkt in den Stoffwechsel eingeschleußt oder reoxidiert und als dreiwertige Ionen in Proteinen, wie beispielweise dem Ferritin gespeichert (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999).

Obwohl der domestizierte Laborstamm K12 des kommensalen Darmbakteriums *E. coli* lediglich Enterobaktin synthetisiert, weist K12 eine Vielzahl spezifischer Rezeptoren für unterschiedliche Siderophoren anderer Mikroorganismen (Xeno-Siderophore) auf, die dann zum Teil von einem einzigen ABC-Transporter in das Zytoplasma gebracht werden (Andrews *et al.*, 2003). Dazu gehört unter anderem pilzliches Ferrichrom, das zur Hydroxamat-Gruppe der Siderophoren gehört und unter Eisenmangel von z. B. *Ustilago maydis* gebildet wird (Wang *et al.*, 1989). Außerdem konnte eine Aufnahme von Fe(III)-Citrat-Komplexen durch den FecA-vermittelten FecCDE-Transporter nachgewiesen werden (Hussein *et al.*, 1981, Andrews *et al.*, 2003).

Im Gegensatz dazu sind pathogene *E. coli* Stämme in der Lage, weitere Siderophoren zu synthetisieren, um so mit den Wirtszellen in Konkurrenz um die rar vorhandenen Eisenionen zu treten und damit eigentlich sterile Kompartimente des Wirtes wie die Blase zu besiedeln. Beispielsweise wird von uropathogenen *E. coli* Stämmen (UPEC) Salmochelin gebildet, das

als C-glykosyliertes Enterobaktinderivat nicht von wirtproduziertem Lipocalin-2 im Zuge des Abwehrmechanismus erkannt und sequestriert, sondern als Ferri-Siderophor-Komplex über den spezifischen Rezeptor IroN zurück in die bakterielle Zelle transportiert wird (Hantke *et al.*, 2003, Fischbach *et al.*, 2006).

Darüber hinaus weisen manche pathogene *E. coli* Sämme ebenfalls die Fähigkeit auf, Häm als Eisenquelle zu nutzen. Bei Häm handelt es sich um ein Eisen-Protoporphyrin IX Molekül, das als prosthetische Gruppe unter anderem in Hämoglobin oder Albumin vorkommt. In enteropathogenen *E. coli* Stämmen (EPEC) wurde nachgewiesen, dass die sekretierte Serin-Protease EspC Hämoglobin abbaut und die prosthetische Gruppe binden kann, was zur weiteren Häm-Verwertung beitragen könnte (Drago-Serrano *et al.*, 2006). In uropathogenen *E. coli* Stämmen (UPEC) ähnelt das Häm-Transportsystem dem für Ferri-Siderophoren, wobei als Häm spezifischer Rezeptor ChuA identifiziert wurde, der TonB/ExbB/ExbD abhängig fungiert (Torres und Payne, 1997, Torres *et al.*, 2001). Die Verwertung von Häm als Eisenquelle nach dem Transport über die innere Membran durch den ABC-Transporter ChuTUV ist bislang jedoch noch ungeklärt.

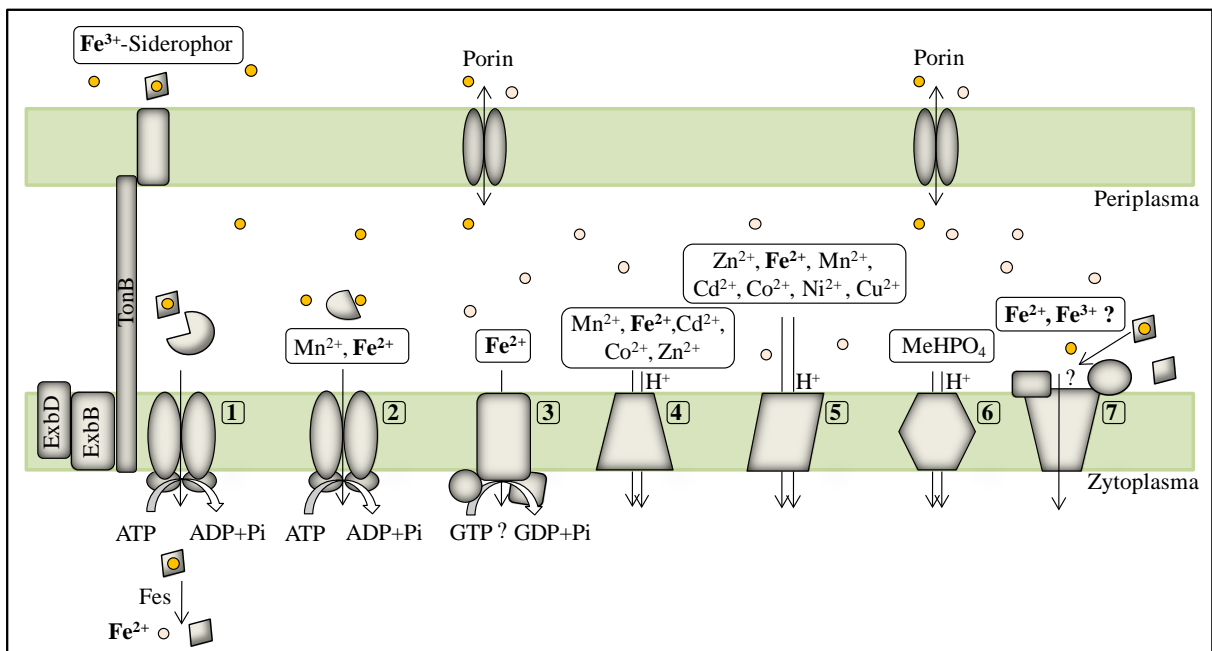


Abb. 1: Bekannte Eisenaufnahmemechanismen des Gram-negativen Bakteriums *E. coli*.

Eisen kann von *E. coli* als drei- und zweiwertiges Kation über Transporter verschiedener Proteinfamilien aufgenommen werden. Dabei erfolgt die Aufnahme von Ferri-Siderophor-Komplexen durch Rezeptor-gestützte ABC-Transporter (1), während der ABC-Transporter SitABCD ohne Rezeptorvermittlung divalente Mangan- und Eisenionen aus dem periplasmatischen Raum in das Zellinnere leitet (2) (Payne und Mey, 2010). Desweiteren wird die Aufnahme divalenter Eisenionen sowohl von dem spezifischen FeoABC-System katalysiert (3) (Kammler *et al.*, 1993), als auch von unspezifischen Transportern ermöglicht. Dazu zählen der NRAMP-Vertreter MntH, der neben Mangan- auch Eisen-, Cadmium-, Kobalt- und Zinkionen transportiert (4) (Makui *et al.*, 2000), sowie ZupT, das zur ZIP-Familie gehört und ein sehr breites Substratspektrum aufweist (5) (Grass *et al.*, 2005). Weiterhin gelangen Eisenionen wahrscheinlich auch als Metall-Phosphat-Komplexe durch den PitA-Transporter in das Zytoplasma (6) (Taudte, 2010). Die Permease EfeU gehört zur OFeT Proteinfamilie innerhalb der ILT-Superfamilie und ist Bestandteil des Eisenaufnahmesystems EfeUOB (7) (Grosse *et al.*, 2006, Cao *et al.*, 2007). Hier ist noch nicht geklärt, ob zwei- oder dreiwertige Eisenionen transportiert werden.

ABC-Transporter ohne Rezeptorvermittlung können nicht-chelatierte Metallionen, die über Porine in der äußeren Membran in den periplasmatischen Raum gelangen, ebenfalls in das Zytoplasma transportieren. Unter anderem besitzen UPEC-Stämme das SitABCD-System (Payne und Mey, 2010), das zuerst in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium identifiziert wurde und aus dem periplasmatischen Bindeprotein SitA, den beiden Permeasen SitC und SitD, sowie den ATP-hydrolysierenden SitB-Untereinheiten besteht (Zhou *et al.*, 1999). Das Sit-System transportiert divalente Mangan- und Eisenionen (Kehres *et al.*, 2002), was bezüglich der Eisenionen auch für das verwandte Sit-System aus *Shigella flexneri* nachgewiesen wurde (Fisher *et al.*, 2009).

Das Aufnahmesystem für zweiwertige Eisenionen Feo (*Ferrous iron*) ist in allen *E. coli* Stämmen zu finden und setzt sich aus den zwei zytoplasmatischen Proteinen FeoA und FeoC, sowie dem Membranprotein FeoB zusammen. FeoB bindet und hydrolysiert über seine N-terminale Domäne GTP, was für den Fe²⁺-Transport essentiell aber vermutlich nicht ausreichend ist (Marlovits *et al.*, 2002, Hantke, 2003). Zusätzlich wurde eine GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*) ähnliche Domäne in FeoB beschrieben, was einen G-Protein gekoppelten Zyklus vermuten lässt (Eng *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus von FeoB, als auch die Funktion der beiden löslichen Proteine sind jedoch noch nicht bekannt.

MntH (*Manganese transporter H-dependent*) gehört zur Familie der NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) Transporter, die unter anderem an der Pathogenabwehr von Eukaryoten beteiligt sind (Cellier *et al.*, 1995). In *E. coli* fungiert MntH als Protonen-Symporter, der vorwiegend divalente Mangan- aber auch Eisen-, Cadmium-, Kobalt und Zinkionen über die innere Membran transportiert (Kehres *et al.*, 2000, Makui *et al.*, 2000, Chaloupka *et al.*, 2005, Courville *et al.*, 2008).

Während in *Arabidopsis thaliana* das Membranprotein IRT1 (*Iron Regulated Transporter*), ein Vertreter der ZIP (*ZRT, IRT-like Protein*) Familie, als Eisenaufnahmesystem in den Wurzelzellen charakterisiert wurde (Eide *et al.*, 1996, Grotz *et al.*, 1998, Vert *et al.*, 2002), weist als weiteres Mitglied dieser Familie ZupT (*Zinc uptake Transporter*) aus *E. coli* ein äußerst breites Substratspektrum auf. So werden Eisenionen durch diese Permease eher unspezifisch neben hauptsächlich Zink- aber auch Cadmium-, Cobalt-, Mangan und vermutlich auch Kupfer- und Nickelionen über die Zytoplasmamembran transportiert (Grass *et al.*, 2005, Taudte, 2010). Angetrieben wird der Transport höchstwahrscheinlich durch das Membranpotential (Taudte und Grass, 2010, Lin *et al.*, 2010).

Unspezifisch können Metallionen auch über das gering-affine Phosphataufnahmesystem PitA in das Zytoplasma gelangen (Rosenberg *et al.*, 1977, van Veen *et al.*, 1994). Dabei werden

diese als Metall-Phosphat-Komplexe im Symport mit Protonen transportiert, was vermutlich auch für Eisenionen zutrifft (Taudte, 2010).

Obwohl *E. coli* zahlreiche Eisenaufnahmesysteme besitzt, wäre ein Überschuss an divalenten Eisenionen im Zytoplasma toxisch, da diese als Katalysator der Fenton Reaktion fungieren und somit die Erzeugung reaktiver Hydroxylradikale fördern würden (Haber und Weiss, 1932), welche unter anderem die DNA schädigen können (Imlay *et al.*, 1988). Aus diesem Grund wird die Eisen-Homöostase von *E. coli* streng kontrolliert, wobei der globale Eisenregulator Fur (*Ferric-uptake regulator*) eine zentrale Rolle übernimmt und in Gegenwart von Eisenüberschuss die Expression zahlreicher Gene reprimiert, die unter anderem für Eisenaufnahmesysteme und Siderophoren kodieren (Bagg und Neilands, 1987, Andrews *et al.*, 2003). Dabei bindet Fur als Homodimer mit Fe^{2+} als Kofaktor an eine sogenannte Fur-Box, die als palindromische Sequenz innerhalb von Promotoren liegt und verhindert so deren Gentranskription (Escolar *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann der Fur-Regulator indirekt ebenso als Aktivator fungieren, indem er in der eisengebundenen Form die Expression der kleinen, nichttranslatierten RNA RyhB unterdrückt (Masse und Gottesman, 2002) Diese würde als antisense RNA mit Hilfe des Chaperons Hfq beispielsweise an die mRNA des Eisenspeicherproteins Ferritin binden und somit dessen Abbau bewirken. Über die RyhB-Repression durch den Fe^{2+} -Fur-Regulator werden jedoch eisenhaltige Proteine synthetisiert, die damit auch zur Erhaltung einer physiologischen Eisenkonzentration innerhalb der Zelle beitragen (Masse *et al.*, 2005).

Die Genexpression für Eisenaufnahmesysteme kann auch durch die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff beeinflusst werden, wodurch bei neutralem pH-Wert Eisen entweder vorrangig als trivalentes oder divalentes Kation vorliegt und die dafür spezifischen Transporter in Abhängigkeit davon synthetisiert werden. So konnte nachgewiesen werden, dass die *feoABC*-Expression in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen anstieg und durch den globalen Transkriptionsfaktor Fnr (*Fumarate nitrate reduction*) reguliert wird (Kammler *et al.*, 1993). Dieser induziert beispielsweise unter anaeroben Bedingungen Gene, deren Produkte an der Fermentation oder der anaeroben Atmung beteiligt sind (Guest, 1995). Dabei nimmt er Sauerstoff direkt über Eisen-Schwefel-Cluster wahr, die für dessen Aktivität essentiell sind und in Gegenwart von Sauerstoff zerfallen (Green *et al.*, 1991, Jordan *et al.*, 1997, Achebach *et al.*, 2005). Das aktive Fnr-Homodimer geht dann in beide inaktive Protomere über, die keine DNA-Affinität mehr aufweisen (Lazizzera *et al.*, 1996).

1.3 Das EfeUOB-Eisenaufnahmesystem von *E. coli*

Auch für das Eisenaufnahmesystem EfeUOB konnte neben einer für abhängigen Regulation (McHugh *et al.*, 2003, Grosse *et al.*, 2006) gezeigt werden, dass dessen Genexpression bei alkalischem pH-Wert reprimiert und bei saurem pH-Wert (Maurer *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2007), bei dem zweiwertige Eisenionen aerob stabil vorliegen, induziert wird. Eisen wird dann über EfeUOB in Gegenwart von Sauerstoff spezifisch aufgenommen. Die Repression unter alkalischen Bedingungen erfolgt über das Zweikomponenten-System CpxAR (Cao *et al.*, 2007), das sich aus der signalspezifischen Sensor-Kinase CpxA (Albin *et al.*, 1986) und dem *Response*-Regulatorprotein CpxR zusammensetzt (Dong *et al.*, 1993). Dieses Signaltransduktionssystem gehört zum extrazytoplasmatischen Stressregulon und ist an der Antwort auf Änderungen des pH Wertes, der Osmolarität, von Metallen oder falschgefalteten Proteinen beteiligt (Raivio und Silhavy, 2001, Keller und Hunke, 2009).

Während *efeU* (*elemental ferrous iron Uptake*) als Bestandteil des tricistronischen Operons *efeUOB* in *E. coli* K12 eine *frame-shift*-Mutation aufweist und somit nicht funktionell ist, besitzen einige pathogene *E. coli* Stämme und der probiotische *E. coli* Stamm Nissle 1917 ein intaktes *efeU*-Gen, das für die Eisenaufnahmepemrase kodiert (Grosse *et al.*, 2006).

Hierbei handelt es sich um ein Protein, das 24% identische Aminosäuresequenz zu dem hoch-affinen Eisentransporter Ftr1p (*Ferric transporter*) aus *Saccharomyces cerevisiae* aufweist (Stearman *et al.*, 1996, McHugh *et al.*, 2003). Die Aufnahme der trivalenten Eisenionen durch Ftr1p ist sehr komplex, da die kaum löslichen Ionen zunächst durch eine flavin- und hämhaltige, NADPH-abhängige Membranreduktase wie beispielsweise Fre1p zu divalenten Ionen reduziert werden (Dancis *et al.*, 1990, Schröder *et al.*, 2003). Unmittelbar danach erfolgt durch die sauerstoffabhängige Multi-Kupfer-Oxidase (MCO) Fet3p eine erneute Oxidation der Ionen (Hassett *et al.*, 1998), die erst dann durch Ftr1p in das Zellinnere transportiert werden (Stearman *et al.*, 1996). Unter Eisenlimitation ist der Reoxidationsschritt vermutlich auf einen kinetischen Vorteil zurückzuführen und dient der Substratspezifität (Kosman, 2003).

Zu Ftr1p verwandte Proteine, die in Pilzen und niederen Eukaryoten aber auch wie das EfeU-Protein in Bakterien zu finden sind, gehören innerhalb der ILT (*Iron/Lead Transporter*, TC.9.A.10) Superfamilie zur OFeT (*Oxidase dependent Fe(II) Transporter*, TC.9.A.10.1) Familie (Grosse *et al.*, 2006, Saier *et al.*, 2006, Debut *et al.*, 2006). Deren Mitglieder weisen zwei sogenannte REXXE-Motive auf, die für die Eisenaufnahme durch Ftr1p in Hefe essentiell sind (Severance *et al.*, 2004). Mittels *in silico* und *in vivo* Analysen konnten für das Membranprotein EfeU sieben transmembrane Helices bestimmt werden, wobei die beiden

REGLE-Motive in dem ersten und vierten Membrandurchgang lokalisiert sind und die einzigen negativ geladenen Aminosäurereste in den hydrophoben Helices darstellen (Grosse *et al.*, 2006), (Abb. 2).

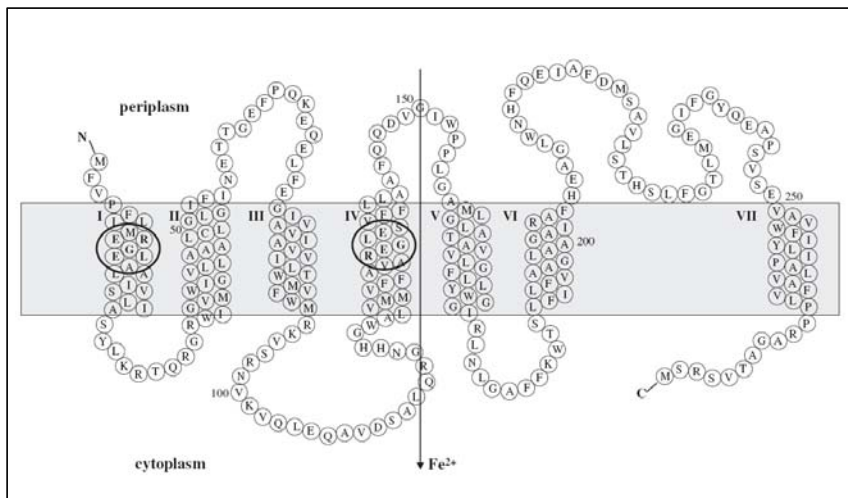


Abb. 2: Topologie-Modell von EfeU aus *E. coli* Nissle 1917.

Dargestellt sind die Aminosäurereste mit Positionsangaben und wahrscheinliche Positionen transmembranärer Helices, gekennzeichnet von I – VII. Durch die Kreise sind die REGLE-Motive gekennzeichnet, die für die Mitglieder der OFeT-Proteinfamilie charakteristisch sind. Die Abbildung ist aus Grosse *et al.* (2006) entnommen.

Wie für Ftr1p in Hefe konnte von Grosse *et al.* (2006) gezeigt werden, dass beide REGLE Motive für die *in vivo* Eisenaufnahme durch EfeU essentiell sind, da für die *E. coli* Deletionsstämme GR536 ($\Delta fecABCDE::kan$, $\Delta zupT::cat$, $\Delta mntH$, $\Delta feoABC$, $\Delta entC$), welche die gezielt-mutierten *efeU*-Gene *in trans* exprimierten, kein verbessertes Wachstum unter Eisenmangel zu beobachten war.

Aufgrund der Ftr1p-Homologie von EfeU wurde zunächst angenommen, dass das Operon *efeUOB* ein Eisenaufnahmesystem kodiert, das dem Ftr1p/Fet3p-System aus der Hefe ähnelt, indem die Permease EfeU mit einer periplasmatischen Eisenoxidase oder –reduktase zusammenarbeitet (McHugh *et al.*, 2003). Es handelt sich jedoch bei Efe um ein neuartiges Eisenaufnahmesystem (Grosse *et al.*, 2006, Cao *et al.*, 2007), da alle drei Efe-Proteine für die Funktion notwendig sind (Cao *et al.*, 2007) und es sich weder bei EfeO noch bei EfeB um eine Multi-Kupfer-Oxidase wie Fet3p mit den Typ 1–3 Kupferzentren handelt (Solomon *et al.*, 1996, Grosse *et al.*, 2006).

Sturm *et al.* (2006) beschrieben das periplasmatische EfeB-Protein als erstes Tat (*Twin-arginine translocation*) Substrat, das als dimeres Protein ein *b*-Typ Häm aufwies, welches nicht kovalent gebunden war. *In vitro* konnte eine Peroxidaseaktivität von EfeB unter sauren Bedingungen nachgewiesen werden (Sturm *et al.*, 2006), was vermuten ließ, dass das Protein ähnlich wie Fet3p als Ferroxidase fungiert (Cao *et al.*, 2007).

EfeO ist ebenfalls im Periplasma lokalisiert, wird jedoch nicht Tat-abhängig transportiert (Sturm *et al.*, 2006). *In silico* Analysen offenbarten eine C-terminale Peptidase-M75 Domäne mit einem konservierten HxxE-Motiv, das möglicherweise als Metall-Bindestelle fungiert

(Rajasekaran *et al.*, 2009). Diese Domäne wird über einen flexiblen Linker mit der N-terminalen Cupredoxin-ähnlichen Dömäne verbunden, für die eine Cu^{2+} - und eine Fe^{3+} -Bindestelle vorhergesagt wurden. Cupredoxine (IPR008972) sind kupferhaltige, eindomänige, Elektronentransferproteine, die eine *Greek key* β -barrel Topologie aufweisen (Rajasekaran *et al.*, 2009). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Modell aufgestellt (Abb. 3), in dem divalente Eisenionen im Periplasma zunächst über die Peptidase-M75 Domäne von EfeO gebunden und oxidiert werden. Die trivalenten Eisenionen werden dann über den flexiblen Linker auf die Cupredoxin-ähnliche Dömäne übertragen und anschließend zur EfeU-Permease gebracht, die diese in das Zytoplasma transportiert. Die bei der Oxidation anfallenden Elektronen könnten über die Cu^{2+} -Bindestelle der Cupredoxin-ähnlichen Dömäne und dem peroxidaseaktiven EfeB-Protein auf einen Elektronenakzeptor übergeben werden (Rajasekaran *et al.*, 2009).

Parallel dazu konnte jedoch auch gezeigt werden, dass EfeB im Periplasma eine Eisenextraktion aus exogenen Häm über einen noch unbekanntem Mechanismus ermöglicht (Letoffe *et al.*, 2009). Dabei bleibt der Tetrapyrrolium des Häms intakt. Das Eisenion könnte dann ohne Häm möglicherweise durch das EfeU-Protein über die innere Membran transportiert werden (Abb. 3). Um die Funktion der einzelnen EfeUOB-Proteine und deren Zusammenspiel genau zu verstehen, bedarf es jedoch weiterführender Studien.

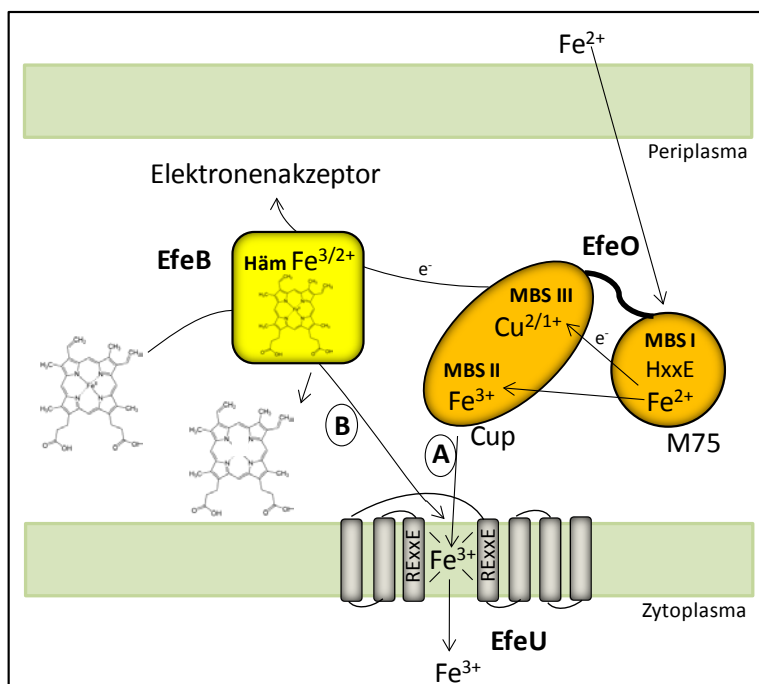


Abb. 3: Modell der Eisenaufnahme über das EfeUOB-System.

Im aktuellen Modell werden im Periplasma divalente Eisenionen über die Peptidase-M75 Domäne von EfeO in der Metallbindestelle (MBS) I gebunden und oxidiert. Anschließend erfolgt der Transfer der trivalenten Eisenionen über die Cupredoxin-ähnliche Domäne (EfeO-Cup) zur EfeU-Permease, die die Kationen über die Zytoplasmamembran transportiert (A). Die bei der Oxidation freigegebenen Elektronen könnten über die MBS III in EfeO-Cup und die Hämgruppe von EfeB auf einen noch unbekanntem Elektronenakzeptor übertragen werden.

Ausserdem ist EfeB in der Lage, aus exogenen Häm Eisen zu extrahieren, dass möglicherweise durch EfeU ebenfalls in das Zytoplasma aufgenommen werden kann (B).

1.4 Vorkenntnisse über FetMP und Ziele der Arbeit

Die meisten pathogenen Mikroorganismen sind davon abhängig, ausreichend Eisen vom Wirtsorganismus aufzunehmen. In einigen pathogenen *E. coli* Stämmen, aber auch vielen anderen Bakterien wurde *in silico* ein zweites Mitglied der ILT-Familie identifiziert (Saier *et al.*, 2006, Debut *et al.*, 2006, Grass, 2007), das jedoch mit dem Pb^{2+} -Aufnahmeprotein PbrT aus *Cupriavidus metallidurans* Stamm CH34 verwandt ist (TC.9.A.10.2.1) und somit zur gleichnamigen PbrT (*Lead (Pb²⁺) Uptake Porter*, TC.9.A.10.2) Familie gehört (Borremans *et al.*, 2001). Das entsprechende Gen *fetM* (*ferrous transport, membrane protein*) (EcF11_1995, ZP_03035145) aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm F11 (genomische Sequenz NZ_AAJU02000030) ist im Vergleich zu *efeU* nicht Teil eines tri-, sondern dicistronischen Operons und weist einen viel längeren offenen Leserahmen auf (Abb. 4).

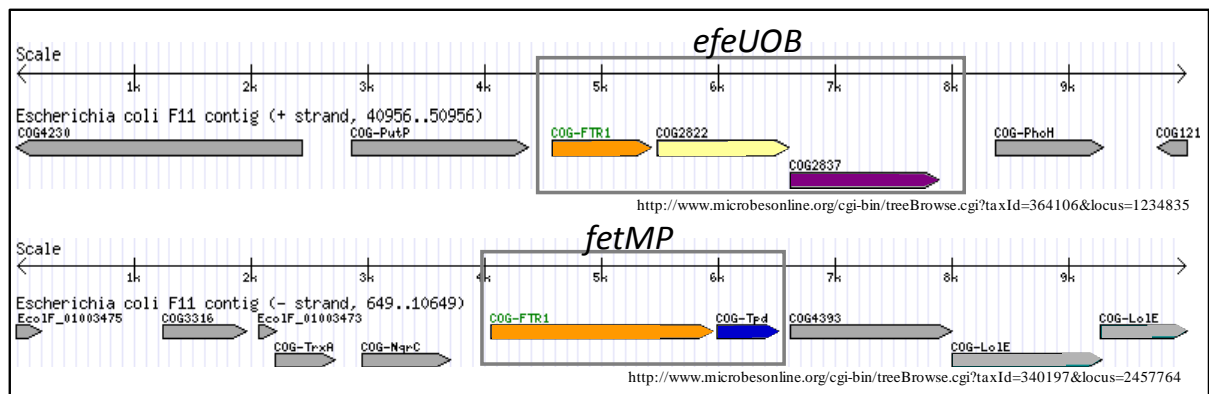


Abb. 4: Anordnung der beiden Operone *efeUOB* und *fetMP* aus *E. coli* F11.

Physikalische Kartierung beider Operone (<http://www.microbesonline.org>), wobei die Pfeile die jeweiligen Gene mit entsprechender Transkriptionsrichtung darstellen. Die Pfeilgrößen korrelieren dabei mit der Basenpaaranzahl der Gene.

Während das EfeU-Protein mit seinen 276 Aminosäuren zwei REGLE-Motive in der ersten und vierten von insgesamt sieben transmembranen Helices besitzt, wurden für das aus 648 Aminosäuren bestehende Protein FetM acht Transmembrandurchgänge vorhergesagt, wobei drei REXXE Motive jeweils in der zweiten, vierten und fünften α -Helix lokalisiert sind (Abb. 26, Seite 86). Auffällig dabei erscheint die riesige N-terminale Domäne mit 362 Aminosäuren zwischen dem ersten und zweiten Membrandurchgang, die wahrscheinlich im Periplasma liegt. Unbekannt ist, ob die erste α -Helix tatsächlich als Membrananker vorliegt oder diese als Signalsequenz abgespalten wird. Eine 29%ige Sequenzidentität zwischen EfeU und der FetM-Aminosäuresequenz ohne periplasmatischen Domäne lassen vermuten, dass FetM ebenfalls als Eisen-Permease fungiert und mit einem periplasmatischen

Protein fusioniert vorliegt, dass möglicherweise als Chaperon die Metallionen zuerst binden könnte.

Das stromabwärts von *fetM* liegende Gen *fetP* (*ferrous transport, periplasmic protein*) (EcF11_1994, ZP_03035154) kodiert ein putatives Periplasmaprotein, das wahrscheinlich am hochaffinen Fe²⁺-Transport beteiligt ist aber keine Verwandtschaft zu EfeO oder EfeB aufweist. Jedoch konnte für das zu FetP homologe Protein P19 aus *Campylobacter jejuni* bereits gezeigt werden, dass dieses für das Wachstum unter eisenlimitierenden Bedingungen äußerst wichtig ist und als Homodimer neben Eisen- auch Kupferionen binden kann (Chan *et al.*, 2010). Das entsprechende Gen liegt innerhalb eines dicistronischen Operons, welches Fur-abhängig reguliert wird (Palyada *et al.*, 2004, Chan *et al.*, 2010). Interessanterweise kodiert das benachbarte Gen das Membranprotein cFtr1 (TC.9.A.10.2.4), was ebenfalls zur PbrT-Familie gehört und möglicherweise als Eisentransporter fungiert. Ein weiteres FetP orthologes Protein ist ChpA (*Copper handling protein*) aus dem marinen, magnetotaktischen Bakterienstamm MV-1, das an der Biosynthese von Magnetosomen beteiligt ist und nach Reinigung aus dem Periplasma ein Kupferion pro Homodimer bindet (Dubbels *et al.*, 2004). Aufgrund von zwei putativen Genen stromaufwärts von *chpA*, die eine Ftr1p-ähnliche Eisenpermease und ein Ferredoxin-ähnliches Protein kodieren, vermuteten die Autoren ein Aufnahmesystem für Eisen analog zum System aus der Hefe. Das Membranlipoprotein Tp34 aus *Treponema pallidum* (Swancutt *et al.*, 1989) weist ebenfalls Homologien zu FetP auf. Deka *et al.* (2006) zeigten, dass das nichtacylierte, rekombinante Protein metallabhängig dimerisiert und zwei Metallbindestellen im interfacialen Bereich von Zinkionen besetzt werden. Darüber hinaus besitzt Tp34 die Eigenschaft, humanes Laktoferrin zu binden.

Obwohl bislang schon eine große Vielzahl verschiedenster Aufnahmesysteme für das Biometall Eisen identifiziert wurde, ist davon auszugehen, dass selbst in so gut untersuchten Organismen wie *E. coli*, noch Überraschungen zu erwarten sind.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die physiologische Funktion von FetMP aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm F11 zu untersuchen. Dazu war es notwendig, die jeweiligen Gene mittels Mini-Transposon in das Genom des nicht pathogenen *E. coli* Stammes W3110 (K12-Derivat) zu integrieren, der das entsprechende Operon nicht besitzt. Weiterhin war eine biochemische Charakterisierung von FetP von großem Interesse, die durch strukturelle Daten von der kooperierenden AG Michael Murphy (Vancouver, Kanada) komplementiert werden sollte. Dabei stand die mögliche Metallbinde-eigenschaft von FetP im Vordergrund. Die Frage einer möglichen Interaktion zwischen dem löslichen Periplasmaprotein und der riesigen periplasmatischen Domäne von FetM sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

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)
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac</i> [F', <i>proAB, lacIqZΔM15, Tn10 (tet^R)</i>]	(Bullock, 1987), Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21	pLysS	F <i>dcm, omp, hsdS, (r_B⁻ m_B⁻), lon⁻, galλ, DE3, (pLysS, cm^R), Überexpressionsstamm für Strep-tagII[®]-System</i>	Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21	plasmidfrei	F <i>dcm, omp, hsdS, (r_B⁻ m_B⁻), lon⁻, galλ, DE3, Überexpressionsstamm</i>	diese Arbeit
EC100D TM <i>pir-116</i>	plasmidfrei	F <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG pir-116(DHFR)</i>	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
F11	plasmidfrei	extra-intestinal pathogener <i>E. coli</i> (ExPEC), <i>fetMP⁺</i>	(Stapleton <i>et al.</i> , 1991)
H1717	plasmidfrei	<i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR ΔaroB, fhuF::λplacMu53</i>	(Hantke, 1987)
ECA150	plasmidfrei	<i>ΔlacZYA</i>	Stammsammlung, AG Nies
ECA458	plasmidfrei	<i>ΔentC ΔfecA-E ΔfeoABC ΔmntH ΔzupT</i>	(Taudte und Grass, 2010)
ECA611	plasmidfrei	<i>ΔentC ΔfecA-E ΔfeoABC ΔmntH ΔzupT glmS-aacC1, gm^R</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1:

ECA612	plasmidfrei	$\Delta entC \Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT glmS-fetMP-aacC1, gm^R$	diese Arbeit
ECA613	plasmidfrei	$\Delta entC \Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT glmS-fetM-aacC1, gm^R$	diese Arbeit
ECA614	plasmidfrei	$\Delta entC \Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT glmS-fetP-aacC1, gm^R$	diese Arbeit
ECA615	plasmidfrei	$\Delta lacZYA glmS-fetMp-lacZ-aacC1, gm^R$	diese Arbeit
	pTNS1	Helferplasmid, T7 Transposase Expressionsvektor, amp^R	(Choi und Schweizer, 2006)
	pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm	Mobilisierbares pUC18 Suizid-Derivat, ColE1 durch R6K Replikationsursprung ersetzt, Mini-Tn7 Element, gm^R	(Choi und Schweizer, 2006)
	pUC18-mini-Tn7T-Gm-lacZ	Mobilisierbares pUC18 Suizid-Derivat, ColE1 durch R6K Replikationsursprung ersetzt, Mini-Tn7 Element, <i>lacZ</i> Transkriptions-Fusion, gm^R	(Choi und Schweizer, 2006)
ECA621	pECD1102	<i>fetMP</i> als <i>XhoI/SpeI</i> Fragment mit Promotor-Region in pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm kloniert, gm^R	diese Arbeit
ECA622	pECD1103	<i>fetM</i> als <i>ApaI/PstI</i> Fragment mit Promotor-Region in pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm kloniert, gm^R	diese Arbeit
ECA623	pECD1104	<i>fetP</i> als <i>NcoI</i> Fragment mit <i>fetM</i> -Promotor-Region in pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm kloniert, gm^R	diese Arbeit
ECA624	pECD1105	<i>fetM</i> -Promotor-Region als <i>ApaI/PstI</i> Fragment in pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm kloniert, gm^R	diese Arbeit
ECA625	pECD1106	pECD1105 Derivat mit <i>lacZ</i> als <i>KpnI</i> Fragment kloniert, gm^R	diese Arbeit
	pGEM [®] -T Easy	<i>lacPOZ</i> zur Klonierung von PCR-Produkten; amp^R	Promega, Madison, Wi-USA
ECA381	pECD967	<i>fhuF</i> -Promotor kloniert in pGEM [®] -T Easy, amp^R	(Koch <i>et al.</i> , 2007)

Fortsetzung Tab. 1:

ECA616	pECD1097	<i>fetM</i> -Promotor kloniert in pGEM [®] -T Easy, amp ^R	diese Arbeit
	pASK-IBA3	Expressionsvektor mit C-terminalen <i>Strep</i> -tag [®] II, amp ^R	IBA-GmbH, Göttingen
ECA617	pECD1098	<i>fetM</i> als <i>EcoRI/PstI</i> Fragment ohne Promotor-Region kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA3 Derivat (C-terminaler <i>Strep</i> -tag [®] II) amp ^R	diese Arbeit
ECA618	pECD1099	<i>fetP</i> als <i>EcoRI/PstI</i> Fragment ohne Promotor-Region kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA3 Derivat (C-terminaler <i>Strep</i> -tag [®] II) amp ^R	diese Arbeit
ECA619	pECD1100	<i>fetMP</i> als <i>EcoRI/PstI</i> Fragment ohne Promotor-Region kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA3 Derivat (C-term. <i>Strep</i> -tag [®] II) amp ^R	diese Arbeit
	pASK-IBA6	Expressionsvektor mit N-term. <i>ompA</i> -Signalsequenz, <i>Strep</i> -tag [®] II und Xa-Erkennungssequenz, amp ^R	IBA-GmbH, Göttingen
ECA670	pECD1138	<i>fetM</i> , N-Terminus kodierender Teil (73-1160) als <i>BsaI</i> Fragment ohne Promotor-Region, ohne Signalsequenz kloniert hinter tet Promotor, pASK-IBA6 Derivat (N-term. <i>ompA</i> Signalsequenz, <i>Strep</i> -tag [®] II und Xa-Erkennungssequenz), amp ^R	diese Arbeit
	pET22b(+)	Expressionsvektor mit N-term. <i>pelB</i> -Signalsequenz und C-term. <i>His</i> -tag [®] , amp ^R	Novagen, Darmstadt
ECA620	pECD1101	<i>fetP</i> als <i>NcoI/XhoI</i> Fragment ohne Promotor-Region, ohne Signalsequenz, mit C-term. Thrombin-Erkennungssequenz kloniert hinter T7 Promotor, pET22b(+) Derivat (N-term. <i>pelB</i> Signalsequenz, C-term. <i>His</i> -tag [®]), amp ^R	diese Arbeit
ECA660	pECD1128	pECD1101 Derivat mit FetP E _{46Q} , amp ^R	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1:

ECA661	pECD1129	pECD1101 Derivat mit FetP M ₉₀ I, amp ^R	diese Arbeit
ECA662	pECD1130	pECD1101 Derivat mit FetP H ₁₂₇ A, amp ^R	diese Arbeit
ECA663	pECD1131	pECD1101 Derivat mit FetP M ₃₆ I, amp ^R	diese Arbeit
ECA664	pECD1132	pECD1101 Derivat mit FetP M ₃₉ I, amp ^R	diese Arbeit
ECA665	pECD1133	pECD1101 Derivat mit FetP M _{88/90} I, amp ^R	diese Arbeit
ECA666	pECD1134	pECD1101 Derivat mit FetP D ₉₄ N, amp ^R	diese Arbeit
ECA667	pECD1135	pECD1101 Derivat mit FetP M ₂₉ I, amp ^R	diese Arbeit
ECA668	pECD1136	pECD1101 Derivat mit FetP H ₁₂₅ R, amp ^R	diese Arbeit
ECA669	pECD1137	pECD1101 Derivat mit FetP M ₃₄ I, amp ^R	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 H₂O_{bidest.}

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

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

35 g ad 1 l H₂O_{bidest.}

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

C) MacConkey Agar, (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

50 g ad 1 l H₂O_{bidest.}

Dieses Festmedium wurde für den Fur-Titrationsassay (FURTA) verwendet.

D) 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 H₂O_{bidest.}

SOB-Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* zur Gewinnung elektrokompetenter Zellen eingesetzt. Nach der Elektroporation wurde zu den Zellen SOC-Medium, das sich aus SOB-Medium, 5 µl/ml 1 M MgSO₄ und 20 µl/ml 1 M Glukose zusammensetzt, hinzugegeben.

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

0.1 g ZnSO₄ x 7 H₂O

0.03 g MnCl₂ x 4 H₂O

0.3 g H₃BO₃

0.2 g CoCl₂ x 6 H₂O

0.01 g CuCl₂ x 2 H₂O

0.188 g NiCl₂ x 6 H₂O

0.03 g Na₂Mo₄ x 2 H₂O

ad 1 l H₂O_{bidest.}

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

Komponente A (20-fach):

800 ml H₂O_{bidest.}

121.1 g Tris-HCl

HCl ad pH 7.0

danach Zugabe von:

93.6 g NaCl

29.8 g KCl

21.4 g NH₄Cl

4.0 g MgCl₂ x 6 H₂O

0.60 g CaCl₂ x 2 H₂O

0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat

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

ad 1 l H₂O_{bidest.}

Komponente B (20-fach):

900 ml H₂O_{bidest.}

19.5 g Na₂SO₄ x 10 H₂O

4.6 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

ad 1 l H₂O_{bidest.}

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 Casaminosäurehydrolysat und 20 g/l Glycerin für areobe Kultivierung zugesetzt und autoklaviert. Für anaerobe Anzucht wurde dem Medium nach dem Autoklavieren steril filtrierte Glukose in der Endkonzentration von 20 g/l als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Zur Herstellung von Tris-gepufferten Minimalmedium ohne Eisen wurde Komponente A ohne Eisen-Ammonium-Citrat verwendet.

Für die Herstellung von Minimalmedium ohne Eisen unterschiedlicher pH Werte (5 bis 9) wurden Komponenten A ohne Eisen-Ammonium-Citrat mit zusätzlich 195.2 g/l MES verwendet, welche zuvor mit NaOH bzw. HCl auf den entsprechenden pH Wert eingestellt wurden.

F) Medienzusätze

Schwermetallsalze

Die Schwermetallsalze $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$ und $MnCl_2$ lagen als 1 M wässrige Stammlösungen vor. $FeSO_4$ wurde in Anwesenheit von Ascorbat (beides immer frisch hergestellt) zugegeben, dabei lag $FeSO_4$ als 100 mM wässrige Stammlösungen vor und Ascorbat in einer 1 M Stammlösung. $AgCl$ lag als 1 M wässrige Stammlösung vor und wurde Licht abgeschirmt gelagert.

Für Isothermische Titrationskalorimetrie (2.8.9.6) wurden die Stammlösungen mit hochreinem Wasser (ROTISOLV® LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) hergestellt und die Konzentration mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (2.8.9.4) verifiziert.

Chelatoren

Als Fe^{2+} -Chelatoren wurden 2,2'-Dipyridyl (DIP) und trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (CDTA) verwendet. Dabei wurde DIP in 96%-Ethanol und CDTA in leicht basischem H_2O_{bidest} gelöst. Die Stammlösungen (0.1 M DIP, 1 mM CDTA) wurden im sterilen Medium auf die beschriebene Endkonzentration verdünnt.

Antibiotika

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

Tab. 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen im Medium

Antibiotika/Mediumzusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml H ₂ O <i>bideest.</i>	125 mg/l
Gentamicin	15 mg/ml H ₂ O <i>bideest.</i>	15 mg/l
Chloramphenicol	20 mg/ml 96% Ethanol	20 mg/l
IPTG	40 mg/ml H ₂ O <i>bideest.</i>	40 mg/l
X-Gal	48 mg/ml DMF	48 mg/l
AHT	2 mg/ml DMF	200 µg/l

2.2.2 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 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. Zur anaeroben Anzucht wurden mit Medium maximal befüllte Hungate-Röhrchen beimpft und stehend bei 37°C (im Brutraum) für 17 h inkubiert. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem Spektrophotometer (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) gemessen. Beimpfte Agarplatten wurden bei 37°C (im Brutraum) für 16-24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation in einer Sigma-Laborzentrifuge bei 12000 rpm (Laborzentrifugen GmbH, Osterode).

2.2.3 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 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

Glyzerinkulturen 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 Plasmidisolation 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 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Es wurden 4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 12000 rpm pelletiert (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte unter Verwendung des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1* (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 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Es wurden 1.5 ml Übernachtskultur der zu untersuchenden *E. coli* Stämme bei 12000 rpm 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

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide (Akada, 1994). 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% (v/v) Glycerin, 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l BPB] zugegeben. Nach

Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2TM, 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 (*Easy CastTM Elektrophoresis System*). Dabei variierte die Gelkonzentration von 8 g/l bei großen Fragmenten bis zu 20 g/l bei kleinen Fragmenten. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer 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 Ethidiumbromid (0.5 g/l) 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, ± 2.5 g/l Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-20 µl (analytische Gele) bzw. 20-120 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (Biometra[®], Göttingen bzw. Pharmacia Biosystems, Freiburg), 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-Fragmenten 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 1-20 (analytisch) bis 100 µl (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 µg 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, erhitztem H₂O_{bidest}. 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 H₂O_{bidest} 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 (Tab. 3) wurden von kommerziellen Anbietern (Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H₂O_{bidest.} gelöst (Stammlösung mit 100 pmol/μl) und auf eine Endkonzentration von 10 pmol/μl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Primer

Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5' → 3' Position ^{a)}	Bemerkung
Primer zur Integration von Genen ins Chromosom von <i>E. coli</i>		
<i>fetM</i> _{p d}	→ -328 TTACAGCGTCTTGCCAGCGA TC	<i>upstream</i> liegender Bereich von <i>fetM</i> für Klonierung des <i>fetM</i> Promotors in pGEM [®] -T Easy.
<i>fetM</i> _{p u}	← 4 AAGAGTTACGGAAGTTACGCAC GT	<i>upstream</i> liegender Bereich von <i>fetM</i> für Klonierung des <i>fetM</i> Promotors in pGEM [®] -T Easy.
<i>fetP</i> _u	← 597 GTACGGCGGGTTGAATTAAGC G	<i>downstream</i> liegender Bereich von <i>fetP</i> für Klonierung von <i>fetP</i> in pGEM [®] -T Easy.
<i>fetM</i> _u	← 1956 GTATCCTCTCGTCTAAAACAA CGGCT	<i>downstream</i> liegender Bereich von <i>fetM</i> für Klonierung von <i>fetM</i> in pGEM [®] -T Easy.
Delta <i>fetM</i> <i>NcoI</i> _d	→ 1938 AAACCATGGAACCCATAATC GTTGTATAGCCGT	an Position 1938 codierender Bereich von <i>fetM</i> zur Erstellung von pECD1104.
Delta <i>fetM</i> <i>NcoI</i> _u	← 111 AAACCATGGATGGTAAGCCCT CCCGTATCGT	an Position 111 codierender Bereich von <i>fetM</i> zur Erstellung von pECD1104.
<i>lacZ</i> _{KpnI d}	→ 2231 TTTGGTACCCAGGAAACAGCT ATGACCATGATT	5'-codierender Bereich von <i>lacZ</i> an Position 2231 in pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> für Klonierung in pECD1105.

Fortsetzung Tab. 3:

<i>lacZ</i> KpnI u	← 5317ACGGGTACCCATGGCCTGCCC GGTTATTAT	3'-codierender Bereich von <i>lacZ</i> an Position 5317 in pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> für Klonierung in pECD1105.
Tn7R	← CACAGCATAACTGGACTGATTTC	Testprimer, der am rechten Ende des mini-Tn7T bindet.
Tn7L	→ ATTAGCTTACGACGCTACACCC	Testprimer, der am linken Ende des mini-Tn7T bindet.
<i>glmS</i> d	→ 1805TGGCAAATCGGTTACGGTTG AG	Testprimer, an Pos. 1805 codierender Bereich von <i>glmS</i> .

Primer für RT-PCR

<i>rpoZ</i> d	→ 119CGGAAGAAAACGATAAAACC A	an Position 119 codierender Bereich von <i>rpoZ</i> .
<i>rpoZ</i> u	← 208TTCCTGCTCTTGCTGTTCTG	an Position 208 codierender Bereich von <i>rpoZ</i> .
<i>fetM</i> d	→ 800CGAGGGAAATAACCGCACCGA	an Position 800 codierender Bereich von <i>fetM</i> .
<i>fetM</i> u	← 1114ACTGGGTTTCTTCGCCTTCGC	an Position 1114 codierender Bereich von <i>fetM</i> .
<i>fetP</i> d	→ 216CGCTGTAGAAGGCAATAAAAA CGG	an Position 216 codierender Bereich von <i>fetP</i> .
<i>fetP</i> u	← 450CCTACGCCTGTTTCGCTGTCA	an Position 450 codierender Bereich von <i>fetP</i> .

Primer für Sandwich-Hybridisierungs-Assay

<i>fetP</i> T7 d	→ GAAATTAATACGACTCACTATAGGG AA ₁₃₄ CCTGCAACCGATTGATATG G	an Position 134 codierender Bereich von <i>fetP</i> mit 5'-codierender T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz für Synthese von <i>in vitro</i> <i>fetP</i> -mRNA.
<i>fetP</i> u	← 528GGCGCGTTGGTTAGTCGGTT	an Position 528 codierender Bereich von <i>fetP</i> .

Fortsetzung Tab. 3:

<i>fetP</i> Helfersonde1 (H1)	← ₃₉₅ TTCAATGTGGTAGGTCACCTTA	an Position 395 codierender Bereich von <i>fetP</i> zur Stabilisierung der linearen <i>fetP</i> -RNA-Struktur.
<i>fetP</i> Helfersonde2 (H2)	← ₃₃₁ CCATCGCTGGCAACCATCG	an Position 331 codierender Bereich von <i>fetP</i> zur Stabilisierung der linearen <i>fetP</i> -RNA-Struktur.
<i>fetP</i> -Immobilisierungssonde (BIO)	← Biotin- ₃₇₄ AGTTGCCACGCCATCATT	an Position 374 codierender Bereich von <i>fetP</i> mit 5'-Biotinmarkierung für Immobilisierung der <i>fetP</i> -RNA an Streptavidin.
<i>fetP</i> Detektionssonde (DIG)	← ₃₅₃ TGATGTTCGCGCCATAGTGC	an Position 353 codierender Bereich von <i>fetP</i> , der für Detektion der <i>fetP</i> -RNA nachträglich am 3'-Ende Digoxigenin markiert wird.

Überexpressionsprimer

<i>fetM</i> EcoRI d	→ ₄ GGCGAATTCACGTGCGTAACT TCCGTAACCTCTT	5'-codierender Bereich von <i>fetM</i> ohne Startcodon für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>fetM</i> PstI u	← ₁₉₁₅ AAACTGCAGTGGGTTATTTTT TATCGTCTCCCCGGGA	3'-codierender Bereich von <i>fetM</i> ohne Stoppcodon für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>fetP</i> EcoRI d	→ ₄ AGCGAATTCACCATGAAGAAAA CCCTGATTGCC	5'-codierender Bereich von <i>fetP</i> ohne Startcodon für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>fetP</i> PstI u	← ₄₉₅ TCGCTGCAGGTTTCAGACCGAC ATATTTAAACTCGTAGCTC	3'-codierender Bereich von <i>fetP</i> ohne Stoppcodon für Klonierung in pASK-IBA3.
<i>fetM</i> BsaI d	→ ₇₃ ATGGTAGGTCTCAGCGCACCTC GACGAATTATGCGCCTTT	5'-codierender Bereich von <i>fetM</i> ohne Signalsequenz für Klonierung in pASK-IBA6.

Fortsetzung Tab. 3:

<i>fetM</i> BsaI u	← 1131ATGGTAGG <u>TCTC</u> ATATCAACT ATAGAGCAGCAGACTCCACT	3`kodierender Bereich des N-Terminus kodierenden Teil (73-1160) von <i>fetM</i> für Klonierung in pASK-IBA6.
<i>fetP</i> NcoI d	→ 73AAACCATGGGCTTTAAAGAGT ACCCGGCAGGC	5`kodierender Bereich von <i>fetP</i> ohne Signalsequenz für Klonierung in pET22b(+).
<i>fetP</i> XhoI u	← 525AAACTCGAGGCTGCCGCGCGG CACCAGGCCGCTGCTGTTCAGAC CGACATATTTAAACTC	3`kodierender Bereich von <i>fetP</i> ohne Stoppcodon mit <i>Thrombin-Erkennungs-sequenz</i> für Klonierung in pET22b(+).

Sequenzierprimer

pGEM d	→ 2909GCGAAAGGGGGATGTGCT	Sequenzierprimer für pGEM-Konstrukte.
pGEM u	← 81ATATGGTCGACCTGCAGGCG	
pASK d	→ 90AAAAGTGAAATGAATAGTTTCG ACAAAA	Sequenzierprimer für pASK-IBA-Konstrukte.
pASK u	← 292CGGTAAACGGCAGACAAAAA AAATG	
T7 Promoter	→ 57TAATACGACTCACTATAGG	Sequenzierprimer für <i>fetP</i> -Konstrukt in pET22b(+).
T7 Terminator	← 388CTAGTTATTGCTCAGCGG	

***fetP* Mutagenese Primer**

<i>fetP</i> E46Q d	→ 184AAAGCCGATGTTACCTT <u>CAG</u> GCGGATATCCACGCTGTA	<i>Quik-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G202C/A204G, (E46Q).
<i>fetP</i> E46Q u	← 223TACAGCGTGGATATCCGC <u>CTG</u> AAGGTGAACATCGGCTTT	
<i>fetP</i> M90I d	→ 319GGCACCTTCATGCCGAT <u>CGTT</u> GCCAGCGATGGC	<i>Quik-Change</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G336C, (M90I).
<i>fetP</i> M90I u	← 352GCCATCGCTGGCAAC <u>G</u> ATCGG CATGAAGGTGCC	

Fortsetzung Tab. 3:

<i>fetP</i> H127A d	→	430GCCGGGATGCATCGC <u>GCT</u> ACT GACAGCGAAACAGGC	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, C445G/A446C, (H127A).
<i>fetP</i> H127A u	←	466GCCTGTTTCGCTGTCAGTA <u>GC</u> GCGATGCATCCCGGC		
<i>fetP</i> M36I d	→	91GGCGAGCCTGTCACCAT <u>CA</u> ATG AAATGGAGCTGGCG	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G108C, (M36I).
<i>fetP</i> M36I u	←	127CGCCAGCTCCATTTCA <u>TTG</u> ATG GTGACAGGCTCGCC		
<i>fetP</i> M39I d	→	97CCTGTCACCATGAATGAAAT <u>CG</u> AGCTGGCGGCCGTT	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G117C, (M39I).
<i>fetP</i> M39I u	←	133AACGGCCGCCAGCTC <u>G</u> ATTTC ATTCATGGTGACAGG		
<i>fetP</i> M88/90I d	→	310AAACAGGAAGGCACCTTCAT <u>C</u> CCGAT <u>CG</u> TTGCCAGCGATGGC	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G330/336C, (M88/90I).
<i>fetP</i> M88/90I u	←	352GCCATCGCTGGCAAC <u>G</u> ATCGG <u>G</u> ATGAAGGTGCCTTCCTGTTT		
<i>fetP</i> D94N d	→	328ATGCCGATGGTTGCCAGC <u>A</u> AT GGCCCGCACTATGGCGCG	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G346A, (D94N).
<i>fetP</i> D94N u	←	367CGCGCCATAGTGCGGGCCAT <u>T</u> GCTGGCAACCATCGGCAT		
<i>fetP</i> M29I d	→	133TACCTGCAACCGATTGATAT <u>C</u> GAACCGCGCGGCATGGGC	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G153C, (M29I).
<i>fetP</i> M29I u	←	172GCCCATGCCGCGCGGTT <u>CG</u> AT ATCAATCGGTTGCAGGTA		
<i>fetP</i> H125R d	→	421CCGTCAAAAGCCGGGATGC <u>GC</u> CGCCATACTGACAGCGAA	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, A440G/T441C, (H125R).
<i>fetP</i> H125R u	←	460TTCGCTGTCAGTATGGCG <u>GCG</u> CATCCCGGCTTTTGACGG		

Fortsetzung Tab. 3:

<i>fetP</i> M34I d	→	¹⁴⁸ GATATGGAACCGCGCGGCAT <u>C</u> GGCTTACCGGCAGCAAAA	<i>Quik-Change</i>	Mutagenese- Primer, führen Mutation in <i>fetP</i> ein, G168C, (M34I).
<i>fetP</i> M34I u	←	¹⁸⁷ TTTTGCTGCCGGTAAGCC <u>G</u> AT GCCGCGCGGTTCCATATC		

a) Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. **Unterstrichene und fett** dargestellte Basen weisen auf Austausch hin. Tiefergestellte Ziffern kennzeichnen die Basenposition in der jeweiligen Gensequenz. *Kursiv* dargestellte Basen kennzeichnen eine T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz bzw. eine Thrombin-Erkennungssequenz.

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 *Taq/Tgo*-Gemisch [*ExpandTM 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 H₂O_{bidest.} überführt. Nach Erhitzung 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)
5 µl	10 x PCR Puffer
1 µl	20 mM dNTP-Mix
1 µl	Primer 1 (10 pmol)
1 µl	Primer 2 (10 pmol)
0.7 -1 µl	Polymerase
(5 µl	DMSO)
ad 50 µl	steriles H ₂ O _{bidest.}

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+Tgo/Taq)</i>
	Schritt 2- 4:	25-30 Zyklen	
5.	4 min	68/72°C	Nachsynthese (<i>Pwo,Taq+Tgo/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 *Quik-ChangeTM Site-Directed Mutagenesis-PCR*

Diese Methode (Stratagene Cloning Systems, Heidelberg) diente zur Mutagenese eines oder mehreren nebeneinander liegender Basenpaare. Wichtig hierfür ist das Vorliegen der zu mutierenden Sequenz in einem relativ kleinen doppelsträngigen, *supercoilten* Vektor (z.B. pET22b(+)), der aus einem *dam⁺ 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 *Quik-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 erfolgte.

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

2.3.4.1 Transformation nach der CaCl₂-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 angezogen. 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 5000 rpm und 4°C in der Eppendorf Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg). Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml eiskalter 0.1M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-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. CaCl₂-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 LB-Medium und Inkubation für 45 min bei 37°C wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

A) Herstellung kompetenter Zellen (Dower *et al.*, 1988)

50 ml SOB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit einer Vorkultur 1:100 beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach Abkühlung auf Eis (15 min) zentrifugiert (15 min 5000 rpm, 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 elektrokompetenten Zellen wurden als 40 µl Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

B) Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser (BIORAD, München). Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5 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 37°C inkubiert. 50-200 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 Integration von *single-copy* Genen in das Chromosom von *E. coli*

Nach Choi und Schweizer (2006) können mit Hilfe des Mini-Transposons mini-Tn7T, welches im Vektor pUC18R6K codiert wird, Einzelkopien von Genen orts- und orientierungsspezifisch in das Chromosom von Bakterien an der Tn7-*attachment site* (*attTn7*) stromabwärts des hochkonservierten *glmS*-Gens inseriert werden (Gringauz *et al.*, 1988, Cleaver und Wickstrom, 2000).

Hierfür wurden die jeweiligen Gene mittels PCR (2.3.3.2) amplifiziert und in den pGEM[®]-T Easy-Vektor kloniert. Nach erfolgreicher Kontrollsequenzierung wurden die Gene aus dem Vektor mit spezifischen Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, jeweils in die multiple Klonierungsstelle im mini-Tn7T-Element des Suizid-Vektors pUC18R6K ligiert (2.3.2.7) und anschließend in den Stamm EC100D[™] *pir*-116 transformiert (2.3.4.1). Zur Erstellung einer Promotor-*lacZ*-Fusion wurde zunächst der jeweilige Promotor in den Vektor pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm kloniert. Danach wurde das *lacZ*-Gen mit dem Vektor pUC18-mini-Tn7T-Gm-*lacZ* als *template* über PCR amplifiziert und in den Vektor pUC18R6K-mini-Tn7T-Gm::prom als Promotor-*lacZ*-Fusion subligiert, welcher anschließend in den Stamm EC100D[™] *pir*-116 transformiert wurde.

Die rekombinaten mini-Tn7T-Vektoren wurden in die entsprechenden *E. coli*-Zielstämme jeweils mit dem Helferplasmid pTNS1 kotransferiert, welches die für die Tn7 ortsspezifische Transposition notwendigen Gene *tnsABCD* codiert (Biery *et al.*, 2000, Stellwagen und Craig, 2001, Peters und Craig, 2001). Pro Elektroporationsansatz (2.3.4.2) wurden jeweils 50 ng beider Vektoren eingesetzt. Da das Mini-Transposon das Resistenzgen für Gentamicin trägt, können die Zellen nach erfolgreicher Transposition auf Gentamicin-haltigem Agar selektiert werden. Die Überprüfung der jeweiligen Einzelkopie-Geninsertionen erfolgte mittels PCR (2.3.3.2).

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 Verwendung des *DYEnamicTM ET terminator cycle sequencing kit*

Für die Sequenzreaktion (GE Healthcare, Freiburg), die im Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) stattfand, wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

Plasmid-DNA (0.5 µg)	2 µl
Primer (4 pM)	2 µl
<i>ABI-Sequencing-Mix</i>	2 µl
H ₂ O _{bidest.}	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 bis 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 20minütiger Zentrifugation bei RT und 10500 g und anschließendem 5 min Waschen mit 70% (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 Lindenstrauß.

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 dem Computerprogramm 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 und die Berechnung von Protein-Molekulargewichten und den theoretischen Extinktionskoeffizienten anhand der AS-Sequenzen erfolgte mit dem Internet-Programm *Expasy* des *Expasy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz). Topologievoraussagen wurden nach dem TMHMM-Modell des *TMHMM Server v. 2.0* (Zentrum für biologische Sequenzanalyse, Technische Universität, Lyngby, Dänemark) erstellt, wobei postulierte Signalsequenzen mit dem Programm *SignalP 3.0* (Zentrum für biologische Sequenzanalyse, Technische Universität, Lyngby, Dänemark) untersucht wurden.

2.4 Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

Alle verwendeten Puffer, Lösungen und auch $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ wurden mit 0.1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC), welches ein starker Inhibitor von RNAsen ist, versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

2.4.1 Gesamt-RNA-Isolation

Vorkulturen der *E. coli* Stämme wurden über Nacht in LB-Medium und entsprechenden Antibiotikum bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Mit den Vorkulturen wurden 4 ml Tris-Minimalmedium ohne Eisen pH 7 1:400 beimpft und erneut über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden citratgespülte Klettkolben, die jeweils 20 ml Tris-Minimalmedium ohne Eisen pH 7 enthielten, 1.5%ig angeimpft und schüttelnd bei 37°C bis zum Erreichen von 100 Klett inkubiert. Zur Zellernte wurden die Kulturen in Aliquots von 2 ml in Eppendorftubes für 10 min bei 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert, das Medium vollständig abgenommen und die Zellpellets sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bis zur Isolation der RNA bei -80°C gelagert.

Um die Gesamt-RNA zu gewinnen, wurde zunächst das Lysegemisch (6 ml Phenol/Chloroformgemisch, 72 μ l 20% (w/v) SDS, 2.5 ml AE-Puffer) in ein 15 ml Greinerröhrchen pipettiert und auf 60°C vorgewärmt. Pro Isolation wurden die Zellpellets von jeweils 10 ml Kultur mit 500 μ l AE-Puffer (20 mM Na-acetat pH5.5, 1 mM EDTA in DEPC H₂O) durch mehrmaliges Aufziehen in einer sterilen Spritze mit Kanüle resuspendiert und zu den vorgewärmten Lysegemisch gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 60°C inkubiert und währenddessen aller 30 sec geschüttelt. Danach wurde der Ansatz auf Eis für mindestens 10 min stehen gelassen. Anschließend erfolgte durch eine 20 min Zentrifugation bei 10°C und 5000 rpm eine Phasen-Trennung. Die Oberphase wurde daraufhin mit 3 ml Phenolgemisch und 300 μ l 3 M Na-acetat pH 5.5 gemischt. Nach starkem Schütteln erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 5000 rpm. Diese Schritte wurden mehrmals wiederholt, um die Proteine aus der Interphase zu entfernen. Die Oberphase wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 2.5 Vol. eiskaltem 96% (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch einstündige Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm. Das Pellet wurde nochmals mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol für 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Ethanol wurde vollständig abgenommen und das Greinerröhrchen kopfüber zum Trocknen des Pellets gestellt. Anschließend wurde dieses zweimal mit 50 μ l DEPC-H₂O gelöst und in ein Eppendorftube überführt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Um die Konzentration der präparierten RNA zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 nm an einem NanoDrop[®]ND-1000 Spektrophotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemessen. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 μ g ssRNA/ml. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen zu. Ist dieser Wert kleiner als 1.7, ist die RNA-Präparation mit Proteinen verunreinigt. Beträgt der Wert 1.7 oder mehr, spricht dies für eine geringe Verunreinigung mit Phenol und die RNA-Präparation gilt als rein.

2.4.3 DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA

Um die nach der Isolation noch vorhandene DNA aus der Gesamt-RNA-Präparation zu entfernen, wurde ein Verdau mit RNase-freier DNaseI durchgeführt.

Dafür wurden 20 bis 30 μ g RNA eingesetzt. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 60 μ l durchgeführt. Nach Auffüllen der entsprechenden Menge an RNA mit DEPC-H₂O wurde diese für 3 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen des Ansatzes auf Eis

wurden 6 µl 10x DNase Puffer und 6 µl RNase-freie DNaseI (Promega, Mannheim) hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Dazu wurden 100 µl des Phenol/Chloroformgemisches und 10 µl 3 M Na-acetat pH 5.2 hinzugegeben, gut geschüttelt und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit 2.5 Vol. eiskaltem 96% (v/v) Ethanol für 1 h bei -80°C gefällt. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 14000 rpm wurde die RNA im Pellet gewonnen und nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol luftgetrocknet und in 22 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA wurde auf Eis oder bei -20°C gelagert. Die präparierte RNA wurde im Formaldehydgel auf Intaktheit und mittels PCR auf Verunreinigung mit DNA überprüft.

2.4.4 Fomaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische Zwecke wurden 1.5%ige denaturierende Formaldehydgele verwendet. Für ein 50 ml Gel wurden 0.75 g Agarose in 43.5 ml DEPC-H₂O mit 5 ml 10x MOPS (0.2 M MOPS, 0.05 M Na-acetat, 0.01 M EDTA in DEPC-H₂O pH 7) in der Mikrowelle gelöst und auf ca. 50°C abgekühlt. Danach wurden 1.5 ml Formaldehyd hinzugegeben, gut gemischt und in eine Minigelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Es wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA mit 12.5 µl Formamid, 2.5 µl 10x MOPS und 4 µl Formaldehyd gemischt und bei 65°C für 15 min denaturiert. Zum schnellen Abkühlen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und anschließend mit 3 µl Probenpuffer (100 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0.1% SDS, 0.1% BPB) und 0.5 µl Ethidiumbromid versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V.

2.4.5 Reverse transcriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Um die Expression der Gene *fetM* und *fetP* in den jeweiligen Stämmen zu verifizieren, wurde die Methode der RT-PCR angewandt. Außerdem wurde mit dieser Methode die Operonstruktur von *fetMP* bestimmt. Dabei wurde im ersten Schritt die RNA mittels der Reversen Transkriptase SUPERScript™II (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben, die im zweiten Schritt amplifiziert wurde.

cDNA-Synthese:

Gesamt-RNA	1 µg
random Primer	1 µl
steriles DEPC-H ₂ O _{bidest.}	ad 6 µl

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt.

Danach erfolgte die Zugabe von:

5x <i>first strand</i> -Puffer	2 μ l
0.1 M DTT	1 μ l
10 mM dNTP-Lösung	0.5 μ l
SUPERSCRIPT TM II (200 U/ μ l)	0.5 μ l

Der Ansatz wurde bei RT für 10 min inkubiert.

Daran schloss sich die Reaktion für 1 h bei 42°C an. Das Enzym wurde danach für 15 min bei 70°C inaktiviert.

Im zweiten Schritt schloss sich die Amplifizierung der synthetisierten cDNA an:

cDNA	1 μ l
Primer1 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer2 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
10 mM dNTP-Lösung	1 μ l
10x PCR-Puffer	5 μ l
H ₂ O _{bidest.}	40 μ l
Taq-Polymerase (Roche, Mannheim, 1 U/ μ L)	1 μ l

Der Ansatz wurde gut gemischt und die cDNA nach dem unter 2.3.3.2. beschriebenen Protokoll amplifiziert.

Je 10 μ l der RT-PCR-Produkte wurden in einem 2.5%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollen wurden PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA des *E. coli* Stammes F11 als *Template* (Positivkontrollen) und ohne *Template* (Negativkontrollen) mitgeführt.

2.4.6 Sandwich-Hybridisierungs-Assay

Die Sandwich-Hybridisierung (Thieme *et al.*, 2008) dient der Quantifizierung von RNA, was auf der Detektion von Hybridisierungsereignissen zweier Oligonukleotid-Sonden und der Ziel-RNA basiert. Direkt aus dem Rohzellextrakt wird die Ziel-RNA an einem festen Trägermaterial immobilisiert und mittels einer Detektionssonde mit einem entsprechenden Substrat nachgewiesen. Hierbei wird der Rohzellextrakt nach Zellaufschluss mittels Ultraschall verwendet, was ein zeitaufwendiges Isolieren von RNA nicht erforderlich macht. Zur Berechnung der spezifischen Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens wird die Relation zwischen Optischer Dichte bei 600 nm und der Zellzahl verwendet, wobei 6×10^8 Zellen/ml einer OD₆₀₀ von 1.0 entsprechen (Piovant und Lazdunski, 1975). Ein *in vitro*

Standard wird verwendet, um die molare Konzentration an Transkripten, zu bestimmen, sodass mit diesem Assay die Anzahl der Moleküle pro Zelle berechnet werden kann.

2.4.6.1 Zellanzucht, Zellernte und Aufschluss

Nach einer Vorkultur in LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C wurden die Zellen 1:400 in Tris-Minimalmedium ohne Eisen verdünnt. Das Wachstum dieser Mittelkultur erfolgte schüttelnd bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden citratgespülte Kolben, die jeweils 50 ml Tris-Minimalmedium ohne Eisen enthielten, 5%ig angeimpft und schüttelnd bei 37°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte bei 600 nm von 0.7 inkubiert. Vor der Zellernte wurden in 1.5 ml Eppendorftubes 100 µl Stopplösung zur Inaktivierung von RNasen vorgelegt. Die Stopplösung setzte sich aus 5 Teilen Phenol und 95 Teilen 96% (v/v) Ethanol zusammen und wurde mit der entnommenen Kultur auf eine Endkonzentration von 9% verdünnt. Zu definierten Zeitpunkten (0, 5, 6, 11, 16, 21, 26, 46, 66 und 86 min) wurden jeweils 1 ml Kultur entnommen, in ein Eppendorftube mit dem RNase-Inaktivator überführt und die Optischen Dichten bei 600 nm bestimmt. Zur Repression bzw. Induktion der zu untersuchenden Gene wurden den Kulturen jeweils nach 6 min 100 µM FeCl₃ und nach 20 min 200 µM CDTA zugesetzt.

Anschließend erfolgte die Pelletierung der Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, die Zellpellets sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Bandelin *electronic*, Berlin). Dazu wurden die Pellets in 150 µl eiskaltem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 60 W und 20 kHz für 1 x 3 s auf Eis aufgeschlossen und für 3 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Von den Lysaten wurden jeweils 20 µl für den Assay eingesetzt.

2.4.6.2 Herstellung des *in vitro* transkribierten RNA Standards

Der *in vitro* RNA Standard diente der Berechnung der Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens aus den Fluoreszenzdaten. Der Standard wurde vom gereinigten DNA-PCR-Produkt für das nachzuweisende Gen hergestellt. Die Amplifikation des ca. 400 bp Fragmentes wurde mit den Primern *fetP* T7 d und *fetP* u wie unter 2.3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei der *fetP* T7 d Primer am 5'-Ende die T7 Promotor-Sequenz als Bindestelle für die T7-RNA-Polymerase enthielt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels *E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit* (peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgereinigt (2.3.2.5) und das gesamte Produkt für die RNA-Synthese verwendet.

Die Synthese der RNA erfolgte über die RNA-Polymerase *in vitro* Transkription mittels *MAXIscript*TM T7-Kit (Ambion, Austin, TX, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Qualität der *in vitro* erstellten RNA-Transkripte wurde in einem denaturierenden Formaldehydgel wie unter 2.4.4 beschrieben geprüft. Zur Aufbewahrung wurde die RNA in 5 µl Aliquots zunächst kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.6.3 RNA-Bestimmung

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes der Proben wurde die *in vitro* RNA zur Erstellung einer Eichgerade in jedem Assay mitgeführt. Hierfür war es erforderlich, die Menge der *in vitro* erstellten RNA mit dem *Quant-IT RiboGreen RNA-Assay* (Invitrogen, Karlsruhe) zu bestimmen. Als Standard diente eine Eichgerade mit ribosomaler *E. coli* RNA (100 pmol/ml), welche Bestandteil des verwendeten Kits war. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Extinktion von 480 nm und einer Emission von 525 nm.

2.4.6.4 DIG-Labeling

Die Markierung der DIG-markierten Detektionssonde erfolgte am 3'-Ende mittels *DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit 2nd generation* (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

2.4.6.5 Biotin-Labeling

Die Biotin-markierte Detektionssonde wurde direkt vom Hersteller (Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Die Markierung erfolgte am 5'-Ende.

2.4.6.6 Sandwich-Hybridisierungs-Assay

Dieser Assay wurde in 96 *well* Microplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt. Für jede Probe wurden jeweils drei parallele Hybridisierungsreaktionen angesetzt, wobei pro Messung drei Reaktionen mit *in vitro* RNA für den Standard mitgeführt wurden. Zur Herstellung des Hybridisierungspuffers wurden folgende Reagenzien vorbereitet: 20 x SSC (0.3 M Na-citrat pH 7.0, 3 M NaCl in DEPC-H₂O), 100 x Denhardts-Reagenz (2% (w/v) Ficoll 400, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon-360) und 10%ige Blockierungslösung in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure/NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl). Für den Assay wurden 90 µl des Hybridisierungspuffers pro Ansatz eingesetzt, der sich wie folgt zusammensetzt:

5 x	SSC
20%	Formamid
3%	Dextransulfat
0.2%	Tween 20
1 x	Denhardts Reagenz
1 x	Blockierungslösung
ad 86 µl	DEPC-H ₂ O _{bidest.}

Dieser Ansatz wurde als Stammlösung vorbereitet und bei 4°C gelagert. Vor jedem Assay wurde eine entsprechende Menge an Hybridisierungspuffer für einen Mastermix entnommen, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und je 1 µl Helfersonde 1 (1 pmol/µl), Helfersonde 2 (1 pmol/µl), DIG-markierte Detektionssonde (0.05 pmol/µl) und Biotin-markierte Detektionssonde (5 pmol/µl) zugesetzt. Mit einer *Multichannel*-Pipette (8-*Channel*-Pipette, 30-300 µl, Eppendorf AG, Hamburg) wurden 90 µl des komplettierten Hybridisierungspuffers pro well pipettiert. Die Platte wurde für 5 min bei 50°C auf einem Thermoblock (*Shaker* DTS-2, NeoLab, Heidelberg) inkubiert, wonach jeweils 20 µl der aufgeschlossenen Proben bzw. die *in vitro* RNA zugegeben wurden. Für die Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe über acht verschiedene Konzentrationen hergestellt. Anschließend wurde die Microplatte für 30 min bei 50°C schüttelnd inkubiert, wobei die Hybridisierung der Sonden an die Transkripte erfolgen sollte.

Darauf schloss sich die Immobilisierung an *Magnetic Beads* (Streptavidin-*MagneSphereParamagnetic Particles*, Promega, Mannheim) an, wovon 15 µl pro well eingesetzt wurden. Vorbereitend wurde die erforderliche Menge an *Magnetic Beads* in ein Eppendorftube überführt, dieses in einem *MagnaSphere*[®] *Magnetic Separation Stand* (Promega, Mannheim) fixiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die *Magnetic Beads* dreimal mit 5 x SSC gewaschen und im ursprünglichen Volumen darin aufgenommen. Nach Zugabe der *Magnetic Beads* in die Reaktionsansätze wurden die RNA-DNA-Hybride während einer 25 min Inkubation bei 50°C und 900 rpm daran immobilisiert. Danach wurde die Microplatte auf einem *MagnaBot*[®] 96 *Magnetic Separation Device* (Promega, Mannheim) zur Ansammlung der *Magnetic Beads* am Boden der wells für 2 min inkubiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und 120 µl Waschlösung (1 x SSC, 0.01% SDS) zugegeben. Es folgte eine Inkubation auf dem Thermoblock für 2 min bei 50°C und 900 rpm. Dieser Vorgang wurde anschließend zweimal bei 30°C wiederholt und der Waschpuffer komplett entfernt. Für die Antikörper-Bindung wurden pro well 100 µl einer komplettierten Enzymlösung (1 x SSC, 0.1% (v/v) Tween 20, 1:10000 Anti-DIG-AP-

Konjugat; Roche, Mannheim) hinzu pipettiert und für 30 min bei 30°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde erneut dreimal mit je 120 µl Waschpuffer bei 30°C gewaschen, wonach der komplette Puffer entfernt wurde.

Anschließend wurden pro well 100 µl 2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazolphosphat (BBTP) AttoPhos[®]-Substrat (AttoPhosAP *Fluorescent Substrate System*, Promega, Mannheim) zugegeben und die Microplatte für 20 min bei 37°C und 900 rpm inkubiert. Zur kompletten Resuspendierung der *Magnetic Beads* wurde mit 1300 rpm für 5 s gestartet. Daraufhin wurde die Microplatte zur Separation auf den *MagnaBot[®] 96 Magnetic Separation Device* für 1 min gestellt, sodass jeweils 90 µl der Reaktionsansätze in eine schwarze Microplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld) zur Fluoreszenzmessung überführt wurden. Dabei muss der Einsatz gleicher Volumina sicher gestellt sein. Die Messung des Substrat-Umsatzes zu anorganischem Phosphat (P_i) und fluoreszierenden 2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazol (BBT) erfolgte an einem Infinite[®] M200 Mikroplatten-Reader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim), der die Fluoreszenz bei einer Extinktion bei 430 nm und einer Emission bei 560 nm verfolgt. Die Konzentration der spezifischen Transkripte wurde anhand der Kalibrierungskurve der *in vitro* erstellten Ziel-m-RNA berechnet.

2.5 Zellwachstumsversuche

2.5.1 Wachstumsversuche in Flüssigmedien

2.5.1.1 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 die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probennahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

Neben der kontinuierlichen Messung des Zellwachstums wurde auch die Zelldichte nach einer definierten Wachstumszeit (16 h, 17 h oder 20 h) bestimmt. Dazu wurde die Optische Dichte

der Kulturen bei 600 nm mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) gemessen. Die Bestimmung des Zelltrockengewichtes erfolgte mittels Eichkurven.

2.5.1.2 Zellanzucht von *E. 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-Minimalmedium ohne Eisen 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-Minimalmedium ohne Eisen. Das Wachstum der Mittelkultur erfolgte im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 rpm. Nach zweistündigem Wachstum wurden 10 µl dieser Mittelkulturen in 4 ml Tris-Minimalmedium ohne Eisen überimpft, wobei verschiedene Schwermetalle bzw. Chelatoren in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt wurden. Das Wachstum der Hauptkultur erfolgte für 16 h bzw. 20 h im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 rpm. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm mit einem Spektrophotometer (SmartSpec™3000, BIORAD, München) bestimmt. Sollte das Wachstum bei pH 5, 7 und 9 vergleichend bestimmt werden, wurde das jeweilige MES/Tris-Minimalmedium ohne Eisen für die Vor- und Hauptkulturen verwendet.

B) Anaerobe Wachstums-Endpunktbestimmungen

Die Vorkulturen wurden wie oben beschrieben beimpft. Eine zweistündige Mittelkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur verwendet (1:400). Als Medium für die Hauptkultur diente Tris-Minimalmedium ohne Eisen mit Glukose als C-Quelle. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von FeCl₃ bzw. FeSO₄ zum Medium hinzu gegeben. Nahezu anaerobe Wachstumsbedingungen wurden erreicht, indem citratgespülte Hungate-Kulturröhrchen nahezu 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 17 h direkt in einem Spektrophotometer (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Bei Zusatz von AgCl wurden die Kulturen Licht abgeschirmt inkubiert.

C) Zeitabhängige Wachstumsversuche

Für die Anzucht der kontinuierlich zu vermessenden Hauptkulturen wurden citratgespülte Seitenarmkolben verwendet. Vorkulturen wurden wie oben beschrieben angezogen. Es wurden 10 ml Tris-Minimalmedium ohne Eisen 1:400 mit der entsprechenden Mittelkultur angeimpft. Als Zusatz für die Hauptkultur wurde 1 µM CDTA eingesetzt. 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.

2.6 Enzymologische Methoden

2.6.1 Fur-Titrationsassay (FURTA)

Mit diesem Assay (Stojiljkovic *et al.*, 1994) sollte untersucht werden, ob das *fetMP*-Operon Fur abhängig reguliert wird. Dazu wurde der entsprechende Promotor zuvor in den pGEM[®]-T Easy-Vektor kloniert, welcher dann in den *E. coli* H1717 Stamm transformiert wurde. Dieser Stamm weist eine chromosomale *fhuF-lacZ*-Fusion auf. Als Kontrollen wurde der Vektor mit kloniertem *fhuF*-Promotor bzw. das Leerplasmid transformiert. Vorkulturen der *E. coli* H1717-Derivate wurden über Nacht in LB-Medium und entsprechenden Antibiotikum bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden diese auf MacConkey Laktose-Agar mit 30 µM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Expression von *fhuF* wird in Gegenwart von Eisen durch Fur reprimiert. Im Falle einer Fur Titration vom chromosomalen *fhuF-lacZ*-Promotor wird die im Medium vorhandene Laktose durch die gebildete β-Galaktosidase von den Zellen verwertet. Durch die damit verbundene Säureproduktion färbt sich der umgebene Agar rot.

2.6.2 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

2.6.2.1 Zellanzucht der *E. coli*-Stämme

Vorkulturen der *E. coli* Stämme mit *lacZ*-Fusionen wurden über Nacht in LB-Medium und entsprechenden Antibiotikum bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Mit den Vorkulturen wurden 4 ml MES/Tris-Minimalmedium ohne Eisen mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 5 bis 9) 1:400 beimpft und erneut über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden jeweils 15-25 ml frisches Medium mit entsprechenden pH-Werten mit der zweiten Vorkultur 1%ig angeimpft und für weitere 2 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufteilung dieser Kulturen in sterile Kulturröhrchen (jeweils 2 ml) unter Zusatz von 50 µM DIP, 10 µM FeCl₃ oder 10 µM FeSO₄. Im Fall von FeSO₄ wurde den Kulturen 1 mM Ascorbat hinzugefügt. Nach 2 stündiger Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurde die OD₆₀₀ gemessen und die Kulturen für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität eingesetzt. *E. coli* F11 Stämme mit *lacZ*-Fusionen wurden am Robert-Koch-Institut in Wernigerode unter Herrn Dr. Wolfgang Rabsch wie oben beschrieben angezogen, wobei

die Medien 0.2% Glukose anstelle von Glycerin enthielten, um die Expression des Wildtyp *lacZYA*-Operons zu reprimieren.

2.6.2.2 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Für den Enzymtest (Miller, 1972, Miller, 1992) wurden 250-500 μ l Hauptkultur in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 10 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Das Pellet wurde in 950 μ l Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 0.5 M Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50 μ l Permeabilisierungspuffer [0.25% (w/v) CTAB; 0.5% (w/v) Natriumdesoxycholat] permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Substratlösung [0.4% (w/v) ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz kurz gemischt und bis zur Gelbfärbung bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des Substrates ONPG zu o-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt und die Reaktionszeit notiert. Na_2CO_3 erhöht den pH-Wert im Reaktionsansatz auf elf, wodurch die β -Galaktosidase inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (SmartSpecTM 3000, BioRad München) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial. Mit Hilfe der Extinktion (E_{420}) und der Reaktionszeit konnte die Enzymaktivität (in Miller Units) nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität (Miller Units)} = 1000 * E_{420} / (\text{Reaktionszeit} * \text{OD}_{600} * \text{Probenvolumen})$$

Formel 1: Faktor E_{420} = Extinktion bei 420 nm, Reaktionszeit = Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion. OD_{600} = Optische Dichte bei 600 nm, Probenvolumen (ml). Dabei ist 1 U definiert als Substratumsatz in nmol pro min bei 30°C.

2.6.3 Reduktaseassay

2.6.3.1 Zellanzucht der *E. coli* Stämme

In Anlehnung an einen etablierten Reduktaseassay für *S. cerevisiae* (Georgatsou und Alexandraki, 1994) wurden nach einer Vorkultur in LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C die Zellen 1:400 in Tris-Minimalmedium verdünnt. Das Wachstum dieser Mittelkultur erfolgte schüttelnd bei 37°C über Nacht. Mit der Mittelkultur wurde die Hauptkultur, bestehend aus Tris-Minimalmedium ohne Eisen auf eine Optische Dichte bei

600 nm von 0.1 angeimpft. Bis zum Erreichen der $OD_{600} = 0.5$ erfolgte das Zellwachstum bei 37°C schüttelnd. Anschließend wurden 6 ml jeder Kultur für 15 min bei 5000 rpm und 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert, die Zellen anschließend zweimal in eiskaltem Puffer (50 mM Na-citrat pH 4.0, 0.5% Glukose) gewaschen und in 1 ml Puffer aufgenommen.

2.6.3.2 FeCl₃ Reduktaseassay

Der Assay wurde in einem jeweiligen Gesamtvolumen von 250 µl in 96 *well* Microplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 150 µl Zellen mit 50 µl Puffer und 1 mM Bathophenanthrolin-disulfonsäure (BPS) für 10 min bei 37°C auf einem Thermoblock (*Shaker* DTS-2, NeoLab, Heidelberg) inkubiert und anschließend die Absorption bei 520 nm in einem Infinite[®] M200 Mikroplatten-Reader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) gemessen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an FeCl₃ gestartet und die Absorption bei 520 nm für 2 h bei 37°C verfolgt. Die Menge an erzeugten Fe(II)-Ionen konnte mittels zuvor erstellter Kalibrierungskurve bestimmt werden. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Zellen, FeCl₃ oder BPS gemessen.

2.7 Transportstudien mit radioaktivem ⁵⁵Fe

2.7.1 Zellanzucht der *E. coli* Stämme

Nach einer Vorkultur in LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C wurden die Zellen 1:400 in Tris-Minimalmedium verdünnt. Das Wachstum dieser Mittelkultur erfolgte schüttelnd bei 37°C über Nacht. Mit der Mittelkultur wurde die Hauptkultur, bestehend aus Tris-Minimalmedium 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 gewaschen und die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Für die Transportstudien wurden die Kulturen auf eine Optische Dichte von ca. 0.4 eingestellt.

Für Eisenaufnahmeexperimente bei verschiedenen pH Werten wurden die entsprechenden *E. coli* Stämme in MES/Tris-Minimalmedium (pH 5, 7 und 9) bis zur Verdopplung der Klettzahl bei 37°C schüttelnd inkubiert, anschließend in Medium mit entsprechendem pH Wert gewaschen, die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt und diese auf 0.4 eingestellt.

2.7.2 Aufnahmeexperiment mit radioaktivem ^{55}Fe

Hierzu wurden nach Kammler *et al.* (1993) die Zellen in MES/Tris-Minimalmedium ohne Eisen, Phosphat, Spurenelementen und Casaminsäurehydrolysat mit entsprechendem pH Wert 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 ^{55}Fe -Lösung (3.7×10^7 Bq in 0.1 M HCl, Perkin Elmer *Life Science* INC., Boston) gestartet, die neben dem radioaktiven Metallisotop, FeSO_4 und Ascorbat enthielt. Die radioaktive ^{55}Fe -Lösung wurde so eingesetzt, dass die Eisengesamtkonzentration 5 μM und die Ascorbatkonzentration 1 mM betrug. Nach definierten Zeiten (0.1, 2.5, 5 und 10 min) wurden 500 μl Proben entnommen und filtriert (NC 45, Schleicher und Schüll, Dassel). Um unspezifisch gebundenes Metall von der Zelloberfläche zu entfernen, wurden die Filter mit 10 ml Waschpuffer (0.1 mM LiCl) gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready SafeTM wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt. Die Zählzeit betrug 2 min. Die gemessene Radioaktivität wurde in *counts per million* (cpm) angegeben. Als Absolutwert wurden 500 μl Probe aus der jeweiligen Kultur entnommen und ohne Filtration in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt und vermessen.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

A) *Strep-tag*[®]II-Protein Purification System (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Mit dem *Strep-tag*[®]II System (Schmidt und Skerra, 1994) ist es möglich, Proteine zu produzieren und diese mit Hilfe einer Einschritt-Affinitätschromatographie zu reinigen, wobei die Bindung des eingefügten *Strep-tag*[®]II (WSHPQFEK) an das Säulenmaterial *StrepTactin* genutzt wird. Dieser *tag* beeinflusst weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Es wurden mit Hilfe des Vektors pASK-IBA6 periplasmatisch lokalisierte Proteine mit N-terminaler *Strep-tag*[®]II-Fusion und OmpA-Signalsequenz hergestellt. Außerdem wurde der Vektor pASK-IBA3 verwendet, womit Proteine mit C-terminaler *Strep-tag*[®]II-Fusion erzeugt wurden. Die Induktion der Expression erfolgte mittels AHT (Anhydrotetracyclin), da das Gen des zu exprimierenden Proteins hinter einen tet-Promotor kloniert wurde. Unspezifisch bindende Proteine konnten während eines Waschschrilles entfernt werden, während das *Target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule

eluiert werden konnte. Während der Expression und Aufreinigung der Proteine wurden Proben entnommen, die eine Kontrolle des gesamten Prozesses durch SDS-PAGE ermöglichten.

B) His-tag[®]-Protein Purification System (QIAGEN GmbH, Hilden)

Mittels Einschnitt-Affinitätschromatographie können Proteine, welche einen 6xHis-tag[®] aufweisen, über die Bindung an Ni-NTA Agarose gereinigt werden. Durch Verwendung des Vektors pET22b(+) wurden Proteine mit C-terminaler Fusion und N-terminaler *pelB* Signalsequenz zur Translokation in den periplasmatischen Raum erzeugt. Die Induktion der Expression erfolgte mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), da das Gen hinter einen T7 Promotor kloniert wurde. Unspezifisch bindende Proteine konnten während eines Waschschrilles entfernt werden, während das *Target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Imidazol von der Säule eluiert werden konnte. Während der Expression und Aufreinigung der Proteine wurden Proben entnommen, die eine Kontrolle des gesamten Prozesses durch SDS-PAGE ermöglichten.

2.8.1.1 Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den *E. coli* Überexpressionsstamm BL21 transformiert. Die Vorkultur, welche über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, wurde 2%ig in frisches LB-Medium überführt. Diese Hauptkulturen wurden schüttelnd bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte von etwa OD₆₀₀ = 0.8 inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von 200 µg AHT/l bzw. 40 mg IPTG/l induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°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 entweder bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss zur Fraktionierung des Periplasmas verwendet.

2.8.1.2 Aufschlussmethoden

(A) Periplasmatischer Aufschluss ohne Lysozym (Brüser *et al.*, 1998)

Das Zellpellet einer 1 l Kultur wurde in 400 ml TES [10 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 20% (w/v) Saccharose] vorsichtig resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder durch Zentrifugation für 15 min bei 4500 g und 4°C sedimentiert, in 20 ml eiskalter 5 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation für 30 min bei 23000 g und 4°C konnte die

Periplasmafraktion (Überstand) von der Zytoplasma-/Membranfraktion (Pellet) getrennt werden. Das Pellet wurde erneut in 20 ml 5 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen, während die vollständig abgenommene Periplasmafraktion bis zur Affinitätschromatographie auf Eis gelagert wurde.

(B) Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

Das Zellpellet wurde in 30 ml (pro 1 l Kultur) Puffer W [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl] resuspendiert und mit 1 mM PMSF versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French*-Presse (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm²) in mehreren Durchgängen aufgeschlossen. Nach 20 min Zentrifugation bei 20200 g und 4°C in der Sorvall-Zentrifuge wurde der Überstand auf Eis gelagert.

2.8.1.3 Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand des Rohextraktes einer Ultrazentrifugation (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 dem BCA-Kit bestimmt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Die Solubilisierung der Membran erfolgte mit 1% n-Dodecyl-β-D-Maltosid für 1 h auf Eis. Nach der Solubilisierung schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 min bei 100000 g und 4°C an, um ungelöste Membranreste und Zelltrümmer zu pelletieren. Der klare Überstand mit solubilisiertem Membranprotein wurde bis zur Affinitätschromatographie auf Eis gelagert.

2.8.1.4 Chromatographische Methoden

A) Native Proteinreinigung mittels *Strep*Tactin-Chromatographie

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1-10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1-5 ml Säulenmaterial (*Strep*Tactin) gepackt und mit 2 Vol. Puffer W [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl] equilibriert. Die Fraktion mit solubilisiertem Membranprotein bzw. die Periplasmafraktion, welche das *Strep*-tag[®]II-Fusionsprotein enthielt, wurde anschließend auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 5 Vol. Puffer W [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl] entfernt. Das *Target*-Protein wurde mittels 3 Vol. Puffer E [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM Desthiobiotin] eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch Spülen mit 10 Vol. Puffer R [100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM HABA]

regeneriert und konnte nach der Äquilibration wiederverwendet werden. Das Protein wurde anschließend analysiert und für weitere Arbeiten verwendet.

B) Native Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie

Die entsprechende Periplasmafraktion wurde zunächst 1:1 mit Equilibrierungspuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol] versetzt und auf eine zuvor mit 5 Vol. Equilibrierungspuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol] gespülte Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1-10 ml, QIAGEN, Hilden) mit einem Matrixvolumen von 1-5 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 5 Vol. Waschpuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 20 mM Imidazol] gespült, bevor mit 5 Vol. Elutionspuffer [20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol] das Fusionsprotein eluiert wurde. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und anschließend analysiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.8.2.1 BCA-Test

Zu 50 µl Proteinlösung wurden 1 ml BCA-Lösung (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit*; Sigma GmbH, Osterode) 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.

2.8.2.2 Bradford-Proteinbestimmung

Nach dieser Proteinbestimmung (Bradford, 1976) 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 H₂O_{bidest} versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm mit dem Spektrophotometer (SmartSpecTM3000, BIORAD, München). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde.

2.8.2.3 Direkte Bestimmung am NanoDrop[®]ND-1000 Spektrophotometer

Zur genaueren Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine direkte spektroskopische Methode verwendet, bei der das spezifische Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins berücksichtigt werden.

Die theoretischen Extinktionskoeffizienten der denaturierten Proteine wurden mit Hilfe des Programms ProtParam des ExPASy-Systems bestimmt, welches mit nach (Pace *et al.*, 1995) korrigierten Extinktionskoeffizienten rechnet. Um Extinktionskoeffizienten von nativen Proteinen zu erhalten, wurde nach (Gill und von Hippel, 1989) die Extinktion des jeweiligen Proteins sowohl unter denaturierenden Bedingungen (4 – 6 M Guanidiniumchlorid, 20 mM K-phosphat pH 6.5) als auch im Messpuffer an einem UV/VIS Spektrophotometer 930 (UVIKON 930, Tresser Instruments/Kontron, Groß-Zimmern) bestimmt. Es wurden folgende Werte berechnet und für die Proteinbestimmung am NanoDrop[®]ND-1000 Spektrophotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet:

$\epsilon_{280}(\text{Strep-FetM}_{Loop})$	$49440 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{280}(\text{FetM}_{Loop})$	$46470 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{280}(\text{FetP-His})$	$36380 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{280}(\text{FetP})$	$30400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.8.3 Chloroform-Methanol-Fällung

Salzhaltige Proteinlösungen wurden mit Chloroform-Methanol gefällt (Wessel und Flugge, 1984). Eine Proteinlösung von 100 μl wurde mit 400 μl Methanol und 100 μl Chloroform versetzt und gemischt. Dazu wurden 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gegeben, nochmals gemischt und der Ansatz für 5 min bei 8000 x g in einer Sigma-Laborzentrifuge (Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgehoben und verworfen. Die untere Phase und Interphase wurden mit 300 μl Methanol versetzt, vorsichtig geschwenkt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das ausgefallenen Protein luftgetrocknet.

2.8.4 Dialyse

Die Dialyse von Proteinen erfolgte in Dialyseschläuchen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gegen das 50- bis 100fache Volumen der Proteinsuspension. Die Dauer wurde in Abhängigkeit vom Verwendungszweck des Proteins und Konzentrationsunterschieden zwischen beiden Lösungen festgelegt und lag zwischen 3 und 16 h. Der Dialysepuffer wurde wenn notwendig erneuert.

2.8.5 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden im Dialyseschlauch, ggf. direkt im Anschluss an die Dialyse, auf festem trockenem PEG 20.000 auf das gewünschte Volumen konzentriert. Weiterhin konnten Proteinsuspensionen mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert 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 4500 g, 4°C zentrifugiert bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war. Zur Lagerung wurde die Säule mit 70%igem Ethanol gespült und anschließend in 20%igem Ethanol gelagert.

2.8.6 Faktor Xa und Thrombin Proteaseverdau

2.8.6.1 Abspaltung des N-terminalen Strep-tag® II der FetM-Loop-Domäne

Für diesen Verdau wurde das *Factor Xa Protease System* von Qiagen GmbH (Hilden) verwendet. Zunächst wurde die FetM-Loop-Domäne als Strep-tag® II-Fusionsprotein über Nacht gegen Xa-Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 6.5, 50 mM NaCl, 1mM CaCl₂) dialysiert. Der dialysierten Proteinlösung wurde pro 1 mg FetM-Loop-Domäne 20 U Faktor Xa Protease (2 U/μl) zugegeben und für 16 h bei RT inkubiert. Um die Protease anschließend aus dem Ansatz zu entfernen, wurden pro 4 U Faktor Xa 100 μl einer 50 %igen *Xa-Removal-Resin* Suspension zum Reaktionsansatz gegeben und das Gemisch für 10 min bei RT rotierend inkubiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g und 4°C wurde der Überstand mit dem Protein von dem *Xa-Removal-Resin* getrennt. Mittels einer erneuten StrepTactin-Chromatographie wurde die FetM-Loop-Domäne im Durchfluss, getrennt von noch vorhandenen Strep-tag® II-Fusionsproteinen, gewonnen. Für nachfolgende Experimente wurde die Protein-Domäne auf die gewünschte Konzentration eingengt (2.8.5), mit 10 mM EDTA für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend gegen entsprechenden Reaktionspuffer dialysiert (2.8.4), um den Chelator zu entfernen.

2.8.6.2 Abspaltung des C-terminalen 6xHis-tag® von FetP

Hierfür wurde das *Thrombin Cleavage Capture Kit* der Firma Novagen (Darmstadt) verwendet. FetP-His₆-Fusionsprotein wurde dazu in den Thrombin-Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH8.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) dialysiert. Der dialysierten Proteinlösung wurde pro 1 mg FetP-His₆ 1 U biotinyliertes Thrombin (1 U/μl) zugegeben und für 16 h bei RT inkubiert. Um das Thrombin anschließend aus dem Ansatz zu entfernen,

wurden 32 µl einer 50%igen Streptavidin-Agarose zum Reaktionsansatz gegeben und das Gemisch für 30 min bei RT rotierend inkubiert. Über den Biotin-tag des Thrombins wurde dieses an die Streptavidin-Agarose gebunden und über Zentrifugationsfilter abgetrennt. Mittels einer erneuten Ni-NTA-Chromatographie wurde FetP im Durchfluss, separiert von noch vorhandenen *His*-tag[®]-Fusionsproteinen, gewonnen. Für nachfolgende Experimente wurde das Protein auf die gewünschte Konzentration eingengt (2.8.5), mit 10 mM EDTA für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend gegen entsprechenden Reaktionspuffer dialysiert (2.8.4), um den Chelator zu entfernen.

2.8.7 Elektrophoretische Methoden

2.8.7.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (*Mini-PROTEAN[®] Tetra Electrophoresis System*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden Glasplatten mit integrierten 7.5 mm *Spacern* verwendet.

A) 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) β-Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau (BPB)] gemischt und 5 min bei 95° denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) auf das Gel.

B) Proteinmarker

Um Aussagen über die Größe der im Gel analysierten Proteine treffen zu können, wurden Proteinmarker aufgetragen.

Dabei wurden folgende Marker verwendet: *Strep*-tag[®] Proteinmarker von IBA GmbH, Göttingen mit Proteinbanden der Größen 100, 60, 45, 30, 23.5 und 16 kDa und der Fermentas Marker *PageRuler[™] Prestained Protein Ladder Plus* (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit folgenden Proteingrößen 230, 130, 95, 72, 56, 36, 28, 17 und 11 kDa.

C) Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet.

<u>Trenngel:</u>	<u>12.5%</u>	<u>17.5%</u>
30% (w/v) Acrylamid/ 0.8% (w/v) Bisacrylamid Stammlösung		
1.88 M Tris/HCl pH 8.8	2.5 ml	3.5 ml
5 g/l SDS	1.2 ml	1.2 ml
H ₂ O _{bidest}	1.1 ml	0.1 ml
TEMED	5 µl	5 µl
10% (w/v) APS	30 µl	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 Trenngeles wurde das Wasser wieder entfernt und 1.5 ml Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das zur Formierung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde.

Sammelgel:

30% (w/v) Acrylamid/ 0.8% (w/v) Bisacylamid Stammlösung	0.33 ml
0.625 M Tris/HCl pH 6.8	0.4 ml
5 g/l SDS	0.4 ml
H ₂ O _{bidest}	0.87 ml
TEMED	2 µl
10% (w/v) APS	10 µl

Der Elektrodenpuffer [30.2 g/l, 144 g/l Glyzin, 10 g/l SDS] wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben. Das Gel wurde mittels Klemmen an der Kammer befestigt und der Kamm unter Puffer entnommen. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Stromstärke und 150-200 V durchgeführt.

2.8.7.2 Native PAGE

Um Proteine in ihrer nativen Form aufzutrennen, wurden nicht-denaturierende vertikale Gradientengele verwendet, bei denen kein SDS zugesetzt wurde. Das Trennungsprinzip beruht dabei hauptsächlich auf der Eigenladung der Proteine.

A) Probenvorbereitung

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 und mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufgetragen.

B) Native Gradienten-PAGE

Die native Auftrennung von Proteinen konnte mit dieser PAGE bewerkstelligt werden.

<u>Trenngel:</u>	<u>5.0%</u>	<u>13.5%</u>
49.5% (w/v) Acrylamid/		
1.5% (w/v) Bisacrylamid	0.212 ml	0.573 ml
150 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0,		
1.5 M ϵ -Aminocapronsäure	0.7 ml	0.7 ml
Glyzerin	0.14 ml	0.56 ml
H ₂ O bidest.	1.028 ml	0.247 ml
TEMED	2 μ l	2 μ l
10% (w/v) APS	5.5 μ l	5.5 μ l

Zur Herstellung des Gels wurde ein Gradientenmischer (MX 10, LTF Labortechnik, Wasserburg) verwendet. Das Trenngel wurde 2 h getrocknet. Anschließend wurde ein Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das zur Formierung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde. Diese wurde ebenfalls 2 h getrocknet.

<u>Sammelgel:</u>	<u>4%</u>
49.5% (w/v) Acrylamid/	
1.5% (w/v) Bisacrylamid	0.121 ml
150 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0,	
1.5 M ϵ -Aminocapronsäure	0.5 ml
Glyzerin	-
H ₂ O bidest.	0.86 ml
TEMED	3 μ l
10% (w/v) APS	8 μ l

Als Elektrodenpuffer diente 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 mit 0.1 M Glycin. Die Elektrophorese wurde bei 100 V und I_{\max} im Kühlraum über Nacht durchgeführt.

2.8.7.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Der Transfer der Proteine aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran (Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren) mittels *Semi-Dry-blot*. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für 5 min in Towbin-Puffer [25 mM Tris/HCl, 0.192 M Glyzin, 20% (v/v) Methanol] inkubiert. 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 weitere zwei 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/cm² Gelfläche, 15 V) für 30 min. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt und die Membran luftgetrocknet.

2.8.7.4 *Strep-tag*[®] II Detektionssystem

Der spezifische Nachweis *Strep-tag*[®] II-haltiger Proteine auf Nitrocellulose-Membranen erfolgte mittels *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen).

Die Blot-Membran (56 cm²) wurde in 20 ml Blockingpuffer [1 x PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 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*[®]-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, 50 µl Luminol (3-Aminophthalhydrazid, gelöst in DMSO) und 22 µl p-Cumarsäure (gelöst in DMSO)] und Lösung B (5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 4 µl 30% H₂O₂) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen Folie gelegt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm[™] ECL, Amersham Biosciences, UK) für einige Minuten exponiert.

2.8.7.5 His-tag[®]-Detektionssystem

Dieser Nachweis beruht auf der Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären AK an diesen Komplex. Eine an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase ermöglicht den Nachweis der gebildeten Immunokomplexe durch eine Lichtreaktion.

Die Nitrocellulosemembran mit den transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen in 20 ml Blockingpuffer [1 x PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl) mit 5% Magermilchpulver] für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Membran, 3 x 5 min in PBS-Puffer mit 0.1% (v/v) Tween 20, wurde 20 ml PBS-Puffer mit 0.5% BSA und 0.02% (w/v) Na-azid hinzugegeben, in welchem der primäre AK, Anti-His-Epitope-Tag (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen), 1:2500 verdünnt wurde. In dieser Lösung wurde die Membran für eine Stunde bei RT schwenkend inkubiert, welche zur mehrmaligen Verwendung bei 4°C aufbewahrt wurde. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Dann wurde die Membran 1 h mit dem Goat Anti-Rabbit IgG-HRP-Konjugat (BIORAD, München) inkubiert, welches 1:2000 in PBS-Puffer mit 0.5% BSA verdünnt wurde. Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Zum Nachweis der gebildeten Immunokomplexe wurde die Membran einige Minuten in Lösung A [5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 µl Luminol (3-Aminophtalhydrazid, gelöst in DMSO) und 22 µl p-Cumarsäure (gelöst in DMSO)] und Lösung B (5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 4 µl 30% H₂O₂) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen Folie gelegt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm[™] ECL, Amersham Biosciences, UK) für einige Minuten exponiert.

2.8.7.6 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau

Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden 1 h 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 H₂O_{bidest}) inkubiert (Weber und Osborn, 1969). Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärberlösung (40% Ethanol, 7.5% Essigsäure). Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O_{bidest} aufbewahrt.

2.8.7.7 Far-Western-Blot

Ausgehend vom Standard Western Blot wurde diese Methode entwickelt (Wu *et al.*, 2007), um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachzuweisen. Eine mögliche Interaktion zwischen

FetP und des N-terminalen FetM-Loops sollte hiermit untersucht werden. Zunächst wurden jeweils 5 µg des so genannten *prey* Proteins FetP-His₆ in drei nativen Gradientengelen (5 – 13.5%) wie unter 2.8. 7.2 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen dienten jeweils 5 µg *Strep*-FetM-Loop und BSA. Eines der drei Gele wurde zum Nachweis aller Proteine wie unter 2.8.7.6 beschrieben mit Coomassie-Blau gefärbt. Nach dem Transfer der Proteine aus den zwei weiteren Polyacrylamid-Gelen auf zwei Nitrocellulose-Membranen (2.8.7.3) erfolgte der Nachweis des *prey* Proteins mit dem His-tag[®] Detektionssystem (2.8.7.5) auf einer der Membranen. Die zweite Membran wurde für die Interaktionsstudie verwendet, welche zur Absättigung unspezifischer Bindestellen in Blockingpuffer [1 x PBST-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) mit 5% Magermilchpulver] für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach dem Waschen der Membran für 5 min in 1 x PBST-Puffer wurde 5 ml Protein-Bindepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 0.1% (v/v) Tween 20, 2% Magermilchpulver, 1 mM DTT) hinzugegeben, welchem 100 µg des so genannten *bait* Proteins *Strep*-FetM-Loop zugesetzt wurden, das zuvor mit MnCl₂ für 30 min auf Eis inkubiert und daraufhin gegen Protein-Bindepuffer dialysiert wurde. In dieser Lösung wurde die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min in PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenes *bait* Protein zu entfernen. Der Nachweis einer Interaktion zwischen *prey* und *bait* Protein erfolgte durch die Detektion des *Strep*-tag[®] II mit dem unter 2.8.7.4 beschriebenen *Strep*-tag[®] II-Detektionssystem.

2.8.8 Analytik

2.8.8.1 Massenspektrometrie

Zur Größenbestimmung der gereinigten Proteine wurde die Massenspektrometrie verwendet. Die Messung wurde an einem MALDI-TOF Massenspektrometer (UltraflexII MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie, Bruker Daltonik GmbH, Bremen) von Frau Dr. A. Schierhorn am Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle durchgeführt.

2.8.8.2 *In-Source-Decay* (ISD) MALDI MS

Zur Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz wurde FetM über seinen C-terminalen *Strep*-tag[®] II aus der periplasmatischen Fraktion gereinigt und mit Chloroform-Methanol wie unter 2.8.3 beschrieben gefällt. Die N-terminale Sequenzierung mittels ISD MALDI MS (Mortz *et al.*, 2009) wurde von Frau Dr. A. Schierhorn am Institut für

Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle durchgeführt, wobei 1 µl einer Proteinlösung (30 pmol/µl) eingesetzt wurde.

2.8.8.3 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Durch diese Methode kann anhand des Sedimentationskoeffizienten und des Molekulargewichtes, das Oligomerisierungsverhalten eines Proteins analysiert werden (Schuster und Toedt, 1996). Der Sedimentationskoeffizient ergibt sich aus dem Quotienten von Sedimentationsgeschwindigkeit (v) und Zentrifugalbeschleunigung ($\omega^2 \times r$) und wird in Svedberg-Einheiten (S) angegeben. Dieser ist von den jeweiligen Puffereigenschaften und Temperatur abhängig, was einer Normalisierung bedarf.

FetP wurde bei einer Protomer-Konzentration von 17 µM in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 in Gegenwart von 100 mM bzw. 20 mM NaCl oder 100 µM ZnCl₂, CuCl₂, FeCl₃ bzw. ohne Zusatz bei 25°C in Doppel-Sektorzellen in einer analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) mit einem An50Ti Rotor zentrifugiert. Die Sedimentations-Equilibrierungs-Messung erfolgte bei 8000 rpm, während die Sedimentationsgeschwindigkeit bei 40000 rpm bestimmt wurde. Dazu wurde die Wanderung der sedimentierenden Grenzschicht zum Boden bei 280 nm verfolgt und mit der von Beckman zur Verfügung gestellten Software ausgewertet. Die Durchführung und quantitative Analyse der Experimente erfolgte durch Herrn Dr. Hauke Lilie am Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle.

2.8.8.4 Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)

Die AAS dient zum Nachweis von Metallionen, die an Proteine gebunden sind. Das Prinzip beruht darauf, das Licht verschiedener Wellenlängen mit einer bestimmten Intensität durch eine atomisierte Probe absorbiert wird 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, Mangan, Zink bzw. Kupfer bestimmen zu können, wurde eine Kalibrierungskurve für das entsprechende Metall erstellt. Aus der Menge an eingesetztem Protein und dem Messwert konnte dann das Verhältnis Protein:Metall bestimmt werden.

Probenvorbereitung:

Gereinigtes Protein mit einer Protomer-Konzentration von 7 µM wurde mit 10 mM EDTA behandelt. Der Überschuss an EDTA wurde durch Dialyse gegen 25 mM Tris/HCl pH7.2

über Nacht entfernt. Anschließend wurde das Protein mit jeweils 35 μM ZnCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , FeSO_4 mit 1 mM Ascorbat bzw. ohne Zusatz von Metallionen für 30 min auf Eis inkubiert. Der Überschuss an Metall wurde mit Hilfe von Vivaspin500-Konzentratoren (Sartorius AG, Göttingen) durch fünfmaliges Waschen mit 25 mM Tris/HCl pH7.2 entfernt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das Protein mit 0.5% HNO_3 (65%ig, Fluka, Fe-Gehalt: <0.000001%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 0.5% H_2O_2 (30%ig, Fluka, Fe-Gehalt: <0.00000003%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 5 min bei 95 °C angesäuert und mineralisiert. Danach wurden die Proben mit hochreinem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) auf 500 μl Endvolumen aufgefüllt und in der AAS (ZEEnit[®]600/650, Analytik Jena AG) vermessen. Proben ohne Protein wurden als Nullabgleich verwendet.

Probenanalyse:

Die Messung des Eisen-, Mangan-, Zink- oder Kupfergehaltes in den Proben erfolgte nach folgenden Parametern:

	Fe	Mn	Zn	Cu
<u>Optische Parameter</u>				
Wellenlänge	248.3 nm	279.5 nm	213.9 nm	324.8 nm
Spaltbreite	0.2 nm	0.2 nm	0.5 nm	1.2 nm
Lampen-Typ	M-HKL	M-HKL	M-HKL	M-HKL
HKL-Strom	6.0 mA	7.0 mA	4 mA	3 mA
Untergrund-Korrektur	Ein/3-Feld	Ein/2-Feld	Ein/3-Feld	Ein/3-Feld
Feldstärke	0.8 T/0.5 T	0.8 T	0.8 T/0.5 T	1.0 T/0.5 T
<u>Integrationsparameter</u>				
Integr.-art	Signal-A	Signal-A	Signal-A	Signal-A
Integr.-zeit	4.0 s	3.0 s	3.5 s	4.0 s
Verzögerungszeit	0	0	0	0
Messzyklen	3	3	3	3
<u>Ofen</u>				
Trocknungs-Temp.	85/95/110°C	85/95/110°C	90/105/110 °C	90/105/110 °C
Pyrolyse	1200 °C	800 °C	600 °C	1000 °C
Atomisieren	2200 °C	1900 °C	1500 °C	2250 °C
Heizrate	FP	1500 °C/s	500 °C/s	500 °C/s
Haltezeit	4.0 s	3.0 s	4.0 s	4.0 s

Probengeber

Typ/Teller	MPE60/89 Pos.	MPE60/89 Pos.	MPE60/89 Pos.	MPE60/89 Pos.
Arbeitsweise	kontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich
Injektion	20 µl/-0.9 mm	20 µl/-0.9 mm	20 µl/-0.9 mm	20 µl/-0.9 mm
Autom. Tiefenkorrektur	ein	ein	ein	ein
Verdünnung	bei Überschreit.	bei Überschreit.	bei Überschreit.	bei Überschreit.
Modifizier (5 µl)	0.1% Mg(NO ₃) ₂	-	0.1% Pb(NO ₃) ₂ 0.05% Mg(NO ₃) ₂	0.1% Pb(NO ₃) ₂ 0.05% Mg(NO ₃) ₂

Kalibration

Verfahren	Standard	Standard	Standard	Standard
Herstellen durch:	Verdünnen	Verdünnen	Verdünnen	Verdünnen
Kalibrierbereich:	0-100 µg/l	0-8 µg/l	0-10 µg/l	0-50 µg/l
Kall-0:	0	0	0	0
Stammllösung:	100 µg/l	8 µg/l	10 µg/l	50 µg/l
Bezugsfunktion:	linear	linear	linear	linear
Messzyklen:	3	3	3	3

2.8.8.5 Circular dichroismus (CD)

Bei der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht gemessen. Dazu ist es notwendig, dass die Probe chirale Moleküle enthält. Die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren ($\lambda = 250-190$ nm) erfolgte am Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle. Die Messungen wurden in einer 0.1 mm Quarzglasküvette an einem Jasco J-710 CD-Spektropolarimeter durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min, einer Empfindlichkeit von 100 mdeg und einer Auflösung von 0.5 nm. Es wurden jeweils 25 Spektren akkumuliert, gemittelt und anschließend durch Abzug des Pufferspektrums korrigiert. Es wurde FetP mit einer Dimerkonzentration von 25 µM in Gegenwart von jeweils 150 µM FeSO₄, FeCl₃, MnCl₂ CuCl₂ oder ZnCl₂ bzw. ohne Zusatz und FetM mit einer Konzentration von 15 µM in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 verwendet. Die Temperatur wurde bei allen Messungen konstant auf 25°C gehalten. Die molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure des jeweiligen Proteins wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta * 100 * MW}{c * d * NA}$$

Formel 2: $[\theta]_{MRW}$ = Molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), θ = gemessene Elliptizität (deg), MW = Molekulargewicht, c = Proteinkonzentration (mg/ml), d = Schichtdicke (cm), NA = Anzahl der Aminosäuren. Der Faktor 100 im Zähler entspringt der Umwandlung der molaren Konzentration in dmol/cm^3 -Einheiten.

2.8.8.6 Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)

Durch ITC kann die bei einer Protein-Ligand- bzw. Protein-Protein-Interaktion umgesetzte Wärme direkt quantitativ bestimmt werden. Da die Methode sehr empfindlich ist, wurden für die Messungen die jeweiligen Dialysepuffer (25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 oder 25 mM ACES/NaOH pH 7.2) verwendet, welche mit hochreinem Wasser (ROTISOLV® LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) hergestellt wurden. Das Protein wurde vor der Messung gegen den Puffer dialysiert, in welchem die Metallionen auf die entsprechende Konzentration verdünnt wurden. Alle Messungen erfolgten bei 25°C. Es wurden jeweils ca. 1.5 ml Proteinsuspension (3 – 17.15 µM FetP-Dimer) mit ca. 280 ml Proteinlösung (16 µM FetM-Loop) bzw. Metallionenstammlösung (205 – 1030 µM) titriert. Die Titration erfolgte in 14, 28 oder 56 Schritten zu je 20, 10 bzw. 5 µl. Die Auswertung erfolgte nach Pufferkorrektur mit dem Programm Microcal-Origin. Es wurde dabei ein Modell mit einer Bindestelle im Protein zugrundegelegt.

Für kompetitive Experimente zur Untersuchung der Metallionenverdrängung wurde das zu titrierende Protein zuvor mit den jeweils entsprechend anderen Metallionen inkubiert, wobei deren Konzentration so gewählt wurde, dass nach Formel 3 (Rauh, 2008) mindestens 90% der Proteine vor dem Titrationsexperiment gesättigt vorlagen.

$$[PK] = \frac{[P]_0 + [K]_0 + k_d}{2} - \sqrt{\frac{([P]_0 + [K]_0 + k_d)^2}{4} - [P]_0 * [K]_0}$$

Formel 3: [PK] = Konzentration des Protein-Kation-Komplexes, [P]₀ = Gesamtkonzentration des Proteins, [K]₀ = Gesamtkonzentration des Kations, k_d = Dissoziationskonstante des Protein-Kation-Komplexes.

2.8.8.7 Modifikation von Histidinen mittels Diethylpyrocarbonat

Um Histidin-Reste zu quantifizieren, die an der Metallbindung beteiligt sind, wurde die Methode der chemischen Modifikation durch Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet (Schiavo *et al.*, 1992). Für die Titrationsexperimente wurde FetP mit einer Protomer Konzentration von 3 µM in Reaktionspuffer (10 mM Na-phosphat pH8.0) eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Die Entstehung von Carbethoxyhistidinen wurde in einem UV/VIS Spektrophotometer 930 (UVIKON 930, Tresser Instruments/Kontron, Groß-Zimmern) bei 242 nm verfolgt. Um unspezifische Reaktionen mit anderen Aminosäuren zu verhindern, wurde DEPC im Verhältnis von 1:1 in Bezug auf die Menge an Histidinen eingesetzt. Die Titration wurde durchgeführt, bis es zu keiner weiteren Zunahme der Absorption kam. Neben einer unbehandelten Probe, wurden Proteinproben vermessen, die zuvor mit einem jeweils zehnfachen Überschuss an MnCl₂ oder

CuCl₂ inkubiert wurden. Zur Auswertung der gemessenen Absorption wurde das Lambert-Beersche-Gesetz verwendet ($\epsilon_{\text{Ethoxyl-His}} = 3200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$):

$$E = \epsilon * c * d$$

Formel 4: E = Extinktion, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($1 * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$), c = Konzentration ($\text{mol} * \text{l}^{-1}$), d = Schichtdicke (cm).

3 Ergebnisse

3.1 Das FetMP-System ist an der Eisen-Homöostase von *E. coli* beteiligt.

Um das FetMP-System aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm F11 charakterisieren zu können, wurde mit Hilfe des Mini-Transposons Mini-Tn7T eine Einzelkopie des dicistronischen *fetMP*-Operons mit dessen Promotor-Sequenz im Chromosom von *E. coli* Stamm W3110 inseriert. Aufgrund der Zugehörigkeit von FetM zur *Iron-Lead*-Transporter (ILT) Superfamilie wurden in W3110 die bekannten Eisenaufnahmesysteme (*fecA-E*, *feoABC*, *mntH*, *zupT*, *entC*) zuvor deletiert. Der resultierte Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) wurde in Wachstums-Endpunktbestimmungen eingesetzt, wobei der Stamm ECA611(*glmS-Gm*) als Negativkontrolle diente. In diesem Stamm wurde lediglich das Resistenzgen für Gentamicin (*Gm*) inseriert.

In Minimalmedium ohne zusätzliches Eisen konnte bei pH 7 nur der Eisen-spezifische Deletionsstamm mit dem *fetMP*-Operon wachsen, die Negativkontrolle ECA611(*glmS-Gm*) dagegen nicht (Abb. 5A). Dieser Effekt trat selbst unter erhöhter Eisenlimitation auf, welche durch den Zusatz von 1 μM des Chelators CDTA (trans-1.2-Diaminocyclohexan-N.N.N'.N'.N'-Tetraessigsäure) (Anderson und Morel, 1982) erzielt wurde (Abb. 5A).

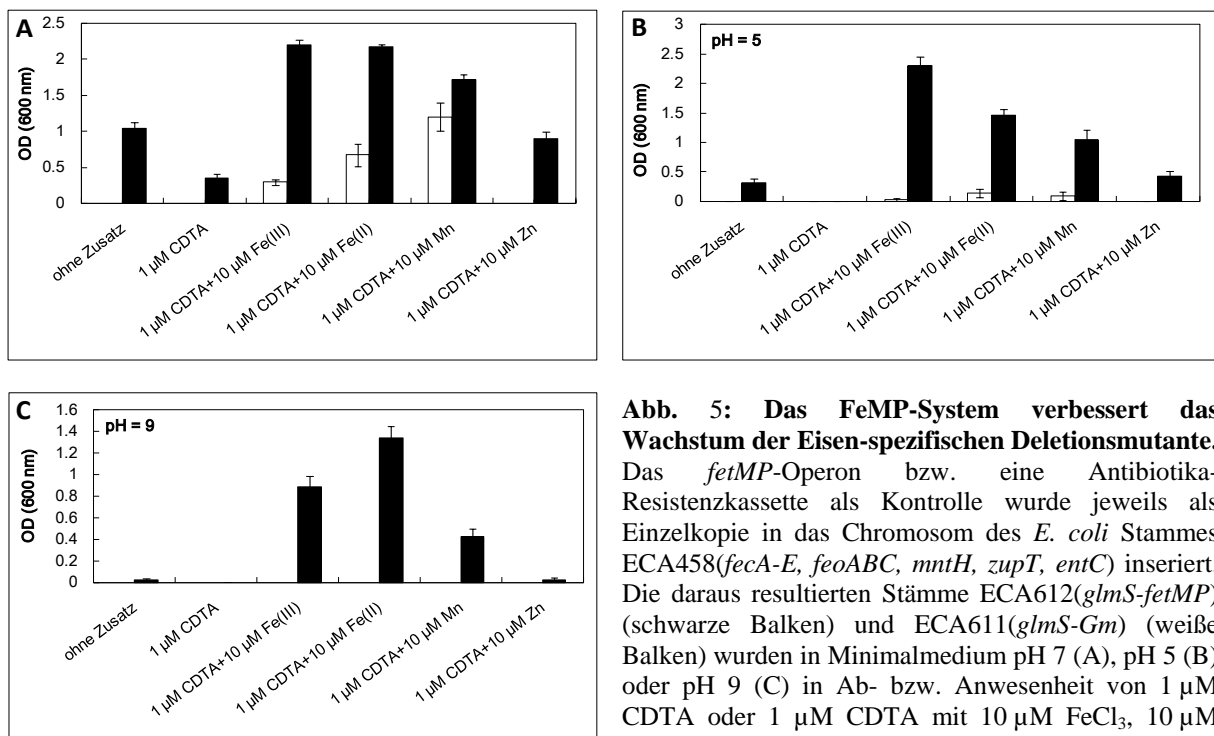


Abb. 5: Das FetMP-System verbessert das Wachstum der Eisen-spezifischen Deletionsmutante. Das *fetMP*-Operon bzw. eine Antibiotika-Resistenzkassette als Kontrolle wurde jeweils als Einzelkopie in das Chromosom des *E. coli* Stammes ECA458(*fecA-E*, *feoABC*, *mntH*, *zupT*, *entC*) inseriert. Die daraus resultierten Stämme ECA612(*glmS-fetMP*) (schwarze Balken) und ECA611(*glmS-Gm*) (weiße Balken) wurden in Minimalmedium pH 7 (A), pH 5 (B) oder pH 9 (C) in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 μM CDTA oder 1 μM CDTA mit 10 μM FeCl₃, 10 μM FeSO₄/1 mM Ascorbat, 10 μM MnCl₂ oder 10 μM ZnCl₂ bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Optische Dichte wurde nach 16 h (A) bzw. 20 h (B und C) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

ZnCl₂ bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Optische Dichte wurde nach 16 h (A) bzw. 20 h (B und C) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Wurden dem Medium neben CDTA geringe Konzentrationen an Fe(III), Fe(II) oder Mn(II) zugefügt, verbesserte es das Wachstum des *E. coli* Stammes ECA612(*glmS-fetMP*) erheblich, während der Kontrollstamm nur geringfügig vom zugesetzten Fe(III) bzw. Fe(II) profitierte (Abb. 5A). Demgegenüber war nur ein geringer Unterschied zwischen beiden Stämmen in Gegenwart von CDTA und Mn(II) zu verzeichnen (Abb. 5A), wobei das stark verbesserte Wachstum des *E. coli* Stammes ECA611(*glmS-Gm*) auf mindestens ein noch unbekanntes Mangan-/Eisenaufnahmesystem hindeutet, welches in der Eisen-spezifischen Deletionsmutante für den Import dieser Metallionen verantwortlich ist. In Anwesenheit von CDTA und Zn(II) glich das Wachstum beider Stämme denen, die nicht mit CDTA behandelt wurden (Abb. 5A), was möglicherweise auf eine kompetitive Freigabe von Eisenionen des Chelators zurückzuführen ist.

Auch unter sauren (pH 5) oder basischen (pH 9) Bedingungen (Abb. 5B, C) verhalf das FetMP-System der Eisen-spezifischen Deletionsmutante zum Wachstum in Minimalmedium ohne zusätzlichem Eisen, während der *E. coli* Stamm ECA611(*glmS-Gm*) nicht wachsen konnte. Bei Zusatz von CDTA war jedoch auch für den Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) kein Wachstum bei pH 5 bzw. pH 9 (Abb. 5B, C) zu verzeichnen. Erst durch die Kombination aus Chelator und Fe(III) bzw. Fe(II) wurde ein verbessertes Wachstum der Mutante mit dem *fetMP*-Operon im Vergleich zum Kontrollstamm erzielt (Abb. 5B, C). Ausgehend davon resultierte der Zusatz von Mn(II) neben CDTA in einem leicht verbesserten Wachstum des *E. coli* Stammes ECA612(*glms-fetMP*) (Abb. 5B, C). In Ab- bzw. Anwesenheit von CDTA mit Zn(II) war ein ähnliches Wachstumsverhalten jeweils beider Stämme auch unter sauren bzw. basischen Bedingungen zu beobachten (Abb. 5B, C). Demnach wurde der Wachstumsvorteil der *E. coli* Deletionsmutante durch das FetMP-System in Gegenwart von Eisen am Stärksten verbessert. Die Experimente wurden mit anderen Metallen (Cu(II), Co(II), Cd (II) und Ni(II)) ebenso durchgeführt, wobei sich der *E. coli* Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) jeweils ähnlich wie in Gegenwart von CDTA mit Zn(II) verhielt (Daten nicht gezeigt).

Diese Resultate zeigten, dass das FetMP-System unter neutralen aber auch sauren bzw. basischen Bedingungen als Eisenaufnahmesystem fungiert, wobei Mn(II) ebenfalls transportiert worden sein könnte, andere zweiwertige Ionen den Transport jedoch nicht hemmten.

3.2 Der Eisen-Regulator Fur kontrolliert die Expression von *fetMP*.

In silico Analysen wiesen stromaufwärts des *fetMP*-Operons auf eine mögliche Bindestelle (Fur-Box) für den globalen Repressor der Eisen-Homöostase Fur (Escolar *et al.*, 1998, Andrews *et al.*, 2003) hin. Demnach würde in Gegenwart von hohen Eisenkonzentrationen das Fur-Protein als Homodimer mit Fe^{2+} als Korepressor an die 19 bp Palindrom-Sequenz stromaufwärts von *fetM* binden (Abb. 6) und die Transkription von *fetMP* reprimieren.

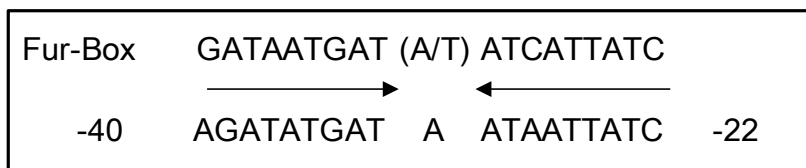


Abb. 6: Putative Bindestelle für den Eisen-Regulator Fur (Fur-Box).

Die Fur-Bindestelle weist sich als palindromische 19 bp-Konsensussequenz aus (oben), die nicht vollständig konserviert, 40 bp stromaufwärts des annotierten *fetMP*-Operons vorliegt (unten).

Um eine mögliche Regulation der *fetMP*-Expression durch Fur zu bestimmen, wurde ein Fur –Titrationssassay (FURTA) durchgeführt. Hierfür wurde der *E. coli* Stamm H1717, der eine *fhuF-lacZ*-Fusion aufweist und dessen Expression Fur abhängig reguliert wird, jeweils mit den *high-copy number* Vektoren pECD1097(pGEM::*fetM_p*), pECD967(pGEM::*fhuF_p*) als Positivkontrolle bzw. dem Leervektor als Negativkontrolle transformiert. Anschließend wurden die resultierten H1717 Derivate auf MacConkey Laktose-Agar mit 30 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ausgestrichen.

Es zeigte sich, dass die drei unabhängigen Klone (1, 2, 3) des H1717-Stammes mit pECD1097(pGEM::*fetM_p*) den umgebenen Agar rot färbten, was auch bei dem H1717-Kontrollstamm mit dem Vektor pECD967(pGEM::*fhuF_p*) (+) zu beobachten war (Abb. 7).



Abb. 7: Nachweis der eisenabhängigen Regulation des *fetMP*-Operons mittels Fur-Titrationssassay.

Vorkulturen der *E. coli* Zellen mit einer *fhuF-lacZ*-Fusion und dem Vektor pGEM[®]-T-Easy mit dem *fetM*-Promotor (1, 2, 3 unabhängige Klone), dem *fhuF*-Promotor als Positivkontrolle (+) bzw. ohne Promotor als Negativkontrolle (-) wurden auf MacConkey Laktose-Agar mit 30 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurde eine Fur-Box in den Vektor pGEM[®]-T-Easy kloniert, wird der Fur-Repressor vom Promotor der *fhuF-lacZ*-Fusion wegtriiert, sodass β -Galaktosidase produziert und die im Medium vorhandene Laktose von den Zellen verwertet werden kann. Dies ist durch eine Rotfärbung des MacConkey-Agars zu beobachten.

Dies war darauf zurückzuführen, dass der Fur Repressor vom chromosomalen *fhuF-lacZ*-Promotor wegtitriert wurde, was bei der Negativkontrolle mit dem H1717-Stamm und dem Leervektor (-) nicht zu beobachten war (Abb. 7). Somit konnte gezeigt werden, dass die putative Fur-Box stromaufwärts des *fetMP*-Operons funktionell war und die Expression der *fet*-Gene eisenabhängig durch Fur reguliert wurde.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden *fetM_p-lacZ* Reporter-gen-Fusionen als Einzelkopie mit dem Mini-Transposon Mini-Tn7T in das jeweilige Chromosom von *E. coli* W3110(Δ *lacZYA*) und F11 inseriert. Die Insertionsmutanten wurden in Minimalmedium ohne Eisen bei verschiedenen pH Werten mit 50 μ M des Chelators 2,2'-Dipyridyl (DIP) (Pugsley und Reeves, 1976), 10 μ M FeCl₃ oder 10 μ M FeSO₄/1mM Ascorbat inkubiert und anschließend die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt. Vergleich man die Aktivitäten, welche aus den Zellen des *E. coli* Stammes W3110(Δ *lacZYA*, *glmS-fetM_p-lacZ*) resultierten, wurde ersichtlich, dass die maximale Induktion in Gegenwart von 50 μ M DIP bei pH 6.5 auftrat (Abb. 8A), wobei die relativ geringen Aktivitäten aufgrund der noch vorhandenen bekannten Eisenaufnahmesysteme (*fecA-E*, *feoABC*, *mntH*, *zupT*, *entC*) in den Zellen den Erwartungen entsprachen. In Gegenwart von FeCl₃ blieb die Expression über den gesamten pH-Bereich niedrig und konstitutiv (Abb. 8A). Die eisenabhängige Regulation sollte ebenfalls in dem natürlichen *E. coli* Wirt F11 mit der Reporter-gen-Fusion bei verschiedenen pH Werten überprüft werden. Die ermittelten β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abbildung 8B dargestellt. Erneut konnte eine maximale Induktion bei pH 6.5 unter Eisenmangel bestimmt werden, was die vorangegangenen Resultate bestätigte. Eine pH-unabhängige, niedrig-konstitutive Expression wurde bei Eisenüberschuss ebenfalls beobachtet.

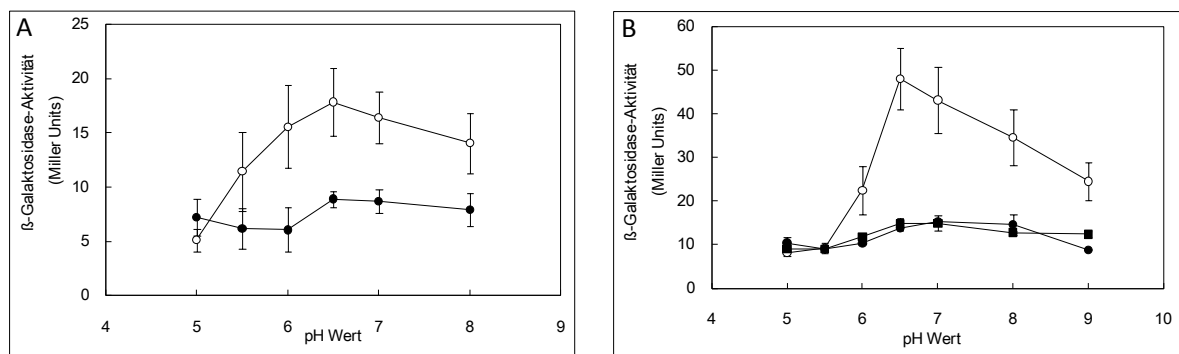


Abb. 8: Expression von *fetM_p-lacZ* in *E. coli* W3110(Δ *lacZYA*)(A) und F11 (B).

Die *fetM_p-lacZ* Reporter-gen-Fusion wurde als Einzelkopie in das jeweilige Chromosom von *E. coli* W3110(Δ *lacZYA*) oder F11 inseriert. Die Zellen wurden in Minimalmedium (pH 5-9) mit 50 μ M DIP (○), 10 μ M FeCl₃ (●) oder 10 μ M FeSO₄/1 mM Ascorbat (■) inkubiert und die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Die Regulierung der *fetMP*-Expression wurde auch auf RNA-Ebene überprüft. Dazu wurden die beiden Stämme ECA612(*glmS-fetMP*) und ECA611(*glmS-Gm*) als Negativkontrolle für den Sandwich-Hybridisierungs-Assay eingesetzt und die jeweiligen mRNA-Transkripte von *fetP* pro Zelle bestimmt. In Minimalmedium ohne Eisen pH 7 konnten für den *E. coli* Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) 70 *fetP*-spezifische mRNA-Transkripte pro Zelle ermittelt werden (Abb. 9), womit eine Induktion der *fetMP*-Expression unter Eisenmangel bestätigt werden konnte. Wurde den Kulturen 100 μM FeCl_3 nach 5 min zugesetzt, fiel die Anzahl der *fetP*-mRNAs innerhalb von 20 min auf ca. 5 Kopien pro Zelle (Abb. 9), was einer Halbwertszeit des Transkripts von 5 min (Regressionskoeffizient 99.1%) entsprach. Dieses Ergebnis ging mit der eisenabhängigen Fur-Regulation des *fetMP*-Operons einher (Abb. 7). Um die Zellen erneut unter Eisenlimitation zu setzen, wurde den Kulturen nach 20 min 200 μM CDTA-Chelator hinzugegeben. Daraus resultierte ein langsamer Anstieg der *fetP*-spezifischen mRNA-Transkripte pro Zelle (Abb. 9), wobei die ursprünglichen 70 Kopien pro Zelle nicht erreicht wurden. Dies war wahrscheinlich auf Eisenspeicherung in den Zellen nach vorherigem Zusatz von 100 μM FeCl_3 zurückzuführen. Für den Kontrollstamm ECA611(*glmS-Gm*) wurde unter gleichen Bedingungen kein *fetP*-spezifisches Transkript ermittelt (Abb. 9). Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse eine eisenabhängige Regulation der *fetMP*-Expression durch Fur.

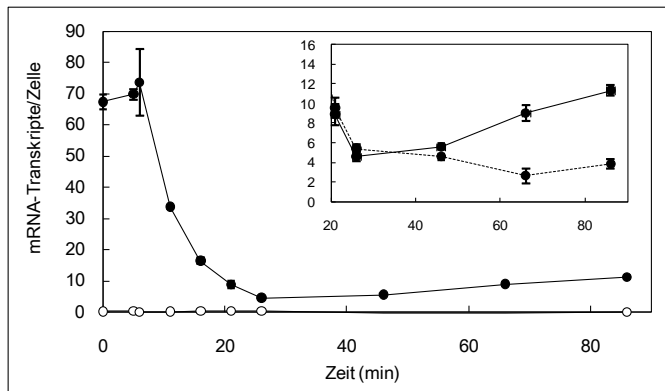


Abb. 9: Eisenabhängige *fetMP*-Expression.

Die beiden *E. coli* Stämme ECA612(*glmS-fetMP*) (●) und ECA611(*glmS-Gm*) (○) wurden in Minimalmedium ohne Eisen pH 7 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach 5 min wurden 100 μM FeCl_3 (Pfeil) zugegeben. Nach 20 min (Pfeil) wurde die Kultur des Stammes ECA612(*glmS-fetMP*) geteilt und ohne weiteren Zusatz (--) bzw. mit 200 μM CDTA (→) für weitere 70 min inkubiert. Die Zellen wurden zeitabhängig geerntet und die *fetP*-mRNA Transkripte pro Zelle mittels Sandwich-Hybridisierungs-Assay bestimmt. Die mRNA-

Transkripte/Zelle von ECA612(*glmS-fetMP*) nach CDTA Zusatz bzw. ohne Zusatz sind im Nebenbild vergrößert gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

3.3 FetM verbessert als Eisen-Importer das Wachstum der Eisenaufnahmemutante.

In zeitabhängigen Wachstumsversuchen sollte der Einfluss der jeweiligen Einzelgene des *fetMP*-Operons auf das Wachstum von ECA458($\Delta entC \Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zupT$) in Gegenwart von Eisenmangel untersucht werden. Dazu wurden die Gene *fetM* und *fetP* jeweils mit dem *fetM*-Promotor als Einzelkopie mit dem Mini-Transposon Mini-Tn7T stromabwärts des *glmS*-Gens im Chromosom von *E. coli* ECA458 inseriert. Das Wachstum der resultierten Stämme ECA613(*glmS-fetM*) und ECA614(*glmS-fetP*) wurden vergleichend mit ECA612(*glmS-fetMP*) und ECA611(*glmS-Gm*) in Minimalmedium ohne Eisen pH 7 mit 1 μ M CDTA als Chelator für 22 h bei 37°C bestimmt (Abb. 10).

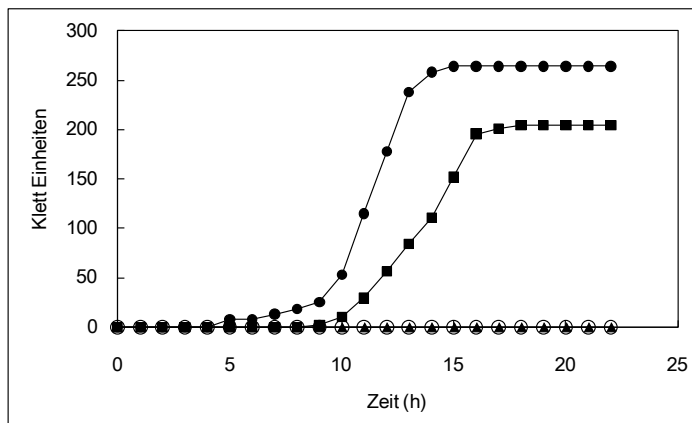


Abb. 10: FetM ist für das Wachstum von ECA612(*glmS-fetMP*) unter Eisenmangel essentiell.

Die *E. coli* Stämme ECA611(*glmS-Gm*), ECA612(*glmS-fetMP*), ECA613(*glmS-fetM*) und ECA614(*glmS-fetP*) wurden in Minimalmedium ohne Eisen pH 7 mit 1 μ M CDTA schüttelnd bei 37°C kultiviert und das Wachstum für 22 h als Zelltrübung in Klett-Einheiten ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Messungen.

Stamm ECA611(*glmS-Gm*) konnte unter den gewählten Bedingungen nicht wachsen (Abb. 10), wohingegen ohne Chelator ein Wachstum nach 12 h zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt). Jedoch erreichte der Stamm in der stationären Phase nur 150 Klett-Einheiten, was durch Zusatz von 10 μ M FeCl₃ nochmals erhöht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber verbesserte das FetMP-System das Wachstum der Eisenaufnahmemutante unter Eisenmangel erheblich. Der Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) begann bereits nach 5 h zu wachsen und erreichte mit 264 Klett nach 15 h die stationäre Phase (Abb. 10). Die Expression von *fetP* allein im Stamm ECA614(*glmS-fetP*) hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Eisen-spezifischen Deletionsmutante unter Eisenmangel (Abb. 10), während die *fetM*-Expression zu einem verzögerten Wachstum des Stammes ECA613(*glmS-fetM*) nach 10 h unter den gewählten Bedingungen führte (Abb. 10). Dabei erreichten die Zellen in der stationären Phase jedoch nur 204 Klett-Einheiten. Somit war FetM für das Wachstum des *E. coli* Stammes ECA612(*glmS-fetMP*) unter Eisenmangel essentiell, wobei eine Wachstumsverbesserung durch zusätzliche Expression von *fetP* erreicht wurde.

Mittels *Reverse transcriptase*-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) wurde als Kontrolle überprüft, ob die jeweiligen Einzelgene *fetM* bzw. *fetP* in den verwendeten Stämmen unter den gewählten Bedingungen tatsächlich exprimiert wurden. Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen der Stämme ECA611(*glmS-Gm*), ECA612(*glmS-fetMP*), ECA613(*glmS-fetM*) und ECA614(*glmS-fetP*) isoliert, die dann mit *random* Primern in cDNA umgeschrieben wurden. Mit genspezifischen Primern wurden anschließend *fetM* und *fetP* in PCR-Reaktionen amplifiziert, wobei die cDNAs als *Template* eingesetzt wurden. Durch die Detektion von *fetM*-spezifischen PCR-Produkten mit einer jeweiligen Größe von 314 bp (Abb. 11A) konnte nachgewiesen werden, dass das Gen unter den gewählten Bedingungen in den Stämmen ECA613(*glmS-fetM*) und ECA612(*glmS-fetMP*) exprimiert wurde. Eine erfolgreiche *fetP*-Expression in den Stämmen ECA614(*glmS-fetP*) und ECA612(*glmS-fetMP*) wurde durch den Nachweis eines *fetP*-spezifischen 234 bp großen Fragmentes bestätigt (Abb. 11B).

Darüber hinaus wurde mit einem *fetM*-spezifischen *down* Primer und einem *fetP*-spezifischen *up* Primer für den Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) ein 1636 bp großes PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 11C). Damit wurde der Nachweis erbracht, dass die Gene *fetM* und *fetP* tatsächlich als ein Operon kodiert vorlagen.

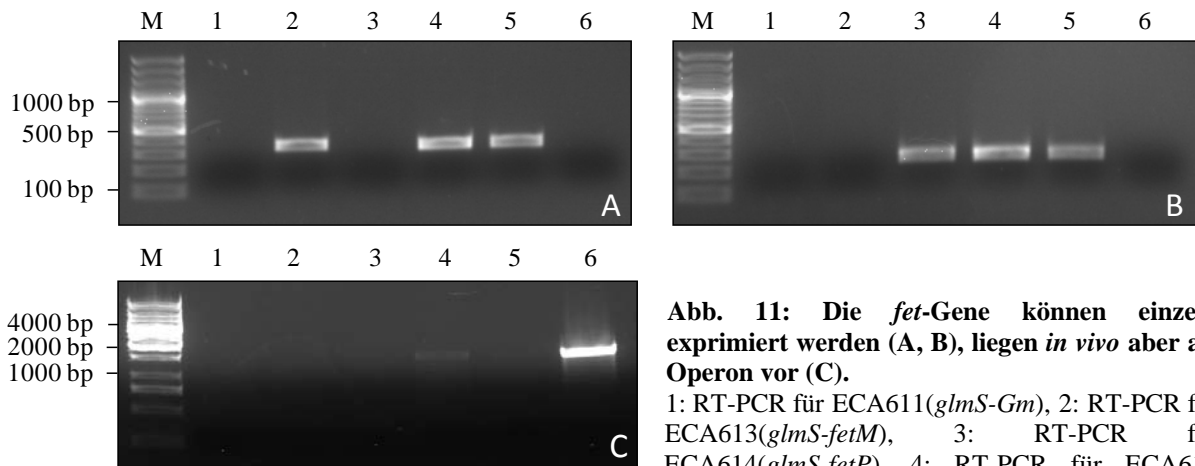


Abb. 11: Die *fet*-Gene können einzeln exprimiert werden (A, B), liegen *in vivo* aber als Operon vor (C).

1: RT-PCR für ECA611(*glmS-Gm*), 2: RT-PCR für ECA613(*glmS-fetM*), 3: RT-PCR für ECA614(*glmS-fetP*), 4: RT-PCR für ECA612(*glmS-fetMP*), 5: Positivkontrolle der PCR mit DNA aus *E. coli* Stamm F11, 6: Negativkontrolle der PCR ohne *Template*, [bei (C): 5 und 6 vertauscht]. M: *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* (MBI) (A, B), *Gene Ruler* 1 kb DNA *Ladder* (MBI) (C). Je 10 μ l PCR-Produkt wurden in 1 – 2.5%igen Agarosegelen aufgetrennt. (A): Nachweis der *fetM*-Expression. (B): Nachweis der *fetP*-Expression. (C) Nachweis eines gemeinsamen Transkripts von *fetM* und *fetP*.

Im Hinblick auf FetMP als putatives Eisenaufnahmesystem sollte unter anaeroben Bedingungen ein möglicher Unterschied im Wachstum der Stämme in Abhängigkeit von Fe(II) bzw. Fe(III) untersucht werden. Dazu wurden die Stämme ECA611(*glmS-Gm*), ECA612(*glmS-fetMP*), ECA613(*glmS-fetM*) und ECA614(*glmS-fetP*) in anaeroben

Wachstums-Endpunktbestimmungen eingesetzt. Hierbei zeigte sich erneut, dass ohne Zusatz von Eisen das Wachstum der Eisenaufnahmemutante ECA458($\Delta entC \Delta fecA-E \Delta feoABC \Delta mntH \Delta zurT$) durch das FetMP-System erheblich verbessert wurde (Abb. 12), während der Stamm ECA611(*glms-Gm*) wegen mindestens noch einem unbekanntem Eisenaufnahmesystem ebenfalls wachsen konnte. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten der Stämme ECA611(*glms-Gm*), ECA613(*glmS-fetM*) und ECA614(*glmS-fetP*) war dabei nicht festzustellen (Abb. 12). Erstaunlicherweise war in Gegenwart von $Fe(II)SO_4$ bzw. $Fe(III)Cl_3$ ein vermindertes Wachstum von ECA614(*glmS-fetP*) gegenüber der Negativkontrolle ECA611(*glms-Gm*) zu beobachten (Abb. 12), während sich der Stamm ECA613(*glmS-fetM*) im Wachstum dem von ECA612(*glmS-fetMP*) annäherte. Auffällig war dabei, dass in Gegenwart von $100 \mu M Fe(II)SO_4$ beide Stämme eine ähnliche Optische Dichte nach 17 h Inkubation bei $37^\circ C$ erreichten (Abb. 12A). Handelte es sich jedoch um $100 \mu M Fe(III)Cl_3$, so erhöhte FetP das Wachstum von ECA612(*glmS-fetMP*) im Vergleich zu Stamm ECA613(*glmS-fetM*) um einen Faktor von 1.35 ± 0.02 (T-Test $p > 0.999$), was sich in einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Kulturen widerspiegelte (Abb. 12B). Dies deutete darauf hin, dass FetP in Gegenwart von niedrigen Eisenkonzentrationen und bei hohen $Fe(III)$ -Konzentrationen für ein maximal verbessertes Wachstum nötig war.

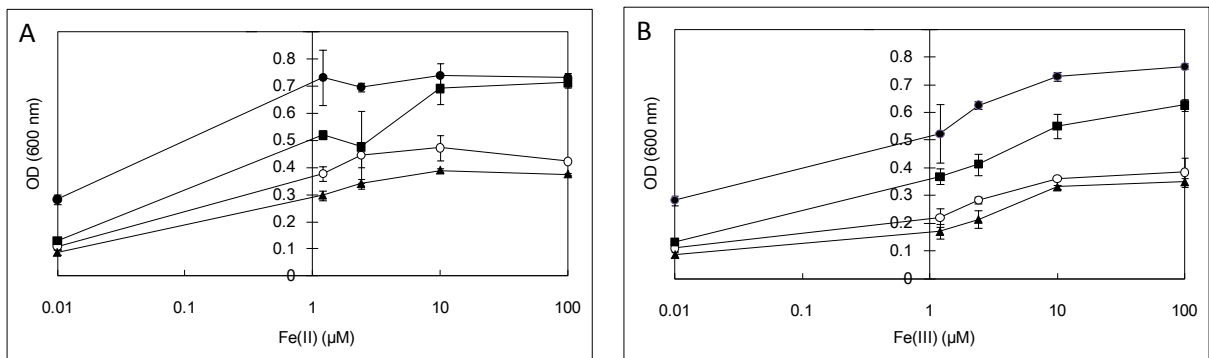


Abb. 12: Anaerob verbessert FetMP das Wachstum der Eisenaufnahmemutante.

Die *E. coli* Stämme ECA611(*glms-Gm*) (○), ECA612 (*glmS-fetMP*) (◆), ECA613 (*glmS-fetM*) (■) und ECA614(*glmS-fetP*) (▲) wurden in Minimalmedium mit 0.2% Glukose für 17 h bei $37^\circ C$ anaerob kultiviert und die jeweiligen Optischen Dichten bei 600 nm bestimmt. Dabei wurden dem Medium steigende Konzentrationen an $FeSO_4$ (A) bzw. $FeCl_3$ (B) zugesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Zur abschließenden Bestätigung der Funktion von FetMP als Eisenaufnahmesystem wurden Transportstudien mit radioaktivem Eisen durchgeführt. Da in Minimalmedium pH 7 zwischen den beiden Stämmen ECA611(*glms-Gm*) und ECA612(*glmS-fetMP*) kein Unterschied in der Eisenaufnahme zu beobachten war (Daten nicht gezeigt), wurden die jeweiligen Einzelgene bzw. das *fetMP*-Operon jeweils ohne Promotor-Region in den Vektor pASK-IBA3 (IBA-

GmbH, Göttingen) kloniert und die erzeugten Vektoren anschließend in die Eisenaufnahmemutante transformiert. Die Expression der Gene wurde mit Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Hierbei konnte eine gesteigerte Akkumulation an ^{55}Fe um einen Faktor von 2.8 ± 0.1 durch die Expression von *fetMP* in den Zellen innerhalb von 10 min gemessen werden (Abb. 13A), wobei die Expression von *fetM* allein die Eisenaufnahme bereits um einen Faktor von 1.7 ± 0.25 erhöhte (Abb. 13A). Daher ist FetM ein Eisenaufnahmetransporter. Die Expression von *fetP* allein hatte keinen Einfluss (Abb. 13A), die Expression von *fetP* zusätzlich zu *fetM* resultierte jedoch in einer erhöhten Eisenaufnahme der Zellen.

Unter sauren bzw. basischen Bedingungen konnte im Vergleich zum Kontrollstamm ECA611(*glmS-Gm*) in den Zellen von Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) ebenfalls eine erhöhte Eisenakkumulation nachgewiesen werden (Abb. 13B, C). Auch hierfür war FetM essentiell und konnte durch FetP noch gesteigert werden (Abb. 13B, C). Unabhängig vom pH Wert nahmen die Zellen mit dem FetMP-System etwa doppelt so viel Eisen als die jeweiligen Kontrollstämme auf.

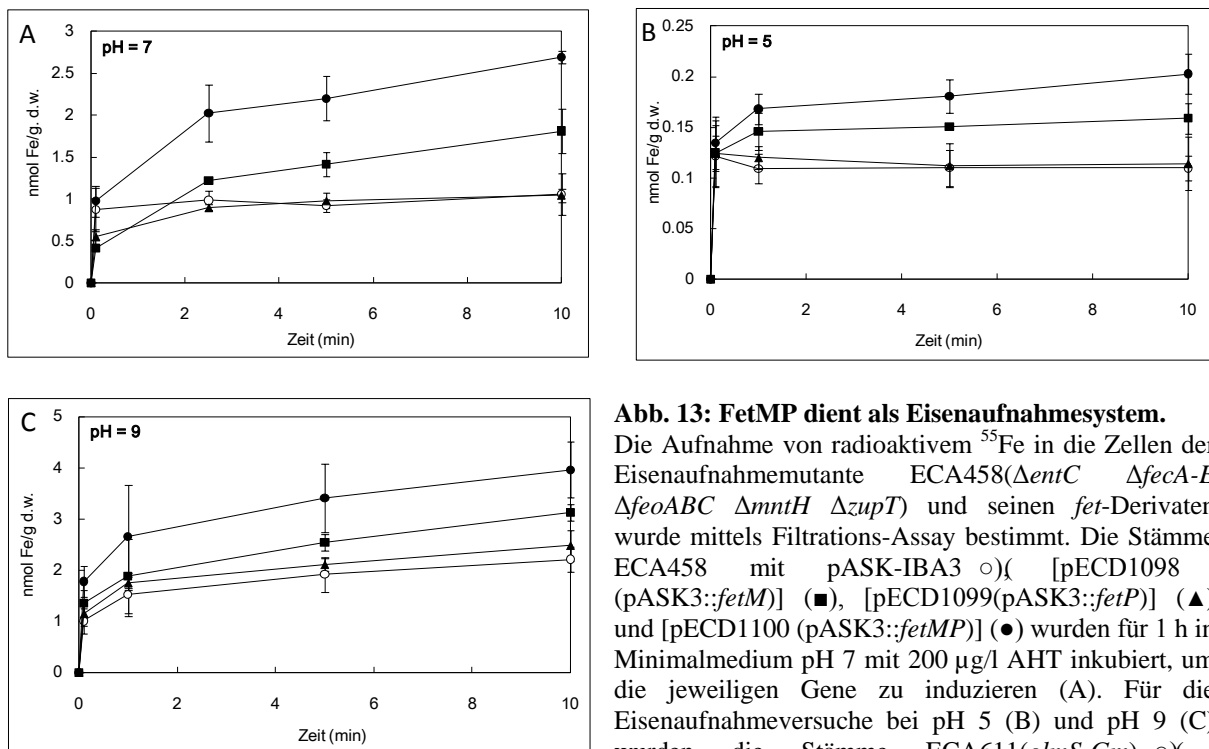


Abb. 13: FetMP dient als Eisenaufnahmesystem.

Die Aufnahme von radioaktivem ^{55}Fe in die Zellen der Eisenaufnahmemutante ECA458($\Delta\text{entC } \Delta\text{fecA-E } \Delta\text{feoABC } \Delta\text{mntH } \Delta\text{zupT}$) und seinen *fet*-Derivaten wurde mittels Filtrations-Assay bestimmt. Die Stämme ECA458 mit pASK-IBA3 (○) ([pECD1098 (pASK3::*fetM*)] (■), [pECD1099(pASK3::*fetP*)] (▲) und [pECD1100 (pASK3::*fetMP*)] (●) wurden für 1 h in Minimalmedium pH 7 mit 200 $\mu\text{g/l}$ AHT inkubiert, um die jeweiligen Gene zu induzieren (A). Für die Eisenaufnahmeversuche bei pH 5 (B) und pH 9 (C) wurden die Stämme ECA611(*glmS-Gm*) (○),

ECA612(*glmS-fetMP*) (●), ECA613(*glmS-fetM*) (■) und ECA614(*glmS-fetP*) (▲) in Minimalmedium inkubiert. Zum Start der Transportstudien wurde den Kulturen 5 μM $^{55}\text{FeCl}_3$ mit 1 mM Ascorbat zugesetzt und nach definierten Zeitpunkten Proben genommen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

3.4 FetP bindet als Homodimer Metallionen im Periplasma.

Im Folgenden wurde der Fokus auf die Charakterisierung von FetP gelegt, um die Funktion dieses Proteins als Teil eines Eisenaufnahmesystems aufzuklären.

Zunächst wurde mit dem Programm *Expasy* des *Expasy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz) anhand des *fetP*-Leserahmens ein Molekulargewicht von 19.224 kDa für das FetP-Protein errechnet, das aus 175 Aminosäuren (AS) bestand. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ausgehend vom Startcodon an Aminosäureposition 22 eine mögliche Schnittstelle (AFA) für Signalpeptide von periplasmatischen Proteinen existierte (Nielsen *et al.*, 1997), was mit dem Programm *SignalP 3.0* (Zentrum für biologische Sequenzanalyse, Technische Universität, Lyngby, Dänemark) überprüft wurde (Abb. 14). Eine Signalsequenz mit 24 AS wurde hiermit postuliert, die sich aus der n-Region (MTMKKT), der h-Region (LIASAVMASIFI) und der c-Region (APAAFA) zusammensetzte.

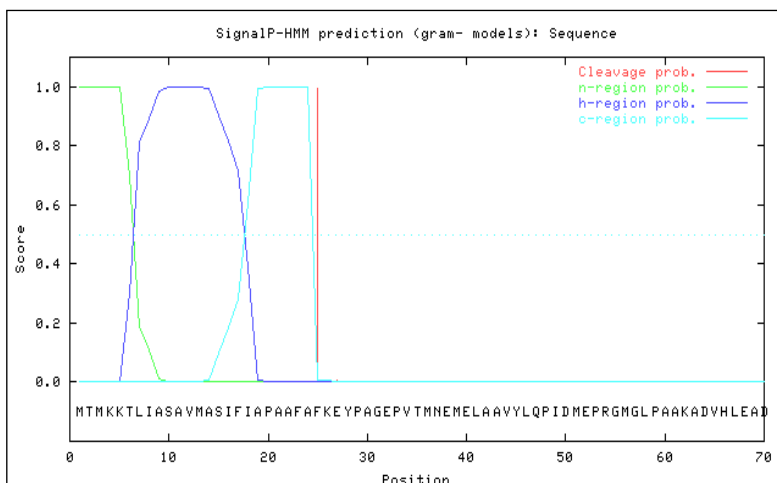


Abb. 14: Vorhersage des putativen Signalpeptides von FetP.

Nach dem *SignalP 3.0*-Modell konnte eine AFA-Restriktionschnittstelle nachgewiesen werden, wobei nach der Aminosäure 24 die hydrophile Aminosäuresequenz des FetP-Proteins mutmaßlich von dem hydrophoben Signalpeptid getrennt wird, welches sich aus einer n-Region, einer h-Region und einer c-Region zusammensetzt.

Um eine periplasmatische Lokalisation von FetP nachzuweisen, sollte *fetP* als *Strep-tag*[®] II-Fusionsprotein exprimiert und anschließend aus dem Periplasma mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden. Dazu wurde *fetP* ohne eigenes Start- und Stoppcodon hinter den *tetA*-Promotor in den Vektor pASK-IBA3 kloniert (pECD1099), sodass die Genexpression im plasmidfreien *E. coli* Stamm BL21 durch AHT-Zusatz induziert werden konnte. Nach einem periplasmatischen Aufschluss ohne Lysozym konnte FetP aufgrund des C-terminalen *Strep-tag*[®] II-Epitops (WSHPQFEK), das an das Säulenmaterial StrepTactin-Sepharose bindet, bis zur Homogenität aus der periplasmatischen Fraktion gereinigt werden (Abb. 15). Dies zeigte, dass es sich bei FetP tatsächlich um ein periplasmatisch lokalisiertes

Protein handelte. Bei der Aufreinigung wurde eine Ausbeute von 5 mg Protein je Liter Kultur erzielt.

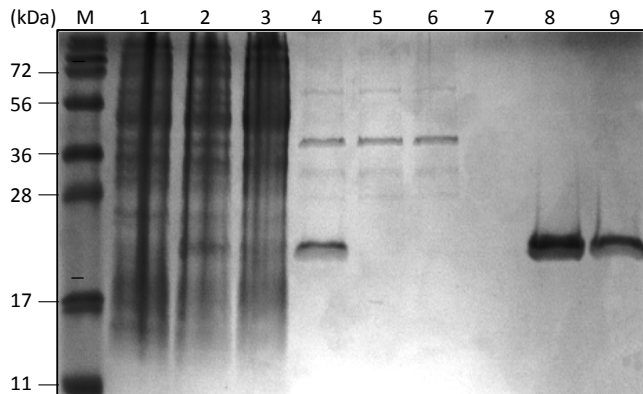


Abb. 15: Aufreinigung von FetP als *Strep-tag*[®] II-Fusionsprotein aus dem periplasmatischen Extrakt.

In der 17.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung wurden verschiedene Fraktionen der *StrepTactin* Affinitätschromatographie aufgetragen. 1: 10 µl Rohextrakt vor Induktion (50 µg TG), 2: 10 µl Rohextrakt nach Induktion (50 µg TG), 3: 10 µl zytoplasmatischer Extrakt (50 µg TG), 4: 5 µl periplasmatischer Extrakt, 5: 10 µl Säulendurchfluss, 6: 10 µl der ersten Waschfraktion, 7: 10 µl der letzten Waschfraktion, 8: 5 µl der zweiten Eluatsfraktion (4 µg Protein), 9: 5 µl

der dritten Eluatsfraktion (2 µg Protein). Zur Größenbestimmung wurde der Protein Marker (M) *PageRuler*[™] *Prestained Protein Ladder Plus* (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Das theoretische Molekulargewicht des FetP-*Strep-tag*[®] II-Fusionsproteins von 18.662 kDa wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt. Interessanterweise wurden hierbei zwei *Peaks* detektiert, die jeweils einem Molekulargewicht von 18.676 kDa bzw. 18.739 kDa entsprachen (Abb. 16).

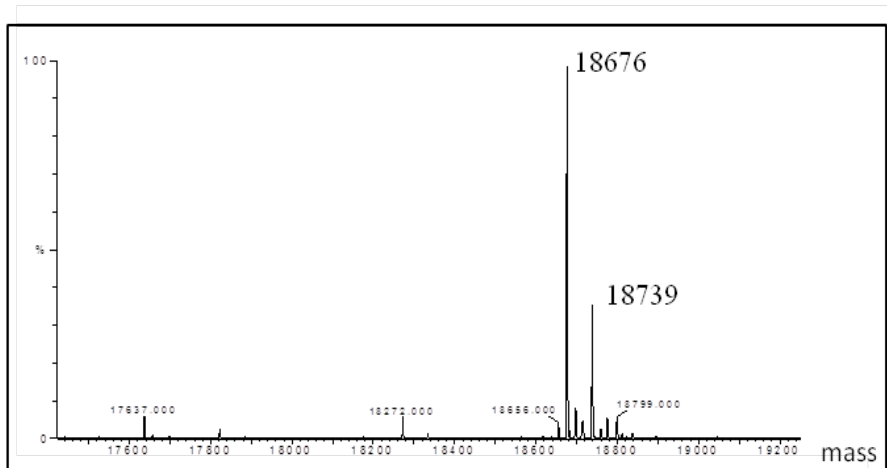


Abb. 16: MALDI-TOF Analyse von FetP.

Das *Strep-tag*[®] II-Fusionsprotein wurde aus dem Periplasma gereinigt. Durch MALDI-TOF konnten zwei *Peaks* detektiert werden, die jeweils einem Molekulargewicht von 18.676 kDa bzw. 18.739 kDa entsprachen. Die Messung wurde von Frau Dr. A. Schierhorn durchgeführt.

Das korrespondierende Molekulargewicht von 18.676 kDa des Haupt-*Peaks* kam dem erwarteten Wert mit einem Fehler von 0.075% nahe, während die Differenz von 63 Da der Atommasse von Kupfer entsprach. Daher wurde das Protein wahrscheinlich mit und ohne einem fest gebundenen Kupferion gereinigt.

Eine putative Kationenbindung von FetP sollte durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) bestimmt werden. Dazu wurde das gereinigte Protein zunächst mit dem Chelator EDTA inkubiert und anschließend gegen Reaktionspuffer dialysiert, um vorhandene

Metallionen aus der Proteinprobe zu entfernen. Danach wurde das EDTA behandelte Protein mit einem jeweils fünffachen molaren Überschuss an FeSO_4 , MnCl_2 , CuCl_2 oder ZnCl_2 inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen der einzelnen Proben wurde ungebundenes Metall entfernt und der jeweilige Metallgehalt mittels AAS quantifiziert, nachdem die einzelnen Proteinkonzentrationen bestimmt worden waren. Aus diesen Messungen resultierten folgende molare Stöchiometrien: 0.6 Eisen, 0.7 Mangan, 1.5 Kupfer oder 1.0 Zink pro Protomer (Daten nicht gezeigt). FetP konnte daher Metallionen binden.

Um auszuschließen, dass der *Strep-tag*[®] II die Metallbindung beeinflusst haben könnte, sollte FetP in den Metallbindestudien auch ohne *tag* eingesetzt werden. Dazu wurde das *fetP*-Gen in den Vektor pET22b(+) ohne eigene Signalsequenz und ohne Stoppcodon hinter einen T7 Promotor kloniert (pECD1101), sodass die Genexpression durch IPTG-Zugabe im plasmidfreien *E. coli* Stamm BL21 induziert wurde. Die synthetisierten Proteine wiesen eine N-terminale *pelB*-Signalsequenz zur Translokation in den periplasmatischen Raum auf. Durch Bindung des abspaltbaren C-terminal fusionierten *His*-tags[®] an Ni-NTA Agarose konnte FetP affinitätschromatographisch aus dem Periplasma nativ gereinigt werden (Abb. 17A). Bei der Aufreinigung wurde eine Ausbeute von 6 -7 mg Protein je Liter Kultur erzielt.

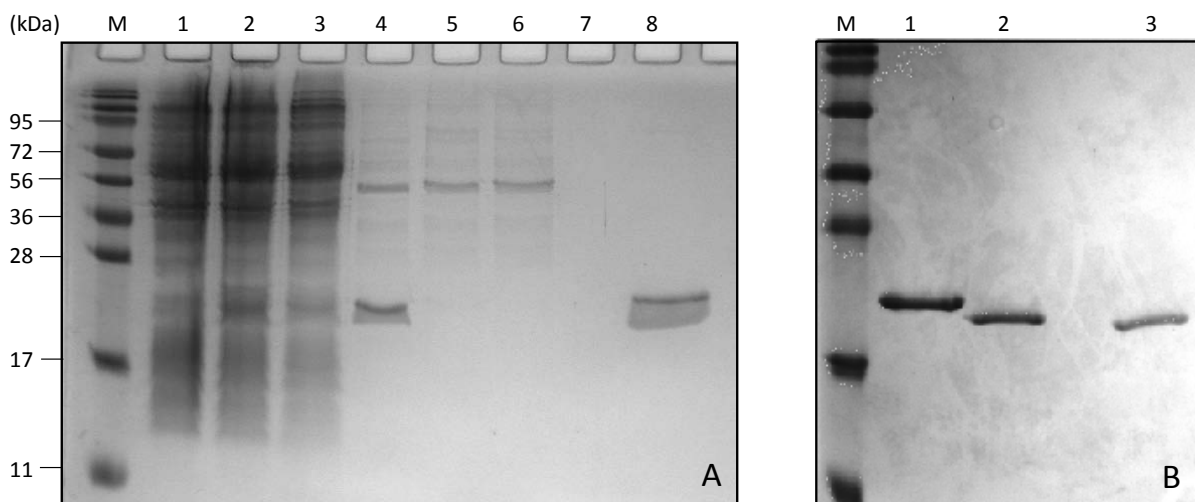


Abb. 17: Aufreinigung von FetP als *His*-tag[®]-Fusionsprotein aus dem periplasmatischen Extrakt (A) und Abspaltung des C-terminalen *His*-tag[®] (B).

In der 17.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung wurden verschiedene Fraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgetragen (A). 1: 10 μl Rohextrakt vor Induktion (50 μg TG), 2: 10 μl Rohextrakt nach Induktion (50 μg TG), 3: 10 μl zytoplasmatischer Extrakt (50 μg TG), 4: 5 μl periplasmatischer Extrakt, 5: 10 μl Säulendurchfluss, 6: 10 μl der ersten Waschfraktion, 7: 10 μl der letzten Waschfraktion, 8: 5 μl der zweiten Eluatsfraktion (5 μg Protein). In der 17.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung wurden Fraktionen aufgetragen, um die erfolgreiche *His*-tag[®]-Abspaltung von FetP mittels Thrombin zu dokumentieren (B). 1: 2 μg FetP-*His* vor Abspaltung, 2: 2 μg FetP-*His* nach Abspaltung, 3: 2 μg FetP aus Säulendurchfluss der zweiten Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Das gesplattene Protein hat eine um den *His*-tag[®] geringere Größe. Zur Größenbestimmung wurde jeweils der Protein Marker (M) *PageRuler*[™] *Prestained Protein Ladder Plus* (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Im nächsten Schritt wurde der *His*-tag[®] mit der Protease Thrombin vom Protein abgespalten und konnte durch eine weitere Ni-NTA-Affinitätschromatographie vom Zielprotein abgetrennt werden. Die damit verbundene Änderung des FetP-Molekulargewichtes von theoretisch 18.851 kDa auf 17.642 kDa war in der SDS-PAGE zu erkennen (Abb. 17B). Für nachfolgende Experimente wurde das gereinigte Protein ohne *His*-tag[®] mit dem Chelator EDTA inkubiert und anschließend gegen entsprechenden Reaktionspuffer dialysiert, um eventuell noch vorhandene Metallionen aus der Proteinprobe zu entfernen.

Das Oligomerisierungsverhalten von FetP in Anwesenheit von Metallen wurde durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ) bestimmt (Tab. 4). Dabei wurde das Molekulargewicht und die Sedimentationskonstante von FetP in Gegenwart von FeCl₃, CuCl₂, ZnCl₂ oder hohen Salzkonzentrationen in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 ermittelt. Es zeigte sich, dass FetP metall- und salzunabhängig als stabiles Homodimer vorlag, da ein Molekulargewicht zwischen 34.5 und 37 kDa und Sedimentationskoeffizienten von 2.7 – 2.8 S bestimmt wurden. Daher war FetP ein Dimer (FetP_D) und die Dimerisierung hing nicht von der Gegenwart von Metallen ab.

Tab. 4: FetP liegt als stabiles Homodimer vor.

Zusätze	s_{app} , (S)	$M_{r,app}$, (Da)
-	2.7	35000
100 μ M FeCl ₃	2.7	34500
100 μ M CuCl ₂	2.8	37000
100 μ M ZnCl ₂	2.7	34600
20 mM NaCl	2.8	34800
100 mM NaCl	2.8	35400

EDTA behandeltes FetP ohne *His*-tag[®] wurde bei einer Protomer-Konzentration von 17 μ M in Ab- bzw. Anwesenheit der angegebenen Metallsalze in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 in einem Volumen von jeweils 300 μ l analytisch ultrazentrifugiert und das jeweilige Molekulargewicht und die Sedimentationskonstante von FetP bestimmt.

Die CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie im Fern-UV Bereich sollte als weitere Methode verwendet werden, um mögliche Änderungen in der Sekundärstruktur von FetP durch die Bindung von Metallionen zu untersuchen. FetP wies im Fern-UV Bereich ein außergewöhnliches Spektrum mit einem deutlichen Minimum bei 220 nm und zwei Maxima bei 202 nm und 233 nm auf (Abb. 18A). Proteine mit einem hohen Anteil an α -Helices zeichnen sich durch zwei Minima bei 208 nm und 220 nm aus (Bulheller *et al.*, 2007), während bei β -Faltblatt-Spektren ein Maximum bei 196 nm und ein Minimum bei 217 nm zu beobachten ist. Demnach war keine klare Zuordnung der jeweiligen Sekundärstrukturen für

FetP möglich. Es konnte jedoch vermutet werden, dass FetP nur einen sehr geringen Anteil an α -Helices besaß, da bei 208 nm sich kein Minimum abzeichnete (Abb. 18A). Da das aufgenommene FetP Spektrum eher dem von β -Faltblättern ähnelte, wobei es möglicherweise zu einer starken Überlagerung bei 235 nm durch den hohen Anteil an Aromaten (9 Tyr, 5 Phe und 3 Trp) kam, ließ sich vermuten, dass die grundlegenden Sekundärstrukturelemente von FetP β -Faltblätter waren.

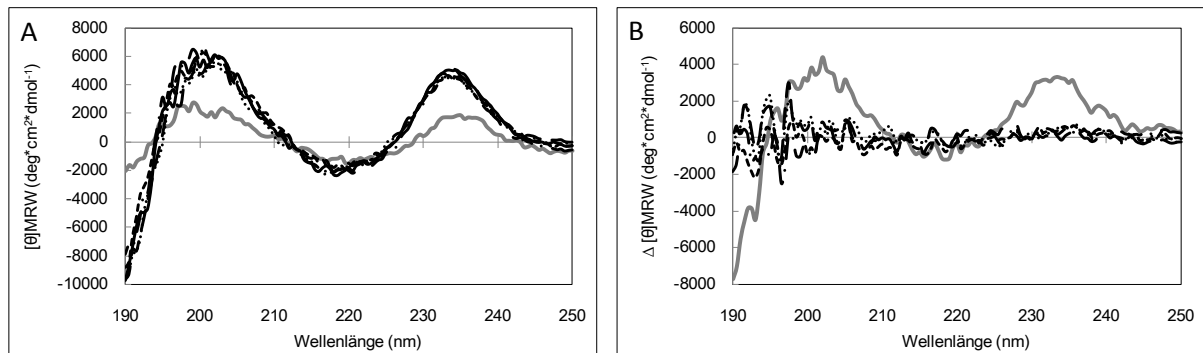


Abb. 18: CD-Spektren von FetP deuten auf β -Faltblattstruktur hin.

Die Fern-UV Spektren wurden von FetP bei einer Dimer-Konzentration von 25 μ M in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 bei 25 °C aufgenommen (A). Dargestellt sind die Spektren ohne Zusatz (—), mit 150 μ M FeSO₄/1 mM Ascorbat (---), mit 150 μ M FeCl₃ (···), mit 150 μ M MnCl₂ (---), mit 150 μ M CuCl₂ (—) bzw. 150 μ M ZnCl₂ (---) nach jeweiligem Abzug des Pufferspektrums. Weiterhin sind die jeweiligen Differenzspektren ([θ]MRW mit jeweiligem Metall von [θ]MRW ohne Zusatz subtrahiert) abgebildet (B).

Im Hinblick auf die CD-Spektren von FetP_D mit einem jeweils sechsfach molaren Überschuss an FeSO₄, FeCl₃, MnCl₂, CuCl₂ oder ZnCl₂ war zunächst festzuhalten, dass das Protein unter den gewählten *in vitro* Bedingungen nicht denaturierte, da bei etwa 200 nm kein Minimum zu erkennen war (Abb. 18A). Auffällig erschien das CD-Spektrum von FetP mit CuCl₂, da beide Maxima flacher verliefen, während sich die Spektren des Proteins in Ab- bzw. Anwesenheit der anderen Metallsalze nicht signifikant unterschieden. Die Abflachung der Maxima bei 202 nm und 233 nm durch CuCl₂-Zusatz wurde durch Abbildung der jeweiligen Differenzspektren (Abb. 18B) nochmals hervorgehoben und konnte möglicherweise auf eine Veränderung in der Proteinkonformation zurückgeführt werden.

Die mögliche Bindung von Kationen an FetP wurde durch Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) gemessen. Hierbei wurde das Protein mit Kationen titriert, wobei die bei der Bindung umgesetzte Wärme direkt kalorimetrisch gemessen wurde. Lösungs- und Verdünnungsenthalpien wurden in vergleichbaren Experimenten ohne Protein ermittelt und vor der Berechnung subtrahiert. Zunächst musste dafür ein geeigneter Reaktionspuffer ermittelt werden, in dem nicht nur das Protein und die jeweiligen Metallionen stabil vorlagen, sondern auch die umgesetzte Wärme messbar war. In Tabelle 5 wurden alle getesteten Puffer

mit den jeweils beobachteten und zum Teil bekannten Effekten aufgeführt. Wie sich zeigte, war eine Vielzahl der Puffer nicht geeignet, da beispielsweise für Tris eine zu hohe Protonierungsenthalpie bekannt war, in anderen Pufferlösungen oftmals Präzipitationsereignisse auftraten oder die Puffersubstanz selbst eine zu hohe Affinität für die Kationen aufwies. Zwei Pufferlösungen (25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 und 25 mM ACES/NaOH pH 7.2) konnten jedoch als Reaktionspuffer in den folgenden ITC Experimenten verwendet werden.

Tab. 5: Bis-Tris und ACES sind geeignete Puffersubstanzen für die ITC.

Pufferlösungen	Charakteristika
100 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl ^a	Interaktion mit divalenten Kationen ^h , hohe Puffer-Protonierungsenthalpie ⁱ
20 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl ^b	CuCl ₂ -Präzipitation
50 mM TMED pH 9, 30 mM NaCl ^c	Protein-Präzipitation
100 mM Borat pH 9.2, 20 mM NaCl ^d	CuCl ₂ - und ZnCl ₂ -Präzipitation
50 mM Cacodylate pH 7 ^e	CuCl ₂ - und Protein-Präzipitation
25 mM Bis-Tris pH 7.2 ^f	-
25 mM ACES pH 7.2 ^g	hohe Cu ²⁺ -Affinität ^j

Beobachtete Effekte, die pufferabhängig während der Titrationsexperimente auftraten. ^a(Grossoehme *et al.*, 2007), ^b(Deka *et al.*, 2007), ^c(Kittleson *et al.*, 2006), ^d(Zhang und Wilcox, 2002), ^e(Bagai *et al.*, 2007), ^f(Spuches und Wilcox, 2008), ^g(Grossoehme *et al.*, 2006), ^h(Hanlon *et al.*, 1966), ⁱ(Morin und Freire, 1991)

Da FetP bereits als Cu²⁺-gebundenes *Strep*-tag[®]II-Fusionsprotein aus dem Periplasma gereinigt werden konnte und die Resultate der CD-Spektroskopie auf eine Bindung dieses Kations hindeuteten, wurde FetP zunächst mit CuCl₂ in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 titriert (Abb. 19A). Die Bindungskurve wies eine typische Form von einem Protein mit zwei Bindestellen auf, da während der Titration die anfangs exothermen in endotherme Reaktionen übergingen. Die Kontrolltitration von CuCl₂ in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 resultierte jedoch in qualitativ und quantitativ ähnlichen endothermen Reaktionen (Daten nicht gezeigt), sodass nach deren Subtraktion für die Auswertung der exothermen Reaktionen das *One-Set of Sites*-Modell für gleiche, unabhängige Bindungsstellen am Protein verwendet wurde. Dabei wurde eine Stöchiometrie von Cu²⁺ : FetP-Dimer von 1.83 : 1 bestimmt und eine Wärmeabgabe ΔH von -2.18 kcal* mol^{-1} mit einer Dissoziationskonstante k_d von 4.1 μM berechnet (Tab. 6). Der Bindungsprozess wurde hierbei Enthalpie- und Entropie-getriebenen. Interessanterweise konnte jedoch keine Cu²⁺-Bindung von FetP in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was vermutlich auf die zu hohe Cu²⁺-Affinität der Puffersubstanz selbst zurückzuführen war (Morin und Freire, 1991).

Weiterhin wurde MnCl_2 und ZnCl_2 zu FetP titriert, da durch die vorhergehenden AAS-Ergebnisse für diese Metallionen ebenfalls eine Bindung an FetP zu erwarten war. Für die MnCl_2 -Titration von FetP in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 (Abb. 19B) konnten ebenfalls die endothermen Reaktionen durch Subtraktion der Kontrolltitration ausgeglichen werden und anschließend mit dem Modell für eine Bindestelle am Protein eine Stöchiometrie von $\text{Mn}^{2+} : \text{FetP-Dimer}$ von 0.808 : 1 bestimmt werden, wobei eine Wärmeabgabe ΔH von $-3.82 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ zu verzeichnen war (Tab. 6). Die Dissoziationskonstante k_d für Mn^{2+} betrug nach dieser Berechnung $0.6 \mu\text{M}$.

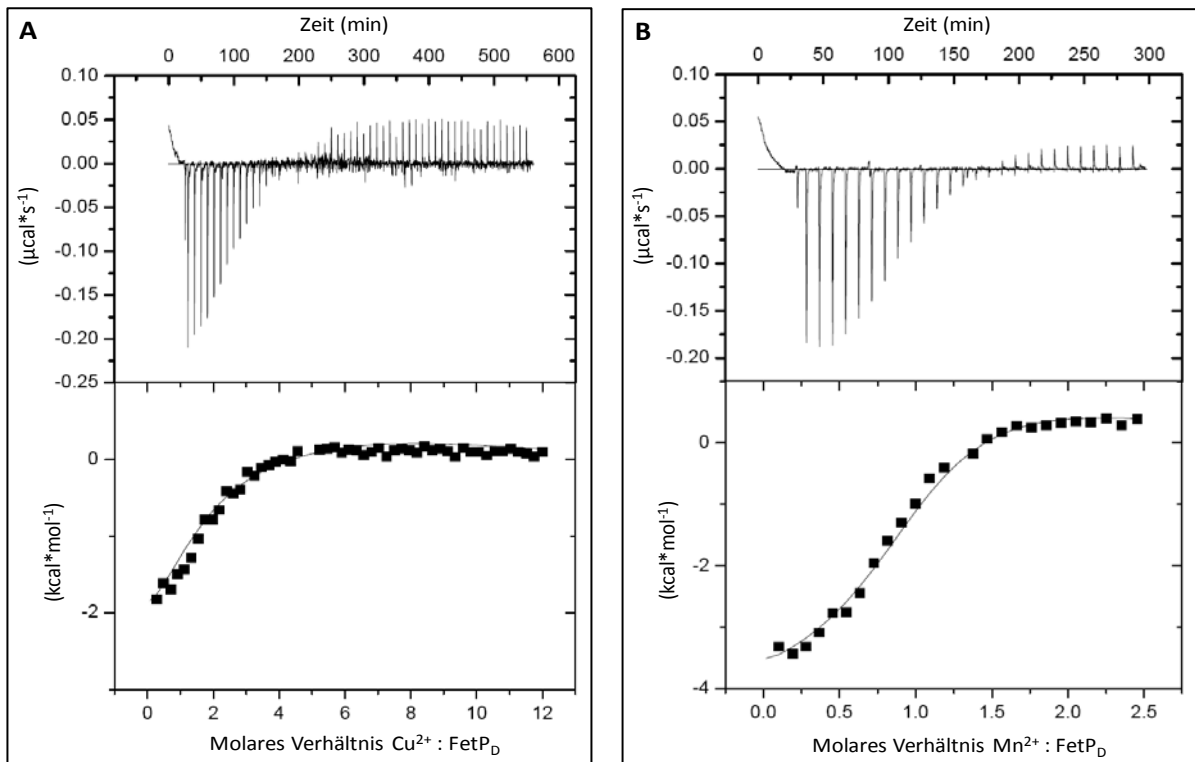


Abb. 19: ITC mit CuCl_2 bzw. MnCl_2 in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2.

Titration von $17.15 \mu\text{M}$ FetP_D mit $1030 \mu\text{M}$ CuCl_2 in 56 Schritten zu je $5 \mu\text{l}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (A). Titration von $17.15 \mu\text{M}$ FetP_D mit $215 \mu\text{M}$ MnCl_2 in 28 Schritten zu je $10 \mu\text{l}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (B). Die unteren Abbildungen zeigen jeweils die integrierten Daten. Die Linien entsprechen der angepassten Kurven für zwei voneinander unabhängige Bindestellen am Protein.

Im Gegensatz zu CuCl_2 konnten für den Enthalpie- und Entropie-getriebenen Bindungsprozess zwischen FetP und MnCl_2 in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 (Abb. 20A) ähnliche Parameter bestimmt werden: $n = 0.852$ pro FetP-Dimer, $\Delta H = -3.66 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, $k_d = 3.6 \mu\text{M}$ (Tab. 6). Hierbei wies die Bindungskurve jedoch die typische Form eines Proteins mit einer Bindestelle auf. Wenn FetP mit ZnCl_2 in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 titriert wurde (Abb. 20B), konnte reproduzierbar eine Wärmeaufnahme $\Delta H = +2.27 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ mit dem *One-Set of Sites*-Modell für gleiche, unabhängige Bindestellen am Protein berechnet werden (Tab. 6). Die endotherme Zn^{2+} -Bindung von FetP wurde daher rein durch die Entropieänderung

angetrieben. Im Vergleich zu den anderen Metallionen wurde eine Stöchiometrie von Zn^{2+} : FetP-Dimer von 2.8 : 1 bestimmt und eine Dissoziationskonstante k_d von 15.2 μM berechnet. Erstaunlicherweise konnte eine Zn^{2+} -Bindung von FetP in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 nicht nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf einen Pufferartefakt zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

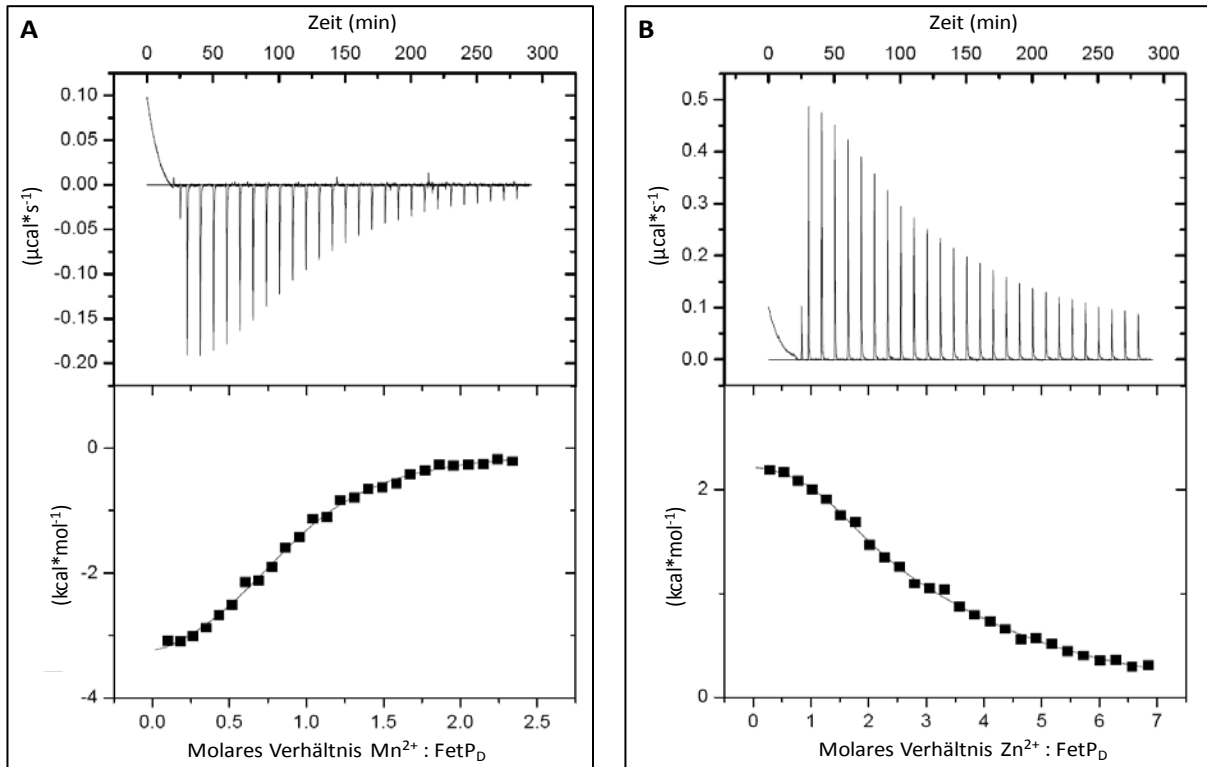


Abb. 20: ITC mit MnCl_2 bzw. ZnCl_2 in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2.

Titration von 17.15 μM FetP_D mit 205 μM MnCl_2 in 28 Schritten zu je 10 μl bei 25 °C (A). Titration von 17.15 μM FetP_D mit 600 μM ZnCl_2 in 28 Schritten zu je 10 μl bei 25 °C (B). Die unteren Abbildungen zeigen die integrierten Daten. Die Linien entsprechen der angepassten Kurven für eine Bindestelle am Protein.

Die jeweiligen ITC-Ergebnisse konnten in verschiedenen Experimenten mit Protein aus mehreren voneinander unabhängigen Aufreinigungen und unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen bestätigt werden. Die dabei bestimmten Stöchiometriewerte konnten durch Ungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung oder auch durch teilweisen Verlust des Bindevermögens des Proteins auf zwei Cu(II)-, eine Mn(II)- oder zwei bis drei Zn(II)-Bindestellen pro FetP-Dimer angenähert werden. Somit wurden die vorangegangenen AAS-Ergebnisse bestätigt, die pro FetP-Dimer auf drei Cu(II)-, zwei Zn(II)-, eine Mn(II)- bzw. eine Fe(II)-Bindestelle hinwiesen. Aufgrund der starken Adhäsion von Fe(III) an Oberflächen bzw. der spontanen Oxidation von Fe(II) unter aeroben Bedingungen war eine Titration mit diesen Metallionen nicht möglich. Da jedoch Mn(II) als Fe(II)-Analogon fungiert (Langlois

d'Estaintot *et al.*, 2004, Imlay, 2008), war für eine mögliche Fe^{2+} -Bindung von FetP ein ähnlicher Bindungsprozess zu erwarten.

In kompetitiven ITC-Experimenten (Tab. 6) konnte die Cu^{2+} -Bindung von FetP in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 durch vorherige Inkubation des Dimers mit ZnCl_2 unterbunden werden (Daten nicht gezeigt), wobei die Konzentration an ZnCl_2 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und der zuvor ermittelten Dissoziationskonstanten so gewählt wurde, dass mindestens 90% von FetP als Proteindimer-Kation-Komplex für die Titration vorlag. In der reversen Titration wurde erwartungsgemäß auch keine Zn^{2+} -Bindung von FetP in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 nach Vorinkubation des Proteins mit Cu^{2+} nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat deutete darauf hin, dass Zn^{2+} und Cu^{2+} unter anderem mindestens einen Aminosäurerest als gemeinsamen Liganden nutzten.

Tab. 6: Ergebnisse der ITC-Experimente mit FetP und verschiedenen Metallionen.

Puffer (25 mM, pH 7.2)	17.15 μM FetP _D \pm Metallion (μM)	titriertes Metallion	<i>n</i>	<i>k_d</i> (μM)	ΔH (kcal* mol^{-1})	ΔS (cal* mol^{-1} * K^{-1})	ΔG (kcal* mol^{-1})
Bis-Tris	ohne Zusatz	Cu ²⁺	1.83 \pm 0.046	4.1	-2.18 \pm 0.054	17.3	-7.33
	ohne Zusatz	Mn ²⁺	0.808 \pm 0.011	0.6	-3.82 \pm 0.140	15.5	-8.44
	ohne Zusatz	Zn ²⁺			keine Bindung		
	160 μM Zn ²⁺	Cu ²⁺			keine Bindung		
ACES	ohne Zusatz	Mn ²⁺	0.852 \pm 0.007	3.6	-3.66 \pm 0.108	16.8	-8.67
	ohne Zusatz	Zn ²⁺	2.8 \pm 0.041	15.2	2.27 \pm 0.098	29.6	-6.55
	ohne Zusatz	Cu ²⁺			keine Bindung		
	94 μM Cu ²⁺	Zn ²⁺			keine Bindung		

Die Tabelle listet die verschiedenen Metallionen auf, die jeweils zu 17.15 μM FetP-Dimer in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 oder in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 titriert wurden. Für kompetitive Experimente wurde das Protein zuvor mit Metallionen inkubiert, wobei die entsprechenden Konzentrationen in Abhängigkeit von den ermittelten *k_d*-Werten so eingesetzt wurden, dass das Protein-Dimer zu mindestens 90% mit dem jeweiligen Kation gesättigt vorlag. Durch die Auswertung mit dem Programm Microcal-Origin wurden die Werte für die Stöchiometrie (*n*, Kation : FetP-Dimer), die Dissoziationskonstante der Bindung (*k_d*), die gemessene Enthalpie (ΔH) und die Entropieänderung (ΔS) bestimmt, womit die Änderung der freien Gibbs-Energie (ΔG) ermittelt werden konnte.

Da unter anderem Histidin-Reste an der Bildung von Bindestellen für Metallkationen in Proteinen beteiligt sein können und ein FetP-Protomer sechs dieser Aminosäuren aufwies, erfolgte eine Titration mittels DEPC (Diethylpyrocarbonat), um einzelne Histidine von FetP chemisch zu modifizieren und somit deren mögliche Beteiligung an der Metallbindung zu untersuchen. Die Carbethoxylierung eines Stickstoffatoms am Imidazolring dieser Aminosäurereste ist nur dann möglich, wenn der Histidin-Rest dem DEPC frei zugänglich ist und nicht durch Bindung eines Metallkations geschützt wird. Daher wurde EDTA behandeltes Protein direkt oder erst nach Inkubation mit einem jeweils zehnfachen Überschuss an $MnCl_2$ bzw. $CuCl_2$ für die Titration eingesetzt. Der jeweilige Anstieg der Absorption bei 242 nm wurde hinsichtlich der Entstehung von Carbethoxylhistidinen verfolgt, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Proteinproben detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass die Histidin-Reste von FetP entweder nicht an der Ausbildung der Metallbindestellen beteiligt waren oder diese Aminosäurereste strukturebedingt dem DEPC nicht zugänglich waren.

3.5 Welche Aminosäurereste sind an der Metallionenbindung von FetP beteiligt?

Zu den FetP verwandten Proteinen zählten P19 aus *C. jejuni*, ChpA aus dem marinen, magnetotaktischen Bakterienstamm MV-1 und Tp34 aus *T. pallidum*, die eine Identität von 54%, 49% bzw. 35% zu FetP aufwiesen. Durch *multiple Alignments* (Abb. 21) mit diesen FetP-homologen Proteinen wurden konservierte Aminosäuren identifiziert, die für die Bindung der entsprechenden Metallionen in FetP notwendig sein könnten. Darüber hinaus besaß FetP ein MX_2M -Motiv, das für Kupfertransportproteine wie Ctr1p in *S. cerevisiae* charakteristisch ist (Dancis *et al.*, 1994, Koch *et al.*, 1997) und unter anderem für die Kupferbindung in ChpA diskutiert wird (Dubbels *et al.*, 2004).

Davon ausgehend sollten in FetP die entsprechenden Aminosäuren gezielt ausgetauscht und das Bindungsverhalten der FetP-Varianten gegenüber verschiedener Kationen untersucht werden.

3 Ergebnisse

FetP	MTMKKTLIASAVMASIFIAPA-----AFAFK <u>E</u> YPAGEPV <u>T</u> <u>M</u> <u>N</u>	37
P19	-MIKKVLSVVAAAVISTN-----LFAGEVPIGDPKELN	33
ChpA	MHKKLLQMI I I SVMAATIGTT-----AATAGEQPAGEPIVIN	37
Tp34	-MKRVSLLSAAIFALVFSACGGGGEGHQHGEEEMAAVPAPDAEGAAGFDEFPIGEDRDVG	59
	: * * * : .	
FetP	<u>E</u> <u>M</u> FLAAVYLQPID <u>M</u> EPRG <u>M</u> GLPA-AKADV <u>H</u> <u>L</u> EADIHAVEG-NKNGFGAGEWIPYLTISYT	95
P19	GMEIAAVYLQPIEMEPRGIDLAA-SLADIHLEADIHALKN-NPNGFPEGFWMPYLTIAEY	91
ChpA	GMEVMGIFLQPVDMEPAMHDQGS-AVTDIHLEADIHAVVG-NENGFAGGEWIPYLNISYE	95
Tp34	PLHVGGVYFQPVEMHPAPGAQPSKEEADCHIEADIHANEAGKDLGYGVGDFVPYLRVVA	119
	:: : : * * : * . * : * * : * * * * * : * : * * : * * * :	
FetP	LVNNDTGEKQEGTFMP <u>M</u> VAS <u>D</u> GPHYGANIKMMG-----VGNYKVITYHIEPPSKAG <u>M</u> <u>H</u> <u>R</u>	148
P19	LKNTDTGAIKRGTLMPMVADDGPHYGANIAMEKDKKGGFGVGNIELTFYISNPEKQGFGR	151
ChpA	LTKSGSDWKKAGFMGMVASDGPYGANVKLDG-----AGEYNLVFHIQPPEGHAFMR	147
Tp34	LQKHGSEKVVQVFMFAPMNAGDGPYGANVKFEEG-----LGTYKVRFEIAAPSHDEYSL	173
	* : . : : * * . * * * * * * * : * * * : * * .	
FetP	<u>H</u> TDSETGVG--RWWKPFVDSYEFKYVGLN-----	175
P19	HVDEETGVG--KWFEPFKVDYKFKYTGTPK----	179
ChpA	HTDKETGVG--PWWKPFDYTGFSIFAGAGKGGY	180
Tp34	HIDEQTVSGRFWSEPLVAEWDDEFWKGPQW---	204
	* * . : * * . * : * :	

Abb. 21: Sequenz-Alignment von FetP mit homologen Proteinen.

Dargestellt ist ein *Alignment* von FetP aus *E. coli* Stamm F11 mit den homologen Proteinen P19 aus *C. jejuni*, ChpA aus dem marinen, magnetotaktischen Stamm MV-1 und Tp34 aus *T. pallidum*. Identische (*) und ähnliche (.) AS sind unterhalb der Sequenz gekennzeichnet. Das MX₂M-Motiv ist mit Rahmen hervorgehoben. **Fett und unterstrichen** sind die AS, die in FetP gegen andere AS durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden.

Folgende Aminosäure-Austausche wurden mittels *Quik-Change* Mutagenese vorgenommen und kontrollsequenziert (Abb. 22): E5Q, M14I, M17I, M29I, M34I, H44R, E46Q, M90I, D94N, H97R, H125R und H127R.

FetP	<u>M</u> GFK <u>E</u> ₅ YPAGEPV <u>T</u> <u>M</u> ₁₄ <u>N</u> <u>E</u> <u>M</u> ₁₇ ELAAVYLQPID <u>M</u> ₂₉ EPRG <u>M</u> ₃₄ GLPAKADV <u>H</u> ₄₄ <u>L</u> <u>E</u> ₄₆ AD	48
	IHAVEGNKNGFGAGEWIPYLTISYTLVNNDTGEKQEGTFMP <u>M</u> ₉₀ VAS <u>D</u> ₉₄ GPH <u>H</u> ₉₇ YGAN	101
	IKMMGVGNYKVITYHIEPPSKAG <u>M</u> ₁₂₅ <u>R</u> <u>H</u> ₁₂₇ TDSETGVGRWWKPFVDSYEFKYVGLN	153

Abb. 22: Aminosäuresequenz von FetP ohne Signalpeptid.

Hervorgehoben sind die Aminosäuren mit Positionsangaben, die durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht wurden. Aminosäuren, die aufgrund der Klonierung artifiziell am N-Terminus vorliegen, sind unterstrichen.

Die mutierten *fetP*-Gene lagen jeweils im Vektor pET22b(+) vor. Zunächst wurde getestet, ob von allen Plasmiden *fetP* exprimiert wurde. Dazu wurde nach Transformation in den plasmidfreien *E. coli* Stamm BL21 im kleinen Maßstab die jeweilige Expression durch IPTG-Zusatz induziert und anschließend das Periplasma aufgeschlossen. In Abbildung 23 ist erkenntlich, dass sich das Laufverhalten der Variantenproteine in der SDS-PAGE durch die jeweiligen Aminosäureaustausche leicht veränderte und sich die Proteinausbeuten stark unterschieden. Da die FetP-Varianten mit E5Q, H44R oder H127R nicht zu sehen waren (zum

Teil in Abb. 23 gezeigt), wurden diese Aminosäuren jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Hierdurch konnte die Variante mit H127A nachgewiesen werden, während die Variantenproteine mit dem Austausch von E5A bzw. H44A auch weiterhin nicht detektierbar waren (Abbildung nicht gezeigt).

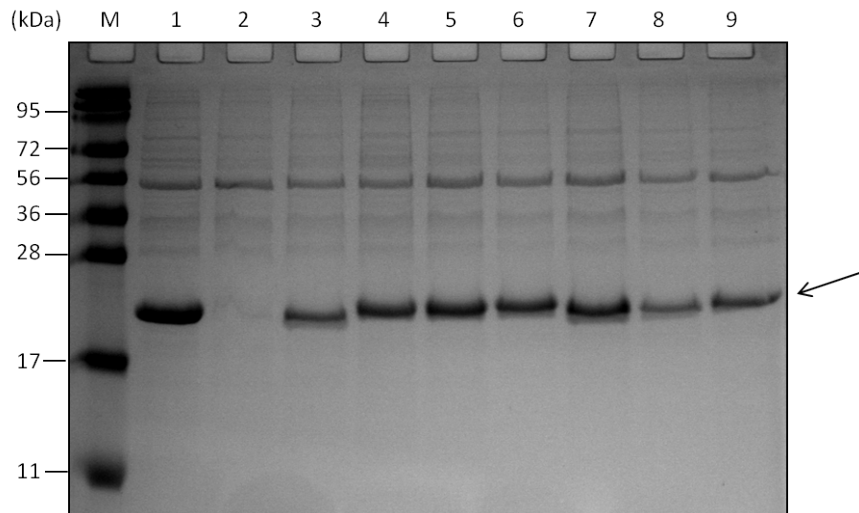


Abb. 23: Testüberexpression gezielt-mutierter *fetP*-Gene.

In der 17.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung wurden je 5 µl der verschiedenen periplasmatischen Extrakte mit den FetP-Varianten (Pfeil) als jeweilige *His*-tag[®]-Fusionsproteine im Vergleich zum Wildtyp FetP-*His*₆ aufgetragen. 1: WT-FetP, 2: E5Q, 3: E46Q, 4: M90I, 5: H97R, 6: H125R, 7: M14I, 8: M17I, 9: M29I. Zur Größenbestimmung wurde der Protein Marker (M) *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Davon ausgehend wurden die einzelnen Varianten als *His*-tag[®]-Fusionsprotein aus dem Periplasma mittels Ni-NTA-Chromatographie nativ gereinigt, der jeweilige 6x*His*-tag[®] mit der Protease Thrombin vom Protein abgespalten und vorhandene Metallionen aus den Proteinproben durch EDTA-Behandlung entfernt. Nach sich anschließender Dialyse gegen die beiden Reaktionspuffer 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 und 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 wurden alle Varianten in ITC-Experimenten eingesetzt, um deren Metallionenbindung im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu analysieren.

Der Austausch der Aminosäuren M14, M29, M34 und H125 gegen Isoleucin bzw. Arginin hatte keinen Einfluss auf die Metallionenbindung von FetP (Tab. 7, Tab. 8). Die vom Wildtyp-Protein leicht abweichenden thermodynamischen Daten lagen dabei im Toleranzbereich des Messsystems oder waren auf mögliche Fehler bei der Proteinbestimmung bzw. teilweisen Verlust der Bindeeigenschaft des Proteins zurückzuführen.

Der Einfluss des hoch konservierten H97 auf die Metallionenbindung von FetP konnte nicht untersucht werden, da das Protein mit dem H97R Austausch während der Titration präzipitierte.

Für die Aminosäure D94 konnte eine Beteiligung an der Mn^{2+} -Bindung von FetP gezeigt werden, da durch den Austausch von Aspartat gegen Asparagin nur die Mn^{2+} -Bindung in beiden Reaktionspuffern unterbunden wurde (Tab. 7, Tab. 8). Da sich beide Aminosäuren strukturell sehr ähneln, schien die Carboxylgruppe an der Mn^{2+} -Koordinierung beteiligt zu sein.

Interessanterweise konnten für die E46Q und H127A Variantenproteine jeweils weder eine Mn^{2+} -noch Cu^{2+} -Bindung nachgewiesen werden, während Zn^{2+} weiterhin Entropie-getrieben gebunden wurde (Tab. 7, Tab. 8). Daher schienen die Carboxylgruppe des Glutamats und möglicherweise der Imidazolrest des Histidins an der Bindung von beiden Metallionen beteiligt zu sein. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Stöchiometriewerte von FetP für Mn^{2+} und Cu^{2+} (Tab. 6) konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass beide Aminosäurereste nicht in der Ausbildung einer einzigen Metallionenbindestelle beteiligt waren, an die beide Ionen banden.

Der Aminosäureaustausch M90I hatte zur Folge, dass die Variante weder Cu^{2+} noch Zn^{2+} binden konnte, während sich die Enthalpie- und Entropie-getriebene Mn^{2+} -Bindung von der des Wildtyp-Proteins in beiden Reaktionspuffern kaum unterschied (Tab. 7, Tab. 8).

Die M17I-FetP-Variante wies keine Zn^{2+} -Bindung mehr auf, während eine Enthalpie- und Entropie-getriebene Bindung von Mn^{2+} und Cu^{2+} auch weiterhin bestimmt werden konnte (Tab. 7, Tab. 8). Die Aminosäure M17 lag in dem FetP-homologen Protein ChpA aus dem Stamm MV-1 konserviert vor (Abb. 21) und sollte als Bestandteil eines putativen Kupfer *handling* Motivs (MX_2M) analysiert werden.

Tab. 7: Ergebnisse der ITC-Versuche mit den FetP-Varianten in Bis-Tris.

FetP-Varianten	25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2									
	Mn ²⁺					Cu ²⁺				
	<i>n</i>	<i>k_d</i> (μM)	Δ <i>H</i> (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)	Δ <i>S</i> (cal* <i>mol</i> ⁻¹ * <i>K</i> ⁻¹)	Δ <i>G</i> (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)	<i>n</i>	<i>k_d</i> (μM)	Δ <i>H</i> (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)	Δ <i>S</i> (cal* <i>mol</i> ⁻¹ * <i>K</i> ⁻¹)	Δ <i>G</i> (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)
WT	0.81 ± 0.011	0.6	-3.82 ± 0.140	15.5	-8.44	1.83 ± 0.046	4.1	-2.18 ± 0.054	17.3	-7.33
M14I	0.62 ± 0.010	1.7	-4.44 ± 0.236	13.1	-8.35	1.93 ± 0.065	5.8	-2.75 ± 0.112	14.7	-7.13
M17I	0.82 ± 0.045	2.3	-2.13 ± 0.121	19.0	-7.80	1.91 ± 0.126	4.0	-1.08 ± 0.099	21.1	-7.37
M29I	0.72 ± 0.019	0.6	-4.25 ± 0.3	14.1	-8.45	1.96 ± 0.04	2.3	-1.32 ± 0.059	21.4	-7.70
M34I	0.98 ± 0.017	1.9	-4.83 ± 0.232	10.0	-7.80	1.95 ± 0.053	7.1	-1.67 ± 0.063	17.9	-7.01
E46Q			keine Bindung					keine Bindung		
M90I	0.97 ± 0.048	3.7	-2.84 ± 0.117	18.0	-8.20			keine Bindung		
D94N			keine Bindung			1.98 ± 0.117	7.5	-1.35 ± 0.094	16.4	-6.24
H97R			Proteinpräzipitation					Proteinpräzipitation		
H125R	0.94 ± 0.0165	1.3	-2.88 ± 0.114	17.2	-8.01	1.96 ± 0.078	7.3	-1.94 ± 0.05	18.3	-7.40
H127A			keine Bindung					keine Bindung		

Die Tabelle listet die verschiedenen Metallionen auf, die zu den jeweiligen Varianten des FetP-Dimers in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 titriert wurden. Im Vergleich dazu sind nochmals die Daten des Wildtyp-Proteins vermerkt. Durch die Auswertung mit dem Programm Microcal-Origin wurden die Werte für die Stöchiometrie (*n*, Kation : FetP-Dimer), die Dissoziationskonstante der Bindung (*k_d*), die gemessene Enthalpie (Δ*H*) und die Entropieänderung (Δ*S*) bestimmt, womit die Änderung der freien Gibbs-Energie (Δ*G*) ermittelt werden konnte.

Tab. 8: Ergebnisse der ITC-Versuche mit den FetP-Varianten in ACES.

FetP-Varianten	25 mM ACES/NaOH pH 7.2									
	Mn ²⁺					Zn ²⁺				
	<i>n</i>	<i>k_d</i> (μM)	ΔH (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)	ΔS (cal* <i>mol</i> ⁻¹ *K ⁻¹)	ΔG (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)	<i>n</i>	<i>k_d</i> (μM)	ΔH (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)	ΔS (cal* <i>mol</i> ⁻¹ *K ⁻¹)	ΔG (kcal* <i>mol</i> ⁻¹)
WT	0.85 ± 0.007	3.6	-3.66 ± 0.108	16.8	-8.67	2.8 ± 0.041	15.2	2.27 ± 0.098	29.6	-6.55
M14I	0.66 ± 0.018	2.8	-4.28 ± 0.364	11.0	-7.56	2.72 ± 0.060	15.6	1.57 ± 0.078	27.3	-6.57
M17I	0.89 ± 0.036	1.0	-2.22 ± 0.139	21.3	-8.57	keine Bindung				
M29I	0.90 ± 0.007	0.8	-2.37 ± 0.043	19.8	-8.27	2.34 ± 0.197	22.5	1.77 ± 0.406	26.8	-6.22
M34I	0.85 ± 0.015	1.7	-3.52 ± 0.165	14.6	-7.87	2.91 ± 0.048	15.4	2.07 ± 0.09	31.0	-7.17
E46Q	keine Bindung					2.3 ± 0.080	10.2	1.08 ± 0.105	26.5	-6.82
M90I	0.82 ± 0.011	3.3	-2.58 ± 0.167	16.4	-7.47	keine Bindung				
D94N	keine Bindung					2.92 ± 0.056	11.9	1.42 ± 0.074	27.3	-6.72
H97R	Proteinpräzipitation					Proteinpräzipitation				
H125R	0.95 ± 0.065	1.9	-2.37 ± 0.310	18.1	-7.77	2.94 ± 0.076	16.6	1.17 ± 0.079	27.6	-7.06
H127A	keine Bindung					2.68 ± 0.12	20.50	1.22 ± 0.158	25.5	-6.38

Die Tabelle listet die verschiedenen Metallionen auf, die zu den jeweiligen Varianten des FetP-Dimers in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 titriert wurden. Im Vergleich dazu sind nochmals die Daten des Wildtyp-Proteins vermerkt. Durch die Auswertung mit dem Programm Microcal-Origin wurden die Werte für die Stöchiometrie (*n*, Kation : FetP-Dimer), die Dissoziationskonstante der Bindung (*k_d*), die gemessene Enthalpie (ΔH) und die Entropieänderung (ΔS) bestimmt, womit die Änderung der freien Gibbs-Energie (ΔG) ermittelt werden konnte.

3.6 Handelt es sich bei FetP um eine neuartige Eisen-Reduktase?

Basierend auf der Beobachtung, dass FetP *in vitro* das redoxaktive Metall Kupfer und Mangan als Analogon für Eisen gebunden hatte, sollte mittels Reduktaseassay überprüft werden, ob das Protein *in vivo* Fe(III) zu Fe(II) reduzieren kann. Die Bildung des Produktes Fe(II) wurde durch spezifische Bindung an Bathophenanthrolin-disulfonsäure (BPS) und Absorptionsänderung bei 520 nm gemessen. Der Kontrollstamm ECA611(*glmS-Gm*) konnte aufgrund von noch vorhandenen Reduktasen Fe(III) zu Fe(II) reduzieren. Die *fetP*-Expression im Stamm ECA614(*glmS-fetP*) bewirkte jedoch eine Verdopplung der Reduktionsrate (Abb. 24A). Durch die jeweilige Differenz der Reduktionsraten beider Stämme konnte mittels Lineweaver-Burk-Plot ein v_{\max} von 3 $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{min}/\text{g TG}$ und ein k_m mit 1.5 mM Fe(III) bestimmt werden (Abb. 24B). Wurden die Reduktionsraten beider Stämme jeweils einzeln nach Lineweaver-Burk geplottet, waren die Ergebnisse sehr fehlerbehaftet (Daten nicht gezeigt). Trotzdem konnte aufgrund der doppelt so hohen Reduktionsrate von ECA614(*glmS-fetP*) im Vergleich zum Kontrollstamm gefolgert werden, dass FetP *in vivo* vermutlich als Reduktase agiert.

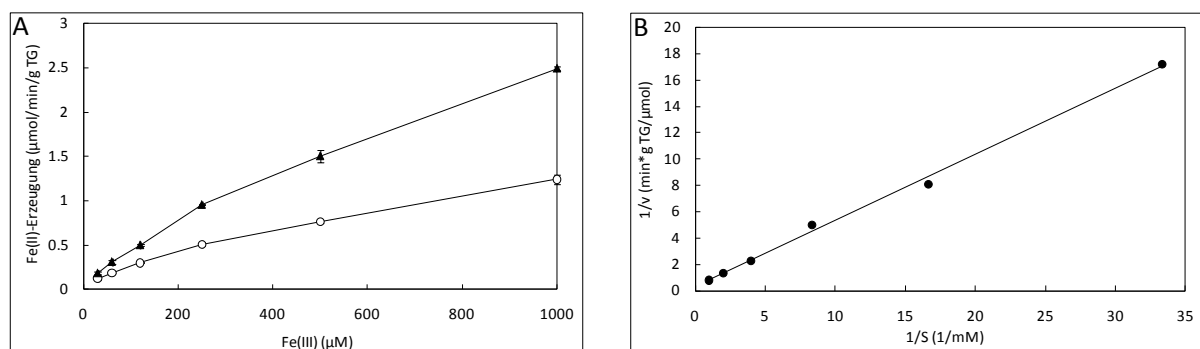


Abb. 24: FetP funktioniert *in vivo* als Eisen-Reduktase.

Ein Eisen-Reduktaseassay wurde mit den *E. coli* Stämmen ECA611(*glmS-Gm*) (○) und ECA614(*glmS-fetP*) (▲) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an FeCl_3 durchgeführt. Die Fe(II)-Erzeugung wurde jeweils mit 1 mM Bathophenanthrolin-disulfonsäure (BPS) bei 37°C für 2 h bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmt, wobei 132 μg Trockengewicht (TG) an Zellen jeweils eingesetzt wurden und die Reduktionsrate in 1/min daraus resultierte. Mittels Kalibrierungskurve wurde unter den gleichen Bedingungen ein Absorptionskoeffizient von 0.0695 pro nmol Fe(II) ermittelt, der zur Berechnung der Reduktionsrate in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g TG}$ eingesetzt wurde. Diese wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen in Abhängigkeit der eingesetzten FeCl_3 -Konzentrationen dargestellt (A). In einem Lineweaver-Burk-Plot wurde die reziproke Differenz beider Kurven ($1/(v_{\text{fetP}} - v_{\text{Kontrolle}})$) gegen $1/S$ aufgetragen (B). Durch lineare Regression ($R^2 = 0.9967$) wurde ein v_{\max} von 3 $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{min}/\text{g TG}$ und ein k_m von 1.5 mM Fe(III) ermittelt.

Im Rückblick auf die anaeroben Wachstums-Endpunktbestimmungen (Abb. 12) war demnach der signifikante Unterschied zwischen den Stämmen ECA612(*glmS-fetMP*) und ECA613(*glmS-fetM*) bei hohen Fe(III)Cl_3 -Konzentrationen vermutlich auf die fehlende FetP-Reduktaseaktivität im Stamm ECA613(*glmS-fetM*) zurückzuführen.

Um zu untersuchen, ob FetP für die Eisen-Reduktion möglicherweise Cu(I) als Elektronendonator nutzte, wurden die anaeroben Wachstums-Endpunktbestimmungen in Gegenwart hoher Fe(III)Cl₃-Konzentrationen und Zusatz von Ag(I) als Cu(I)-Analogon wiederholt. In der Tat konnte der FetP spezifische Effekt durch 1 µM Ag(I)Cl gehemmt und das Wachstum von Stamm ECA612(*glmS-fetMP*) um einen Faktor von 1.06 ± 0.03 verringert werden (Abb. 25). Basierend auf diesen Ergebnissen konnte FetP als Eisen-Reduktase beschrieben werden, die möglicherweise Cu(I) als Elektronendonator nutzt, was in dieser Form noch nicht beschrieben wurde.

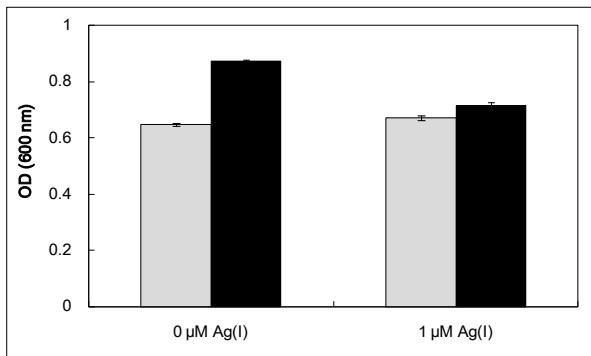


Abb. 25: Anaerob hemmt Ag(I) das verbesserte Wachstum von ECA612(*glmS-fetMP*) bei hohen Fe(III)-Konzentrationen.

Die *E. coli* Stämme ECA612(*glmS-fetMP*) (schwarze Balken) und ECA613(*glmS-fetM*) (graue Balken) wurden in Minimalmedium mit 0.2% Glukose und 100 µM FeCl₃ in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 µM AgCl bei 37°C anaerob und Licht abgeschirmt kultiviert. Die jeweiligen Optischen Dichten bei 600 nm wurden nach 17 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

3.7 FetM weist einen großen N-terminalen *Loop* im Periplasma auf.

Mit dem Programm <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> wurde eine Topologie-Vorhersage für FetM getroffen und damit ein zweidimensionales Modell erstellt (Abb. 26).

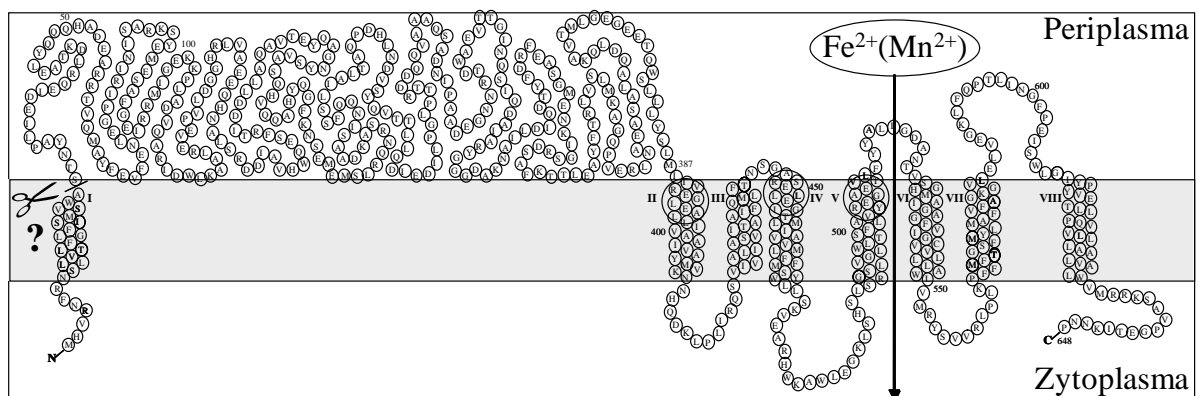


Abb. 26: Putatives Topologie-Modell von FetM.

Dargestellt sind die Aminosäuren mit Positionsangaben und die postulierten transmembranen Helices, gekennzeichnet von I – VIII. Die Kreise zeigen die drei REXXE-Motive (REGLE, RELLE und REGAE). Fraglich ist, ob das Protein N-terminal einen Membran-Anker aufweist oder die Signalsequenz abgespalten wird.

Dabei wurden acht transmembrane Helices (TMH) postuliert, wobei beide Termini zytoplasmatisch lokalisiert waren. Auffällig erschien die riesige periplasmatische *Loop*-Domäne zwischen TMH I und II.

Um zu überprüfen, ob TMH I als N-terminaler Membran-Anker fungiert, sollte das Membranprotein als *Strep-tag*[®]II-Fusionsprotein synthetisiert und mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden. Hierfür wurde die *fetM*-Gensequenz ohne eigenes Start- und Stoppcodon hinter den *tetA*-Promotor in den Vektor pASK-IBA3 kloniert (pECD1098), sodass die Genexpression in dem plasmidfreien *E. coli* Stamm BL21 durch AHT-Zusatz induziert wurde. Nach Zellaufschluss wurde das FetM-Protein aus der Membran solubilisiert und konnte aufgrund des C-terminalen *Strep-tag*[®]II-Epitops (WSHPQFEK), der an das Säulenmaterial StrepTactin-Sepharose band, bis zur Homogenität nativ gereinigt werden (Abb. 27). Bei der Aufreinigung wurde eine Ausbeute von etwa 1 mg Protein je Liter Kultur erzielt.

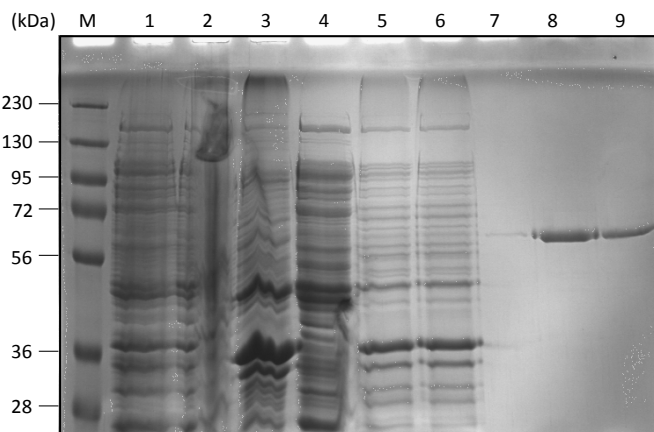


Abb. 27: Aufreinigung von FetM als *Strep-tag*[®]II-Fusionsprotein.

In der 12.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie Färbung wurden verschiedene Fraktionen der *StrepTactin*-Affinitätschromatographie aufgetragen. 1: 10 µl Rohextrakt vor Induktion (50 µg TG), 2: 10 µl Rohextrakt nach Induktion (50 µg TG), 3: 10 µl resuspendierte Pelletfraktion nach Zellaufschluss und Zentrifugation (50 µg TG), 4: Säulendurchfluss, 6: 10 µl der ersten Waschfraktion, 7: 10 µl der letzten Waschfraktion, 8: 10 µl der zweiten Eluatsfraktion (4 µg Protein), 9: 10 µl der dritten Eluatsfraktion (2 µg Protein). Zur Größenbestimmung wurde der

Protein Marker (M) *PageRuler*[™]*Prestained Protein Ladder Plus* (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde für das FetM *Strep-tag*[®]II-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 71.372 kDa ermittelt (Daten nicht gezeigt), was dem theoretischen Molekulargewicht mit 71.357 kDa des Fusionsproteins ohne gebundenem Metallion und ohne eigener Signalsequenz entsprach. Die tatsächliche Abspaltung des putativen Membran-Ankers sollte durch *In-Source-Decay* (ISD) MALDI MS verifiziert werden. Hierbei wurde die Aminosäuresequenz LDKTAELYQQQHADE durch die massenspektrometrischen Unterschiede der ISD-Fragmente ermittelt (Abb. 28). Über das Molekulargewicht des kleinsten ISD-Fragmentes mit 1648.102 Da konnte der N-Terminus von FetM mit der Aminosäuresequenz STNYAPLIEDIEQR ohne Signalsequenz bestätigt werden.

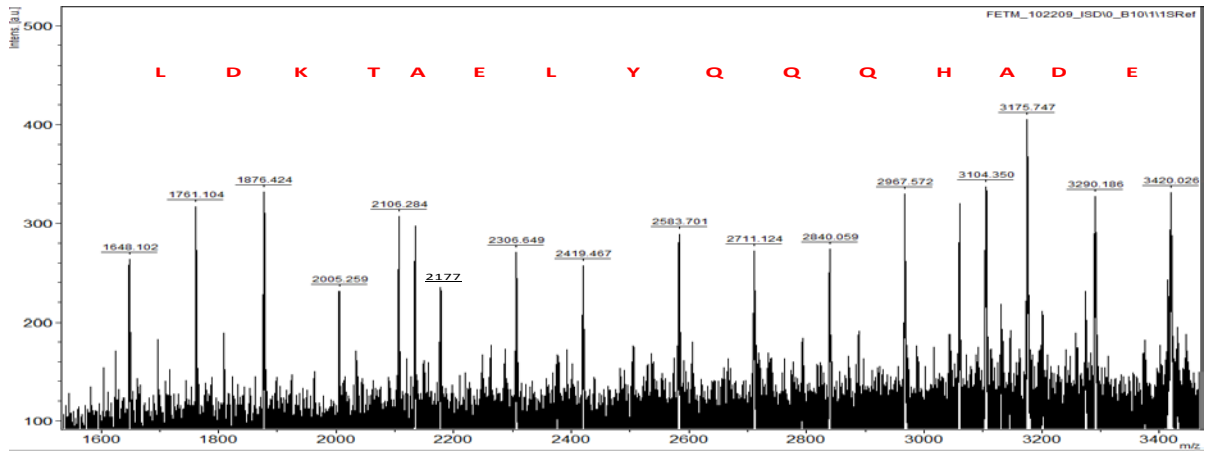


Abb. 28: In-Source-Decay (ISD) MALDI-MS von FetM.

Das *Strep*-tag[®] II-Fusionsprotein wurde aus der Membran solubilisiert und gereinigt. Mittels ISD MALDI-MS wurden die massenspektrometrischen Unterschiede der ISD-Fragmente einzelnen Aminosäuren zugeordnet und so die N-terminale Aminosäuresequenz für FetM bestimmt. Die Messung wurde von Frau Dr. A. Schierhorn durchgeführt.

3.8 Die FetM-Loop-Domäne weist einen hohen Anteil an α -Helices auf.

Für fortführende Untersuchungen sollte nur die *Loop*-Domäne von FetM als *Strep*-tag[®] II-Fusionsprotein synthetisiert und aus dem Periplasma mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden. Dazu wurde die für die *Loop*-Domäne kodierende *fetM*-Sequenz (*fetM*₇₃₋₁₁₆₀) hinter den *tetA*-Promotor in den Vektor pASK-IBA6 kloniert (pECD1138), sodass die Genexpression in dem plasmidfreien *E. coli* Stamm BL21 durch AHT-Zusatz induziert wurde. Nach dem periplasmatischen Aufschluss ohne Lysozym konnte die 42.106 kDa *Loop*-Domäne aufgrund des N-terminalen *Strep*-tag[®] II-Epitops (WSHPQFEK), der an das Säulenmaterial StrepTactin-Sepharose band, aus der periplasmatischen Fraktion gereinigt werden (Abb. 29). Dabei wurde eine Ausbeute von 5 mg Protein je Liter Kultur erzielt.

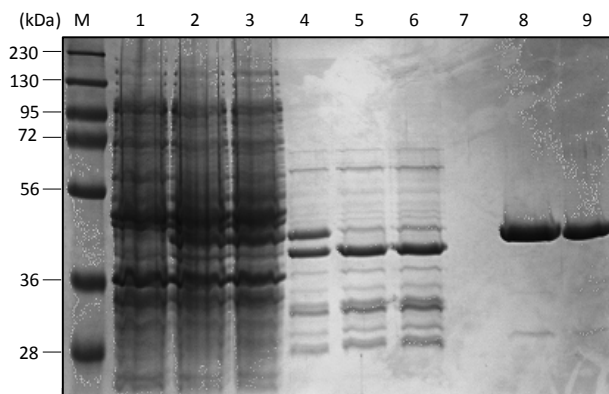


Abb. 29: Aufreinigung von FetM_{loop} als *Strep*-tag[®] II-Fusionsprotein aus dem periplasmatischen Extrakt.

In der 12.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung wurden verschiedene Fraktionen der *Strep*Tactin-Affinitätschromatographie aufgetragen. 1: 10 µl Rohextrakt vor Induktion (50 µg TG), 2: 10 µl Rohextrakt nach Induktion (50 µg TG), 3: 10 µl zytoplasmatischer Extrakt (50 µg TG), 4: 5 µl periplasmatischer Extrakt, 5: 10 µl Säulendurchfluss, 6: 10 µl der ersten Waschfraktion, 7: 10 µl der letzten Waschfraktion, 8: 5 µl der zweiten Eluatsfraktion (5 µg Protein), 9: 5 µl der dritten Eluats-

fraktion (4 µg Protein). Zur Größenbestimmung wurde der Protein Marker (M) *PageRuler*[™] *Prestained Protein Ladder Plus* (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Ein CD-Spektrum im Fern-UV Bereich sollte zeigen, ob die FetM-*Loop*-Domäne typische Sekundärstrukturen aufwies. Aufgrund des Maximums bei 192 nm und der beiden Minima bei 208 nm und 220 nm (Abb. 30) zeichnete sich die *Loop*-Domäne durch einen hohen Anteil an α -Helices aus, was für eine native Struktur sprach.

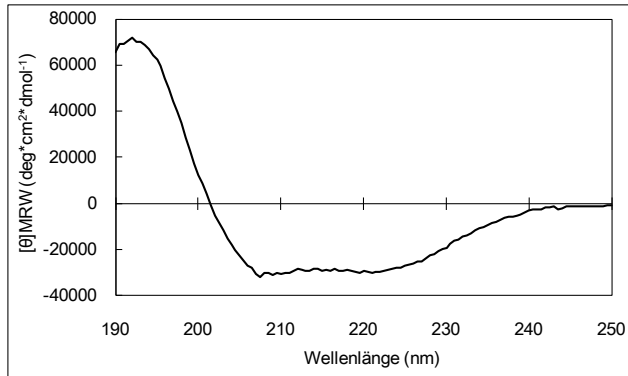


Abb. 30: CD-Spektrum der FetM-*Loop*-Domäne. Das Fern-UV Spektrum wurde bei einer Proteinkonzentration von 15 μ M in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 bei 25 °C aufgenommen. Dargestellt ist das Proteinspektrum, wovon das Referenzspektrum des Puffers abgezogen wurde.

3.9 Die *Loop*-Domäne von FetM bindet Mn^{2+} als Fe^{2+} -Analogon mit hoher Spezifität.

Desweiteren sollte eine direkte Metallionenbindung an die FetM-*Loop*-Domäne mittels ITC untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass weder Cu^{2+} in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 noch Zn^{2+} in 25 mM ACES/NaOH pH 7.2 von der FetM-*Loop*-Domäne gebunden wurde, was sich in verschiedenen Experimenten mit Protein aus mehreren voneinander unabhängigen Aufreinigungen und unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen reproduzieren ließ (Daten nicht gezeigt). Wurde die N-terminale Domäne von FetM jedoch mit $MnCl_2$ in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 titriert, konnte eine Bindung beobachtet werden (Abb. 31A).

Es zeigte sich hierbei ein Übergang von exothermen in endotherme Reaktionen, was eigentlich für ein Protein mit zwei Bindestellen spricht und bereits bei den Titrations von FetP im gleichen Puffer beobachtet wurde (Abb. 19B). Da die Kontrolltitration von $MnCl_2$ in 25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2 in qualitativ und quantitativ ähnlichen endothermen Reaktionen resultierte (Abb. 31B) wurde nach Subtraktion der Kontrolltitration mit dem Modell für eine Bindestelle am Protein eine Stöchiometrie von Mn^{2+} : FetM-*Loop*-Domäne mit 0.745 : 1 bestimmt und eine Wärmeabgabe ΔH von $-0.413 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ mit einer Dissoziationskonstante k_d von $5.6 \mu\text{M}$ berechnet. Mit Hilfe der errechneten Entropieänderung S von $+22 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ konnte die Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG mit $-6.56 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ermittelt werden, wobei der Bindungsprozess Enthalpie- und Entropie-getriebenen wurde.

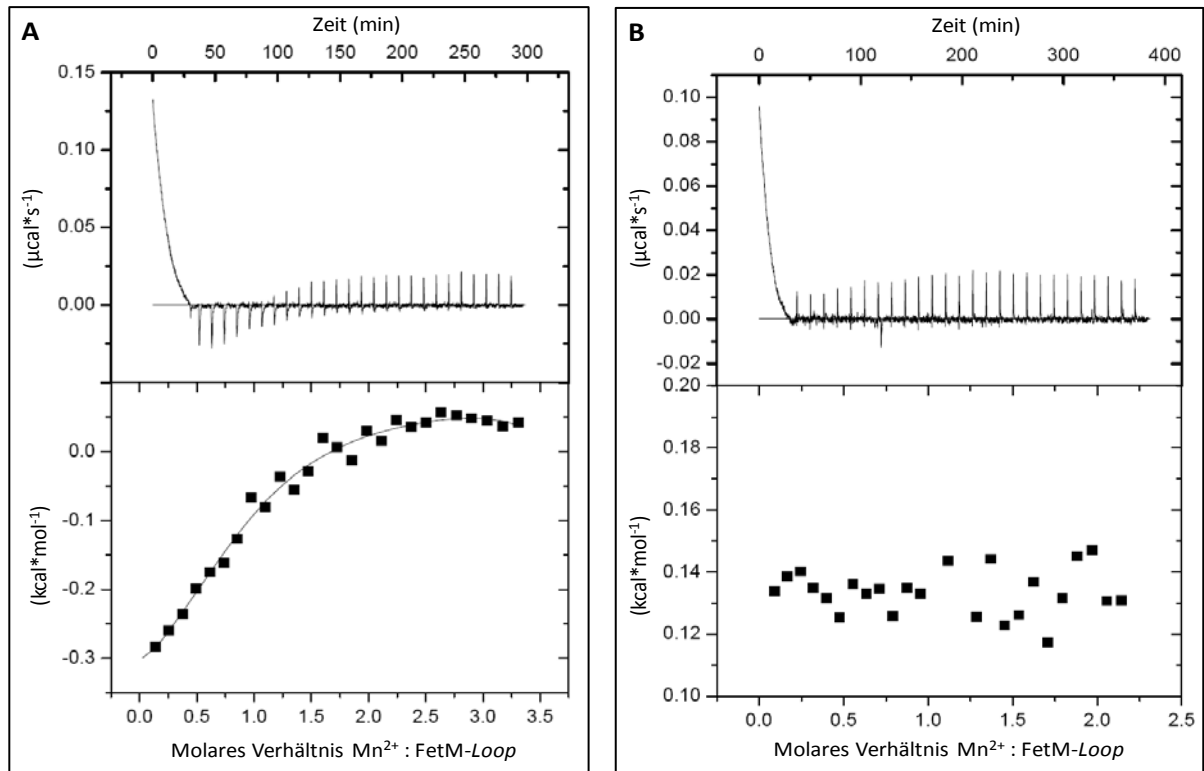


Abb. 31: ITC mit MnCl₂ in 25 mM Bis-Tris pH 7.2.

Titration von 13.3 μM FetM-Loop-Domäne mit 216 μM MnCl₂ in 28 Schritten zu je 10 μl bei 25 °C (A). Kontrolltitration mit 216 μM MnCl₂ in die Pufferlösung in 28 Schritten zu je 10 μl bei 25 °C (B). Die unteren Abbildungen zeigen die integrierten Daten. Die Linie entspricht der angepassten Kurve für eine Bindestelle am Protein (A).

Die Spezifität der N-terminalen Loop-Domäne von FetM für Mn(II) als Fe(II)-Analogon ging mit den erhaltenen physiologischen Daten einher und unterstützte die Annahme, dass FetM als Fe(II)-Importer fungiert, wobei Mn(II) ebenfalls transportiert worden sein könnte.

3.10 Interagiert die FetM-Loop-Domäne mit FetP?

Eine *in vitro* Interaktionsstudie sollte mittels Far-Western-Blot durchgeführt werden, wobei die FetM-Loop-Domäne als Strep-tag[®] II-Fusionsprotein vorlag und FetP als His-tag[®]-Fusionsprotein gereinigt wurde, ohne anschließend den His-tag[®] abzuspalten. In drei nativen Gradientengelen wurde jeweils FetP-His als sogenanntes *prey* Protein neben dem Strep-FetM-Loop und BSA als Positiv- bzw. Negativkontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Da unter nativen Bedingungen das Laufverhalten eines Proteins stark von dessen Ladung (Wittig und Schagger, 2005) und Konformation abhängig ist, wurde kein Protein Marker in den Gelen aufgetragen. Die Coomassie-Färbung eines der Gele diente dem Nachweis und der Lokalisation der jeweiligen Proteine, wobei sich zeigte, dass der Strep-FetM-Loop und BSA

mit einem jeweiligen Molekulargewicht von 42 kDa und 66 kDa auf gleicher Höhe lagen (Abb. 32A). Die zusätzlich schwache Bande von BSA deutete auf eine beginnende Denaturierung hin. Für FetP-*His* hingegen wurde ein Schmier detektiert, der wahrscheinlich auf eine Monomerisierung des Homodimers und partielle Entfaltungen des Proteinprotomers selbst zurückzuführen war. Nach dem Transfer der Proteine aus den zwei weiteren Polyacrylamid-Gelen auf zwei Nitrocellulose-Membranen erfolgte zunächst der Nachweis des *prey* Proteins über dessen *His*-tag[®] (Abb. 32B). Die zweite Membran wurde für die Interaktionsstudie verwendet, welche mit dem *bait* Protein *Strep*-FetM-*Loop* überschichtet wurde, das zuvor mit MnCl₂ für 30 min auf Eis inkubiert und danach gegen Puffer zum Entfernen ungebundener Metallionen dialysiert wurde. Nach Inkubation und anschließendem Waschen der Membran wurde nicht gebundenes *bait* Protein entfernt und die FetM-*Loop*-Domäne mittels *Strep*-tag[®]II-Detektionssystem nachgewiesen. Aufgrund der detektierten Hauptbande und eines schwachen Schmiere war ebenfalls von einer partiellen Denaturierung der FetM-Domäne im Gel auszugehen (Abb. 32C). Darüber hinaus war eine Bande auf etwa gleicher Höhe in der Spur zu sehen, in der FetP-*His* aufgetrennt wurde. Demnach schien an dieser Stelle das für die Interaktion nötige native FetP-Protein vorzuliegen. Da keine Bande in der Spur von BSA detektiert werden konnte, war von einer spezifischen Interaktion zwischen FetP und der FetM-*Loop*-Domäne auszugehen. Wurde mangangebundenes FetP-*His*₆ als *bait* und die FetM-*Loop*-Domäne als *prey* Protein eingesetzt, konnte jedoch keine Interaktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies war auch bei Verwendung von *Blue-Native*-Gradientengelen der Fall (Daten nicht gezeigt).

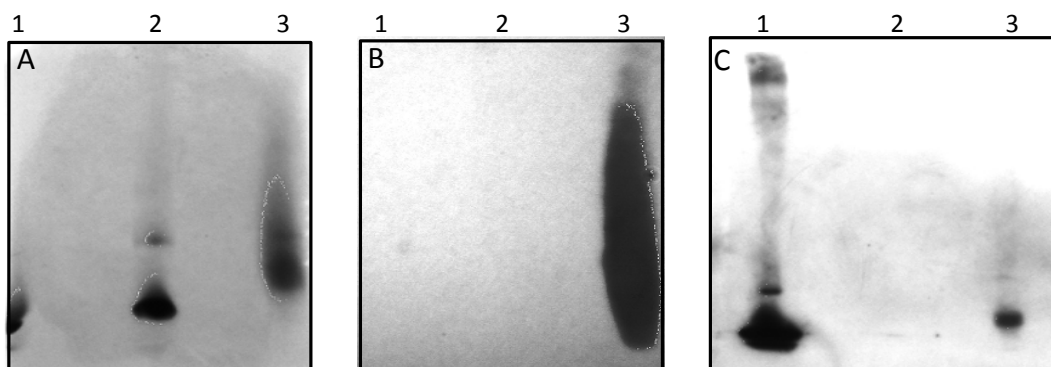


Abb. 32: Der periplasmatische FetM-*Loop* interagiert *in vitro* mit FetP.

Mittels Far-Western-Blot konnte eine erfolgreiche Interaktion nachgewiesen werden. In dem nativen Gradientengel (5 – 13.5%) nach Coomassie Färbung wurden jeweils 5 µg *Strep*-FetM-*Loop* (1), BSA (2) und FetP-*His* (3) aufgetragen (A). Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde FetP-*His* in Spur 3 mit dem *His*-tag[®] Detektionssystem nachgewiesen, während der *Strep*-FetM-*Loop* (1) und BSA (2) dabei nicht detektiert wurden (B). Nach dem Transfer der Proteine auf eine zweite Membran, wurde diese für die Interaktionsstudie mit 100 µg mangangebundenem *Strep*-FetM-*Loop* in Protein-Bindepuffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach ausreichendem Waschen der Membran erfolgte der Nachweis des FetM-*Loops* mittels *Strep*-tag[®]II-Detektionssystem.

Mittels ITC sollte eine Interaktion zwischen der manganbeladenen FetM-Loop-Domäne und FetP verifiziert werden. Dazu war es notwendig, dass beide Interaktionspartner ohne jeweiligen tag eingesetzt werden konnten. FetP wurde aus dem Periplasma gereinigt und der His-tag[®] mit der Protease Thrombin vom Protein abgespalten. Wie zuvor gezeigt, konnte auch die FetM-Loop-Domäne erfolgreich aus dem Periplasma gereinigt werden und lag als Strep-tag[®]II-Fusionsprotein vor. Im nächsten Schritt wurde das N-terminale Strep-tag[®]II-Epitop mit der Protease Faktor Xa von der Loop-Domäne abgespalten und über eine zweite StrepTactin-Affinitätschromatographie von der FetM-Loop-Domäne getrennt. Nach der Spaltung wurde eine einzige Bande erhalten, wobei der erwartete Shift von theoretisch 42.106 kDa auf 40.452 kDa in der 12.5%igen SDS-PAGE nicht zu sehen war (Abb. 33A). Aus diesem Grund wurde die Abspaltung des N-terminalen Strep-tag[®]II-Epitops mittels Strep-tag[®]II-Detektionssystem auf einer Nitrocellulose-Membran überprüft und konnte bestätigt werden (Abb. 33B).

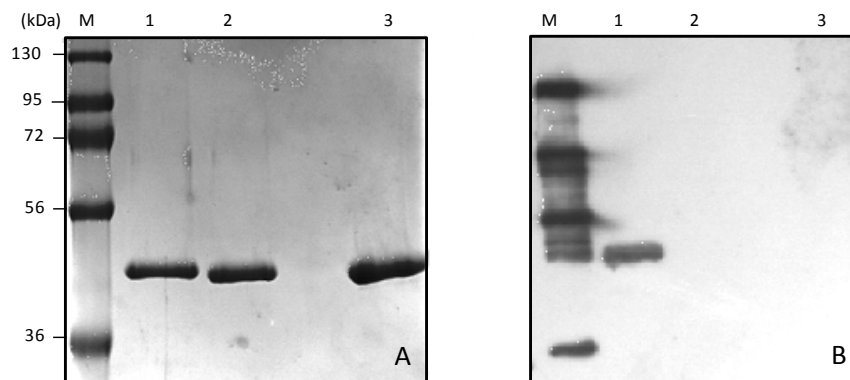


Abb. 33: Abspaltung des N-terminalen Strep-tag[®]II-Epitops von der FetM-Loop-Domäne.

In der 12.5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung wurden Fraktionen aufgetragen, um die erfolgreiche Strep-tag[®]II-Abspaltung von der FetM-Loop-Domäne mittels Faktor Xa zu dokumentieren (A). 1: 2 µg Strep-FetM-Loop-Domäne vor Abspaltung, 2: 2 µg Strep-FetM-Loop-Domäne nach Abspaltung, 3: 2 µg FetM-Loop-Domäne aus Säulendurchfluss der zweiten StrepTactin-Affinitätschromatographie. Die gesplante Domäne hatte eine um den Strep-tag[®]II geringere Größe was hiermit jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Daher wurden die Fraktionen in der 12.5%igen SDS-PAGE wie für (A) beschrieben aufgetrennt und die FetM-Loop-Domänen auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis für die Abspaltung des Strep-tag[®]II-Epitops erfolgte mittels Strep-tag[®]II-Detektionssystem (B). Zur Größenbestimmung wurde jeweils der Protein Marker (M) PageRuler[™]Prestained Protein Ladder Plus (#SM1811) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet

Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen der FetM-Loop-Domäne und FetP metallabhängig erfolgte, wurden für die nachstehenden ITC-Experimente zunächst eventuell noch vorhandene Metallionen aus den jeweiligen Proteinproben entfernt, indem FetP und die FetM-Loop-Domäne mit dem Chelator EDTA inkubiert und anschließend gegen entsprechenden Reaktionspuffer (25 mM Bis-Tris/HCl pH 7.2) dialysiert wurde. Wurde dann FetP mit der FetM-Loop-Domäne titriert, konnte keine Enthalpieänderung beobachtet werden, was auch für die reverse Titration galt. Aus diesem Grund wurde zunächst die FetM-Loop-

Domäne mit MnCl_2 vorinkubiert und anschließend erneut gegen Reaktionspuffer dialysiert, um ungebundene Metallionen zu entfernen, die anderenfalls direkt an FetP während der Titration binden und so den Interaktionsnachweis zwischen der FetM-Loop-Domäne und FetP beeinträchtigen würden. Wurde FetP nun mit der mangangebundenen FetM-Loop-Domäne titriert, traten exotherme Reaktionen auf, die mit dem Modell für eine Bindestelle am Protein ausgewertet werden konnten (Abb. 34A). Dabei wurde eine Stöchiometrie von FetM-Loop-Domäne : FetP_D mit 0.22 : 1 bestimmt. Dieser ungewöhnliche Wert war damit zu erklären, dass nach der Inkubation der FetM-Loop-Domäne mit MnCl_2 und anschließender Pufferdialyse in Abhängigkeit der ermittelten Bindeaffinität für dieses Metallion ($k_d = 5.6 \mu\text{M}$) und der Proteinkonzentration nur etwa 20% der eingesetzten FetM-Loop-Domäne noch mangangebunden für die FetP-Titration vorlag. Daher konnte gefolgert werden, dass die Interaktion zwischen der FetM-Loop-Domäne und FetP_D mit einer Stöchiometrie von 1 : 1 metallabhängig erfolgte.

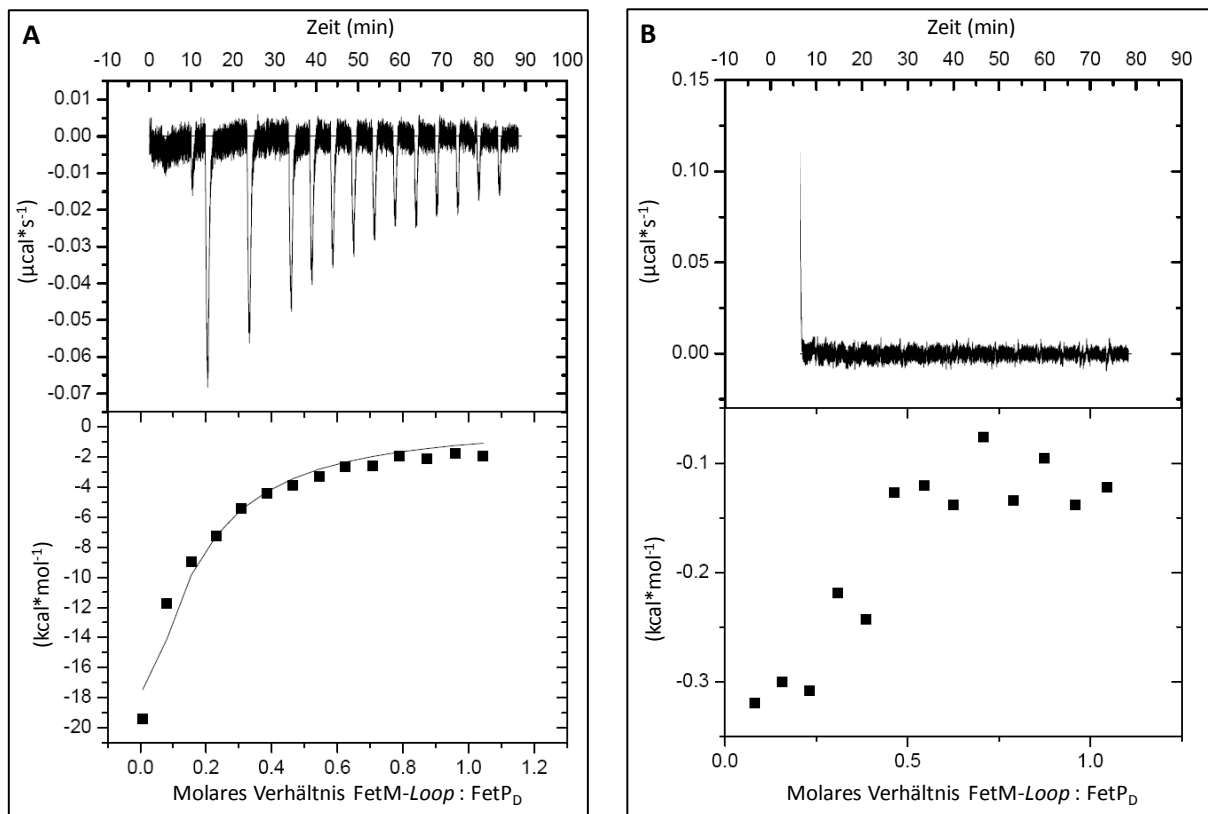


Abb. 34: ITC – Metallabhängige Interaktion zwischen der FetM-Loop-Domäne und FetP.

Titration von $3 \mu\text{M}$ FetP_D mit $16 \mu\text{M}$ FetM-Loop-Domäne in 14 Schritten zu je $20 \mu\text{l}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (A). Für die Titration wurde die FetM-Loop-Domäne zuvor mit $200 \mu\text{M}$ MnCl_2 für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend gegen Reaktionspuffer zur Entfernung ungebundener Metallionen dialysiert. Kontrolltitration mit $16 \mu\text{M}$ mangangebundener FetM-Loop-Domäne in die Pufferlösung in 14 Schritten zu je $20 \mu\text{l}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (B). Zur Datenauswertung wurde die zweite Kontrolltitration von $3 \mu\text{M}$ FetP_D mit Reaktionspuffer durchgeführt, die aufgrund der Ähnlichkeit zu (B) hier nicht gezeigt wird. Die unteren Abbildungen zeigen die integrierten Daten. Die Linie entspricht der angepassten Kurve für eine Bindestelle am Protein (A).

Eine Aussage über die Affinität wurde nicht getroffen, da die Enthalpieänderung nicht nur aus der Proteininteraktion, sondern auch der Metallbindung resultieren konnte.

Wurde für die reverse Titration FetP mit MnCl_2 vorinkubiert, danach gegen Reaktionspuffer dialysiert und anschließend zu der metallfreien FetM-*Loop*-Domäne titriert, konnte jedoch keine Bindung beobachtet werden, was möglicherweise auf eine Denaturierung der FetM-*Loop*-Domäne während der Titration zurückzuführen war und kongruent zu dem negativen Resultat des Far-Western-Blots mit der FetM-*Loop*-Domäne als *prey* Protein einherging.

4 Diskussion

4.1 FetMP als spezifisches Eisenaufnahmesystem in *E. coli*.

Die ILT-Superfamilie (TC.9.A.10) umfasst die Transporter der OFeT-Familie (TC.9.A.10.1) und der PbrT-Familie (TC.9.A.10.2) (Debut *et al.*, 2006). Topologie-Analysen zufolge weisen die Proteine dieser Superfamilie sieben transmembrane Helices mit zwei konservierten REXXE Motiven im ersten und vierten Membrandurchgang auf. Dass diese für einen entsprechenden Metallionentransport essentiell sind, konnte bereits für die beiden Vertreter der OFeT-Familie Ftr1p aus *S. cerevisiae* und EfeU aus *E. coli* Nissle 1917 gezeigt werden (Severance *et al.*, 2004, Grosse *et al.*, 2006). Neben diesen beiden Proteinen gehören vorwiegend Permeasen hochaffiner Fe²⁺-Aufnahmesysteme aus Pilzen, die eine große Homologie zu Ftr1p aus *S. cerevisiae* besitzen und Oxidase-abhängig eine ähnliche Funktion übernehmen, zu dieser Familie. Darunter zählen beispielsweise Fip1 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Askwith und Kaplan, 1997) oder auch CaFTR1 aus *Candida albicans* (Ramanan und Wang, 2000). Neben EfeU aus *E. coli* Nissle 1917 wurde bislang nur YwbL aus *Bacillus subtilis* als weiterer bakterieller OFeT-Vertreter charakterisiert. Dieses Membranprotein ist Bestandteil des EfeUOB orthologen Systems YwbLMN, was für ein Wachstum unter eisenlimitierenden Bedingungen ohne Citrat und Siderophore essentiell ist (Ollinger *et al.*, 2006). Durch Microarray-Analysen konnten bisher nur zwei weitere Gene aus *Magnetospirillum magneticum* Stamm AMB-1 identifiziert werden, die ILT-Vertreter jeweils einer Familie kodieren und deren Genexpression in Gegenwart von Eisenmangel induziert wird (Suzuki *et al.*, 2006)

Als Namensgeber der zweiten Familie transportiert das PbrT-Protein aus dem schwermetallresistenten Bakterium *C. metallidurans* Stamm CH34 divalente Bleiionen über die innere Membran in das Zytoplasma (Borremans *et al.*, 2001), die dort entweder akkumuliert oder über die ATPase PbrA und die putativ akzessorischen Proteine PbrBCD wieder aus der Zelle transportiert werden können. Warum ein solch toxisches Kation überhaupt von den Zellen aufgenommen wird, ist bislang offen (Silver und Phung Le, 2005). Im Gegensatz zu den OFeT-Transportern besitzt das PbrT-Protein neben sieben putativen Membrandurchgängen in der C-terminalen Region ein N-terminales hydrophobes Segment, das möglicherweise als Signalsequenz dient (Debut *et al.*, 2006). Aufgrund einer 28%igen Sequenzidentität zwischen der C-terminalen Region von PbrT und dem OFeT-Vertreter Ftr1p ist von einer strukturellen als auch funktionellen Verwandtschaft auszugehen. Homologe PbrT-Proteine sind ausschließlich in Proteobakterien zu finden und mit etwa

620 Aminosäuren recht groß (Debut *et al.*, 2006). Hierzu gehört ebenfalls das aus 648 Aminosäuren bestehende Protein FetM aus dem *E. coli* Stamm F11 (Grass, 2007). Basierend auf den Kenntnissen über die ILT-Superfamilie und der Tatsache, dass der uropathogene *E. coli* Stamm F11 (Stapleton *et al.*, 1991) wohl kaum einer erhöhten Konzentration an Bleiionen im Urin ausgesetzt ist (Brooks und Keevil, 1997), sondern vielmehr von einer ausreichenden Eisenaufnahme abhängig ist (Johnson, 1991, Stapleton *et al.*, 1991, Payne und Mey, 2010), wurde vermutet, dass FetM divalente Eisenionen in das Zytoplasma transportiert.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde das *fetMP*-Operon mittels Mini-Transposon (Choi und Schweizer, 2006) in das Chromosom des Eisen-spezifischen Deletionsstammes ECA458 (Taudte und Grass, 2010) integriert, um so FetMP-spezifische Effekte besser analysieren zu können. Diesem Stamm fehlen die Eisenaufnahmesysteme, die in *E. coli* K12 (W3110) bekannt und für das Wachstum in Minimalmedium notwendig sind (Grass *et al.*, 2005). Dazu gehören das Eisencitrat-Aufnahmesystem FecA-E (Hussein *et al.*, 1981, Enz *et al.*, 2003), das Fe²⁺-Aufnahmesystem FeoABC (Kammler *et al.*, 1993), der Transporter für divalente Metallionen MntH (Makui *et al.*, 2000), das ZupT-Protein mit breitem Substratspektrum (Grass *et al.*, 2005), als auch die Isochorismat-Synthase EntC (Tummuru *et al.*, 1989, Liu *et al.*, 1990), die den ersten Schritt der Enterobaktinsynthese katalysiert. Obwohl *E. coli* auch in der Lage ist, dreiwertige Eisenionen durch Xeno-Siderophore wie Ferrichrom über das Fhu-System aufzunehmen (Hantke, 1983, Braun *et al.*, 1999, Andrews *et al.*, 2003), kann dies bei Verwendung des definierten Mediums ohne Xeno-Siderophore ausgeschlossen werden.

Erste Hinweise darauf, dass FetMP ebenfalls als Eisenaufnahmesystem fungieren könnte, wurden anhand von Wachstums-Endpunktbestimmungen ermittelt (Abb. 5A). Dabei zeigte sich, dass der Deletionsstamm mit dem *fetMP*-Operon unter eisenlimitierenden Bedingungen wachsen konnte, was für den Kontrollstamm nicht zutraf. Dieser drastische Effekt wurde hinsichtlich des EfeU-Eisenaufnahmetransporters von Grosse *et al.* (2006) nicht beobachtet, was vermutlich auf dem verwendeten Minimalmedium beruht, das im Gegensatz zu den Experimenten in der vorliegenden Arbeit 5 µM Eisen-Ammonium-Citrat enthielt und somit das Wachstum des Kontrollstammes ermöglichte. Dennoch wurde ein verbessertes Wachstum der eisenspezifischen-Deletionsmutante nachgewiesen, das aus der vektorgekoppelten *in trans* Expression des *efeU*-Gens resultierte. Da keine Wachstumsverbesserung in einem zink- bzw. kupferspezifischen Deletionsstamm auftrat, scheint die EfeU-Permease ausschließlich an der Eisenaufnahme beteiligt zu sein (Grosse *et al.*, 2006).

Dass dies auch auf das FetMP-System zutrifft, wurde durch eine erhebliche Wachstumsverbesserung der Eisenaufnahmemutante mit dem *fetMP*-Operon in Gegenwart

des Chelators CDTA und einer geringen Konzentration an Fe(III) bzw. Fe(II) nachgewiesen (Abb. 5A). Während Cao *et al.* (2007) für das EfeUOB System eine Präferenz gegenüber divalenten Eisenionen feststellten, trat hinsichtlich der Fet-Proteine kein signifikanter Wachstumsunterschied bei Zusatz der verschiedenen Eisenspezies auf. Das dabei beobachtete Wachstum des Kontrollstammes ist auf noch unbekannte Eisenaufnahmesysteme und den Phosphat-Transporter PitA zurückzuführen (Taudte, 2010), der Metallionen unspezifisch als Phosphat-Komplexe in die Zelle transportieren kann (Rosenberg *et al.*, 1977, van Veen *et al.*, 1994). Wurde den Kulturen neben CDTA jedoch Zn(II) (Abb. 5A), Co(II), Cu(II), Cd(II) oder Ni(II) zugesetzt (Daten nicht gezeigt), war das Wachstum mit dem der Kulturen ohne Zusätze vergleichbar. Dies könnte darin begründet sein, dass durch den zehnfachen Überschuss an Zn(II) zu dem Chelator, komplexierte Eisenionen kompetitiv frei gegeben und somit durch FetMP in die Zellen aufgenommen werden konnten.

Untersuchungen zur Antwort auf Zinkstress in dem *E. coli* Wildtypstamm W3110 zeigten, dass unter anderem zahlreiche Gene induziert wurden, deren Produkte an der Synthese und Aufnahme von Enterobaktin, als auch der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern für Eisenspeicherproteine wie Ferritin beteiligt sind (Egler *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass der Eisenmetabolismus durch hohe Zinkkonzentrationen beeinträchtigt wird (Pagani *et al.*, 2007). So resultiert Zinkstress in einem geringeren intrazellulären Eisengehalt und könnte die Synthese und Funktion von eisenhaltigen Proteinen und Hämgruppen drastisch ändern. Obwohl Zinkionen in der Lage sind, Eisenionen in ihren Komplexen zu ersetzen (Nies, 2007), können die physiologischen Funktionen der eisenhaltigen Proteine dann nicht mehr aufrechterhalten werden, da Zinkionen nicht redoxaktiv sind.

Ferner wurde durch Genexpressionsprofile von *E. coli* K12 gezeigt, dass durch Kupferstress Gene induziert wurden, deren Produkte an der Synthese und Aufnahme von Enterobaktin beteiligt sind (Kershaw *et al.*, 2005). Vermutlich resultiert dies entweder aus der Konkurrenz zwischen Eisen- und Kupferionen um die Bindestellen eisenhaltiger Proteine oder ist auf den kupferabhängigen Expressionsanstieg des *cueO*-Gens zurückzuführen, da die Multi-Kupfer-Oxidase Enterobaktin oxidieren kann und somit diesen Weg der Eisenaufnahme verhindert (Grass *et al.*, 2004).

In Betracht all dieser Kenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass das leicht verbesserte Wachstum der Eisenaufnahmemutante bei Zugabe von CDTA und Zn(II) (Abb. 5A) oder anderen divalenten Metalionen nicht auf deren Transport durch das FetMP-System basiert.

Wurden die Kulturen jedoch mit CDTA und Mn(II) versetzt, förderte dies bereits das Wachstum des Kontrollstammes erheblich (Abb. 5A), was auf ein unbekanntes

Manganaufnahmesystem schließen lässt. Das Zusammenspiel von Eisen- und Mangan-Homöostase in *E. coli* wurde von Imlay (2008) und Taudte (2010) analysiert. So scheinen Manganionen über einen noch unbekanntem Transporter in die Zellen aufgenommen zu werden, wo diese unter anderem die Synthese von aktiver SodA fördern und so unter aeroben Bedingungen einen Schutz vor oxidativem Stress gewähren. Die Disproportionierung der Superoxid-Anionen durch die eisenhaltige SodB sollte in diesen Zellen nicht gegeben sein, da deren Expression nur in Gegenwart von Eisen indirekt über den Fur-Regulator und direkt über die regulatorische RNA RyhB aktiviert wird (Dubrac und Touati, 2000). Darüber hinaus besitzt *E. coli* für die DNA-Synthese zwei weitere Isoformen von Ribonukleotid-Reduktasen, wobei NrdAB Eisen und NrDEF Mangan als Kofaktor nutzen (Atta *et al.*, 1992, Monje-Casas *et al.*, 2001). An diesen wenigen Beispielen wird deutlich, dass unter Eisenlimitation zentrale Stoffwechselprozesse der Eisenaufnahmemutante durch Manganionen aufrechterhalten werden können und somit das Wachstum fördern. Ob demzufolge der FetMP-abhängige Wachstumsunterschied bei Zusatz von CDTA und Mn(II) (Abb. 5A) ebenfalls auf einer kompetitiven Freigabe der Eisenionen beruht oder das FetMP-System neben Eisen- auch Manganionen transportieren kann, lässt sich anhand dieses Experimentes nicht eindeutig klären.

Als UPEC besiedelt der Stamm F11 den Urinaltrakt, wo das Bakterium neben eisenlimitierenden Bedingungen auch ständigen Änderungen der Urinzusammensetzung unterliegt, was deren Konzentration, Sauerstoffgehalt und pH Wert mit einschließt (Brooks und Keevil, 1997). Wie letzteres die Expression zahlreicher Gene in *E. coli* K12 reguliert, zeigt eine Arbeit von Maurer *et al.* (2005). Interessanterweise wurde eine Induktion vieler Gene durch einen niedrigen pH Wert nachgewiesen, deren Expression bei oxidativem Stress ebenfalls erhöht wurde. Somit folgerten die Autoren, dass eine gesteigerte aerobe Atmung bei pH 5 mit einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht, was eine Antwort auf oxidativen Stress nach sich zieht. Demgegenüber ist eine Energiekonservierung durch die protonenabhängige F₀F₁-ATPase bei einem hohen pH Wert nicht möglich, was mit der Repression von Genen korreliert, deren Produkte an energieaufwendigen Prozessen wie der Chemotaxis beteiligt sind (Maurer *et al.*, 2005). Dies könnte begründen, warum unter sauren bzw. basischen Bedingungen die Eisenaufnahmemutante kaum in der Lage war, zu wachsen (Abb. 5B, C), obwohl Fe(III) aerob dann als Fe(III)(OH)₂⁺ bzw. Fe(III)(OH)₄⁻ eine höhere Löslichkeit aufweist und so von den Zellen leichter aufgenommen werden könnte. Das geringe aber deutliche Wachstum des Kontrollstammes bei saurem pH Wert und Zusatz von CDTA und Fe(II) bzw. CDTA und Mn(II) resultiert wahrscheinlich auf dem maximalen

Transport von Metall-Phosphat-Komplexen des Protonen-Symporters PitA (van Veen, 1997), da hier die externe Protonenkonzentration am höchsten ist.

Umso stärker erscheint die FetMP-vermittelte Wachstumsverbesserung der Eisen-Mangelmutante mit dem *fet*-Operon bei diesen pH Werten (Abb. 5B, C). In der Veröffentlichung von Cao *et al.* (2007) wurde EfeUOB als das erste bakterielle Eisenaufnahmesystem beschrieben, dessen Genexpression durch einen niedrigen pH Wert induziert wird, was mit einem größeren Wachstumsvorteil durch das Transportsystem bei Eisenlimitation unter niedrigen pH Bedingungen korreliert. Dies trifft jedoch nicht auf das FetMP-System zu. Offensichtlich verhilft das putative Eisenaufnahmesystem dem Deletionsstamm unter Eisenmangel bei neutralem pH zum größtmöglichen Wachstum, ist aber dennoch bei allen pH Werten funktionell (Abb. 5A, B, C). Im Hinblick auf die sich ändernden Bedingungen im Urin könnte FetMP somit die Eisenversorgung im F11 Stamm gewährleisten.

Dass dafür das Membranprotein FetM als Eisenaufnahmepermease vermutlich essentiell wäre, beweisen zeitabhängige Wachstumsversuche und Transportstudien mit radioaktivem Eisen (Abb. 10, Abb. 13). Hier wird deutlich, dass das Wachstum der Eisen-Mangelmutante unter Eisenlimitation von der erhöhten Fe-Akkumulation durch FetM abhängig ist, während die alleinige *fetP*-Expression keinen signifikanten Einfluss hatte, jedoch die FetM-vermittelte Wachstumsverbesserung noch etwas steigern konnte.

Untersuchungen zur Eisenaufnahme in *B. subtilis* zeigten, dass ein Wachstum unter Eisenmangel ohne Siderophore und ohne Citrat durch das YwbLMN-System ermöglicht wird, wobei das EfeU orthologe Membranprotein YwbL hierfür ebenfalls essentiell war (Ollinger *et al.*, 2006).

Demgegenüber wurde der positive Effekt des EfeUOB-Systems aus *E. coli* O157:H7 auf das Wachstum unter Eisenlimitation nicht vorwiegend von dem Eisenaufnahmeprotein EfeU ermöglicht, sondern schien von allen drei Komponenten abhängig zu sein (Cao *et al.*, 2007). Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Resultaten der Publikation von Grosse *et al.* (2006), in der nachgewiesen wurde, dass bereits die EfeU-Permease allein die Eisenaufnahme des *E. coli* Deletionsstammes steigert und damit auch das Wachstum unter Eisenmangel erheblich verbessert.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Transportstudien bei neutralem pH Wert nur dann ein signifikanter Unterschied in der Eisenaufnahme beobachtet, wenn die Eisenaufnahmemutante die jeweiligen Gene vektorvermittelt *in trans* exprimierte. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind mit denen von Grosse *et al.* (2006) und Cao *et al.* (2007) vergleichbar, wobei letztere eine Erklärung für die nach 16 min sprunghaft ansteigende

Akkumulation an divalenten Eisenionen durch das EfeUOB-System schuldig bleiben. Weshalb konnte aber bei pH 5 und pH 9 eine erhöhte Eisenakkumulation für die Deletionsmutante mit der chromosomalen *fetMP*-Integration nachgewiesen werden? Die aerobe Durchführung der Experimente lässt zunächst vermuten, dass Eisenionen in ihrer oxidierten Form vorlagen und damit bei neutralem pH Wert die geringste Löslichkeit aufwiesen, die unter sauren bzw. basischen Bedingungen ansteigt. Durch den Zusatz von jeweils 1 mM Ascorbat als Reduktionsmittel (Mystkowski, 1942) sollten in allen Kulturen pH unabhängig jedoch gut lösliche, divalente Eisenionen im Überschuss vorliegen, sodass der Grund der unterschiedlich hohen Akkumulation nicht bei den Löslichkeitsunterschieden der Metallionen zu suchen ist. Trotz Erklärungsmangel zeigen diese Ergebnisse, dass unter allen pH Bedingungen die Eisenaufnahme durch das FetMP-System im Vergleich zum Kontrollstamm um einen Faktor von etwa 2 erhöht wurde.

4.2 Das *fetMP* Operon gehört zum Fur-Regulon.

In *E. coli* wird die Eisen-Homöostase in Abhängigkeit von der Eisenverfügbarkeit streng durch das Regulatorprotein Fur kontrolliert. Interessanterweise wird die *fur*-Expression durch das SoxRS-System und das OxyR-Protein bei Superoxid und H₂O₂ vermittelten Redoxstress induziert (Zheng *et al.*, 1999), um so Einfluss auf den intrazellulären Gehalt an redoxaktiven Eisenionen zu nehmen. Von den mehr als 90 Genen, die zum Fur-Regulon in *E. coli* gehören, kodieren 35 Gene für Eisen-Akquirierungsproteine, die bei Eisenüberschuss durch Bindung von vermutlich zwei oder mehreren Fur-Fe(II)-Homodimeren an Fur-Boxen innerhalb der jeweiligen Promotoren reprimiert werden (Escolar *et al.*, 1998, Lavrrar *et al.*, 2002, Andrews *et al.*, 2003).

Für das Eisenaufnahmesystem EfeUOB wurde erstmals von McHugh *et al.* (2003) durch ein Transkriptionsprofil nachgewiesen, dass dessen Genexpression ebenfalls eisenabhängig durch das Fur-Protein reguliert wird. Dies konnte in nachfolgenden Arbeiten durch quantitative *real-time reverse transcription*-PCR und Messung der β -Galaktosidase Aktivität bestätigt werden (Grosse *et al.*, 2006, Cao *et al.*, 2007). Auch in *B. subtilis* reprimiert der Fur-Regulator bei Eisenüberschuss die Expression zahlreicher Gene (Baichoo *et al.*, 2002), wozu auch das *efe* orthologe *ywbLMN*-Operon zählt, das in einer *fur*-Deletionsmutante dereprimiert wurde (Ollinger *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine eisenabhängige Fur-Regulation des *fetMP*-Operons mittels Fur-Titrationsassay (Stojiljkovic *et al.*, 1994) ebenfalls nachgewiesen, nachdem in der entsprechenden Promotor-Region eine putative Fur-Bindestelle mit 14 von 19 konservierten

Basenpaaren identifiziert wurde (Abb. 6). Dass funktionelle Fur-Boxen von dem exakten Sequenzmotiv sehr abweichen können, belegt unter anderem die Fur-Bindestelle stromaufwärts des *tonB*-Gens aus *E. coli*, die lediglich 11 der 19 bp aufweist (Newman und Shapiro, 1999).

Darüber hinaus wurde die eisenabhängige Regulation der *fetMP*-Expression durch die *fetP*-Transkriptquantifizierung mittels Sandwich-Hybridisierungs-Assay bestätigt (Abb. 9). Thieme *et al.* (2008) untersuchten mit der gleichen Methode Transkriptionsergebnisse in *E. coli* W3110 unter Kupferstress, wobei die beiden Gene *copA* und *cueO*, als auch das *cusCFBA*-Operon im Focus standen. CopA ist eine membrangebundene P-Typ ATPase, die einwertige Kupferionen aus dem Zytoplasma in das Periplasma transportiert (Rensing *et al.*, 2000), welche dort von der Multi-Kupfer-Oxidase CueO zu weniger toxischen divalenten Kupferionen oxidiert werden (Grass und Rensing, 2001). Das RND (Resistance Nodulation, Cell Division) -System CusCBA dient wahrscheinlich der Kupferentgiftung aus dem Periplasma, wobei das lösliche Periplasmaprotein CusF vermutlich als Kupferchaperon fungiert (Franke *et al.*, 2003, Rensing und Grass, 2003, Bagai *et al.*, 2008).

Der Sandwich-Hybridisierungs-Assay ist eine äußerst sensitive Methode, mit der bis zu 3 Transkripte pro Zelle nachgewiesen werden können (Thieme *et al.*, 2008). So wurden unter Kupferstress 334 *copA*-, 180 *cueO*- und 8 *cusA*-Transkripte pro *E. coli* Zelle bestimmt. Anhand von zeitabhängigen Transkriptionsprofilen zeigte sich, dass die Induktionsmaxima von *copA* und *cueO* bereits nach 3 min erreicht wurden, was im Fall von *cusA* erst nach etwa 10 min zu beobachten war (Thieme *et al.*, 2008). Die rasche Induktion von *copA* und *cueO* ist vermutlich auf den in der Zelle vorliegenden Transkriptionsregulator CueR zurückzuführen, während die einzelnen Zwischenschritte der Signalkaskade des Zweikomponenten-Systems CusRS die zeitverzögerte Induktion von *cusA* erklären würde.

In dieser Arbeit wies die Eisenaufnahmemutante unter Eisenlimitation 70 spezifische *fetP*-mRNA-Transkripte pro Zelle auf (Abb. 9), was im Vergleich zu den Resultaten von Thieme *et al.* (2008) einem mittleren Transkriptionslevel entspricht. Durch Zusatz von Fe(III) fiel die Transkriptmenge innerhalb von 20 min auf 5 Kopien pro Zelle ab. Die hiermit bestimmte Halbwertszeit von etwa 5 min stimmt gut mit dem Durchschnittswert von 6.8 min für bakterielle Transkripte überein (Selinger *et al.*, 2003). Obwohl diese Zeit für die bereits vorliegenden *fetP*-Transkripte berücksichtigt werden muss, erscheint die eisenabhängige Repression durch das Fur Protein im Vergleich zur zügigen *copA*-Induktion durch CueR eher langsam. Da beide Regulatorproteine bereits in der Zelle vorliegen (Zheng *et al.*, 1999, Yamamoto und Ishihama, 2005), ist der Unterschied wahrscheinlich auf die Wirkungsweise der Proteine zurückzuführen. So liegt CueR an der Operatorregion der entsprechenden Gene

bereits gebunden vor und reprimiert in Abwesenheit von Kupfer deren Expression oder induziert diese mit Kupfer als Ko-Aktivator (Stoyanov *et al.*, 2001). Demgegenüber liegt das Fur Protein bei Eisenmangel frei im Zytoplasma vor, das erst nach Bindung von Fe(II) als Korepressor an die entsprechenden Fur-Boxen bindet (Coy und Neilands, 1991).

Wurde den Kulturen erneut der CDTA-Chelator zugesetzt, stiegen die *fetP*-Transkripte nur leicht auf 12 Kopien pro Zelle innerhalb von 65 min an, was darauf beruhen könnte, dass die Zellen noch immer genügend Eisen gespeichert haben.

Im Hinblick darauf, dass die Eisenaufnahmemutante unter Eisenlimitation das größtmögliche Wachstum durch das FetMP-System bei neutralem pH Wert aufwies (Abb. 5A), wurde die Expression des *fetMP*-Operons bei verschiedenen pH Bedingungen anhand der β -Galaktosidase-Aktivität als weitere Methode zur Messung der Genexpression bestimmt (Abb. 8A, B). Hierbei wurde die Vermutung bestätigt, dass der höchste FetMP-vermittelte Wachstumsanstieg bei pH 7 mit der maximalen Induktion der *fetMP*-Expression unter Eisenmangel korreliert.

Für das Eisenaufnahmesystem EfeUOB konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass dessen Operonexpression sowohl eisen-, als auch pH abhängig reguliert wird (Stancik *et al.*, 2002, McHugh *et al.*, 2003, Maurer *et al.*, 2005, Grosse *et al.*, 2006, Cao *et al.*, 2007). So erfolgt die *efe*-Repression durch das Fur Protein bei Eisenüberschuss, während das Zwei-Komponentensystem CpxRA die Operonexpression unter alkalischen Bedingungen reprimiert. Dieses Resultat spiegelt sich in einem verbesserten Wachstum unter Eisenmangel bei pH 6 wieder (Cao *et al.*, 2007), während kein signifikanter Unterschied in der Eisenakkumulation bei pH 5 und pH 7 auftrat (Grosse *et al.*, 2006). Diese Diskrepanz zeigt sich ebenfalls bei den Transportstudien in der vorliegenden Arbeit, da trotz maximaler Induktion des *fetMP*-Operons bei pH 7 keine effizientere Transportaktivität durch das FetMP-System bei diesem pH Wert im Vergleich zu pH 5 und pH 9 unter Eisenmangel ermittelt werden konnte (Abb. 13).

4.3 Strukturanalyse von FetP.

Die kristallographischen Arbeiten, sowie die Datensammlung und -auswertung wurden von Anson C. K. Chan und Prof. Michael E. P. Murphy am Institut für Mikrobiologie und Immunologie der *British Columbia University* (Vancouver, Kanada) durchgeführt und in der Arbeit von Koch *et al.* (2011) publiziert. Eine weitere Arbeit ist in Vorbereitung.

Für FetP bzw. kupferbeladenes FetP (Cu-FetP) liegt die maximale Auflösung der Kristalle bei 1.6 Å bzw. 1.7 Å, wobei sich beide Strukturen nur minimal unterscheiden. FetP, jeweils als Dimer kristallisiert, lässt sich als flach-ovales Makromolekül (20 x 35 x 75 Å) beschreiben, das pro Untereinheit primär aus zwei 4-Strang antiparallelen β -Faltblättern in einer immunoglobulinähnlichen Faltung besteht (Abb. 35) und somit die aufgenommenen CD-Spektren erklärt (Abb. 18).

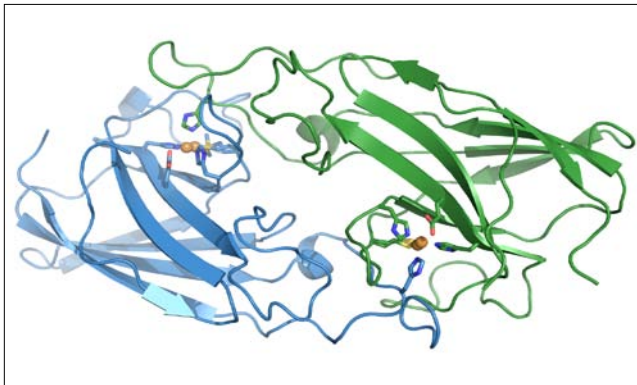


Abb. 35: Gesamtstruktur des Cu-FetP-Dimers. Die zwei Untereinheiten sind blau und grün gefärbt. Kupferionen sind in orange gezeigt, deren Liganden als *stick models* dargestellt sind. Diese Abbildung ist aus Koch *et al.* (2011) entnommen.

Innerhalb der Cu-FetP-Dimerstruktur liegen zwei Bindestellen für Kupferionen (CuA und CuB) verdeckt im interfacialen Bereich etwa 29 Å voneinander lokalisiert. Die Ionen werden jeweils durch H44, E46, M90, H97 und H127* von der jeweils anderen Untereinheit (*) koordiniert (Abb. 36). Die Unzugänglichkeit der Kupferbindestellen korreliert dabei mit dem Ergebnis, dass die an der Bindung beteiligten Histidine durch DEPC nicht chemisch modifiziert werden konnten.

Interessanterweise liegen in beiden Bindestellen sowohl das Kupferion, als auch der Ligand M90 zu jeweils 50% in zwei Positionen vor, die als 1 und 2 gekennzeichnet sind (Abb. 36). Dabei wird das Kupferion stets durch die vier Aminosäurereste von M90, H44, H97 und H127* koordiniert, was mit einer tetraedrischen Geometrie in Konformation 2 einhergeht (Abb. 36B, C, D). In Konformation CuA1 scheint jedoch der Aminosäurerest von E46 als zusätzlicher schwacher Ligand in einem degenerierten oktaedrischen Komplex mit einer Cu-O Distanz von 2.7 Å zu fungieren und somit das Kupferion unter die von den drei Histidinresten gebildete Ebene zu ziehen (Abb. 36A).

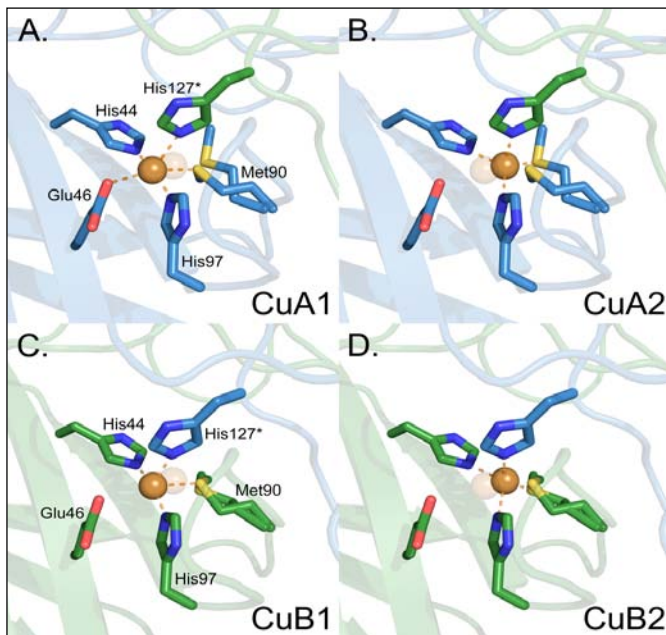


Abb. 36: Verschiedene Konformationen der Kupferbindestellen von FetP.

Die beiden Konformationen des Kupferions und dessen Liganden in den jeweiligen Bindestellen CuA und CuB sind direkt nebeneinander dargestellt. Das Kupferion ist als orangefarbene Kugel gezeigt, die stets durch H44, M90, H97 und H127* der anderen Untereinheit koordiniert wird. Kation und Ligand M90 weisen dabei zwei Konformationen auf. Im Gegensatz zu CuA2 (B) wird das Kation in CuA1 (A) zusätzlich durch E46 mit einer Cu-O Distanz von 2.7 Å in einer degenerierten oktaedrischen Anordnung koordiniert. In CuB (C) beträgt die Cu-O Distanz hingegen 3 Å, wodurch das Kation in der Ebene der drei Histidinreste verbleibt, der Methioninrest M90 jedoch verschiedene Konformationen entsprechend der Kationbewegung aufweist (D). Diese Abbildung ist aus Koch *et al.* (2011) entnommen.

Kupfer Plastizität wurde in der Arbeit von Sendovski *et al.* (2010) für die Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* ebenfalls beschrieben. Dieses Typ 3 Kupfer-Enzym ist an der Synthese von Melanin beteiligt, indem es in Gegenwart von Sauerstoff Phenole zu ortho-Diphenolen hydroxyliert und anschließend zu ortho-Chinonen oxidiert. Das Dimer besitzt pro Untereinheit ein aktives Zentrum mit jeweils zwei divalenten Kupferionen als Kofaktoren, die von sechs Histidinresten koordiniert werden (Sendovski *et al.*, 2010). Anhand der Kristallstrukturen unter verschiedenen Bedingungen zeigten sich variierende Positionen der Kationen, die möglicherweise für die enzymatische Aktivität der Tyrosinase nötig sind.

Die Selektivität einer Kupferbindestelle gegenüber mono- bzw. divalenten Kupferionen wird durch die Identität, Anzahl und Geometrie der entsprechenden Liganden bestimmt (Davis und O'Halloran, 2008). So zeichnen sich Cu(I)-Bindestellen zumeist durch schwefelhaltige Aminosäurereste und einer geringen Koordinierungszahl aus, während Sauerstoff- und Stickstoffdonatoren in höherer Anzahl die Bindung von Cu(II) thermodynamisch begünstigen. Derartig weisen die im Periplasma lokalisierten Kupfer-Homöostaseproteine CopC aus *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* und PcoC aus *E. coli*(pRJ1004) mit plasmidvermittelter Kupfer-Resistenz eine histidinreiche Cu(II)- und eine methioninreiche Cu(I)-Bindestelle auf (Arnesano *et al.*, 2003, Peariso *et al.*, 2003).

Auch das FetP-Dimer könnte anhand der Kristallstruktur über zusätzliche Cu(I)-Bindestellen (CuC) verfügen, die jeweils benachbart zu CuA bzw. CuB liegen und durch die drei Methioninreste M29, M34 und M88 und dem H125* der jeweils anderen Untereinheit gebildet würden (Abb. 37) (Koch *et al.*, 2011). An der Oberfläche des FetP-Dimers befindet sich M34 jeweils auf einer flexiblen Deckel-ähnlichen Schleife in verschiedenen

Konformationen (Abb. 37), wodurch die Distanz zwischen M34-S und H125*-N entweder 7.6 oder 3.5 Å beträgt. Ein in CuC modelliertes Metallion wäre dann 7 Å von dem Kupferion in CuB entfernt.

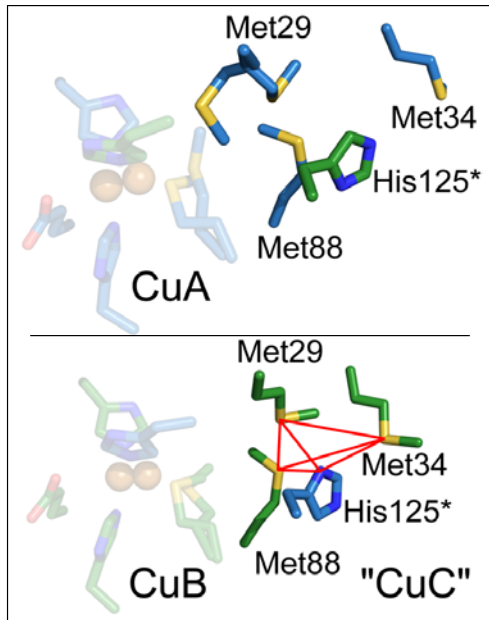


Abb. 37: Eine mögliche dritte Metallbindestelle (CuC) benachbart zu CuB.

In Gegenwart von CuB könnte eine methioninreiche Metallbindestelle existieren. CuC ist als roter Tetraeder gezeigt, der durch M29, M34, M88 und H125* der jeweils anderen Untereinheit gebildet wird. Im Gegensatz dazu liegt M34 weit von CuA entfernt. Diese Abbildung ist aus Koch *et al.* (2011) entnommen.

Demgegenüber liegen beispielsweise in dem Kupfer-Chaperon PcoC beide Kupferbindestellen an den jeweiligen Enden des β -barrel-Moleküls 30 Å entfernt (Wernimont *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2006). Durch *in vitro* Experimente mit PcoC wurde nachgewiesen, dass das gebundene monovalente Kupferion nach Interaktion mit der Multi-Kupfer-Oxidase PcoA unter aeroben Bedingungen zum weniger toxischen divalenten Kation oxidiert und anschließend in die Umgebung entlassen wird (Huffman *et al.*, 2002, Djoko *et al.*, 2008). Multi-Kupfer-Oxidasen (MCO), die ubiquitär verbreitet sind, zeichnen sich durch ein Typ 1 Kupfer als primären Elektronenakzeptor und einem trinukleären Cluster mit einem Typ 2 und zwei Typ 3 Kupfer als Reduktionszentrum von Sauerstoff aus. Die MCO CueO aus *E. coli* weist darüber hinaus eine fünfte Kupferbindestelle mit zwei Methionin- und zwei Aspartatresten als Liganden an einer methioninreichen Helix auf, die den Zugang des Substrates zum Typ 1 Kupfer blockiert (Roberts *et al.*, 2002). Durch Bindung des monovalenten Kations in der fünften Kupferbindestelle erfolgt eine Verringerung des Redoxpotentials, wodurch ein Elektronentransfer über eine Wasserstoffbrücke zu dem 7.5 Å entfernten Kupferion ermöglicht wird (Djoko *et al.*, 2010). Auch in PcoA könnten putative Aminosäurereste in der methioninreichen Region ebenfalls als Cu(I) Liganden fungieren (Djoko *et al.*, 2008). Trotz einer möglichen Cu(I) Bindestelle, benachbart zu CuB, ist FetP

dennoch weder mit MCO verwandt, noch weist FetP ein trinukleäres Kupfer-*Cluster* auf, was das Fehlen einer Oxidaseaktivität vermuten lässt.

Bezug nehmend auf die Strukturen zu FetP homologen Proteinen zeigt sich zunächst, dass nicht nur die flach-ovale Form und immunglobulinähnliche Faltung FetP und dem homodimeren Protein P19 aus *C. jejuni* gemein sind, sondern auch zwei 29 Å voneinander entfernte Kupferbindestellen im interfacialen Bereich, was anhand der Kristallstruktur des kupferrekonstituierten P19 Dimers nachgewiesen wurde (Chan *et al.*, 2010). Die jeweiligen fünf Kupferliganden entsprechen dabei den Aminosäuren H44, E46, M90, H97 und H127* in FetP, die *in silico* Analysen zufolge unter den 100 engsten FetP homologen Proteinen, wie P19 aus *C. jejuni* (Chan *et al.*, 2010), ChpA aus dem marinen, magnetotaktischen Stamm MV-1 (Dubbels *et al.*, 2004) oder Tp34 aus *T. pallidum* (Deka *et al.*, 2007) konserviert vorliegen (Abb. 21, Daten nicht vollständig gezeigt). Jedoch sind diese jeweils an der Bildung von zwei degenerierten oktaedrischen Zn^{2+} -Bindestellen innerhalb des nichtacylierten Tp34 Dimers beteiligt, wobei die Metallionen vermutlich dem Kristallisationsmedium entstammen (Deka *et al.*, 2007). Da Methioninreste jedoch nicht als typische Liganden für Zinkionen fungieren (Maret und Li, 2009), bestehen die Möglichkeiten, dass es sich hierbei um eine neue Art von Zinkbindestellen handeln könnte oder aber *in vivo* Eisen- bzw. Kupferionen von den entsprechenden Liganden koordiniert werden. Dass die Besetzung von Proteinbindestellen durch Metallionen unter *in vitro* Bedingungen von der *in vivo* Situation abweichen kann, wurde anhand von den Periplasmaproteinen CucA und MncA aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. Stamm PCC6803 nachgewiesen (Tottey *et al.*, 2008). So können *in vitro* Kupfer-, Zink- und Manganionen von den jeweils identischen Bindestellen der beiden Proteine koordiniert werden, während nur Cu^{2+} von CucA bzw. Mn^{2+} von MncA *in vivo* gebunden wird. Reguliert wird dies vermutlich, indem das Tat Substrat MncA das entsprechende Manganion während der Faltung im Zytoplasma bindet, wo Kupfer- und Zinkionen mit hoher Affinität gebunden vorliegen. Demgegenüber findet die Faltung und Cu^{2+} -Bindung von CucA im Periplasma statt und scheint an den Kupfertransport in das Periplasma gekoppelt zu sein (Waldron *et al.*, 2010).

Wie Chan *et al.* (2010) anhand von Kompetitionsassays zeigten, weist das P19-Protein aus *C. jejuni* eine Präferenz von Kupfer- gegenüber Zinkionen auf. Ferner beschreiben die Autoren zwei Geometrien der Kupferbindestellen anhand der metallfreien bzw. kupferbeladenen Kristalle: quadratisch-planar in Cu-P19, was eine Koordinierung von Cu(II) vermuten lässt oder tetraedrisch in apo-P19 als mögliche Cu(I) oder Cu(II) Bindestelle. Dass diese an einem Zyklus zwischen oxidierten und reduzierten Kupferionen beteiligt ist, wird hinsichtlich eines zur Proteinoberfläche gerichteten und in unmittelbarer Nähe zur

Kupferbindestelle liegenden Methionins diskutiert, was möglicherweise für die Selektion der Kupferionen verantwortlich ist. Diese Aminosäure entspricht dem M88 der putativen CuC Bindestelle in FetP (M29, M34, M88 und H125*), wobei nur M29 und M88 in P19 bzw. den 100 engsten FetP Homologen konserviert sind (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus besitzt P19 eine von der Kupferbindestelle 7.7 Å entfernte weitere Mangan- oder Eisenbindestelle (Chan *et al.*, 2010). Wie in anderen Arbeiten wurde auch hier Mn(II) als Fe(II)-Analogon verwendet, da Fe(II) sehr reaktiv ist und als Katalysator der Fenton Reaktion Proteine schädigen kann (Haber und Weiss, 1932, Langlois d'Estaintot *et al.*, 2004). Der Aspartat- und die zwei Glutamatreste, die als Mn(II)-Liganden im P19-Protein fungieren, sind in Tp34 und ChpA ebenfalls konserviert und entsprechen E5, E46 und D94 in FetP (Abb. 21), was folgern lässt, dass diese gleichermaßen für die Koordinierung der Kationen verantwortlich sind. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass Mn(II) nicht nur als Fe(II)-Analogon, sondern möglicherweise selbst als Substrat von FetP gebunden wird, wofür die Resultate der Wachstums-Endpunktbestimmungen sprechen (Abb. 5). Interessanterweise scheint E46 an der Koordinierung von sowohl Mangan- bzw. Eisenionen, als auch Kupferionen in Konformation CuA1 beteiligt zu sein, wodurch gegebenenfalls ein Elektronentransfer zwischen beiden Metallionen ermöglicht wird (Chan *et al.*, 2010).

Dass die dimere Form von Tp34 neben Na⁺, durch eine Reihe divalenter Metallionen stabilisiert wird, wiesen Deka *et al.* (2007) durch analytische Ultrazentrifugation nach. Dies korreliert mit der Tatsache, dass ein Aminosäurerest von der jeweils anderen Untereinheit als Ligand innerhalb der Metallbindestelle fungiert. In der Publikation von Chan *et al.* (2010) wurde die Dimerisierung von P19 ebenfalls als metallabhängig beschrieben. Jedoch konnte mittels Gelfiltration für das metallfreie Protein ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa bestimmt werden, was weitaus größer als das theoretische Molekulargewicht eines Protomers mit 18 kDa ist. Die Autoren begründen diese Diskrepanz mit der getreckten Form des Protomers, die auf große hinausstehende *Loops* zurückzuführen ist. Ein *in vivo* Nachweis der dimeren Form von P19 schließt jedoch nicht aus, dass die Dimerisierung auch metallunabhängig erfolgen könnte. Diesbezüglich interessant sind die Tatsachen, dass das metallfreie Protein P19 ebenso als Homodimer kristallisiert und sich die Liganden in An- bzw. Abwesenheit der entsprechenden Metallionen in unveränderter Konformation befinden (Chan *et al.*, 2010). Desweiteren schließt der interfaciale Bereich eines P19-Homodimers 47 Aminosäurereste jeder Untereinheit mit 19 möglichen Wasserstoffbrücken und zwei Salzbrücken ein, sodass bei der Grenzflächenformierung eine Solvatisierungsenergie von -27.9 kcal/M frei wird. Diese beträgt für das FetP-Dimer etwa -45 kcal/M und würde somit

erklären, dass FetP auch in Abwesenheit von Metallionen als stabiles Homodimer in Lösung vorliegt (Tab. 4).

4.4 FetP ist ein periplasmatisches Metallbindeprotein.

In zeitabhängigen Wachstumsexperimenten (Abb. 10) und Transportstudien (Abb. 13) zeigte sich, dass das FetP Protein nicht essentiell für die Eisenaufnahme durch die FetM-Permease unter Eisenlimitation ist, die Eisenakkumulation jedoch bei Ko-Expression von *fetP* noch gesteigert wird. Da keine Verwandtschaft zwischen akzessorischen Proteinen von Ftr-Typ Permeasen und dem FetP Protein nachweisbar ist, scheint dieses Protein eine andere Funktion zu übernehmen, die es zu beschreiben galt.

Unter den zahlreichen FetP orthologen Proteinen, die zumeist als Periplasmaproteine mit einer möglichen Beteiligung an hochaffinem Fe²⁺-Transport annotiert sind, wurden bisher die Proteine P19 aus *C. jejuni* (Chan *et al.*, 2010), ChpA aus dem Stamm MV-1 (Dubbels *et al.*, 2004) und Tp34 aus *T. pallidum* (Deka *et al.*, 2007) charakterisiert, die Homodimere formieren und Metallionen binden können. Dabei weist das P19 Protein mit 54% Identität nicht nur die höchste Ähnlichkeit zu FetP auf (Abb. 21), sondern wird durch das entsprechende Gen auch innerhalb eines dicistronischen Operons kodiert (Palyada *et al.*, 2004). Jedoch resultierte eine Deletion von *p19* in einer drastischen Wachstumsinderung von *C. jejuni* in Gegenwart von Eisenmangel (Chan *et al.*, 2010), während in der vorliegenden Arbeit ein solcher Effekt durch FetP nicht beobachtet werden konnte (Abb. 10, Abb. 13). Wodurch zeichnet sich FetP im Vergleich zu den Homologen also aus?

Zunächst konnte FetP ebenfalls als Periplasmaprotein durch die erfolgreiche Reinigung aus dem periplasmatischen Extrakt (Abb. 15) bestätigt werden. Eine anschließende massenspektrometrische Untersuchung zeigte, dass die gereinigten FetP-Proteine in geringem Maße mit Kupfer beladen waren, das vermutlich während der *fetP*-Expression in *E. coli* aus dem Komplexmedium stammt. Da hierbei keine Metallionen extra zugesetzt wurden, erklärt dies den kleinen Anteil an kupfergebundenen FetP-Proteinen. Ferner deutet dieses Resultat auf eine hohe Affinität und Spezifität für Kupfer gegenüber anderen Metallionen *in vivo* hin. Ähnliches wurde auch für das FetP orthologe Protein ChpA aus MV-1 von Dubbels *et al.* (2004) nachgewiesen. So wurden mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie für das aus dem Periplasma gereinigte ChpA-Dimer 0.5 Kupferatome bestimmt, was ebenso eine unzureichende Kupferbeladung vermuten lässt, während eine Inkubation mit CuCl₂ das Verhältnis auf 1:1 erhöhte.

Ob FetP, wie dessen Ortologe als Metallbindeprotein agieren könnte, wurde *in vitro* mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) und Isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Dabei zeigte sich, dass das dimere Protein FetP neben Kupfer-, auch Zink-, Eisen- und Manganionen bindet (Tab. 6). Die mit beiden Methoden ermittelten Stöchiometriewerte sind vergleichbar, sodass das C-terminale *Strep*-tag[®]-II-Epitop von FetP während der AAS-Experimente keinen Einfluss auf die Bindung der jeweiligen Kationen zu haben scheint. Erwartungsgemäß sollte es sich bei dem Stöchiometriewert von Ligand zu Bindeprotein um eine ganze Zahl handeln. Im Hinblick auf die ITC-Experimente wurden jedoch 1.8 Kupfer-, 0.8 Mangan- bzw. 2.8 Zinkionen pro FetP-Dimer ermittelt (Tab. 6). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Protein nicht mehr 100%ig aktiv ist oder Fehler bei der Proteinbestimmung unterlaufen sind. Hierfür wurde der Extinktionskoeffizient von nativem FetP im Messpuffer in Relation zu dem theoretisch berechneten Wert unter denaturierenden Bedingungen bestimmt (Gill und von Hippel, 1989). Womöglich wurden dabei die für die Extinktion wichtigen Bereiche nicht restlos entfaltet, was die Resultate leicht verfälschen würde. Somit entsprechen die Stöchiometriewerte annähernd einem Mangan- bzw. zwei Kupferionen pro FetP-Dimer, was mit den beiden Cu²⁺-Bindestellen innerhalb eines FetP-Dimers korreliert, die anhand der Kristallstruktur bestimmt wurden (Koch *et al.*, 2011). Mittels AAS konnte sogar ein drittes Kupfer pro FetP-Dimer bestimmt werden. Da die ITC- und AAS-Experimente unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden, bindet Cu(II) gegebenenfalls auch an die putative Cu(I)-Bindestelle CuC, was aufgrund der geringen Affinität dann mittels ITC nicht bestimmt werden konnte und somit CuC als nicht Cu(II)-spezifisch bestätigen würde. Auch für die MCO CueO aus *E. coli* wurde nachgewiesen, dass die fünfte Kupferbindestelle (T4) mit zwei Methionin- und zwei Aspartatresten neben einer großen Cu(I)-Affinität ($k_d = 130$ fM) eine geringere Affinität gegenüber Cu(II) ($k_d = 5.5$ nM) aufweist (Djoko *et al.*, 2010).

Wie anhand der Struktur von P19 gezeigt (Chan *et al.*, 2010), sollten in dem Homodimer FetP ebenfalls zwei Bindestellen für Mangan- bzw. Eisenionen vorliegen. Die Bindung von jedoch nur einem Manganion pro FetP-Dimer ist dabei möglicherweise auf den Aminosäurerest von E46 zurückzuführen, der nicht nur an der Koordination von Mn²⁺ beteiligt zu sein scheint, sondern ebenso als Ligand von Cu²⁺ in der CuA1 Konformation fungiert (Koch *et al.*, 2011). Somit könnte die Cu²⁺-Bindung in CuA1 die Koordinierung von Mn²⁺ in einer Untereinheit von FetP unterbinden, während das Kupferion in CuB die Manganbindung in der anderen Untereinheit erlaubt.

Darüber hinaus wurde eine Bindung von drei Zinkionen mit gleicher Affinität pro FetP-Dimer bestimmt (Tab. 6), was eher unwahrscheinlich erscheint, jedoch durch die Messmethode der

ITC nicht weiter differenziert werden konnte. Erstaunlicherweise wurde die Zn^{2+} -Bindung durch Cu^{2+} inhibiert, was auch *vice versa* zu beobachten war. Dies lässt vermuten, dass beide Metallionen von gleichen Liganden koordiniert werden können und korreliert mit der Beobachtung, dass die Kupferliganden im FetP- bzw. P19-Dimer zwei degenerierte oktaedrische Zn^{2+} -Bindestellen innerhalb des nichtacylierten Tp34-Dimers aus *T. pallidum* bilden (Abb. 21), (Deka *et al.*, 2007, Chan *et al.*, 2010, Koch *et al.*, 2011). Dass verschiedene Metallionen innerhalb von Bindestellen mit ähnlichen Liganden und Geometrien koordiniert werden können, wurde bereits für zahlreiche Proteine belegt (Chakrabarti, 1989). Dies erinnert an die Periplasmaproteine CucA und MncA aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. Stamm PCC6803, deren identische Bindestellen *in vitro* Cu^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+} koordinieren können, obwohl *in vivo* keine Zinkionen gebunden werden (Tottey *et al.*, 2008). Auch für die kupferabhängige Tyrosinase aus dem Pilz *Agaricus bisporus* wurde nachgewiesen, dass Zinkionen ebenfalls im aktiven Zentrum stark Entropie-getrieben gebunden werden können, was mit einer Konformationsänderung einhergeht und so die Substratzugänglichkeit und damit die Aktivität wahrscheinlich inhibiert wird (Han *et al.*, 2007). Ähnliches wurde für die Tyrosinase aus *B. megaterium* (Sendovski *et al.*, 2010) und die Serinprotease Tonin aus der Ratte beschrieben (Fujinaga und James, 1987).

Neben dem Aspekt, dass die Zn^{2+} -Bindung von FetP ebenso rein Entropie-getrieben wurde (Tab. 6), zeigten Chan *et al.* (2010) anhand von Wettbewerbsassays, dass das P19-Protein aus *C. jejuni* eine Präferenz von Kupfer- gegenüber Zinkionen aufweist, wobei die Kupferliganden, denen von FetP entsprechen. Ferner lag FetP, ähnlich wie ChpA aus dem marinen, magnetotaktischen Stamm MV-1 (Dubbels *et al.*, 2004), nach der Reinigung aus dem Periplasma zum Teil kupfergebunden vor (Abb. 16). Auch die Änderung des CD-Spektrums von FetP (Abb. 18), die nur in Anwesenheit von CuCl_2 zu beobachten war, deutet neben all diesen Resultate darauf hin, dass Kupfer- eher als Zinkionen, die eigentlichen Kofaktoren von FetP und dessen Homologen sind.

Die Cu^{2+} -Bindung von FetP erfolgte Enthalpie- und Entropie-getrieben mit einer apparenten Dissoziationskonstante k_d von 4.1 μM (Tab. 6). Ein vergleichbarer Wert wurde für das periplasmatische Metallresistenzprotein CusF aus *E. coli* bestimmt, das unter anderem monovalente Kupferionen mit hoher Affinität ($k_d = 0.5 \mu\text{M}$) bindet (Kittleson *et al.*, 2006).

Eine Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich wurde ebenfalls mittels ITC für das Kupfer-Chaperon Atox1 ermittelt, das Cu^+ von dem Importer Ctr1 in der Plasmamembran zu der WND (*Wilson disease protein*) P-Typ ATPase transportiert, die in dem trans-Golgi-Netzwerk von Hepatozyten lokalisiert ist und die Kupferionen beispielsweise an die MCO Ceruloplasmin übergibt (Wernimont *et al.*, 2004). Dabei weisen die sechs

Metallbindedomänen von WND jeweils eine ähnliche Affinität ($k_d \sim 1 \mu\text{M}$) gegenüber den monovalenten Kationen auf. Jedoch konnten in einer Arbeit anhand von Kompetitionsassays mit BCA (*Bicinchoninic Acid*) für Atox1 und die WND-Domänen wesentlich geringere Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich für Cu^+ nachgewiesen werden (Yatsunyk und Rosenzweig, 2007).

Zahlreiche Schwierigkeiten bei der Ermittlung genauer Metall-Protein Affinitäten wurden in einem umfangreichen Review erörtert (Xiao und Wedd, 2010). Die Autoren ordnen dabei Bindungen mit Dissoziationskonstanten $k_d \geq 10^{-6} \text{ M}$ als unspezifisch ein, während eine große Anzahl von Transportproteinen und deren Chaperonen die Metallionen selektiv ($k_d < 10^{-7} \text{ M}$) binden. Eine Ausnahme scheint dabei der Transkriptionsregulator CueR zu sein, dessen Sensitivität gegenüber monovalenten Kupferionen im zeptomolaren Bereich liegt (Changela *et al.*, 2003), wodurch gewährleistet wird, dass diese Kationen nicht frei im Zytoplasma, sondern nur gebunden an Metallothionein und Chaperone mit Bindekonstanten im pico- bis femtomolaren Bereich vorliegen, was Fenton Reaktionen unterbindet (Rae *et al.*, 1999, O'Halloran und Culotta, 2000, Gonzalez-Guerrero und Arguello, 2008).

Für Cu-FetP wurde eine apparente Dissoziationskonstante k_d von $4.1 \mu\text{M}$ (Tab. 6) in 25 mM Bis-Tris pH 7.2 nachgewiesen (Tab. 6), obwohl Bis-Tris nach Xiao und Wedd (2010) eine hohe Affinität ($k_d \sim 5 \mu\text{M}$) für divalente Kupferionen aufweist. Pufferkomplexe mit Metallionen bieten nicht nur den Vorteil, die Löslichkeit der Ionen erhöhen zu können, sondern ermöglichen die Bestimmung äußerst hoher Bindungskonstanten, indem die Puffersubstanz als kompetierender Ligand zum Protein selbst fungiert (Zhang *et al.*, 2000). Durch Einrechnen der jeweiligen Affinitäten von Bis-Tris und dem FetP-Protein für divalente Kupferionen nach der Gleichung für Verdrängungsexperimente (Sigurskjold, 2000) konnte eine wesentlich geringere Dissoziationskonstante von Cu-FetP ($k_d \sim 1 \text{ nM}$) abgeschätzt werden, die im Bereich derer von Atox1 und den Metallbindedomänen des WND-Proteins liegt (Yatsunyk und Rosenzweig, 2007). Auch für die periplasmatischen Kupferresistenzproteine CopC aus *P. syringae* pathovar *tomato* und PcoC aus *E. coli* (pRJ1004) wurde anhand von Kompetitionsassays nachgewiesen, dass die mono- und divalenten Kupferionen mit hoher Affinität ($0.1 \mu\text{M} \geq k_d \geq 0.1 \text{ pM}$) innerhalb der entsprechenden Bindestellen koordiniert werden (Zhang *et al.*, 2006, Djoko *et al.*, 2008).

Nach Xiao und Wedd (2010) kann somit zusammengefasst werden, dass FetP divalente Kupferionen selektiv bindet, was mit dem Resultat der MALDI-TOF Analyse von FetP nach dessen Reinigung aus dem Periplasma einhergeht (Abb. 16). Dass die von FetP gebundenen divalenten Zinkionen nicht durch Cu^{2+} in den kompetitiven ITC-Experimenten (Tab. 6)

verdrängt werden konnten, ist auf die hohe Affinität von Bis-Tris für divalente Kupferionen zurückzuführen.

Die Mn^{2+} -Bindung von FetP wurde in zwei Puffern charakterisiert, wobei ähnliche thermodynamische Parameter ermittelt wurden (Tab. 6). Da Bis-Tris eine zu vernachlässigende Affinität gegenüber diesen Kationen besitzt ($k_d \sim 200 \text{ mM}$) (Xiao und Wedd, 2010) und sich die in beiden Puffern bestimmten Dissoziationskonstanten von Mn-FetP nur geringfügig unterscheiden, scheint ACES als zweite Puffersubstanz Mn^{2+} ebenso nur schwach zu binden. Darüber hinaus weisen beide Puffersubstanzen vergleichbare Protonierungsenthalpien auf (Fukada und Takahashi, 1998, Naidoo und Sankar, 2001), sodass keine Aussage getroffen werden kann, ob die Bindung der Kationen an FetP mit einer Freigabe von Protonen gekoppelt ist. Jedoch sind die jeweiligen Säurekonstanten der Aminosäurereste, die anhand der FetP-Struktur als Liganden für die entsprechenden Metallionen ermittelt wurden, kleiner als der für beide Pufferlösungen eingestellte pH Wert von 7.2. Das lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Aminosäurereste deprotoniert vorliegen und so vermutlich keine Competition mit bzw. Freilassung von Protonen während der Metallionenbindung stattfindet (Zhang *et al.*, 2000), wengleich die jeweilige Proteinumgebung den $\text{p}K_s$ Wert der einzelnen Aminosäurereste beeinflussen kann (Zhang und Wilcox, 2002).

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass FetMP aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm F11 als Eisenaufnahmesystem fungiert und möglicherweise auch divalente Manganionen transportiert, wurde die Affinität des Periplasmaproteins FetP für Mn(II) bestimmt, wobei Mn(II) nicht nur als putatives Substrat, sondern auch Fe(II)-Analogon diene (Langlois d'Estaintot *et al.*, 2004). Dabei wurden Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich ($k_d = 0.6 \mu\text{M}$ in Bis-Tris, $k_d = 3.6 \mu\text{M}$ in ACES) ermittelt, die eine viel zu geringe Affinität für Mn-FetP beschreiben, als dass dieses Protein unter Eisenmangel eine Chaperonfunktion für divalente Eisen- bzw. Manganionen übernehmen könnte. So ist bekannt, dass im Zuge der Abwehr ein Säugetier durch eisenbindende Proteine wie Transferrin und Laktoferrin die freie extrazelluläre Eisenkonzentration bis auf ca. 10^{-18} M reduziert (Bullen *et al.*, 1978), sodass Pathogene ihre Eisenversorgung unter anderem durch die Synthese hochaffiner Siderophoren ($k_d \sim 0.1 \text{ aM}$) sichern (Koropatkin *et al.*, 2007). So kann beispielsweise *Haemophilus influenza* von Transferrin gebundene trivalente Eisenionen über das ABC-Transportsystem hFbpABC aufnehmen, die zuvor durch das Periplasmaprotein FbpA (*ferric-ion-binding protein A*) mit hoher Affinität ($k_d \sim 1 \text{ aM}$) gebunden wurden (Anderson *et al.*, 2004, Khan *et al.*, 2007). Ähnliche Dissoziationskonstanten wurden auch für periplasmatische Fe(II)-Bindeproteine ermittelt, wie beispielsweise dem FutA1-Protein aus

Synechocystis sp. Stamm PCC6803, das einen k_d Wert von etwa 0.1 μM aufweist (Koropatkin *et al.*, 2007).

Demgegenüber ist die Affinität von FetP für Mn^{2+} eher mit denen von Proteinen zu vergleichen, die an der Speicherung von Eisenionen bei Überschuss beteiligt sind. So wurden Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich für die drei Eisenbindestellen des Ferritins EcFtnA aus *E. coli* bestimmt (Bou-Abdallah *et al.*, 2005). Dessen Expression wird indirekt durch das Fur-Protein reguliert (Masse und Gottesman, 2002), das seinem Kofaktor Fe^{2+} mit einer Dissoziationskonstante k_d von 10 μM bindet (Bagg und Neilands, 1987).

In Hinsicht auf die Funktion von FetMP als Aufnahmesystem korreliert die geringe Affinität von FetP für Mn^{2+} mit der Tatsache, dass gerade 25% der Bindestellen in dem zu FetP homologen Protein P19 mit Mn^{2+} besetzt waren (Chan *et al.*, 2010). Die Autoren vermuten, dass es sich hierbei möglicherweise um Bindestellen für trivalente Eisenionen handelt und somit divalente Manganionen aufgrund der geringeren positiven Ladung nur schwach von den entsprechenden Liganden koordiniert werden. Ausgehend davon und der Annahme, dass FetP als neuartige Eisen-Reduktase fungiert, würden divalente Manganionen als Fe(II)-Analoge demnach die „Abgangsgruppen“ darstellen, die gerade noch so fest gebunden bleiben, dass eine Freigabe an die Umgebung nicht stattfindet und somit toxische Fenton Reaktionen verhindert würden.

4.5 Charakterisierung der Bindestellen in FetP.

Da die Aminosäuren, die im P19-Protein aus *C. jejuni* als Liganden für Mn^{2+} und Cu^{2+} fungieren, in FetP ebenfalls konserviert vorliegen (Abb. 21), war zu vermuten, dass diese gleichermaßen für die Koordinierung der Kationen in FetP verantwortlich sind. Um dies zu bestätigen, sollten die entsprechenden FetP-Varianten gereinigt und deren Metallbindung thermodynamisch analysiert werden (Tab. 7, Tab. 8).

Zunächst zeigte sich, dass einzelne Aminosäure-Austausche in der putativen Cu^{2+} -Bindestelle (H44, E46, M90, H97, H127*) einen großen Einfluss auf die Stabilität von FetP nahmen. Während die H97R-Variante bei den ITC-Messungen präzipitierte, konnten die Varianten mit den jeweiligen Austauschen H44R bzw. H127R nicht aus dem Periplasma gereinigt werden. Obwohl beide Aminosäuren basische Seitenketten besitzen, liegt der Argininrest aufgrund des pK_s Wertes von 12.48 bei neutralem pH Wert protoniert vor, während der Histidinrest mit einem pK_s Wert von 6.04 keine Ladung aufweist. Für die Signalpeptidase LspA aus *E. coli* wurde nachgewiesen, dass positiv geladene Aminosäurereste mit einer zytoplasmatischen Lokalisation der entsprechenden Domänen einhergehen (Andersson *et al.*, 1992). Auch für

das periplasmatische Kupferresistenzprotein CusF aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch der fünf Histidin- gegen Argininreste kein Transport über die innere Membran mehr stattfindet (Franke, 2002). Da jedoch bei beiden FetP-Varianten jeweils nur ein von insgesamt sechs Histidinresten ausgetauscht wurde und die Variantenproteine immunologisch nicht im Rohextrakt nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), ist nicht von einer Fehllokalisation, sondern von einer erhöhten Varianteninstabilität auszugehen. Indessen konnte das Bindungsverhalten der stabilen Variantenproteine E46Q, H127A und M90I gegenüber den entsprechenden Kationen bestimmt werden:

Wurde die Aminosäure E46 gegen ein Glutamin ausgetauscht, konnte für die FetP-Variante keine Bindung von Cu^{2+} oder Mn^{2+} beobachtet werden (Tab. 7, Tab. 8), sodass die spezifische Carboxylgruppe für die Koordinierung dieser Metallionen essentiell zu sein scheint. Dies korreliert mit der Strukturanalyse von kupferbeladenem FetP (Cu-FetP), womit nachgewiesen wurde, dass dieser Aminosäurerest in Konformation CuA1 als Ligand für Cu^{2+} fungieren könnte (Abb. 36) (Koch *et al.*, 2011). Desweiteren wurde der konservierte Aminosäurerest in dem zu FetP homologen Protein P19 aus *C. jejuni* in verschiedenen Konformationen detektiert, der sowohl Cu^{2+} , als auch Mn^{2+} koordiniert und so möglicherweise eine Interaktion zwischen beiden Ionen reguliert (Chan *et al.*, 2010). Basierend auf dem Konzept der harten und weichen Säuren und Basen wird Mn^{2+} als harte Säure bevorzugt durch Carboxylgruppen ligandiert (Frausto da Silva und Williams, 2001), während Cu^{2+} zumeist durch Imidazol- aber auch durch Carboxylgruppen in Proteinen koordiniert werden kann (Cowan, 1997). Obwohl Glutamat- und Aspartatreste ebenso in zahlreichen Zn^{2+} -Bindestellen zu finden sind (Auld, 2001, Maret und Li, 2009), wurde durch den E46Q-Austausch in FetP die Bindung divalenter Zinkionen nicht beeinträchtigt (Tab. 8). Vermutlich ist dieses Resultat darauf zurückzuführen, dass Zn^{2+} aufgrund der vollbesetzten 3d Orbitale lediglich durch vier Liganden koordiniert werden können (Nies, 2007) und der Aminosäurerest E46 an der Formierung einer Bindestelle mit degenerierter oktaedrischer Geometrie wie in Konformation CuA1 beteiligt ist.

Wurde an Position 127 das Histidin zu der kleinen, ungeladenen Aminosäure Alanin mutiert, war die FetP-Variante erwartungsgemäß nicht mehr in der Lage, Cu^{2+} zu binden (Tab. 7). Interessanterweise liegt diese Aminosäure, wie auch in dem homologen Protein P19, auf einem großen, zu der jeweils anderen Untereinheit hervorragenden *Loop* und ist Bestandteil der dort lokalisierten Cu^{2+} -Bindestelle (Abb. 36) (Chan *et al.*, 2010, Koch *et al.*, 2011). Ferner wies die FetP-Variante H127A keine Bindung divalenter Manganionen mehr auf (Tab. 7, Tab. 8), was gegebenenfalls auf den strukturellen Unterschied zwischen Histidin und Alanin zurückzuführen ist, wodurch eine mögliche Mn^{2+} -Bindestelle, die wie im P19-Protein 7.7 Å von der Kuperbindestelle entfernt liegt (Chan *et al.*, 2010), in ihrer Geometrie verzerrt worden

sein könnte. Eine Kristallstruktur des Variantenproteins würde zur Klärung dieser Vermutung beitragen. Um so erstaunlicher ist, dass die FetP-Variante mit dem H127A-Austausch unverändert divalente Zinkionen binden kann (Tab. 8). Da Alanin nicht bevorzugt als Ligand für Metallionen fungiert (Karlin und Zhu, 1997, Shimazaki *et al.*, 2009) kann gefolgert werden, dass der Histidinrest an Position 127 nicht an der Zn^{2+} -Bindung von FetP beteiligt ist, während diese konservierte Imidazolgruppe in der Formierung der Zn^{2+} -Bindestelle von Tp34 aus *T. pallidum* involviert ist (Abb. 21) (Deka *et al.*, 2007).

Die Mutation des konservierten Methionins an Position 90 hatte keinen Einfluss auf die Mn^{2+} -Bindung des Variantenproteins, resultierte jedoch in einem Verlust der Koordinierung von Cu^{2+} (Tab. 7, Tab. 8). Dies ist kongruent mit der Kristallstruktur von Cu-FetP, in der der Methioninrest an der Bindung des Kations beteiligt ist (Abb. 36) (Koch *et al.*, 2011). Auch in P19 fungiert der konservierte Aminosäurerest als Cu^{2+} -Ligand (Chan *et al.*, 2010) und wurde ebenso in dem homologen Protein ChpA aus dem marinen, magnetotaktischen Stamm MV-1 als Teil des MXM-Kupfer *handling* Motivs von Dubbels *et al.* (2004) beschrieben (Abb. 21). Ausserdem hatte der Aminosäureaustausch M90I zur Folge, dass die FetP-Variante keine divalenten Zinkionen mehr binden konnte (Tab. 8). Dies korreliert mit den Ergebnissen der kompetitiven ITC-Experimente (Tab. 6), wodurch nachgewiesen wurde, dass die Bindung von Zn^{2+} bzw. Cu^{2+} durch das jeweilige andere Kation verhindert wird und somit beide Metallionen von mindestens einem gemeinsamen Liganden koordiniert werden. Es ist bekannt, dass Zinkionen durch eine Vielzahl von Aminosäureresten koordiniert werden können, wozu Histidin-, Cystein-, Glutamat- und Aspartat- aber auch Tyrosin-, Asparagin-, Serin- und Threoninreste zählen (Karlin und Zhu, 1997, Auld, 2001, Maret und Li, 2009). Im Gegensatz dazu werden Kupfer- und Eisenionen durch Methioninreste koordiniert (Castagnetto *et al.*, 2002, Davis und O'Halloran, 2008). Dass dies jedoch auch auf divalente Zinkionen zutrifft, wurde bislang nur für die Zn^{2+} -Bindestelle von Tp34 beschrieben (Deka *et al.*, 2007), wobei die Distanz zwischen dem Ion und dem Methioninrest von mehr als 3 Å für eine eher schwache Koordinierung spricht und die Autoren einräumen, dass diese Metallbindestelle *in vivo* möglicherweise eher von Kupfer- oder Eisenionen besetzt werden könnte. Bezug nehmend auf die Resultate der Konkurrenzexperimente und dass Cu^{2+} hochaffin Enthalpie- und Entropie-getrieben von FetP gebunden wird (Tab. 6), sodass nach der Reinigung des Proteins noch immer ein Teil kupfergebunden vorlag (Abb. 16), lässt die rein Entropie-getriebene Zn^{2+} -Bindung ebenfalls als einen Artefakt vermuten.

Neben dem Aminosäurerest M90 könnte auch das Methionin an Position 17 als Ligand für Zn^{2+} fungieren, da für die M17I-Variante eine Bindung von Mn^{2+} und Cu^{2+} gemessen wurde, was jedoch nicht für Zn^{2+} zutrifft (Tab. 7, Tab. 8). Da diese Aminosäure in ChpA konserviert

vorliegt (Abb. 21) und als Bestandteil eines zweiten Kupfer *handling* Motivs (MXXM) diskutiert wurde (Dubbels *et al.*, 2004) und mit Ausnahme von Tp34 bislang keine Kristallstruktur eines Metallproteins mit einer Zn^{2+} -Koordinierung durch einen Methioninrest bekannt ist (Castagnetto *et al.*, 2002), scheinen die beiden Methioninreste an Position 17 und 90 in einer artifiziellen Weise mit den divalenten Zinkionen zu interagieren.

Zusammenfassend konnte anhand der drei FetP-Varianten E46Q, H127A und M90I die durch die Struktur ermittelte Cu^{2+} -Bindestelle in FetP bestätigt werden.

Darüber hinaus wurde für FetP eine Cu^+ -Bindestelle (CuC) postuliert, die möglicherweise durch die vier Aminosäurereste M29, M34, M88 und H125* der jeweils anderen Untereinheit gebildet wird (Abb. 37). In der Veröffentlichung von Davis und O`Halloran (2008) illustrieren die Autoren, dass Thioethergruppen von Methionen als Cu^+ -Liganden in mehr oxidierender Umgebung, wie dem Periplasma fungieren, während Cysteinthiolatgruppen als Cu^+ -Liganden in zytoplasmatischen Kupferchaperonen und –regulatoren zu finden sind. Auch die periplasmatischen Kupferresistenzproteine CopC aus *P. syringae* pathovar *tomato* und PcoC aus *E. coli*(pRJ1004) weisen neben einer Cu(II)- eine Cu(I)-Bindestelle auf, die ebenso durch jeweils drei bzw. zwei Methionin- und einem Histidinrest formiert werden (Arnesano *et al.*, 2003, Peariso *et al.*, 2003). Infolgedessen wurde das Bindungsverhalten der Varianten M29I, M34I und H125R für die verschiedenen Metallionen ermittelt, wobei die ITC-Experimente unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden und somit Cu^+ nicht eingesetzt werden konnte. Erwartungsgemäß wurden Mn^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} von den Variantenproteinen unverändert gebunden (Tab. 7, Tab. 8), sodass ausgeschlossen werden kann, dass diese Kationen an die putative CuC-Bindestelle binden, welche somit als nicht Mn^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} spezifisch bewiesen werden konnte.

Ferner sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Mn^{2+} -Bindung von FetP in einer eigenen, von der für Cu^{2+} verschiedenen Bindestelle erfolgt, wie dies für das P19-Protein nachgewiesen wurde (Chan *et al.*, 2010). Hier wird Mn^{2+} direkt durch einen Aspartat- und einen Glutamatrest koordiniert, die in FetP konserviert vorliegen und den Aminosäuren D94 und E46 entsprechen (Abb. 21). Ausserdem scheint ein weiteres Glutamat mit dem Kation in einer Distanz von 3.2 Å schwach zu interagieren, welches in FetP an Position 5 lokalisiert ist. Da jedoch das FetP-Protein mit einem E5Q- bzw. E5A-Austausch nicht gereinigt werden konnte, sollte das Bindungsverhaltens der Varianten D94N und E46Q hinsichtlich einer möglichen Mn^{2+} -Bindestelle untersucht werden. Dass die Carboxylgruppe von E46 sowohl an der Koordinierung von Cu^{2+} , als auch Mn^{2+} beteiligt zu sein scheint, wurde bereits erörtert und auch für die konservierte Aminosäure in dem homologen Protein P19 beschrieben (Chan *et al.*, 2010). Wie erwartet resultierte der Austausch von Aspartat zu

Asparagin an Position 94 in einem spezifischen Verlust der Mn^{2+} -Bindung von FetP (Tab. 7, Tab. 8), sodass FetP, wie P19, zwei getrennte Bindestellen für Cu^{2+} und Mn^{2+} aufweisen dürfte, die wiederum durch den Liganden E46 interagieren könnten. Mit einem Aspartat- und zwei Glutamatresten weisen diese putativen Bindestellen von FetP und P19 die für Mangan- und Eisenionen präferierten Carboxylgruppen als Liganden auf (Frausto da Silva und Williams, 2001). Es ist bekannt, dass beide Ionen nicht nur ähnliche Aminosäurereste zur Koordinierung tolerieren (Imlay, 2008), sondern *in vivo* sogar Kompetitionen um spezifische Bindestellen in Metallenzymen, wie der Superoxiddismutase SodA stattfinden (Beyer und Fridovich, 1991). Im Hinblick darauf, dass das FetMP-System als Eisenaufnahmesystem fungiert, ist demnach zu vermuten, dass *in vivo* eher Eisen- als Manganionen innerhalb dieser Bindestelle koordiniert werden.

Interessanterweise hatten die Aminosäureaustausche D94N und E46Q keinen Einfluss auf die Zn^{2+} -Bindung, obwohl diese Ionen im Vergleich zu Fe^{2+} bzw. Mn^{2+} eine wesentlich höhere Affinität gegenüber Carboxylgruppen aufweisen (Nies, 2007). Infolgedessen scheinen divalente Zinkionen nicht innerhalb der Mn^{2+} -Bindestelle koordiniert zu werden, was durch zwei Ursachen begründet sein könnte:

Zum einen erfolgt die Selektion der Metallbindestellen neben einer Reihe anderer Faktoren durch den Ladungszustand des Ions, sodass zwischen den divalenten Zinkionen und den Mangan- bzw. Eisenionen mit verschiedenen Oxidationsstufen unterschieden werden kann (Frausto da Silva und Williams, 2001, Nies, 2007). Zum anderen spielt die Koordinierungsgeometrie einer Bindestelle eine wesentliche Rolle für die Diskriminierung der Ionen. So wird Zn^{2+} aufgrund der vollbesetzten 3d Orbitale durch vier Liganden koordiniert, während Fe^{2+} bzw. Mn^{2+} auch oktaedrisch komplexiert werden kann. Dies spiegelt sich auch in der Geometrie der Bindestellen von NmtR aus *Mycobacterium tuberculosis* und SmtB aus *Synechococcus* sp. Stamm PCC7942 wieder, die als zytoplasmatische Sensorproteine agieren (Tottey *et al.*, 2005). Während SmtB eine für Zn^{2+} spezifische vierzählige Bindestelle aufweist, besitzt NmtR eine dazu analoge Bindestelle mit zwei zusätzlichen Liganden, wodurch die Koordinierung von Co^{2+} ermöglicht wird. Jedoch konnte bislang keine genaue Aussage über die Geometrie der Mn^{2+} -Bindestelle in FetP anhand der Kristallstruktur des manganbeladenen P19-Proteins getroffen werden, da lediglich 25% der Bindestellen von P19 mit Mn^{2+} besetzt waren (Chan *et al.*, 2010). Die Autoren suggerieren jedoch, dass neben den beiden Glutamat- und Aspartatresten weitere Carboxylgruppen in der Umgebung an der Koordinierung des Kations beteiligt sein könnten, was jedoch weiterer Untersuchung bedarf.

4.6 Welche Funktion übernimmt die N-terminale Domäne von FetM im Periplasma?

Wie sich zeigte, ist das FetMP-System an der Eisen- und vermutlich auch Manganaufnahme von *E. coli* beteiligt, wobei FetM eine zentrale Rolle übernimmt. Obwohl für das Membranprotein acht Transmembrandurchgänge postuliert wurden (Abb. 26), konnte in der vorliegenden Arbeit die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei der ersten α -Helix um eine Signalsequenz handelt, die abgespalten wird (Abb. 28). Infolgedessen weist FetM mit sieben Membrandurchgängen und konservierten sauren Aminosäureresten in TMH I und IV die für die ILT-Superfamilie (TC.9.A.10) spezifischen Charakteristika auf (Debut *et al.*, 2006), wobei ein drittes REXXE Motiv in TMH III lokalisiert ist (Abb. 26). Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind diese Aminosäurereste an der Translokation der Kationen beteiligt, wie es für die bislang charakterisierten Mitglieder Ftr1p aus *S. cerevisiae* und EfeU aus *E. coli* Nissle 1917 der OFeT-Unterfamilie nachgewiesen wurde (Severance *et al.*, 2004, Grosse *et al.*, 2006). Während ein EDLWE-Element in TMH III und ein DASE Motiv in dem extrazellulären *Loop* VI für die Funktion von Ftr1p ebenfalls nötig sind (Severance *et al.*, 2004), vermuten Grosse *et al.* (2006) ähnliches für den ersten und letzten periplasmatischen *Loop* von EfeU, die reich an negativ geladenen Aminosäureresten sind. Demgegenüber weist FetM nur wenige putative Liganden für Metallionen in den postulierten extrazytoplasmatischen Domänen zwischen den Membrandurchgängen auf (Abb. 26). Jedoch könnte dies durch zahlreiche geladene Aminosäurereste kompensiert werden, die in der großen N-terminalen Domäne von FetM lokalisiert sind. Wie FetM, zählen unter anderem das PbrT-Protein aus *C. metallidurans* Stamm CH34 (TC.9.A.10.2.1) und das orthologe Protein cFtr1 aus *C. jejuni* (TC.9.A.10.2.4) zur PbrT-Unterfamilie (TC.9.A.10.2), für die *in silico* ebenfalls sieben Membrandurchgänge und ein äußerst großer N-terminaler *Loop* im Periplasma vorhergesagt werden (Daten nicht gezeigt). Ferner liegen auch bei diesen Vertretern drei REXXE Motive konserviert vor. Während PbrT wahrscheinlich als Pb^{2+} -Importer fungiert (Borremans *et al.*, 2001), liegt das *cftr1*-Gen benachbart zu *p19* und kodiert für ein Eisentransport-homologes Protein (Palyada *et al.*, 2004, Holmes *et al.*, 2005, Chan *et al.*, 2010). Welche Aufgabe die beachtliche N-terminale Domäne der jeweiligen Proteine übernimmt, wurde bislang nicht untersucht und sollte für FetM im Rahmen dieser Arbeit anhand des Metallbindeverhaltens und Interaktionsstudien mit FetP analysiert werden.

Zunächst konnte mittels ITC nachgewiesen werden, dass die periplasmatische FetM-*Loop*-Domäne eine hohe Spezifität gegenüber divalenten Manganionen aufweist, da weder Cu^{2+}

noch Zn^{2+} , sondern nur Mn^{2+} gebunden wurde (Abb. 31). Dies ist mit der Zugehörigkeit von FetM zur ILT-Superfamilie (TC.9.A.10) kongruent und deutet darauf hin, dass FetMP als spezifisches Eisen- und Manganaufnahmesystem fungiert, was sich in den Ergebnissen der Wachstums- und Aufnahmeexperimente widerspiegelt (Abb. 5, Abb. 10, Abb. 12, Abb. 13). Ob trivalente Eisenionen ebenfalls zum Substratspektrum von FetM gehören, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Mit einer Dissoziationskonstante k_d von $5.6 \mu\text{M}$ scheint die N-terminale Domäne von FetM jedoch keine Chaperonfunktion für Mn^{2+} bzw. Fe^{2+} zu übernehmen, da hinsichtlich der Situation eines pathogenen Bakteriums wie dem *E. coli* Stamm F11, die freie extrazelluläre Eisenkonzentration durch den Wirt als Abwehrstrategie bis auf eine Konzentration von etwa 10^{-18} M dezimiert wird (Bullen *et al.*, 1978, Andrews *et al.*, 2003). Dies begründet Dissoziationskonstanten im attomolaren Bereich von Siderophoren und periplasmatischen Fe(II)/(III)-Bindeproteinen pathogener Organismen (Anderson *et al.*, 2004, Koropatkin *et al.*, 2007, Khan *et al.*, 2007), wie es bereits hinsichtlich des Bindungsverhaltens von FetP erörtert wurde. Für dessen Affinität gegenüber divalenten Manganionen wurden k_d Werte von $0.6 \mu\text{M}$ in Bis-Tris bzw. $3.6 \mu\text{M}$ in ACES bestimmt (Tab. 6), die demnach mit dem der periplasmatischen FetM-Loop-Domäne vergleichbar sind. Dass Transport- und Bindeprotein ähnliche Substrataffinitäten aufweisen können, wurde für verschiedene Systeme beschrieben. So bindet das zytoplasmatische Chaperon Atox1 Cu^+ mit einer Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich und bringt diese zur Wilson (WND) kupfertransportierenden P-Typ ATPase, für deren Metallbindedomänen annähernd gleiche Affinitäten ermittelt wurden (Yatsunyk und Rosenzweig, 2007). In einer vorhergehenden Arbeit wurden zwar höhere aber dennoch ähnliche Dissoziationskonstanten für Atox1 und das WND-Protein bestimmt (Wernimont *et al.*, 2004). Die Autoren vermuten, dass dabei der Transfer der Metallionen zwischen beiden Proteinen eher kinetischer, als thermodynamischer Kontrolle unterliegt. Dies gilt ebenso für das Silber-/Kupferresistenzsystem CusCFBA aus *E. coli*, da sich die Dissoziationskonstanten des periplasmatischen Chaperons CusF und des Membranfusionsproteins CusB gegenüber monovalenten Silberionen nur geringfügig voneinander unterscheiden (Kittleson *et al.*, 2006, Bagai *et al.*, 2007). Darauf folgend konnte für beide Proteine mittels ITC eine metallabhängige Interaktion nachgewiesen werden, wobei entweder CusF oder CusB mit Ag^+ beladen zu dem jeweils anderen, unbeladenen Protein titriert wurde (Bagai *et al.*, 2008).

Dass die FetM-Loop-Domäne und FetP ebenfalls metallabhängig interagieren, konnte durch Far-Western-Blot (Abb. 32) und ITC (Abb. 34) bestätigt werden. Da für die erste Methode beide Proteine mit einem jeweiligen tag fusioniert vorlagen, scheinen diese somit keinen Einfluss auf die Interaktion zu haben. Jedoch zeigte sich, dass bei beiden Methoden eine

Interaktion nur dann stattfand, wenn die FetM-Loop-Domäne und nicht FetP manganbeladen eingesetzt wurde. Möglicherweise ist dies auf eine Denaturierung der N-terminalen Domäne von FetM zurückzuführen, die durch Mn^{2+} an Stabilität gewinnen könnte.

Anhand einer neuentwickelten X-Ray-Absorptionsspektroskopie (XAS) konnten Bagai *et al.* (2008) darüber hinaus einen bidirektionalen Cu^+ -Transfer zwischen CusF und CusB zeigen, was die ähnlichen Affinitäten beider Proteine für Metallionen widerspiegelt. Dabei verläuft die Metallionenübergabe relativ schnell und endet in einer Gleichverteilung der Ionen zwischen Donor und Akzeptor. Im Hinblick auf die *in vivo* Situation ist hingegen ein Transfer nur von CusF zu CusB zu vermuten, da die von CusB gebundenen Ionen durch das CusCBA-Effluxsystems über die äußere Membran transportiert werden (Bagai *et al.*, 2008). Da für die FetM-Loop-Domäne und FetP ebenfalls vergleichbare Dissoziationskonstanten für Mn^{2+} ermittelt wurden (Abb. 31, Tab. 6), ist demnach auch ein unidirektionaler Transfer anzunehmen, wobei FetP mangan- bzw. eisengebunden zunächst mit der N-terminalen FetM-Domäne interagiert und das entsprechende Metallion übergeben könnte, was anschließend durch FetM in die Zelle aufgenommen würde.

4.7 Die putative Eisenreduktase FetP nutzt vermutlich Cu^+ als Elektronendonator.

Dass das periplasmatische Protein FetP eine Funktion als Fe(III)-Reduktase übernehmen könnte, wurde hinsichtlich zweier Aspekte vermutet: Zum einen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass für die FetMP-vermittelte Eisenaufnahme das Membranprotein FetM essentiell ist (Abb. 10, Abb. 12, Abb. 13), was eine größere Sequenzähnlichkeit mit dem Pb(II)-Transporter PbrT (Borremans *et al.*, 2001), als mit dem Eisenimporter EfeU (Grosse *et al.*, 2006) aufweist und aufgrund seiner Fähigkeit $Mn(II)$ ebenfalls zu transportieren (Abb. 5), dieses Protein eher als Fe(II)- als Fe(III)-Importer fungieren zu scheint. Zum anderen wurde durch anaerobe Wachstums-Endpunktbestimmungen ein FetP spezifischer Beitrag zur Wachstumsverbesserung der Eisenaufnahmemutante mit dem FetMP-System unter Eisenmangel aber auch in Gegenwart hoher Fe(III)-Konzentrationen nachgewiesen, während bei hohen Fe(II)-Konzentrationen keine signifikante Wachstumsverbesserung durch FetP zu beobachten war (Abb. 12). Eine mögliche Reduktaseaktivität von FetP wurde daraufhin in *fetP* exprimierenden *E. coli* Zellen untersucht, für die ein doppelt so hoher Wert im Vergleich zum Kontrollstamm bestimmt wurde (Abb. 24). Vermutlich begründet die Verwendung ganzer Zellen hierbei den hohen,

apparenten k_m Wert von 1.5 mM, während die ermittelte Maximalgeschwindigkeit v_{max} mit 3 $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{min}/\text{g TG}$ einer Reduktion von 1.8 Millionen Fe(III)/Zelle/min entspricht, was selbst bei mikromolaren Eisenkonzentrationen ausreichen würde, um 300000 Eisenatome zur Verfügung zu stellen, die *E. coli* Zellen in Minimalmedium aufweisen (Kirsten *et al.*, 2011).

Möglicherweise nutzt FetP dazu als Elektronendonator ein temporär gebundenes, monovalentes Kupferion in der putativen CuC-Bindestelle, das anhand der Struktur etwa 7 Å von der CuB-Bindestelle entfernt wäre (Abb. 37). Es ist im Hinblick auf die verschiedenen Konformationen der detektierten Kupferbindestellen (Abb. 36) daher denkbar, dass hierbei ein Elektronentransfer von dem monovalenten Kation in CuC auf ein bereits mit hoher Affinität gebundenes divalentes Kupferion in der CuB-Bindestelle erfolgt und anschließend die Eisenreduktion in der Eisen-/Manganbindestelle über den Aminosäurerest E46 vermittelt würde. In ähnlicher Weise findet der Elektronentransfer zwischen einem monovalenten Kupferion in der fünften Kupferbindestelle T4 und einem 7.5 Å entfernten divalenten Kupferion in der T1-Bindestelle der MCO CueO statt (Djoko *et al.*, 2010), wobei in diesem Fall die Oxidation von Cu^+ als Substrat mit der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser gekoppelt ist und das Typ 1 Kupfer als primäres Elektronenakzeptor fungiert.

In Korrelation mit der Vermutung, dass FetP als Eisenreduktase monovalente Kupferionen als Elektronendonator nutzt, konnte der FetP spezifische Effekt in Gegenwart von 100 $\mu\text{M Fe(III)}$ durch Ag(I) als Cu(I)-Analogon (Kittleson *et al.*, 2006, Djoko *et al.*, 2010) aufgehoben werden (Abb. 25), sodass diese Ionen entweder mit Cu(I) um die CuC-Bindestelle zu konkurrieren scheinen oder sogar die Kupferionen aus der CuA- oder CuB-Bindestelle verdrängen können und somit die Fe(III)-Reduktion durch FetP vermutlich verhindern.

Obwohl schätzungsweise 96% der zellulären Kupferionen im Periplasma von *E. coli* lokalisiert sind (Changela *et al.*, 2003), davon die monovalenten Ionen jedoch aufgrund ihrer hohen Toxizität entweder über das Kupferresistenzsystem CusCFBA in den extrazellulären Raum transportiert (Franke *et al.*, 2003, Loftin *et al.*, 2005, Bagai *et al.*, 2008) oder durch die MCO CueO zu weniger toxischen divalenten Kupferionen oxidiert werden (Grass und Rensing, 2001, Roberts *et al.*, 2002, Djoko *et al.*, 2010), stellt sich die Frage hinsichtlich der Elektronenherkunft für die Reduktase FetP. Basierend auf den Kenntnissen der Standardredoxpotentiale von Fe(III)/Fe(II) ($E_0 = +0.77$ V, pH 7.0) und Cu(II)/Cu(I) ($E_0 = +0.15$ V, pH 7.0) könnten demnach Komponenten der Atmungskette an der Reduktion divalenter Kupferionen beteiligt sein, was in einer kürzlich erschienenen Publikation für *E. coli* erstmalig *in vivo* nachgewiesen wurde (Volentini *et al.*, 2011). Dabei zeigte sich, dass vor allem Ubichinon aber auch Menachinon und die NADH Dehydrogenase-2 (NDH-2) an der zellulären Reduktion von Cu(II), jedoch nicht von Fe(III) beteiligt sind. Während NDH-2

auf der Innenseite der Zytoplasmamembran gebunden vorliegt, sind Chinone in der Lage, lateral in der inneren Membran zu diffundieren, wodurch eine Reduktion im zytoplasmatischen, als auch periplasmatischen Raum stattfinden könnte. Ferner wäre möglich, dass im Periplasma geringe Mengen an Glutathion mit einem Standardredoxpotential von GSSH/GSH ($E_0 = -0.264$ V, pH 7.4) an der Erzeugung monovalenter Kupferionen ebenfalls beteiligt sein, die dann direkt von FetP als Elektronendonator genutzt werden könnten.

Die bislang in Prokaryoten charakterisierten assimilatorischen Eisenreduktasen nutzen neben reduziertem Glutathion (GSH) im Periplasma, NAD(P)H im Zytoplasma als Elektronendonator und reduzieren Flavinmononucleotide (FMN), Flavinadenindinucleotide (FAD) oder Riboflavine, die mit Ausnahme von Hmp aus *E. coli* anschließend dissoziieren und als Reduktionsmittel unter anderem für siderophorgebundene trivalente Eisenionen dienen (Poole *et al.*, 1997, Pierre *et al.*, 2002, Schröder *et al.*, 2003, Miethke und Marahiel, 2007). Die Flavinreduktasen sind demnach nur indirekt an der Eisenreduktion beteiligt und weisen keine Substratspezifität auf, was mit deren eisenunabhängigen, konstitutiven Genexpression korreliert (Halle und Meyer, 1992). Das *E. coli* FhuF-Protein stellt demgegenüber eine neue Art von Reduktase dar, die eine Substratspezifität gegenüber Fe-Hydroxamaten besitzt und dessen Genexpression Fur-abhängig reguliert wird (Matzanke *et al.*, 2004). Hier erfolgt der Elektronentransfer vermutlich direkt über das [2Fe-2S] Cluster von FhuF auf das Substrat (Müller *et al.*, 1998), wobei das Protein lose mit der inneren Membran assoziiert ist. Die Existenz periplasmatischer und membrangebundener Fe(III)-Siderophor-Reduktasen in *E. coli* und die Möglichkeit, dass diese auch ungebundene trivalente Eisenionen reduzieren könnten, würde die Reduktaseaktivität der nicht *fetP* exprimierenden *E. coli* Zellen erklären (Abb. 24) (Fischer *et al.*, 1990, Cowart, 2002, Schröder *et al.*, 2003) und eine FetP unabhängige Eisenaufnahme durch FetM ermöglichen (Abb. 10, Abb. 12, Abb. 13, Abb. 25). Da für das zu FetP homologe Protein P19 aus *C. jejuni* *in vitro* keine Ferrireduktaseaktivität in Abhängigkeit von NADH nachgewiesen werden konnte (Chan *et al.*, 2010), zeigt dies einmal mehr, dass FetP nicht mit den bisher in Prokaryoten identifizierten Eisenreduktasen vergleichbar und daher als neuartige Reduktase zu beschreiben ist.

Dies steht ebenfalls in Korrelation mit den untersuchten Eisenreduktasen in Eukaryoten, wozu die membranständigen Fre-Proteine aus *S. cerevisiae* zählen, die ähnlich zu *b*-Typ Cytochromen, wie der großen β -Untereinheit gp91^{phox} der NADPH Oxidase humaner Phagozyten, ein FAD- und NADPH-Bindemotiv aufweisen (Dancis *et al.*, 1992, Shatwell *et al.*, 1996). Vier Histidinreste scheinen zwei Häm *b* Gruppen zu koordinieren, die vermutlich an einem transmembranen Elektronentransfer beteiligt sind, wodurch die zelluläre Umgebung angesäuert und das Fe(III)-Redoxpotential von Ferrisiderophoren als Beihilfe zur

Eisenreduktion erhöht würde (Lesuisse *et al.*, 1995, Finegold *et al.*, 1996, Miethke und Marahiel, 2007). Die unkomplexierten, divalenten Eisenionen werden anschließend entweder direkt über die NRAMP-Orthologen SMF1-3 bzw. den niedrig-affinen Fet4p-Transporter in die Hefezellen aufgenommen oder für die hochaffine Fe(III)-Aufnahme über Ftr1p durch die MCO Fet3p reoxidiert (Dix *et al.*, 1994, De Silva *et al.*, 1995, Stearman *et al.*, 1996, Dix *et al.*, 1997, Pinner *et al.*, 1997, Kosman, 2003). Die glykosylierte Ferroxidase ist ebenfalls in der Membran lokalisiert und ein homologes Protein zu dem humanen Plasmaprotein Ceruloplasmin (de Silva *et al.*, 1997). Neben dem Typ 1 Kupfer als primären Elektronenakzeptor weist Fet3p ein trinukleäres Kupfer-Cluster auf, über das die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Taylor *et al.*, 2005, Sedlak *et al.*, 2008). Da FetP keine vergleichbaren Kupfer-Cluster aufweist (Abb. 35, Abb. 36) und für das homologe Protein P19 aus *C. jejuni in vitro* keine Oxidaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Chan *et al.*, 2010), ist eine Ferroxidaseaktivität für FetP eher auszuschließen.

Als uropathogenes Bakterium toleriert der *E. coli* Stamm F11 ständige Änderungen des Urins in der Blase, was dessen Konzentration, Sauerstoffgehalt und pH Wert einschließt und folglich auch die Fe(III)-Löslichkeit betrifft (Brooks und Keevil, 1997, Millero, 1998). So liegen unter leicht sauren bzw. basischen Bedingungen eher lösliche Fe(III)(OH)_2^+ - bzw. Fe(III)(OH)_4^- -Komplexe vor, die zu den vergleichsweise unlöslichen Fe(III)(OH)_3 -Komplexen dann leichter von dem *E. coli* Stamm F11 aufgenommen werden können. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist das FetMP-System für das Wachstum unter diesen Bedingungen äußerst wichtig (Abb. 5B, C). Unter der Annahme, dass FetP nun monovalente Kupferionen als Elektronendonator zur Fe(III)-Reduktion nutzt, wäre das FetMP-System ein weiteres Beispiel für die Verbindung zwischen Eisen- und Kupferhomöostase. Darüber hinaus würde FetP zusätzlich zu der MCO CueO (Grass und Rensing, 2001, Outten *et al.*, 2001, Roberts *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2004), die toxischen Cu(I) zu weniger toxischen Cu(II) umwandeln.

Zusammenfassend scheint der *E. coli* Stamm F11 sowohl Fe(II), als auch Fe(III) effizient unter variierenden Bedingungen nutzen zu können, was vermutlich unter anderem eine Besiedlung des Urinaltraktes ermöglicht.

4.8 Ausblick

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate wurde das Eisenaufnahmesystem FetMP aus dem uropathogenen *E. coli* Stamm F11 erstmalig charakterisiert.

Wie sich zeigte, ist das Membranprotein FetM für die Eisenaufnahme durch das Fet-System essentiell. Der direkte Transport könnte in weiterführenden Experimenten durch Nutzung von *right side out* Vesikeln nachgewiesen und dessen Energetisierung aufgeklärt werden. Möglicherweise nutzt FetM hierfür die protonenmotorische Kraft, wie es für das EfeU-Protein aus *E. coli* Nissle 1917 von Grosse *et al.* (2006) diskutiert wird. Darüber hinaus ist noch nicht bekannt, ob die drei transmembranen REXXE-Motive an der Translokation der Kationen beteiligt sind. Mittels gerichteter Mutagenese könnten diesbezüglich FetM-Varianten synthetisiert werden, deren Einfluss in Wachstumsversuchen und Transportstudien zur Aufklärung dieser Frage beitragen würden. Zudem sollte für das gesamte Membranprotein das Bindungsverhalten gegenüber entsprechender Kationen mittels ITC untersucht werden, da in der vorliegenden Arbeit für die N-terminale Domäne eine zu geringe Affinität im Hinblick auf ein unter Mangelbedingungen funktionsfähiges Aufnahmeprotein bestimmt wurde.

Für die im Periplasma lokalisierte Eisenreduktase FetP wurden eine besetzte Mn(II)- und zwei Cu(II)-Bindestellen pro Dimer anhand von ITC-Experimenten und Strukturanalysen identifiziert, deren *in vivo* Verifikationen hingegen noch ausstehen. So könnten die jeweils mutierten *fetP*-Gene zusammen mit *fetM* oder allein als Einzelkopie in das Chromosom der Eisen-spezifischen Deletionsmutante integriert und anschließend das Wachstum unter Eisenmangel bzw. die Reduktaseaktivität in Gegenwart von Fe(III) bestimmt werden. Ein Nachweis der in der vorliegenden Arbeit postulierten Cu(I)-Bindestelle CuC wäre hiermit ebenso möglich.

Basierend auf dem erfolgreichen Interaktionsnachweis von FetP und der N-terminalen Domäne von FetM könnte eine Kokristallisation in Gegenwart von Mn(II) erste Hinweise auf die Interaktionsstelle geben und möglicherweise zum Verständnis der Interaktion beitragen.

5 Zusammenfassung

Anhand von *in silico* Analysen wurde im uropathogenen *E. coli* Stamm F11 das putative Membranprotein FetM als Mitglied der PbrT (*Lead (Pb²⁺) Uptake Porter*) Proteinfamilie identifiziert. Das zu *fetM* benachbarte Gen *fetP* kodiert ein Periplasmaprotein. Als Ziel dieser Arbeit sollte die physiologische Funktion von FetM und FetP ermittelt werden.

1. Die Expression von *fetMP* in einer Eisen-spezifischen W3110-Mutante, der alle bekannten Eisenaufnahmesysteme fehlen (Fec, Feo, MntH, ZupT und Enterobaktin), verbessert das Wachstum unter Eisenmangel und erhöht die zelluläre Eisenakkumulation. Essentiell dafür ist das Membranprotein FetM, dessen physiologische Effekte durch FetP noch steigert werden.
2. In Gegenwart hoher Eisenkonzentrationen reprimiert der globale Eisen-Regulator Fur die Transkription des *fetMP*-Operons.
3. FetP ist im Periplasma lokalisiert und liegt *in vitro* metallunabhängig als stabiles Homodimer vor.
4. Durch Atom-Absorptions-Spektroskopie und isothermische Titrationskalorimetrie konnte FetP als Metallbindeprotein bestätigt werden, das Kupfer-, Zink, Eisen- oder Manganionen bindet.
5. FetP bindet zwei divalente Kupferionen mit einer apparenten Dissoziationskonstante von ca. 1 nM jeweils an die vier Aminosäurereste von H44, M90, H97 und H127* der jeweils anderen Untereinheit.
6. Die Bindung von drei Zinkionen pro FetP-Dimer wurde durch Cu²⁺ inhibiert, was auf den Aminosäurerest von M90 als gemeinsamen Liganden unter anderem zurückzuführen ist.
7. FetP bindet das Fe²⁺-Proxy Mn²⁺ mit einer Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich. Als putative Liganden wurden die Aminosäurereste von E46 und D94 identifiziert.
8. FetM wird durch Abspaltung der Aminosäuren 1-25 prozessiert und besitzt eine große N-terminale Domäne im Periplasma, die einen hohen Anteil an α -Helices aufweist und *in vitro* spezifisch ein divalentes Manganion mit einem k_d Wert von 5.6 μ M bindet.
9. Die FetM-Loop-Domäne interagiert metallabhängig mit FetP.
10. *In vivo* resultiert die *fetP*-Expression in einer Verdopplung der zellulären Eisenreduktaseaktivität. FetP trägt demnach als putative Fe(III)-Reduktase zu der Wachstumsverbesserung der Eisen-spezifischen W3110-Mutante mit dem FetMP-System bei.

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.
- Achebach, S., T. Selmer und G. Uden (2005).** Properties and significance of apoFNR as a second form of air-inactivated [4Fe-4S]-FNR of *Escherichia coli*. *Febs J* 272: 4260-9.
- Akada, R. (1994).** Quick-Check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques* 17: 58.
- Albin, R., R. Weber und P. M. Silverman (1986).** The Cpx proteins of *Escherichia coli* K12. Immunologic detection of the chromosomal *cpxA* gene product. *J Biol Chem* 261: 4698-705.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402.
- 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, M. A. und F. M. M. Morel (1982).** The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* 27: 789-813.
- Andersson, H., E. Bakker und G. von Heijne (1992).** Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267: 1491-5.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson und F. Rodriguez-Quinones (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27: 215-37.
- Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, S. Mangani und A. R. Thompsett (2003).** A redox switch in CopC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3814-9.
- Askwith, C. und J. Kaplan (1997).** An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272: 401-5.
- 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.
- Auld, D. S. (2001).** Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* 14: 271-313.

- 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.*
- Bagai, I., C. Rensing, N. J. Blackburn und M. M. McEvoy (2008).** Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone. *Biochemistry* 47: 11408-14.
- Bagai, I., W. Liu, C. Rensing, N. J. Blackburn und M. M. McEvoy (2007).** Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system. *J Biol Chem* 282: 35695-702.
- Bagg, A. und J. B. Neilands (1987).** Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26: 5471-7.
- Baichoo, N., T. Wang, R. Ye und J. D. Helmann (2002).** Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* 45: 1613-29.
- Beyer, W. F., Jr. und I. Fridovich (1991).** *In vivo* competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 303-8.
- Biery, M. C., M. Lopata und N. L. Craig (2000).** A minimal system for Tn7 transposition: the transposon-encoded proteins TnsA and TnsB can execute DNA breakage and joining reactions that generate circularized Tn7 species. *J Mol Biol* 297: 25-37.
- Borremans, B., J. L. Hobman, A. Provoost, N. L. Brown und D. van Der Lelie (2001).** Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* 183: 5651-8.
- Bou-Abdallah, F., M. R. Woodhall, A. Velazquez-Campoy, S. C. Andrews und N. D. Chasteen (2005).** Thermodynamic analysis of ferrous ion binding to *Escherichia coli* ferritin EcFtnA. *Biochemistry* 44: 13837-46.
- 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.
- 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: 12350-5.
- Brooks, T. und C. W. Keevil (1997).** A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol* 24: 203-6.

- Brüser, T., R. Deutzmann und C. Dahl (1998).** Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 164: 329-36.
- Bulheller, B. M., A. Rodger und J. D. Hirst (2007).** Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* 9: 2020-35.
- Bullen, J. J., H. J. Rogers und E. Griffiths (1978).** Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 80: 1-35.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, J. M. Short (1987).** XL1 Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galactosidas selection. *Biotechniques* 5: 376-78.
- Byers, B. R. und J. E. L. Arceneaux (1998).** Microbiol iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. in Metal Ions in Biological Systems. *Marcel Dekker, New York* 35: 37-66.
- Cao, J., M. R. Woodhall, J. Alvarez, M. L. Cartron und S. C. Andrews (2007).** EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe^{2+} transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 65: 857-75.
- Castagnetto, J. M., S. W. Hennessy, V. A. Roberts, E. D. Getzoff, J. A. Tainer und M. E. Pique (2002).** MDB: the Metalloprotein Database and Browser at The Scripps Research Institute. *Nucleic Acids Res* 30: 379-82.
- Cellier, M., G. Prive, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodrigues, W. Chia und P. Gros (1995).** Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10089-93.
- Chakrabarti, P. (1989).** Geometry of interaction of metal ions with sulfur-containing ligands in protein structures. *Biochemistry* 28: 6081-5.
- 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.
- Chan, A. C., T. I. Doukov, M. Scofield, S. A. Tom-Yew, A. B. Ramin, J. K. Mackichan, E. C. Gaynor und M. E. Murphy (2010).** Structure and function of P19, a high-affinity iron transporter of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Mol Biol* 401: 590-604.
- Changela, A., K. Chen, Y. Xue, J. Holschen, C. E. Outten, T. V. O'Halloran und A. Mondragon (2003).** Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301: 1383-7.
- Choi, K. H. und H. P. Schweizer (2006).** Mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* 1: 153-61.
- Cleaver, S. H. und E. Wickstrom (2000).** Transposon Tn7 gene insertion into an evolutionarily conserved human homolog of *Escherichia coli attTn7*. *Gene* 254: 37-44.

- Cornelis, P. und S. C. Andrews (2010).** Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms. *Caister Academic Press, Norfolk*.
- 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.
- Cowan, J. A. (1997).** Inorganic Biochemistry: An Introduction. *Sec. Edition. Wiley-VCH, Inc., New York*.
- Cowart, R. E. (2002).** Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Arch Biochem Biophys* 400: 273-81.
- Coy, M. und J. B. Neilands (1991).** Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry* 30: 8201-10.
- Dancis, A., D. Haile, D. S. Yuan und R. D. Klausner (1994).** The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Biol Chem* 269: 25660-7.
- Dancis, A., R. D. Klausner, A. G. Hinnebusch und J. G. Barriocanal (1990).** Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 2294-301.
- Dancis, A., D. G. Roman, G. J. Anderson, A. G. Hinnebusch und R. D. Klausner (1992).** Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3869-73.
- Davis, A. V. und T. V. O'Halloran (2008).** A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol* 4: 148-51.
- De Silva, D., S. Davis-Kaplan, J. Fergestad und J. Kaplan (1997).** Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin. *J Biol Chem* 272: 14208-13.
- De Silva, D. M., C. C. Askwith, D. Eide und J. Kaplan (1995).** The *FET3* gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J Biol Chem* 270: 1098-101.
- Debut, A. J., Q. C. Dumay, R. D. Barabote und M. H. Saier, Jr. (2006).** The iron/lead transporter superfamily of Fe/Pb²⁺ uptake systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11: 1-9.
- Deka, R. K., C. A. Brautigam, F. L. Tomson, S. B. Lumpkins, D. R. Tomchick, M. Machius und M. V. Norgard (2007).** Crystal structure of the Tp34 (TP0971) lipoprotein of *Treponema pallidum*: implications of its metal-bound state and affinity for human lactoferrin. *J Biol Chem* 282: 5944-58.
- Dix, D., J. Bridgham, M. Broderius und D. Eide (1997).** Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J Biol Chem* 272: 11770-7.
- Dix, D. R., J. T. Bridgham, M. A. Broderius, C. A. Byersdorfer und D. J. Eide (1994).** The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 26092-9.

- Djoko, K. Y., L. X. Chong, A. G. Wedd und Z. Xiao (2010).** Reaction mechanisms of the multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase. *J Am Chem Soc* 132: 2005-15.
- Djoko, K. Y., Z. Xiao und A. G. Wedd (2008).** Copper resistance in *E. coli*: the multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in Cu(I)Cu(II)-PcoC. *Chembiochem* 9: 1579-82.
- Dong, J., S. Iuchi, H. S. Kwan, Z. Lu und E. C. Lin (1993).** The deduced amino-acid sequence of the cloned *cpxR* gene suggests the protein is the cognate regulator for the membrane sensor, CpxA, in a two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Gene* 136: 227-30.
- 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.
- Drago-Serrano, M. E., S. G. Parra und H. A. Manjarrez-Hernandez (2006).** EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol Lett* 265: 35-40.
- Dubbels, B. L., A. A. DiSpirito, J. D. Morton, J. D. Semrau, J. N. Neto und D. A. Bazylinski (2004).** Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* 150: 2931-45.
- 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: 3802-08.
- Egler, M., C. Grosse, G. Grass und D. H. Nies (2005).** Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 2297-307.
- 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 USA* 93: 5624-8.
- 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: 537-47.
- Finegold, A. A., K. P. Shatwell, A. W. Segal, R. D. Klausner und A. Dancis (1996).** Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271: 31021-4.
- Fischbach, M. A., H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R. J. Abergel, D. R. Liu, K. N. Raymond, B. L. Wanner, R. K. Strong, C. T. Walsh, A. Aderem und K. D. Smith (2006).** The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16502-7.

- Fischer, E., B. Strehlow, D. Hartz und V. Braun (1990).** Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* 153: 329-36.
- Fisher, C. F., N. M. Davies, E. E. Wyckoff, Z. Feng, E. V. Oaks und S. M. Payne (2009).** Genetics and virulence association of the *Shigella flexneri* Sit iron transport system. *Infect Immun* 77: 1992-99.
- Franke, S., G. Grass, C. Rensing und D. H. Nies (2003).** Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 3804-12.
- Franke, S. (2002).** Das Kupfer-transportierende CusCFBA-Efflux-System aus *Escherichia coli*. *Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Frausto da Silva, J. J. R. und R. J. P. Williams (2001).** The biological chemistry of the elements. *Sec. Edition. Oxford University Press, Oxford.*
- Fridovich, I. (1995).** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Fujinaga, M. und M. N. James (1987).** Rat submaxillary gland serine protease, tonin. Structure solution and refinement at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 195: 373-96.
- Fukada, H. und K. Takahashi (1998).** Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins* 33: 159-66.
- Georgatsou, E. und D. Alexandraki (1994).** Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 3065-73.
- Gill, S. C. und P. H. von Hippel (1989).** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182: 319-26.
- Gonzalez-Guerrero, M. und J. M. Arguello (2008).** Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5992-7.
- 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. (2007).** New Transport Deals for Old Iron. in *Molecular Microbiology of Heavy Metals. Springer-Verlag, Berlin* 6: 221-233.
- Grass, G., K. Thakali, P. E. Klebba, D. Thieme, A. Muller, G. F. Wildner und C. Rensing (2004).** Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 5826-33.
- Grass, G. (2006a).** Biometall-Homöostase in *Escherichia coli*. *Habilitationsschrift, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Grass, G. und C. Rensing (2001).** CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 902-8.

- Green, J., M. Trageser, S. Six, G. Uden und J. R. Guest (1991).** Characterization of the FNR protein of *Escherichia coli*, an iron-binding transcriptional regulator. *Proc Biol Sci* 244: 137-44.
- Gringauz, E., K. A. Orle, C. S. Waddell und N. L. Craig (1988).** Recognition of *Escherichia coli* attTn7 by transposon Tn7: lack of specific sequence requirements at the point of Tn7 insertion. *J Bacteriol* 170: 2832-40.
- Grosse, C., J. Scherer, D. Koch, M. Otto, N. Taudte und G. Grass (2006).** A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62: 120-31.
- 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.
- Grossoehme, N. E., S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger und D. E. Wilcox (2007).** Thermodynamics of Ni²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ binding to the urease metallochaperone UreE. *Biochemistry* 46: 10506-16.
- 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 USA* 95: 7220-4.
- Guest, J. R. (1995).** The Leeuwenhoek Lecture. Adaptation to life without oxygen. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350: 189-202.
- Haber, F. und J. Weiss (1932).** Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Die Naturwissenschaften* 20: 948-50.
- Halle, F. und J. M. Meyer (1992).** Iron release from ferrisiderophores. A multi-step mechanism involving a NADH/FMN oxidoreductase and a chemical reduction by FMNH₂. *Eur J Biochem* 209: 621-7.
- Han, H. Y., H. C. Zou, J. Y. Jeon, Y. J. Wang, W. A. Xu, J. M. Yang und Y. D. Park (2007).** The inhibition kinetics and thermodynamic changes of tyrosinase via the zinc ion. *Biochim Biophys Acta* 1774: 822-7.
- Hanlon, D. P., D. S. Watt und E. W. Westhead (1966).** The interaction of divalent metal ions with tris buffer in dilute solution. *Anal Biochem* 16: 225-33.
- Hantke, K. (2003).** Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* 11: 192-5.
- Hantke, K. (1987).** Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* 210: 135-9.
- Hantke, K. (1990).** Dihydroxybenzoylserine-a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 55: 5-8.
- 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., G. Nicholson, W. Rabsch und G. Winkelmann (2003).** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3677-82.
- Hasset, R. F., D. S. Yuan und D. J. Kosman (1998).** Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J Biol Chem* 273: 23274-82.
- Holmes, K., F. Mulholland, B. M. Pearson, C. Pin, J. McNicholl-Kennedy, J. M. Ketley und J. M. Wells (2005).** *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology* 151: 243-57.
- Huffman, D. L., J. Huyett, F. W. Outten, P. E. Doan, L. A. Finney, B. M. Hoffman und T. V. O'Halloran (2002).** Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli pco* copper resistance operon. *Biochemistry* 41: 10046-55.
- 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. (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.
- Jogler, C. und D. Schüler (2009).** Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Annu Rev Microbiol* 63: 501-21.
- Johnson, J. R. (1991).** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4: 80-128.
- Jordan, A. und P. Reichard (1998).** Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67: 71-98.
- Jordan, P. A., A. J. Thomson, E. T. Ralph, J. R. Guest und J. Green (1997).** FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve. *FEBS Lett* 416: 349-52.
- Kammler, M., C. Schon und K. Hantke (1993).** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 6212-9.
- Karlin, S. und Z. Y. Zhu (1997).** Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14231-6.
- Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Slauch und M. E. Maguire (2002).** SitABCD is the alkaline Mn²⁺ transporter of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 184: 3159-66.
- 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.

- Keller, R. F. und S. Hunke (2009).** Misfolded maltose binding protein MalE219 induces the CpxRA envelope stress response by stimulating phosphoryl transfer from CpxA to CpxR. *Res Microbiol* 160: 396-400.
- Kershaw, C. J., N. L. Brown, C. Constantinidou, M. D. Patel und J. L. Hobman (2005).** The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology* 151: 1187-98.
- Khan, A. G., S. R. Shouldice, S. D. Kirby, R. H. Yu, L. W. Tari und A. B. Schryvers (2007).** High-affinity binding by the periplasmic iron-binding protein from *Haemophilus influenzae* is required for acquiring iron from transferrin. *Biochem J* 404: 217-25.
- Kirsten, A., M. Herzberg, A. Voigt, J. Seravalli, G. Grass, J. Scherer und D. H. Nies (2011).** Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J Bacteriol*, doi:10.1128/JB.05293-11, in Druck.
- Kittleson, J. T., I. R. Loftin, A. C. Hausrath, K. P. Engelhardt, C. Rensing und M. M. McEvoy (2006).** Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both Cu(I) and Ag(I). *Biochemistry* 45: 11096-102.
- Koch, D., A. C. Chan, M. E. Murphy, H. Lilie, G. Grass und D. H. Nies (2011).** Characterization of a dipartite iron-uptake system from uropathogenic *Escherichia coli* strain F11. *J Biol Chem* 286: 25317-30.
- 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.
- Koch, K. A., M. M. Pena und D. J. Thiele (1997).** Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem Biol* 4: 549-60.
- Koropatkin, N., A. M. Randich, M. Bhattacharyya-Pakrasi, H. B. Pakrasi und T. J. Smith (2007).** The structure of the iron binding protein, FUTA1 from *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* 282: 27468-77.
- Kosman, D. J. (2003).** Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* 47: 1185-97.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Langlois d'Estaintot, B., P. Santambrogio, T. Granier, B. Gallois, J. M. Chevalier, G. Precigoux, S. Levi und P. Arosio (2004).** Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant Ser144Ala. *J Mol Biol* 340: 277-93.
- Lavrrar, J. L., C. A. Christoffersen und M. A. McIntosh (2002).** Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 322: 983-95.
- Lazazzera, B. A., H. Beinert, N. Khoroshilova, M. C. Kennedy und P. J. Kiley (1996).** DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* 271: 2762-8.

- Lesuisse, E., M. Casteras-Simon und P. Labbe (1995).** Ferrireductase activity in *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: colorimetric assays on agar plates. *Anal Biochem* 226: 375-7.
- Letoffe, S., G. Heuck, P. Delepelaire, N. Lange und C. Wandersman (2009).** Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 11719-24.
- Lin, W., J. Chai, J. Love und D. Fu (2010).** Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB. *J Biol Chem* 285: 39013-20.
- 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.
- Loftin, I. R., S. Franke, S. A. Roberts, A. Weichsel, A. Heroux, W. R. Montfort, C. Rensing und M. M. McEvoy (2005).** A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* 44: 10533-40.
- 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.
- Maret, W. und Y. Li (2009).** Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109: 4682-707.
- 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 USA* 99: 16243-8.
- 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.
- 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 USA* 99: 4620-5.
- Matzanke, B. F., S. Anemuller, V. Schunemann, A. X. Trautwein und K. Hantke (2004).** FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* 43: 1386-92.
- Maurer, L. M., E. Yohannes, S. S. Bondurant, M. Radmacher und J. L. Slonczewski (2005).** pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 187: 304-19.
- Mauri-Aucejo, A. R., T. Arnandis-Chover, R. Marin-Saez und M. Llobat-Estelles (2007).** Application of pressurized fluid extraction to determine cadmium and zinc in plants. *Anal Chim Acta* 581: 78-82.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper und S. C. Andrews (2003).** Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* 278: 29478-86.

- 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.
- Miethke, M. und M. A. Marahiel (2007).** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 413-51.
- Miller, J. H. (1992).** A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- Millero, F. J. (1998).** Solubility of Fe(III) in seawater. *Earth Planet Sci Lett* 154: 3232-329.
- 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.
- Morin, P. E. und E. Freire (1991).** Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 30: 8494-500.
- Mortz, E., T. H. Nguyen und J. Crawford (2009).** N- and C-terminal Protein Sequencing using in-source-decay (ISD) MALDI MS. *Alphalyse, Palo Alto, CA*.
- Mosteller, R. D. und R. V. Goldstein (1975).** Unusual sensitivity of *Escherichia coli* to adenine or adenine plus histidine. *J Bacteriol* 123: 750-1.
- Müller, K., B. F. Matzanke, V. Schunemann, A. X. Trautwein und K. Hantke (1998).** FhuF, an iron-regulated protein of *Escherichia coli* with a new type of [2Fe-2S] center. *Eur J Biochem* 258: 1001-8.
- Mystkowski, E. M. (1942).** The oxidation of ascorbic acid in the presence of copper. *Biochem J* 36: 494-500.
- Naidoo, V. und M. Sankar (2001).** A New Perspective of Enthalpies of Proton Transfer of Aliphatic Amines, Hydroxyamines, and Aminoalkylsulfonic Acids in Methanol–Water Mixtures by Direct Calorimetry. *Journal of Solution Chemistry* 30: 825-836.
- Neilands, J. B., T. Peterson und S. A. Leong (1980).** High affinity iron transport in microorganisms. *ACS. Symp. Ser* 140: 264-278.
- Neilands, J. B. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270: 26723-6.
- Newman, D. L. und J. A. Shapiro (1999).** Differential *fiu-lacZ* fusion regulation linked to *Escherichia coli* colony development. *Mol Microbiol* 33: 18-32.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak und G. von Heijne (1997).** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6.

- Nies, D. H. (2007).** Bacterial Transition Metal Homeostasis. in *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin 6: 117-142.
- O'Halloran, T. V. und V. C. Culotta (2000).** Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* 275: 25057-60.
- Ollinger, J., K. B. Song, H. Antelmann, M. Hecker und J. D. Helmann (2006).** Role of the Fur Regulon in Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 3664-73.
- Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale und T. V. O'Halloran (2001).** The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 30670-7.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray (1995).** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4: 2411-23.
- Pagani, M. A., A. Casamayor, R. Serrano, S. Atrian und J. Arino (2007).** Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Mol Microbiol* 65: 521-37.
- Palyada, K., D. Threadgill und A. Stintzi (2004).** Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 186: 4714-29.
- Payne, S. M. und A. R. Mey (2010).** Iron uptake in *Shigella* and *Escherichia coli*. in *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. Caister Academic Press, Norfolk 1: 87-100.
- Peariso, K., D. L. Huffman, J. E. Penner-Hahn und T. V. O'Halloran (2003).** The PcoC copper resistance protein coordinates Cu(I) via novel S-methionine interactions. *J Am Chem Soc* 125: 342-3.
- Peters, J. E. und N. L. Craig (2001).** Tn7: smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 806-14.
- Pfennig, N. (1974).** *Rhodospseudomonas globiformis* sp. n., a new species of Rhodospirillaceae. *Arch Microbiol* 100: 197-206.
- Pierre, J. L., M. Fontecave und R. R. Crichton (2002).** Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biomaterials* 15: 341-6.
- Pinner, E., S. Gruenheid, M. Raymond und P. Gros (1997).** Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family *SMF* by *NRAMP2*, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J Biol Chem* 272: 28933-8.
- Piovant, M. und C. Lazdunski (1975).** Different cyclic adenosine 3',5'-monophosphate requirements for induction of beta-galactosidase and tryptophanase. Effect of osmotic pressure on intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations. *Biochemistry* 14: 1821-5.
- Poole, R. K., N. J. Rogers, A. D'Mello R, M. N. Hughes und Y. Oorii (1997).** *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) reduces cytochrome c and Fe(III)-hydroxamate K by electron transfer from NADH via FAD: sensitivity of oxidoreductase activity to haem-bound dioxygen. *Microbiology* 143: 1557-65.

- Pugsley, A. P. und P. Reeves (1976).** Iron uptake in colicin B-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 126: 1052-62.
- Rae, T. D., P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta und T. V. O'Halloran (1999).** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-8.
- Raivio, T. L. und T. J. Silhavy (2001).** Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 55: 591-624.
- Rajasekaran, M. B., S. Nilapwar, S. C. Andrews und K. A. Watson (2009).** EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *Biometals* 23: 1-17.
- Ramanan, N. und Y. Wang (2000).** A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288: 1062-4.
- Rauh, D. (2008).** Das Wolframat-Bindeprotein TupA aus *Eubacterium acidaminophilum*. *Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra und B. P. Rosen (2000).** CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 652-6.
- Rensing, C. und G. Grass (2003).** *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27: 197-213.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing und W. R. Montfort (2002).** Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2766-71.
- Rosenberg, H., R. G. Gerdes und K. Chegwidan (1977).** Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131: 505-11.
- Saier, M. H., Jr., C. V. Tran und R. D. Barabote (2006).** TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res* 34: 181-6.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989).** Molecular Cloning: a laboratory manual. *Sec Edition. Cold Spring Harbor, New York.*
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977).** DNA-Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5463-67.
- Schiavo, G., O. Rossetto, A. Santucci, B. R. DasGupta und C. Montecucco (1992).** Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J Biol Chem* 267: 23479-83.
- Schmidt, T. G. und A. Skerra (1994).** One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 676: 337-45.

- Schröder, I., E. Johnson und S. de Vries (2003).** Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* 27: 427-47.
- Schüler, D. (1999).** Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 79-86.
- Schuster, T. M. und J. M. Toedt (1996).** New revolutions in the evolution of analytical ultracentrifugation. *Curr Opin Struct Biol* 6: 650-8.
- Sedlak, E., L. Ziegler, D. J. Kosman und P. Wittung-Stafshede (2008).** *In vitro* unfolding of yeast multicopper oxidase Fet3p variants reveals unique role of each metal site. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 19258-63.
- Selinger, D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church und C. Rosenow (2003).** Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* 13: 216-23.
- Sendovski, M., M. Kanteev, V. S. Ben-Yosef, N. Adir und A. Fishman (2010).** First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J Mol Biol* 405: 227-37.
- Severance, S., S. Chakraborty und D. J. Kosman (2004).** The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. *Biochem J* 380: 487-96.
- Shatwell, K. P., A. Dancis, A. R. Cross, R. D. Klausner und A. W. Segal (1996).** The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271: 14240-4.
- Shea, C. M. und M. A. McIntosh (1991).** Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5: 1415-28.
- 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.
- Sigurskjold, B. W. (2000).** Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* 277: 260-6.
- Silver, S. und T. Phung Le (2005).** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 587-605.
- Singh, S. K., G. Grass, C. Rensing und W. R. Montfort (2004).** Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 7815-27.
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram und T. E. Machonkin (1996).** Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev* 96: 2563-606.
- Spuches, A. M. und D. E. Wilcox (2008).** Monomethylarsenite competes with Zn²⁺ for binding sites in the glucocorticoid receptor. *J Am Chem Soc* 130: 8148-9.

- Stancik, L. M., D. M. Stancik, B. Schmidt, D. M. Barnhart, Y. N. Yoncheva und J. L. Slonczewski (2002).** pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 4246-58.
- Stapleton, A., S. Moseley und W. E. Stamm (1991).** Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. *J Infect Dis* 163: 773-9.
- Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner und A. Dancis (1996).** A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271: 1552-7.
- Stellwagen, A. E. und N. L. Craig (2001).** Analysis of gain-of-function mutants of an ATP-dependent regulator of Tn7 transposition. *J Mol Biol* 305: 633-42.
- Stephens, D. L., M. D. Choe und C. F. Earhart (1995).** *Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin. *Microbiology* 141: 1647-54.
- Stojiljkovic, I., A. J. Baumler und K. Hantke (1994).** Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J Mol Biol* 236: 531-45.
- Stoyanov, J. V., J. L. Hobman und N. L. Brown (2001).** CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39: 502-11.
- Sturm, A., A. Schierhorn, U. Lindenstrauss, H. Lilie und T. Bruser (2006).** YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J Biol Chem* 281: 13972-8.
- Suzuki, T., Y. Okamura, R. J. Calugay, H. Takeyama und T. Matsunaga (2006).** Global gene expression analysis of iron-inducible genes in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J Bacteriol* 188: 2275-9.
- Swancutt, M. A., B. S. Riley, J. D. Radolf und M. V. Norgard (1989).** Molecular characterization of the pathogen-specific, 34-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 57: 3314-23.
- Taudte, N. und G. Grass (2010).** Point mutations change specificity and kinetics of metal uptake by ZupT from *Escherichia coli*. *Biometals* 23: 643-56.
- Taudte, N. (2010).** Eisen und Mangan: Wechselwirkungen und Homöostase in *Escherichia coli* mit dem Schwerpunkt ZupT. *Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Taylor, A. B., C. S. Stoj, L. Ziegler, D. J. Kosman und P. J. Hart (2005).** The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15459-64.

- Thieme, D., P. Neubauer, D. H. Nies und G. Grass (2008).** Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions. *Appl Environ Microbiol* 74: 7463-70.
- Torres, A. G. und S. M. Payne (1997).** Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 23: 825-33.
- Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch und S. M. Payne (2001).** TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun* 69: 6179-85.
- Tottey, S., D. R. Harvie und N. J. Robinson (2005).** Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc Chem Res* 38: 775-83.
- Tottey, S., K. J. Waldron, S. J. Firbank, B. Reale, C. Bessant, K. Sato, T. R. Cheek, J. Gray, M. J. Banfield, C. Dennison und N. J. Robinson (2008).** Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* 455: 1138-42.
- 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 (1994).** Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33: 1766-70.
- Vert, G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J. F. Briat und C. Curie (2002).** IRT1, an Arabidopsis transporter essentiell for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14: 1223-33.
- Volentini, S. I., R. N. Farias, L. Rodriguez-Montelongo und V. A. Rapisarda (2011).** Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *Biometals*, doi:10.1007/s10534-011-9436-3, in Druck.
- Waldron, K. J., S. J. Firbank, S. J. Dainty, M. Perez-Rama, S. Tottey und N. J. Robinson (2010).** Structure and metal loading of a soluble periplasm cuproprotein. *J Biol Chem* 285: 32504-11.
- 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: 2811-18.
- Weber, K. und M. Osborn (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-12.
- Wernimont, A. K., L. A. Yatsunyk und A. C. Rosenzweig (2004).** Binding of copper(I) by the Wilson disease protein and its copper chaperone. *J Biol Chem* 279: 12269-76.

- Wernimont, A. K., D. L. Huffman, L. A. Finney, B. Demeler, T. V. O'Halloran und A. C. Rosenzweig (2003).** Crystal structure and dimerization equilibria of PcoC, a methionine-rich copper resistance protein from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* 8: 185-94.
- Wessel, D. und U. I. Flugge (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-3.
- Wittig, I. und H. Schagger (2005).** Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5: 4338-46.
- Wu, Y., Q. Li und X. Z. Chen (2007).** Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc* 2: 3278-84.
- Xiao, Z. und A. G. Wedd (2010).** The challenges of determining metal-protein affinities. *Nat Prod Rep* 27: 768-89.
- Yamamoto, K. und A. Ishihama (2005).** Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* 56: 215-27.
- Yatsunyk, L. A. und A. C. Rosenzweig (2007).** Cu(I) binding and transfer by the N terminus of the Wilson disease protein. *J Biol Chem* 282: 8622-31.
- Zhang, L., M. Koay, M. J. Maher, Z. Xiao und A. G. Wedd (2006).** Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms. *J Am Chem Soc* 128: 5834-50.
- Zhang, Y., S. Akilesh und D. E. Wilcox (2000).** Isothermal titration calorimetry measurements of Ni(II) and Cu(II) binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and bovine serum albumin: a critical evaluation. *Inorg Chem* 39: 3057-64.
- Zhang, Y. und D. E. Wilcox (2002).** Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. *J Biol Inorg Chem* 7: 327-37.
- Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider und G. Storz (1999).** OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* 181: 4639-43.
- Zhou, D., W. D. Hardt und J. E. Galan (1999).** *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* 67: 1974-81.

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. D. H. Nies für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, vor allem aber die vielfältige Unterstützung, die stetige Diskussionsbereitschaft und das große Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Prof. Dr. G. Grass für die Überlassung dieses interessanten Themas. Insbesondere möchte ich mich bei Dir bedanken, dass Du stets Interesse an meiner Arbeit zeigtest und mir mit hilfreichen Vorschlägen und zahlreichen Anregungen trotz weiter Entfernung zur Seite standest.

Dr. A. C. K. Chan und Prof. Dr. M. E. P. Murphy der *British Columbia University* in Vancouver, Kanada für die unkomplizierte und aufschlussreiche Kooperation.

Frau Karola Otto für die engagierte und zuverlässige Arbeit, die mir eine große Stütze war aber auch die aufmunternden Worte, insbesondere bei Rückschlägen!

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der AG von Prof. Dr. D. H. Nies (so z. B. Nadine, Judith, Grit, Andreas, Martin, Nicole, Daniel und viele mehr) für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Zahlreiche Diskussionen und Tipps steuerten zum Gelingen dieser Arbeit bei! Darüber hinaus möchte ich mich auch bei meinem Bachelorstudenten Enrico bedanken, dessen Ergebnisse einen wichtigen Beitrag für die Interaktionsstudien lieferten.

Allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung im Laboralltag. Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. G. R. Sawers für die uneingeschränkte Nutzung der ITC.

Dr. W. Rabsch für die Möglichkeit, am Robert Koch-Institut in Wernigerode einzelne Experimente durchführen zu können.

Dr. C. Lange und Dr. D. Rauh für die Hilfe bei den ITC-Experimenten, PD Dr. H. Lilie für die Zusammenarbeit bei der CD-Spektroskopie und Dr. A. Schierhorn für die massenspektroskopischen Analysen.

Nicht zuletzt meinen Eltern und Jens, die mich in allen Situationen unterstützt und mir gerade in der letzten Phase viel Kraft und Motivation gegeben haben. Ich bin froh, Euch zu haben!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Doreen Koch
Geburtsdatum	17.09.1980
Geburtsort	Halle/Saale
Familienstand	ledig

Bisherige Tätigkeiten

01/2006-09/2011	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
01/2008-08/2011	Forschung zur vorliegenden Arbeit mit Anfertigung der Promotionsschrift
01/2006-12/2007	FieF-Forschungsprojekt mit Auslandsaufenthalt im Labor von Dr. Dax Fu
09/2007-11/2007	Forschungsaufenthalt: Brookhaven National Laboratory; Upton, NY (USA)
07/2003-10/2003	Praktikum bei der Scil Proteins GmbH Halle/Saale

Ausbildung

10/2000-11/2005	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Schwerpunkte in Mikrobiologie, Genetik, Immunologie und Biochemie; Diplomarbeit zum Thema „Charakterisierung des ersten Cobalt-/Nickel-Resistenz-Systems in <i>Escherichia coli</i> “ Abschluss: Diplom-Biologin (Note: „Sehr gut“)
10/1999-09/2000	Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/1999	Abitur am Geiseltalgymnasium in Mücheln (Note: 1.1)
09/1987-07/1999	Grundschule Adolf Holst-OS und Geiseltalgymnasium in Mücheln

Halle/Saale, August 2011

.....
Doreen Koch

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, August 2011

.....
Doreen Koch