

Die Zur- und ZntR-vermittelte Regulation der
Zinktransportsysteme
in *Cupriavidus metallidurans*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Biowissenschaften

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christopher Schmidt
geboren am 13.12.1986 in Bad Muskau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dietrich H. Nies
2. Prof. Dr. Klaus Hantke
3. Prof. Dr. R. Gary Sawers

Tag der Verteidigung: 24.11.2016

Für meine Familie, Julia und Klein Theo

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
I. Abbildungsverzeichnis.....	V
II. Tabellenverzeichnis.....	VII
III. Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Schwermetalle als Biometalle, deren Nutzen und Risiko.....	1
1.2. Aufbau und Regulation der Zinkhomeostasis in <i>Cupriavidus metallidurans</i>	3
2. Materialien und Methoden.....	12
2.1. Bakterienstämme und Plasmide.....	12
2.2. Kultivierungsbedingungen.....	15
2.2.1. Nährmedien.....	15
2.2.1.1. Vollmedien für <i>E. coli</i>	15
2.2.1.2. Minimalmedium.....	16
2.2.2. Medienzusätze.....	17
2.2.3. CAS-Platten.....	18
2.2.4. Anzuchtbedingungen für die verwendeten Stämme.....	18
2.2.5. Stammhaltung.....	19
2.2.6. Reinheitskontrolle.....	19
2.3. Mikrobiologische Methoden.....	19
2.3.1. Wachstumskurve.....	19
2.3.2. Wachstumsendpunktbestimmungen.....	20
2.3.3. CAS-Assay.....	21
2.3.4. Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Zn ⁶⁵	21
2.4. Molekulargenetische Methoden.....	22
2.4.1. DNA-Isolation.....	22
2.4.1.1. Isolation von genomischer DNA aus <i>C. metallidurans</i>	22
2.4.1.2. Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.4.2. DNA-Techniken.....	23
2.4.2.1. Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen.....	23
2.4.2.2. DNA-Reinigung und Konzentrierung.....	23

I. Inhaltsverzeichnis

2.4.2.3. DNA-Reinigung aus Agarosegelen	23
2.4.2.4. Bestimmung der DNA-Konzentration	24
2.4.2.5. Agarose-Gelelektrophorese	24
2.4.2.6. DNA- Größenstandards	24
2.4.2.7. Dephosphorylierung von DNA	25
2.4.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten	25
2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.4.4. <i>Quick-Change site-directed</i> Mutagenese (modifiziert)	27
2.4.5. Sequenzierung über kommerziellen Anbieter	28
2.4.6. Erstellung von Deletionsmutanten über das <i>cre-lox</i> -System nach (Marx & Lidstrom 2002)	29
2.4.7. Bestätigung der <i>Cupriavidus</i> -Mutanten via DNA-DNA-Hybridisierung (Southern 1975)	30
2.4.7.1. Herstellung der DIG-markierten Sonde	30
2.4.7.2. DNA-DNA-Hybridisierung	30
2.4.7.3. Detektion der DIG-markierten Sonde	31
2.4.8. DNA-Transfer und Selektion von Klonen	32
2.4.8.1. Erzeugung CaCl ₂ -kompetenter Zellen	32
2.4.8.2. Transformation von chemisch-kompetenten Zellen nach Sambrook <i>et al.</i> 1989	32
2.4.9. Konjugation als Transfer zwischen <i>E. coli</i> und <i>C. metallidurans</i>	32
2.5. Proteinbiochemische Methoden	33
2.5.1. Protein-Expression und -Reinigung	33
2.5.1.1. Zellanzucht, Induktion und Zellernte	33
2.5.1.2. Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung für Proteinreinigung	33
2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.5.2.1. Kalkulation anhand OD ₆₀₀ / KE	34
2.5.2.2. Bestimmung mittels BCA-Test	34
2.5.2.3 Bestimmung nach Bradford (1976)	34
2.5.2.4. Bestimmung am NanoDrop® ND-1000	35
2.5.3. Konzentrierung von Proteinen	35
2.5.4. Pufferwechsel	36
2.5.5. Lineare denaturierende SDS - PAGE (Laemmli 1970)	36
2.5.6. Native PAGE	37

I. Inhaltsverzeichnis

2.5.7. Färbemethoden für Polyacrylamidgele	38
2.5.7.1. Gesamt - Proteinfärbung mit Coomassie- <i>blue</i> (Weber & Osborn 1969).....	38
2.5.7.2. Silberfärbung	38
2.5.7.3. DNA- Visualisierung mittels Ethidiumbromidalternativen	39
2.5.8. Elektrophoretischer Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran	39
2.5.9. Streptag [®] II Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)	40
2.5.10. Erstellung eines UV-VIS-Spektrums	40
2.5.11. <i>Elektrophoretic Mobility Shift-Assay</i> (Shin <i>et al.</i> 2007)	41
2.5.12. Proteom-Analyse in 2D-PAGE	41
2.5.12.1. Zellanzucht, Ernte und Aufschluss.....	41
2.5.12.2. Isoelektrische Fokussierung und 2. Dimension.....	42
2.6. Enzymologische Methoden	43
2.6.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	43
2.6.2. Anzucht der <i>C. metallidurans</i> -Stämme	43
2.6.3. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	44
3. Ergebnisse	46
3.1. Einfluss der Deletion der einzelnen Fur-Orthologen auf die Physiologie des <i>Cupriavidus</i> -Stammes AE104	46
3.1.1. Erstellung und Verwendung von markerlosen Deletionsmutanten	46
3.1.2. Geringe physiologische Einflussnahme resultierte aus der <i>fur/ zur</i> - Deletion.....	47
3.1.3. Einfluss der drei <i>fur</i> -Ortholgen auf die Eisenaufnahme über das Siederophor Staphyloferrin B	51
3.1.4. Einfluss der Fur-Orthologen auf das Expressionsmuster bekannter Transportsysteme.....	53
3.2. Rekombinante Expression & Reinigung von FurA, FurB sowie Zur _{CH34}	58
3.3. Interaktion von Zur mit Promotorsequenzen seines Regulons.....	64
3.3.1. Zur bindet an die Promotorregion von <i>zupT</i>	64
3.3.2. Das Zur-Bindemotiv in <i>C. metallidurans</i>	68
3.3.3. Identifikation weiterer Zur-Bindemotive	69
3.4. Vergleich des löslichen Proteoms von AE104 und Δzur	74
3.5. Rmet3456 ist der MerR-Regulator für ZntA-physiologische Betrachtung	77
3.6. Bindung von Rmet 3456 an die Promotorregion von <i>zntA</i>	81
4. Diskussion	83
4.1. Stabilität der Zinkhomeostasis erfolgt durch zytoplasmatische Regulatoren	83

I. Inhaltsverzeichnis

4.2. Zur ist der zinkspezifische Aufnahmeregulator aus der Fur-Familie.....	84
4.3. Einflussnahme der <i>zur</i> -Deletion auf die Zinkhomeostasis in <i>C. metallidurans</i>	92
4.4. Die Charakterisierung des Zur-Regulons	99
4. 5. Die Regulation des Zinkefflux über ZntR _{CH34} (Rmet3456)	105
4.6. Das bestätigte Model der Regulation der Zinkhomeostasis in <i>C. metallidurans</i>	109
5. Zusammenfassung	112
6. Ausblick	113
7. Anhang	115
8. Literaturverzeichnis.....	133
9. Danksagung	146
10. Eidesstattliche Erklärung.....	147
11. Lebenslauf	148

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick der bekannten Transportsysteme in gramnegativen Bakterien.....	5
Abb. 2: Überlagerung der Tertiärstrukturvorhersagen der drei codierten Fur-Orthologen in <i>C. metallidurans</i>	10
Abb. 3: Umrechnungseichgerade zwischen OD ₆₀₀ und Klett-Einheiten.....	44
Abb. 4: Erstellung einer Gen-Deletion basierend auf dem <i>cre-lox</i> -System.....	46
Abb. 5: Wachstumskurven in Tris-MM von AE104 und $\Delta furA$, $\Delta furB$, Δzur	48
Abb. 6: Schwermetallresistenz des Stammes AE104 sowie der Mutanten $\Delta furA$, $\Delta furB$, Δzur und $\Delta furB \Delta zur$	49
Abb. 7: Effekt von Δzur auf die Aufnahmedynamik von Zink	51
Abb. 8: Fe(III)-Mobilisierungs-Assay.....	52
Abb. 9: Produktion von <i>Strep</i> -tag-Zur und Zur- <i>Strep</i> -tag in BL21 (DE3).	59
Abb. 10: Massenspektrometrische Analyse von <i>Strep</i> -tag Zur.....	61
Abb. 11: Abspaltung des <i>Strep</i> -tag von Zur mittels Faktor Xa.....	62
Abb. 12: UV/ VIS-Spektrum von <i>Strep</i> tag-FurA, -FurB und -Zur.....	63
Abb. 13: Interaktion von <i>Strep</i> -tag Zur mit der Promotorregion von <i>zupT</i>	65
Abb. 14: Abhängigkeit der Interaktion von <i>Strep</i> -tag Zur zu <i>zupTp</i> unter Zinkmangel sowie -überschuss.	67
Abb. 15: Interaktionsstudien zwischen Zur und <i>zupTp</i> -Varianten.....	68
Abb. 16: Weitere Zur-Bindemotive in den Promotorsequenzen von <i>zur</i> , <i>cobW₁</i> und <i>cobW₃</i> ..	69
Abb. 17: Identifikation der Zur-Bindemotive in <i>cobW_{1p}</i>	70
Abb. 18: Bindestudie von <i>Strep</i> -tag Zur zu <i>cobW_{1p}</i>	71
Abb. 19: Operonstruktur von <i>rmet3234</i> sowie Expressionsmuster der Reporterfusion $\phi(rmet3234:lacZ)$ in AE104 und dessen Mutanten	75
Abb. 20: Vergleich des Proteoms der zytoplasmatischen Fraktion von AE104 und Δzur	75
Abb. 21: Wachstumskurve der Stämme AE104 und der Mutanten $\Delta rmet2302$ sowie $\Delta rmet3456$ in Tris-MM	77
Abb. 22: Schwermetallresistenz des Stammes AE104 sowie der Mutanten $\Delta rmet2302$, $\Delta rmet3456$	78
Abb. 23: Aufnahmeexperiment mit radioaktivem Zn ⁶⁵ -Isotop der Stämme AE104, $\Delta zurT$ sowie $\Delta rmet3456$	79

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 24: EMSA zwischen <i>Strep</i> -tag Rmet3456 und den Promotorregionen von <i>cadA</i> und <i>zntA</i> .	82
Abb. 25: Ein Phylogenetischer Stammbaum bekannter <i>zinc</i> bzw. <i>ferric uptake</i> -Regulatoren grampositiver und -negativer Bakterien.	86
Abb. 26: Alignment der drei Fur-Orthologen aus <i>C. metallidurans</i> .	88
Abb. 27: Überlagerung der vorhergesagten Tertiärstruktur von Zur _{CH34} (grün) und der Kristallstruktur des Zur _{<i>E.coli</i>} -Dimers.	90
Abb. 28: Übersicht der Gene Array-Daten zwischen Δ <i>zur</i> und AE104.	95
Abb. 29: Darstellung der Operonstrukturen des Zur-Regulons in <i>C. metallidurans</i> .	100
Abb. 30: Konsensussequenz des Bindemotivs von Zur in <i>C. metallidurans</i> und für β -Proteobakterien nach Haas <i>et al.</i> 2009.	104
Abb. 31: Überlagerung der Tertiärstruktur des potentiellen ZntR aus <i>C. metallidurans</i> , Rmet3456 und der Kristallstruktur des ZntR _{<i>E.coli</i>} -Dimers	107
Abb. 32: Einfluss von Zur und ZntR auf die Zinkhomeostasis von <i>C. metallidurans</i> .	110
Abb. 33: Expressionsanalyse von <i>zntA</i> und <i>zupT</i> in Abhängigkeit zu freiem Zn ²⁺ .	119
Abb. 34: Produktion von <i>Strep</i> -tag Zur in Minimalmedium.	119
Abb. 35: Inkubations- und Dephosphorylierungsexperiment mit gereinigtem <i>Strep</i> -tag Zur.	120
Abb. 36: Produktion von <i>Strep</i> -tag Zur mit C119S bzw. C122S- Aminosäureaustausch.	121
Abb. 37: Massenspektren von FurA, FurB, Zur und der Variante Zur C119S..	122
Abb. 38: Vergleich des Proteinmusters von AE104 pECD794: <i>zupT</i> : <i>lacZ</i> mit pBBR1MCS3:: <i>zur</i> , <i>strep</i> -tag- <i>zur</i> oder <i>zur</i> - <i>strep</i> -tag..	123
Abb. 39: Interaktionsstudie zwischen <i>Strep</i> -tag Zur und <i>zupTp</i> sowie <i>fieFp</i> .	124
Abb. 40: Interaktionsstudie von Zur- und <i>Strep</i> -tag Zur-Dimeren gegen die Promotorregion von <i>zupT</i> .	124
Abb. 41: Interaktionsstudie von <i>Strep</i> -tag Zur-Dimeren gegen die Promotorregion von <i>cobW</i> ₃ und <i>zur</i> .	125
Abb. 42: Vergleich des Proteoms der zytoplasmatischen Fraktion von AE104 und Δ <i>zur</i> .	126
Abb. 43: Reinigung von <i>Strep</i> -tag Rmet3456.	127
Abb. 44: Alignment der Proteinsequenzen des <i>zinc</i> bzw. <i>ferric uptake regulator</i> der gramnegativen Bakterien	131
Abb. 45: Protein - Alignment MerR-Regulatoren.	132

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten <i>C. metallidurans</i> - Stämme.....	12
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten <i>E. coli</i> – Stämme.....	12
Tabelle 3: Auflistung der erstellten u./ o. verwendeten Plasmide und Vektorsysteme.....	13
Tabelle 4: Antibiotika und deren Stamm- bzw. Endkonzentrationen im Medium	17
Tabelle 5: Zusammensetzung der denaturierenden PAGE als Mini- bzw. Maxigel.....	37
Tabelle 6: Zusammensetzung der nicht-denaturierenden PAGE (nativ)	38
Tabelle 7: Programmlauf für isoelektrische Fokussierung.....	42
Tabelle 8: Resistenzbestimmung der Stämme AE104, $\Delta furA$, $\Delta furB$, Δzur und $\Delta furB\Delta zur$...	50
Tabelle 9: Expressionsanalyse möglicher zinkabhängiger Importsysteme in $\Delta fur/zur$	55
Tabelle 10: Expressionsanalyse bekannter zinkabhängiger Exportsysteme in $\Delta fur/zur$	57
Tabelle 11: Expressionsanalyse (<i>lacZ</i>) von <i>rmet0129</i> und <i>rmet1102</i> in AE104 und Δzur	72
Tabelle 12: Bestimmung der Promotoraktivität von <i>zur</i>	72
Tabelle 13: Promotorsequenzen mit Zur-Box-Ähnlichkeit.....	74
Tabelle 14: Resistenzbestimmung (IC ₅₀) der Stämme AE104, $\Delta rmet3456$	79
Tabelle 15: Aktivität der Reporterfusionen von <i>zntA</i> und <i>cadA</i> in $\Delta rmet3456$	80
Tabelle 16: Darstellung der Promotorregionen von MerR-regulierten Genen.....	108
Tabelle 17: Verwendete Primer und deren Sequenz	115
Tabelle 18: Involvierung der Gene mit möglicher Zur-Box am Zur-Regulon.....	125
Tabelle 19: Vergleich der möglichen Metallbindung über Cysteine und Histidine.....	127
Tabelle 20: Gene-Array-Daten ausgewählter Primär- und Sekundärtransporter in AE104 und der Deletionsmutante Δzur (Gene Array 2014: Grosse & Nies, unveröffentlicht).....	128
Tabelle 21: <i>Gene Array</i> - Daten betroffener Gene für Porine und OMF – Proteine.....	129
Tabelle 22: Einfluss der Deletion von <i>rmet2302</i> auf die Expression von <i>zntA</i> und <i>cadA</i>	129

III. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^R	Ampicillin ^{Resistenz}
APS	Ammoniumpersulfat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BLAST	<i>Basis Logic Alignment Tool</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAS	Chromazurol S
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cpm	<i>counts per minute</i>
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro-{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3,7] decan}-4-yl) phenyl phosphate
CTAB	Cetyltriethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECF	<i>extracellular function family</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
fwd	<i>forward</i>
G	Guanosin
H ₂ O bidest.	Reinstwasser
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylat
HDTMA	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin ^{Resistenz}
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheit
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität

III. Abkürzungsverzeichnis

MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min	Minute
MM	Minimalmedium
MW	Molekulargewicht
NA	Nähragar
NCBI	National center of Biology
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Proteaseinhibitor)
rev	<i>reverse</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
T	Thymin
TAE	TAE Tris-Acetat/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet ^R	Tetracyclin ^{Resistenz}
TG	Trockengewicht
TMH	Transmembranhelix
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
VIS	<i>visibel</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Ein-Buchstabencode der Aminosäuren

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

1. Einleitung

1.1. Schwermetalle als Biometalle, deren Nutzen und Risiko

Bakterien haben alle Lebensräume auf der Erde für sich gewonnen, vom Boden bis zu Süß- bzw. Salzwassergewässern, von den *black smokers* (Jeanthon & Prieur 1990) in der Tiefsee bis hin zu dem Leben in höheren Organismen als Kommensalen oder Pathogene. Stets war und ist es ein Kampf um Nährstoffe für die Energiegewinnung und für den Aufbau der eigenen Biomasse. Dabei ist es nicht nur das Ringen um die Makroelemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel, die am Aufbau zellulärer Biomoleküle, wie z. B. an Proteinen, Nukleinsäuren und Zucker, beteiligt sind. Auch die Alkali- und Erdalkalimetalle Natrium und Kalium sowie Magnesium und Calcium zählen zu den eher häufiger vorkommenden Makroelementen. So sichert Ca^{2+} die Fluidität der Zellmembran (LPS) (Nikaido 2003). Magnesium fungiert als Kofaktor der Polymerasen (Yang *et al.* 2004). Die Schwermetalle mit einer Dichte größer 5 g/cm^3 (Fe, Zn, Ni, Co, Mn, Mo, Cu) zählen zu den Spurenelementen, die in geringerer Konzentration in der Zelle vorkommen. Sie werden laut Nies (1999) in wichtige Spurenelemente mit geringer Toxizität (Fe, Mn, Mo) und in Toxine (Zn, Ni, Cu, V, Co, W, Cr) mit moderater bis hoher Bedeutung für den Organismus unterteilt. Die Schwermetalle Au, Pb, Hg, Cr und Cd werden nicht als Biometalle gehandelt, auf Grund des fehlenden biologischen Nutzens für die Zelle und deren toxischer Wirkung auf biologische Prozesse. Ursache hierfür ist die Ausbildung starker Komplexverbindungen durch die hohe Affinität gegenüber Thiolgruppen (Nies 1999).

Als Kofaktoren von Proteinen mit katalytischer oder sensorischer Funktion sind Metalle essentiell für die Zelle. Eisen als häufigster Proteinkofaktor ist z. B. in der Fe-Superoxiddismutase (SOD) und im Elektronentransport in der Photosynthese und der Atmung vorzufinden. In einigen *Lactobacillus*-Arten wurde Eisen durch Mangan und Cobalt ausgetauscht und können so ohne Eisen überleben (Weinberg 1997). Eine ähnlich wichtige Rolle kommt dem zweithäufigsten Schwermetall Zink als Kofaktor zu.

Zink weist durch das vollständig aufgefüllte $3d^{10}$ -Orbital und dem nachfolgenden $4s^2$ -Orbital nur eine Oxidationsstufe auf und ist nicht redoxaktiv im Vergleich zu anderen Biometallen. Dafür wirkt es als Lewis-Säure (Williams 1987) und zeigt eine gute biologische Verfügbarkeit in wässriger Lösung bei pH 7. Dies ist ein Vorteil gegenüber Eisen, welches in

1. Einleitung

der aeroben Atmosphäre als schwerlösliches Eisen (III) vorliegt und daher eine geringe Verfügbarkeit aufweist. Durch seine gute Bindung von Thiolen schützt Zink diese vor Oxidation und ist daher ein bevorzugter Kofaktor an redox-stabilen Positionen. Die tetrahedrale Koordination erfolgt über das N-Atom von Histidin, das S-Atom von Cystein oder über den Sauerstoff der Carboxylgruppe von Glutamat bzw. Aspartat sowie über mindestens 3 Liganden auf Proteinseite. So werden katalytische, kokatalytische und strukturelle Funktionen (McCall *et al.* 2000) realisiert. Das Zink in der Carbon-Anhydrase, dem Enzym zur Umwandlung von CO_2 und HCO_3^- und *vice versa*, wird über drei Histidine koordiniert und aktiviert so ein Wassermolekül, mit dessen Hilfe ein nukleophiler Angriff gestartet werden kann. Ähnliche Prinzipien sind von zinkhaltigen Metalloproteasen und der Glutamylyklase (Zn^{2+} : DEH) bekannt. Letztere stellt eines der Hauptziele der Alzheimer-Forschung dar (Huang *et al.* 2005; Ruiz-Carrillo *et al.* 2011).

Einer tetrameren Koordination wird eine mehr strukturelle als katalytische Funktion beigemessen. Eine weitreichende Bedeutung für die Zelle hat Zink in Proteinen, die an Nukleinsäuren binden und an der Replikation, Transkription bzw. der Reparatur beteiligt sind (DNA/ RNA-Polymerasen, Ribosomen, Ligasen, Phosphatasen) oder diese regulieren (Coleman 1998). So stabilisiert Zink durch seine Koordination über zwei Cysteine (β -Sheet) und zwei Histidine (α -Helix) die $\beta\beta\alpha$ -Struktur der Zinkfinger-Domäne und somit die Funktionalität von regulatorischen Proteinen der Transkription oder bei Protein-Protein-Interaktionen (Laity *et al.* 2001; Wolfe *et al.* 2000). In eukaryontischen Zellen bilden Transkriptionsfaktoren und Zinkfinger-Proteine 40 % aller Zinkproteine, die wiederum 10 % des gesamten menschlichen Proteoms ausmachen (Andreini *et al.* 2006).

Neben dem Biometallmangel muss auch der Ausgleich von hohen Konzentrationen erfolgen. Zink und Kupfer verdrängen laut der Irving-Williams-Serie [$\text{Zn} < \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Fe} > \text{Mn} \geq \text{Mg} = \text{Ca}$] andere Metalle, wie Eisen, aus den Koordinationszentren wichtiger Enzyme bzw. Metalloproteine (Williams 1987).

Zum einen werden durch die Bindung des nicht-nativen Kofaktors Enzyme inaktiv bzw. weisen eine verringerte Aktivität auf. Zum anderen kommen redoxaktive Metalle frei. Fe^{2+} und Cu^{2+} katalysieren in der Fentonreaktion die Bildung der *reactive oxygen species* (ROS). Diese metallunabhängige Reaktion ist unter dem Namen Haber-Weiss-Reaktion bekannt. Die dabei gebildeten Superoxid- und Hydroxylradikale sowie das H_2O_2 schädigen die Zelle z. B. durch Reaktion mit der DNA und weiteren Zellbestandteilen (Kehrer 2000; Lloyd & Phillips

1. Einleitung

1999) und führen durch Bildung von Nitroso-Radikalen zu weiteren reaktiven Molekülen. Metallhaltige Superoxiddismutasen [Cu/Zn (Benov & Fridovich 1994; Benov *et al.* 1996; Tainer *et al.* 1983), Mn-, Fe- sowie Ni-SOD (Kim *et al.* 1996)] sowie die Enzyme Katalase und Peroxidase sorgen für den Abbau der ROS-Spezien. Anhand der unterschiedlichen Kofaktoren ist die evolutionäre Vielfalt in dieser Enzymgruppe abseits von Eisen zu sehen. Zusammenfassend sind daher die Versorgung des Bakteriums mit den benötigten Biometallen in den entsprechenden Konzentrationen essentielle Prozesse in der Zelle. Durch Im- und Exportsysteme wird ein Gleichgewicht der Zinkkonzentration sichergestellt und dieses als **Zinkhomeostasis** bezeichnet.

1.2. Aufbau und Regulation der Zinkhomeostasis in *Cupriavidus metallidurans*

C. metallidurans CH34 [ehemals *Ralstonia eutropha*, *Wautersia metallidurans* bzw. *Alcaliges eutrophus*, (Vandamme & Coenye 2004)], ein stäbchenförmiges β -Proteobacterium der Familie Burkholderiaceae stellt in dieser Arbeit den schwermetallresistenten Modellorganismus dar. Es zeichnet sich durch eine mesophile (30 °C) und fakultative chemolithoautotrophe Lebensweise aus. Unter anderem wird seine Resistenz im mM-liegenden Bereich gegenüber Schwermetallen unter anderem durch die Resistenzdeterminanten auf den Megaplasmiden pMOL28 (163 kb) und pMOL30 (234 kb) vermittelt (Mergeay *et al.* 1985; Nies & Silver 1989). Einen starken Einfluss haben dabei die **Resistance Nodulation cell Division** (RND) – Proteine, von denen 12 **Heavy Metal Efflux** - RND-Proteine in CH34 codiert werden (Tseng *et al.* 1999; von Rozycki & Nies 2009). Der Multiproteinkomplex (Saier *et al.* 1994) CzcCBA gilt als Ursache für die hohe Zinkresistenz über 200 μ M (Legatzki *et al.* 2003) und der Detoxifizierung des Periplasmas. Dieses Protonen betriebene Effluxsystem besteht aus der RND - Permease (CzcA), welche über eine Periplasma durchspannende Einheit (*trans membrane factor*, CzcB) mit dem *outer membrane factor* (OMF) CzcC in der äußeren Membran verbunden ist. Die Regulation der *czc*-Determinante auf pMOL30 erfolgt über das Zweikomponentensystem CzcRS bestehend aus dem *response* - Regulator und der Sensor-Histidinkinase (van der Lelie *et al.* 1997). Speziell für Zink sinkt die *minimale inhibitoric concentration* (MIC) auf ca. 150 μ M im plasmidfreien Derivat AE104 im Vergleich zum Wildtyp CH34 von 13 mM ZnCl₂ (Grosse *et al.* 2007). Der gesamte Zinkgehalt von AE104 wurde auf 70 000 Zn²⁺ je Zelle in Tris-MM bzw. 125 000 bei

1. Einleitung

Zusatz von 100 μM ZnCl_2 determiniert (Herzberg *et al.* 2014). Dies entspricht einem physiologisch-zellulären Zinkgehalt von 204 – 350 μM Zn^{2+} je Zelle (Herzberg *et al.*, 2016: 1 Zelle = 0,6 pg TG; $0,57 \times 10^{-15}$ l) und somit vergleichbar mit den 0,2 mM von *E. coli* (Outten & O'Halloran 2001). Dieser Zinkgehalt muss gegenüber geringen Konzentrationen im unteren- und sub- μM -Bereich der Laborkultivierung (230 nM ZnSO_4 in dieser Arbeit/ICP-MS-Bestimmung: 202 ± 38 nM; Herzberg *et al.* 2014) und verschiedener Umweltproben (Lau *et al.* 1988) sowie gegen erhöhte Konzentrationen in Schwermetall kontaminierten Lebensräumen (Bi *et al.* 2006) aufgebaut werden. Das zelluläre Zink wird über Zinkbindestellen der Metalloproteine je nach Verfügbarkeit gespeichert und verwaltet sowie über die nachfolgenden beschriebenen Transportsysteme aufgefüllt. Dabei nehmen die zinkhaltigen Untereinheiten der Ribosomen und RpoC der Polymerase durch ihre hohe Anzahl eine wichtige Rolle in der Bildung des sogenannten „zinc repository“ ein (Herzberg *et al.* 2014).

Bakterien haben neben passiven Transportwegen aktive spezifische und unspezifische Systeme für den Im- und Export etabliert, um die physiologisch verträgliche Zinkkonzentration zu erreichen. Diese aktiven Transportsysteme sorgen für den Transfer von Molekülen entgegen dem Konzentrationsgradienten unter Energieaufwendung in Form von ATP (primär) oder Protonen (sekundär). Abb. 1 gibt hierbei eine Übersicht der Transportsysteme, die in gramnegativen Bakterien mit der Translokation von Zn^{2+} über die Membran involviert sind. Die grau hinterlegten Transportsysteme ZnuCBA und MntH werden durch das schwermetallresistente Bakterium CH34 nicht codiert (Kirsten *et al.* 2011). Der hochaffine ATP-binding cassette (ABC)-Transporter (TC.3.A.1) stellt in vielen Bakterien das regulierte und spezifische Zinkaufnahmesystem dar (Patzner & Hantke 1998; Ammendola *et al.* 2007). Dagegen weist der sekundäre Transporter MntH [*natural resistance-associated macrophages protein* (Nramp), T.C.2.A.55] in Eukaryoten (Nevo & Nelson 2006) und Bakterien (Makui *et al.* 2000; Agranoff *et al.* 1999) neben Mangan ein breites Substratspektrum für divalente Kationen (Fe, Zn, Co, Cd und weitere) auf.

Für die Aufnahme von Zink ins Zytoplasma wird ein schneller, konstitutiver und unspezifischer Transport benötigt, der dem chemisch-osmotischen Gradienten folgt. Erst bei Bedarf wird ein langsamer und energieaufwendender Transport aktiviert. (Nies 1999; Nies & Silver 1995). So wird der hochaffine Transporter ZRT1 durch Zink induziert und das geringaffine ZRT2 in *S. cerevisiae* konstitutiv synthetisiert (Zhao & Eide 1996). Gleiches gilt

1. Einleitung

für ZnuABC (Patzer & Hantke 1998) und ZupT (Grass, Franke, *et al.* 2005) in *E. coli*. *C. metallidurans* codiert für 7 sekundäre Transportsysteme (ZupT, PitA, CorA₁₂₃, ZntB und HoxN), die in Verbindung zum Zinkimport stehen (Kirsten *et al.* 2011). Durch eine serielle Deletion der erwähnten Transportsysteme wurde eine Beeinflussung der Resistenz gegen Zink und andere Kationen (Ni, Co und Cd) durch *zupT* (Herzberg *et al.* 2014) über *pitA* bis zur 7fach Mutante beobachtet. Auf eine gegenseitige Substituierung wurde geschlossen, da nach Wegfall eines bzw. mehrerer Systeme die zelluläre Fitness erst ab der $\Delta 7$ -Mutante betroffen war (Herzberg *et al.* 2016).

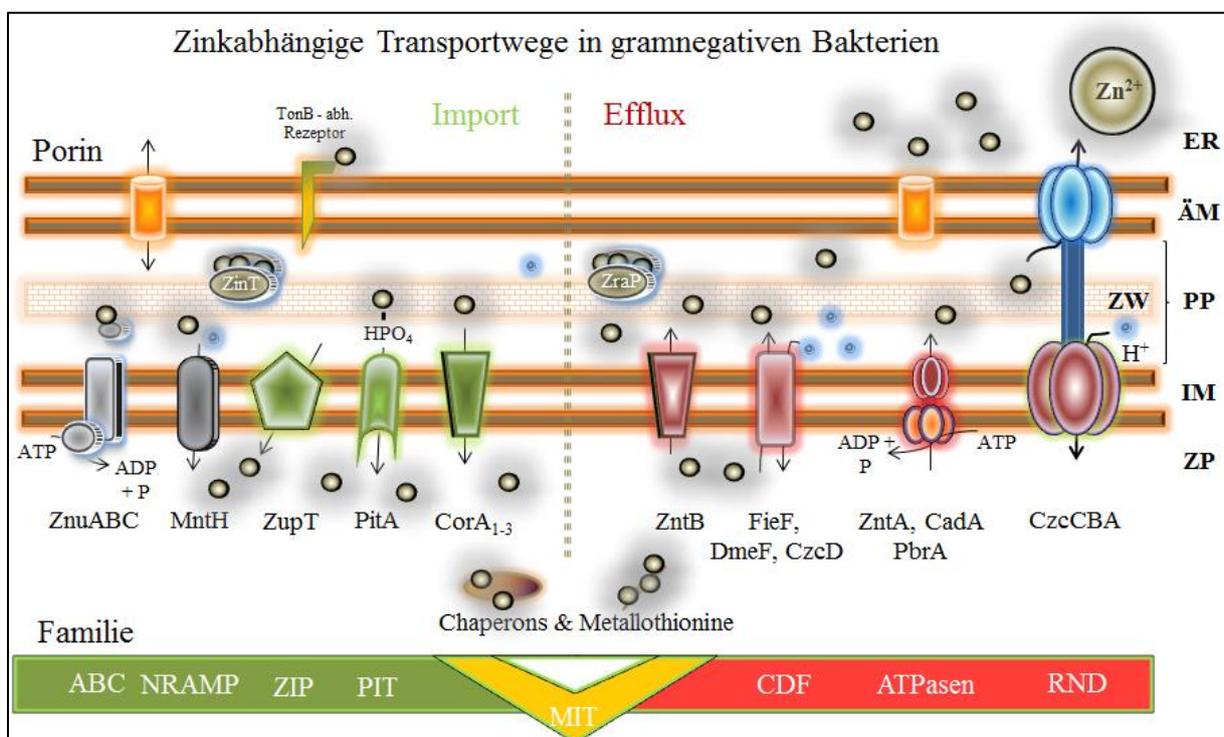


Abb. 1: Überblick der bekannten Transportsysteme in gramnegativen Bakterien für den Import (Grün) und Efflux (Rot) von divalenten Kationen mit Fokus auf den Einfluss auf die Zinkhomeostasis. Grau gekennzeichnete Transportsysteme sind nicht in *C. metallidurans* codiert. Primär- (ATP) bzw. Sekundärtransporter (H⁺) sind anhand des Substrates gekennzeichnet. Periplasmatische Chaperone sind grau-braun als ZinT und ZraP bezeichnet. Die Aufnahme von Metallen über Siderophore wurde durch den TonB-abhängigen Rezeptor angedeutet. Jedoch der zur Energiebereitstellung notwendige ExbB/ExbD-Komplex sowie regulatorische Proteine wurden nicht dargestellt. Abkürzungen stehen für Zytoplasma (ZP), Periplasma (PP), extrazellulärer Raum (ER) sowie innere (IM) und äußere Membran (ÄM). Porine stellen den Transfer kleiner hydrophiler Moleküle als passiver bidirektionaler Transport dar. Neben dem spezifischen primären Transport über das ABC-System spielen die unspezifischen sekundären Transporter der ZIP-, PIT- und MIT (CorA) – Familie in der Zinkaufnahme eine Rolle. Das CorA-Protein ZntB wurde in Proteobakterien dem Efflux und in *C. metallidurans* dem Import zugeordnet. Der Export erfolgt über CDF und CPx-ATPasen mit einem weiten Substratspektrum ins Periplasma und weiter passiv über Porine oder aktiv per OMF-MFP-RND-Komplex. Im Zytoplasma sind Chaperons und Metallothionine, die den zellulären

1. Einleitung

Transport begleiten, dargestellt. Übersichten der verschiedenen Metalltransportsysteme in Proteobakterien (Ma *et al.* 2009; Blindauer 2015) sowie für *C. metallidurans* (von Rozycki & Nies 2009; Kirsten *et al.* 2011; Herzberg *et al.* 2016) wurden zuvor in der Literatur beschrieben.

Gramnegative Bakterien grenzen ihren Reaktionsraum, das Zytoplasma, neben der inneren Zellmembran mit einer weiteren äußeren Membran unter Bildung eines Zwischenraums, dem Periplasma, ab. Unter anderem passieren Schwermetalle diese erste Barriere durch Diffusion über die Hauptproteine der äußeren Membran, den Porinen (Nikaido & Vaara 1985; Nikaido 2003). OmpF und OmpC sind für Kationen im Gegensatz zu PhoE in *E. coli* präferiert und somit für die divalenten Kationen der Schwermetalle. Eine weitere Metallaufnahmeöglichkeit bilden Siderophore. Mit Coelibactin (Bentley *et al.* 2002) und Yersiniabactin (Perry & Fetherston 2011; Kreutzer *et al.* 2011) sind Siderophore beschrieben, die neben Fe^{3+} auch Affinitäten zu divalenten Kationen aufweisen. Als Zincophore nehmen sie gegenüber den hochaffinen ZnuABC-Importsystemen eine geringere Rolle ein (Bobrov *et al.* 2014). *C. metallidurans* codiert nur für die Synthese des Polycarboxylat - Siderophores Staphyloferrin B mit dem Gencluster *rmet1109 – 1117*, welches unter Fe-Mangel hoch reguliert wird (Olsson-Francis *et al.* 2010; Bhatt & Denny 2004) und als Fe^{3+} -Importsystem gilt. Analog zu SirA (Grigg *et al.* 2010) erfolgt der Import ins Periplasma über den TonB-abhängigen Staphyloferrin B - Rezeptor *aleB* (*rmet1118*) und der Beteiligung des TonB-ExbB-ExbD-Systems (*rmet2277-9*). Die Energetisierung wird vermutlich durch die Protonen bewegende Kraft (PMF) realisiert. Weitere TonB-abhängige Rezeptoren (*rmet0837, 1819* und *3999*) sind in *C. metallidurans* codiert und sorgen für die Aufnahme weiterer heterologer Siderophore (Gilis *et al.* 1996).

ZupT als unspezifisches Zn^{2+} -Importsystem ins Zytoplasma von *C. metallidurans* (Kirsten *et al.* 2011; Herzberg *et al.* 2014, 2016) stammt aus der ZRT- and IRT like Protein-Transportfamilie (T.C.2.A.5), kurz ZIP-Familie (ZRT: **Z**inc **R**egulated **T**ransporter, IRT: **I**ron **R**egulated **T**ransporter; (Zhao & Eide 1996)]. ZupT hat seine Funktion in der Versorgung mit Zink unter Bedingungen geringer Verfügbarkeit und kommt in Bakterien (Grass *et al.*, 2002) über Pflanzen (Li *et al.* 2013) bis hin zum Menschen vor. Der Mensch besitzt 15 verschiedene ZIP-Transporter (Białek & Zyska 2014). Mutationen in diesem führen zu einem gestörten Zinkhaushalt und diversen Krankheitsbildern. So wurde eine Mutation in Zip4 als Ursache für das Hereditäre Zinkmangelsyndrom [*Acrodermatitis enteropathica*; (Andrews 2008)] identifiziert. ZupT_{CH34} spielt als induziertes Importsystem unter Zinkmangel

1. Einleitung

(Kirsten *et al.*, 2012) eine große Rolle für die Zinkakquirierung in *C. metallidurans*, da dessen Deletion den Zinkgehalt je Zelle auf 20 000 Atome senkt (Herzberg *et al.* 2014).

Neben dem Transport von Substraten mit chemischer Ähnlichkeit, wie z. B. zwischen Sulfat und Chromat oder Phosphat und Arsenat (Nies & Silver 1995), können Metalle auch als Komplex die Zellmembran über Transportproteine passieren. So importiert der *low-affinity inorganic* Phosphat Transporter PitA auch Zink als Metall-Phosphat-Komplex (MeHPO_4) neben Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} (van Veen *et al.* 1994) in die Zelle und ist in *E. coli* konstitutiv exprimiert (Beard *et al.*, 2000). In *Cupriavidus* wurde eine zink- und phosphat-abhängige Expression von *pitA* festgestellt (Kirsten *et al.* 2011).

Des Weiteren zeigen Magnesiumtransportsysteme Interferenzen mit anderen divalenten Kationen. Grund hierfür können die ähnlichen Ionenradien der divalenten Kationen sein [Mg^{2+} : 72 pm; Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} : 70 pm; Zn^{2+} 74 pm, (A.F. Wells 1984)]. Die CorA-Proteine der Metal Ion Transport-Familie (T.C.1.A.35, (Kehres *et al.* 1998; Smith *et al.* 1993)) besitzen eine N-terminale periplasmatische Domäne mit drei Membranen durchspannenden Regionen in *E. coli* und *S. thyphimurium*. Neben der Bindung von Mg^{2+} wurde auch die Affinität zu Co^{2+} und Ni^{2+} des tetrameren **Co Resistance Protein A** mit seiner periplasmatischen Domäne (PPD) durch S.-Z. (Wang *et al.* 2006) beobachtet. Die Kristallstruktur von CorA aus *Thermotoga maritima* zeigt die Bildung einer Pore aus 5 Monomeren mit je zwei Transmembransegmenten (Lunin *et al.* 2006). Dagegen scheint das verwandte ZntB aus *S. enterica* Thyphimurium eine Exportfunktion für Zink zu haben (Worlock & Smith 2002). *Cupriavidus* codiert für die 4 MIT - Proteine CorA₁₋₃ und ZntB. Kirsten *et al.* (2011) zeigten durch Reporterfusionen eine verringerte Transkription der 3 *corA*-Gene unter Zinkeinfluss. CorA₁ wurde als Hauptmagnesiumimporter beschrieben, welcher die höchste Proteinübereinstimmung mit dem *E. coli* CorA aufwies und dessen Expression unter Magnesiummangel signifikant anstieg. Dagegen wird die Funktion von ZntB als geringerer Importer durch die Steigerung der Zn^{2+} und Cd^{2+} -Resistenz der $\Delta 5$ ($\Delta zupT$, *corA1-3*, *pitA*) zur $\Delta 6$ ($\Delta 5 \Delta zntB$) postuliert (Herzberg *et al.* 2016). Ein unspezifischer Transport von divalenten Metallen neben dem Mg^{2+} Import wird auch durch die ATPasen (T.C.3.A.3.4.1) MgtA und MgtB vermutet (Snavely *et al.* 1989), die auch in AE104 codiert sind.

Ein langsamer spezifischer Transporter wäre noch durch HoxN, ein Vertreter der NiCoT-Subfamilie, zu nennen. Dieser ist am Ni^{2+} - und Co^{2+} - Einstrom beteiligt und dessen Deletion

1. Einleitung

verursachte in der 7fach-Mutante einen Abfall der Fitness. In dieser Mutante, bei der alle anderen bekannten Importsysteme fehlen, war die Expression gesteigert und durch Zinkzugabe reduzierbar, also ähnlich der Beobachtungen von Kirsten (2011) für die MIT-Proteine in AE104.

Der bekannteste Regulator für die Zinkaufnahme stammt aus der Fur-Familie. Namensgeber ist der *ferric uptake regulator* Fur, der in seinem Regulon die Eisenaufnahme über Siderophore, deren Rezeptoren und verschiedene Transport-Systeme kontrolliert (Hantke 2001a). Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne mit einem *helix-turn-helix* (HTH)-Motiv, verbunden über ein *winged-helix* Motiv zum C-Terminus und seiner Dimerisierungsdomäne (Pennella & Giedroc 2005). Trotz der ähnlichen Struktur und der grundsätzlichen Bindung als Dimer an ein spezifisches DNA-Bindemotiv unterteilen sich die Fur-Vertreter über die Sensierung unterschiedlicher Metalle und der Regulation der jeweiligen Metallohomeostasis. So wurden neben Fur auch Nur- (Ni), Mur- (Mn) und auch Zur- (Zn) Orthologe und deren Regulons identifiziert. Des Weiteren codieren *B. subtilis* und *S. coelicolor* neben Fur und Zur auch den Fe²⁺-abhängigen oxidativen Stresssensor PerR (Moore & Helmann 2005; Shin *et al.* 2007). Neben dem in *C. metallidurans* nicht codierten ZnuABC-Transporter suprimiert der *zinc uptake regulator* die Genexpression zinkfreier Enzymparalogue und die genannten Zincophore (Hantke 2005; Lindsay & Foster 2001; Huang *et al.* 2008; Gabriel & Helmann 2009; Gaballa *et al.* 2002).

Die Detoxifizierung des Zytoplasmas von Zink und weiteren divalenten Metallen erfolgt über einen aktiven Transport über P_{IB2}-ATPasen (T.C.3.A.3) und CDF-Proteinen sowie dem erwähnten ZntB. Erhöhte Konzentrationen im Periplasma können passiv über Porine und aktiv über die erwähnte Klasse der RND-Proteine exportiert werden. Zusammengenommen stellen diese Systeme eine Anpassung an schwermetallkontaminierte Herkunftsorte (Vandamme & Coenye 2004; Reith *et al.* 2009) dar.

C. metallidurans codiert chromosomal für 8 Mitglieder der CPX- bzw. IB-Familie mit einem konservierten Prolin sowie mindestens einem flankierenden Cystein in der drittletzten Transmembranhelix (Argüello *et al.* 2007). Dabei werden monovalente Kationen (Cu⁺/ Ag⁺) über die P_{IB1}-typ ATPasen CupA (Rmet3524); CopF: (Rmet6119) transportiert. Die P_{IB2}-typ ATPasen vermitteln die Translokation der divalenten Kationen Zn²⁺, Cd²⁺ und Pb²⁺ (Nies 2003). CH34 codiert für drei P_{IB2}- typ ATPasen (von Rozycki & Nies 2009; Scherer & Nies 2009). Die P_{IB4}-ATPase CzcP (Rmet5970) dient nach Scherer (2009) zur Resistenzsteigerung

1. Einleitung

durch seine höheren Transportraten für Zn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} und ist Teil der *czcCBA*-Resistenzdeterminante auf pMOL30. Die chromosomal codierten ATPasen ZntA (*rmet4594*) und CadA (*rmet2302*) sowie PbrA (*rmet5947*; pMOL30) wiesen zueinander ähnliche Transportraten gegenüber den erwähnten Kationen auf. Dies erklärt die gegenseitige Substituierung der einzelnen P_{IB2} -ATPasen. Dagegen resultierte ihre Bezeichnung durch die Induktion von *zntA* durch Zink und *cadA* durch Cadmium (Legatzki *et al.* 2003). *Cation diffusion facilitator* (CDF, T.C.2.A.4.1.1) -Transporter, wie die Komponente des Cobalt-Zink-Cadmium-Resistenzsystems CzcD aus *C. metallidurans*, exportieren Metallionen und sorgen so für die Detoxifizierung des Zytoplasmas in einem Protonen betriebenen aktiven Prozess. CDF-Transporter bestehen aus einer Transmembranenregion mit sechs hydrophoben Helices neben der hydrophilen Domäne im Zytoplasma (Anton *et al.* 2004; Paulsen & Saier 1997; Grass *et al.* 2001; Grass, Otto, *et al.* 2005). Neben dem *czcD* (*rmet5979*) auf pMOL 28 codiert *C. metallidurans* mit dem konstitutiv exprimierten *fieF* (*rmet3406*) und *dmeF* (*rmet0198*) zwei weitere CDF-Proteine. Ein breites Substratspektrum mit unterschiedlicher Prävalenz wurde für FieF und DmeF postuliert (Munkelt *et al.* 2004).

Der Gegenspieler von Zur und der Regulator der zinkabhängigen CPx-ATPase ZntA in Prokaryoten ist der MerR-Regulator ZntR, welcher die Expression von *zntA* bei Überschreitung des zellulären Zinkoptimums aktiviert. Mitglieder der MerR-Familie zeichnen sich durch eine homologe N-terminale DNA-Binde- und eine variable C-terminale Sensordomäne aus. Dieser unterschiedliche C-Terminus beeinflusst die Koordinierung der Kofaktoren und somit die Spezifität des jeweiligen Regulators. Ein breites Spektrum an Schwermetall-Ionen kann über die Regulatoren MerR (Hg^{2+}), PbrR (Pb^{2+} , Hobman *et al.* 2012), CadR (Cd^{2+}), CueR (Cu^{+} : Stoyanov *et al.* 2001), CoaR (Co^{2+}) sowie ZntR (Zn^{2+} , Brocklehurst *et al.* 1999) abgedeckt werden und führt so zur Aktivierung der jeweiligen ATPase (Brown *et al.* 2003). Außerdem wird oxidativer Stress durch SoxR mit seinem 2Fe-2S-cluster und dem LysR-Regulator OxyR durch entsprechende Regulation der SOD oder der Expression von Dps, einem Eisen- und DNA-Bindeprotein, kontrolliert (Pomposiello & Demple 2001). ZntR-Dimer bindet ein spezifisches palindromisches Bindemotiv in der *spacer*-Region zwischen der -35 (TTGACA) und -10 Box (TatAAT) in der Promotorregion, welches länger als der präferierte Abstand von 17 ± 1 bp der RNA-abhängigen Polymerase (RNAP) ist (deHaseth *et al.* 1998). Eine Verkürzung des Abstandes zwischen der -35 und -10 - Box resultiert aus der Konformationsänderung des Regulators basierend auf der Kofaktorbindung. Die Transkription wird durch Erkennung der -35 und -10 - Box durch den

1. Einleitung

σ^{70} - Sigmafaktor bzw. Alternativen und nachfolgend der RNAP –Bindung initiiert. Des Weiteren hat die Bindung des Kofaktors unter steigender Zinkkonzentration eine erhöhte Halbwertszeit von ZntR zur Folge (Pruteanu *et al.* 2007). Außerdem codiert *C. metallidurans* neben dem Arsenat Repressor ArsR (Rmet0333) fünf weitere ArsR-like Proteine (Zhang *et al.* 2009). ZiaR *Synechocystis sp.* und CzrA *S. aureus* aus der ArsR/ SmtB-Familie regulieren über P-typ ATPasen bzw. CDF-Proteine den Efflux von Zink (Busenlehner *et al.* 2003).

Neben den aufgezeigten Im- und Exportsystemen helfen peri- und zytoplasmatische Chaperone beim Transport oder bei der Sensierung von divalenten Kationen. So leitet ZinT (Gabbianelli *et al.* 2011; Graham *et al.* 2009) gebundenes Zink im Periplasma an das ZnuA des zinkspezifischen ABC-Transporters und ZraP steht in Verbindung mit dem Zweikomponentensystem ZraPS als periplasmatischer Stresssensor (Petit-Härtlein *et al.* 2015). Des Weiteren sind zytoplasmatische Chaperone unter den G3E P-loop ATPasen und speziell für Zink in der Untergruppe COG0523 vorzufinden. Sie stehen unter der Kontrolle von Zur, so auch YeiR_{E. coli} (Haas *et al.* 2009; Blaby-Haas *et al.* 2012). In *C. metallidurans* sind CobW₁₋₃ Kandidaten für mögliche zinkabhängige Chaperonen.

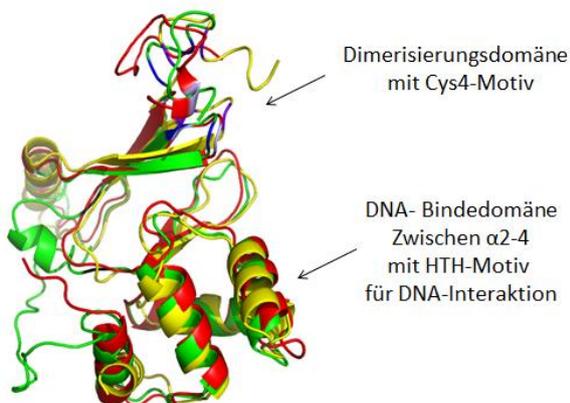


Abb. 2: Überlagerung der Tertiärstrukturvorhersagen der drei codierten Fur-Orthologen in *C. metallidurans*. Die Tertiärstrukturen wurden durch den Phyre²-Server anhand der Primärstruktur von FurA (rot), FurB (gelb) und Zur (grün) vorhergesagt und mit PyMOL™ Molecular Graphics System (Version 1.8.2.0, Schrödinger/ LLC) überlagert. Die konservierten vier Cysteine in der Dimerisierungsdomäne sind blau markiert.

Zusammengenommen erfolgt die Regulation über zinkbindende Moleküle, die direkt oder indirekt als Suppressor oder Aktivator Einfluss auf die Expression oder Stabilität von Transport und Zn^{2+} -Metalloproteinen nehmen (Ma *et al.* 2009).

Cupriavidus metallidurans codiert für drei

Fur-Orthologe mit *rmet2974*, *rmet5746* und *rmet0128*, deren Produkte als FurA, FurB und FurC bezeichnet wurden und eine ähnliche Struktur als Regulator aufweisen (Abb.2; Schmidt *et al.* 2014). In dieser Arbeit wurde anhand der zugrunde liegenden Daten FurC als *zinc uptake regulator*, kurz Zur, bezeichnet. Außerdem besitzt CH34 unter den 13 MerR-Orthologe CueR und CupR für Cu^{+} sowie MerR-Proteine, die an der Regulation

1. Einleitung

der Pb^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} -Resistenz beteiligt sind. Sie wurden als PbrR₁₋₃ (Rmet5946, 2302, 3456) bezeichnet. PbrR₁ und PbrR₂ werden stromaufwärts von *pbrA* bzw. *cadA* codiert. Dagegen befindet sich PbrR₃ (Rmet3456) nicht in der Genregion der dritten P_{IB2}-typ ATPase ZntA. Die Regulation von *pbrA* durch PbrR₁ ist durch *in vitro*-Studien und einem β -Galakosidase-Assay bestätigt (Hobman *et al.* 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation der beiden Hauptregulatoren der Zinkhomeostasis in *C. metallidurans* und deren Einfluss auf die Physiologie, das Transkriptom und Transportom des schwermetallresistenten β -Proteobakteriums. Darüber hinaus sollte über die zinkabhängigen Regulatoren der MerR- und Fur-Familie das Verständnis über intra- und interzelluläre Transportwege, deren bekannte bzw. unbekannte beteiligte Komponenten und letztendlich das Verständnis der Etablierung des *zinc repository* (Herzberg *et al.* 2014) erweitert werden. Dies wurde anhand von physiologischen Untersuchungen, Expressions- und *in-vitro*-Studien verfolgt. Um die Beobachtungen von Effekten beruhend auf Deletionen des Regulators für Zn^{2+} -Im- und Export zu ermöglichen, wurde auf die Resistenzdeterminanten der Megaplasmide in dieser Arbeit verzichtet und auf das plasmidfreie Derivat von CH34, AE104 zurückgegriffen. Der Einfluss über weitere Regulatoren (Waldron & Robinson 2009), z. B. den Proteinen der SmtB/ArsR-Familie (Busenlehner *et al.* 2003) sowie den aus Sensorkinase und DNA-Bindeprotein bestehenden Zwei-Komponentensystemen (Petit-Härtlein *et al.* 2015), wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet.

2. Materialien und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Derivate (Tabelle 1-2) sowie Plasmide (Tabelle 3) aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten *C. metallidurans* - Stämme, deren Genotyp und Herkunft

<i>C. metallidurans</i>	Genotyp	Referenz
AE104	plasmidfreies Derivat von CH34	Mergeay <i>et al.</i> 1985
DN740	AE104 $\Delta furA$	diese Arbeit
DN741	AE104 $\Delta furB$	
DN728	AE104 Δzur	
DN742	AE104 $\Delta furB, \Delta zur$	
DN727	AE104 $\Delta rmet2302$	
DN781	AE104 $\Delta rmet3456$	
DN780	DN578 Δzur	
DN578	AE104 $\Delta cadA, \Delta zntA, \Delta fieF, \Delta dmeF$	Scherer & Nies 2009
DN515	AE104 $\Delta zurT$	Kirsten <i>et al.</i> 2011
DN522	AE104 $\Delta rmet1118 (aleB)$	Claudia Schwarzenberger 2007
DN523	AE104 $\Delta rmet1113-1114 (iucA-C)$	

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten *E. coli* – Stämme

<i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
BI21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), λ (DE3), pLys, cam ^R	Stratagene GmbH, Heidelberg
BI21	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> [malB ⁺] _{K-12} (λ^S)	Studier <i>et al.</i> 2009, Stratagene GmbH, Heidelberg
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR</i> <i>nupG</i> $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Grant <i>et al.</i> 1990
S17/1	<i>pro</i> , Tra ⁺ , <i>recA</i>	Simon <i>et al.</i> 1983

2. Materialien & Methoden

XL1 blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	BULLOCK 1987; Stratagene GmbH, Heidelberg
----------	--	---

Tabelle 3: Auflistung der erstellten u./ o. verwendeten Plasmide und Vektorsysteme

Stamm	Plasmid	Genotyp	Referenz
Plasmid für Klonierung/ Sequenzierung			
pGem [®] -T Easy, Klonierung von PCR-Produkten		Promega, Madison, USA	
Erstellung der <i>cre-lox</i> -Deletionsmutanten			
ECA 910	pECD1335	pECD1002::Δ <i>furA</i> (<i>rmet2976</i>)	diese Arbeit
ECA 911	pECD1336	pECD1002::Δ <i>furB</i> (<i>rmet5746</i>)	
ECA 912	pECD1337	pECD1002::Δ <i>furC</i> (<i>rmet0128</i>)	
ECA 826	pECD1251	pECD1002::Δ <i>rmet2302</i>	
ECB 36	pECD1460	pECD1002:: <i>rmet2302</i> (Δ <i>rmet2302</i> -Komplementation)	
ECB 49	pECD1473	pECD1002::Δ <i>rmet3456</i>	
ECA482	pECD1002	<i>sacB</i> , pECD889-Derivat, Rekombinationsvektor, mutierte <i>loxP</i> ₆₆ & <i>loxP</i> ₇₁ -site, Km ^R , Tet ^R , Amp ^R	Scherer & Nies 2009
VS218	pCM157	Expressionsvektor der Cre-Rekombinase, tet ^R	Marx & Lidstrom 2002
Konstrukte für Operon- <i>lacZ</i> -Fusionen			
VS585	pECD794-1	pLO2: <i>lacZ</i> , Km ^R , <i>lacZ</i> -Fusionen in AE104	Scherer & Nies 2009
ECA 410	pECD986	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>pitA</i>	J. Scherer 2007; Kirsten <i>et al.</i> 2011
ECA 411	pECD987	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>zupT</i>	
ECA 412	pECD988	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>corA</i> ₁	
ECA 413	pECD989	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>corA</i> ₂	
ECA 414	pECD990	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>corA</i> ₃	
ECA 908	pECD1333	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>zntA</i>	
ECA 909	pECD1334	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>cadA</i>	
ECB 14	pECD1438	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I-Dis-Fragment von <i>zur</i>	
ECB 16	pECD1440	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>rmet3234</i>	
ECB 17	pECD1441	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>rmet1298</i>	
ECB 19	pECD1443	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>zntB</i>	
ECB 20	pECD1444	pECD794-1 Derivat, <i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I- Fragment von <i>rmet1102</i>	

2. Materialien & Methoden

Stamm	Plasmid	Genotyp	Referenz
ECB 21	pECD1445	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>rmet1569</i>	
ECB 22	pECD1446	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>rmet0545</i>	
ECB 24	pECD1448	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>rmet0129</i>	
ECB 25	pECD1449	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Dis-Fragment von <i>rmet3042</i>	
ECB 26	pECD1450	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>rmet4281</i>	
ECB 27	pECD1451	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>rmet3880</i>	
ECB 18	pECD1442	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>fieF</i> * Rekonstruktion nach (Munkelt <i>et al.</i> 2004)	diese Arbeit*
ECA 784	pECD1209	pECD794-1 Derivat, <i>XbaI/ PstI</i> - Fragment von <i>rmet5747</i>	Schütttau 2013

Expression in *E. coli*

		pASK-IBA 3 ⁺ , Expressionsvektor, C-terminaler Strep-tag [®] II, amp ^R pASK-IBA 7 ⁺ , Expressionsvektor, N-terminaler Strep-tag [®] II, amp ^R	IBA-GmbH, Göttingen
ECB 38	pECD1462	pASK 3 ⁺ mit <i>furA</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	diese Arbeit
ECB 39	pECD1463	pASK 7 ⁺ mit <i>furA</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	
ECB 40	pECD1464	pASK 3 ⁺ mit <i>furB</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, PstI</i>)	
ECB 41	pECD1465	pASK 7 ⁺ mit <i>furB</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, PstI</i>)	
ECA 913	pECD1338	pASK 3 ⁺ mit <i>zur</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	
ECA 914	pECD1339	pASK 7 ⁺ mit <i>zur</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	
ECB 42	pECD1466	pASK 3 ⁺ mit <i>zur</i> C119S ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	
ECB 43	pECD1467	pASK 7 ⁺ mit <i>zur</i> C119S ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	
ECB 45	pECD1469	pASK 3 ⁺ mit <i>rmet3456</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	
ECB 46	pECD1470	pASK 7 ⁺ mit <i>rmet3456</i> ohne Start-/ Stopcodon (<i>XbaI, SalI</i>)	

Expression in *C. metallidurans*

VS224	pBBR1 MCS 2	RK2 <i>lacZ'</i> , Mob ⁺ , Km ^R	Kovach <i>et al.</i> 1995
VS225	pBBR1 MCS 3	RK2 <i>lacZ'</i> , Mob ⁺ , Tet ^R	
ECB 15	pECD1340	pBBR 1 MCS2:: <i>furA</i> , nativer Promotor, (<i>AgeI/ NcoI/ EcoRI</i>)	diese Arbeit
ECA 915	pECD1439	pBBR 1 MCS2, <i>Streptag-zur</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	
ECB 28	pECD1452	pBBR 1 MCS2, <i>zur-Streptag</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	
ECB 29	pECD1453	pBBR 1 MCS2, <i>zur</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	

2. Materialien & Methoden

Stamm	Plasmid	Genotyp	Referenz
ECB 30	pECD1454	pBBR 1 MCS2, <i>rmet3456-Streptag</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	diese Arbeit
ECB 31	pECD1455	pBBR 1 MCS2, <i>rmet3456</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	
ECB 32	pECD1456	pBBR 1 MCS3, <i>zur-Streptag</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	
ECB 33	pECD1457	pBBR 1 MCS3, <i>zur</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	
ECB 34	pECD1458	pBBR 1 MCS3, <i>rmet3456</i> , (<i>ApaI/ HindIII</i>)	
ECA 917	pECD1342	pBBR 1 MCS3, <i>Streptag- zur</i> , (<i>ApaI/ HindIII/ XbaI</i>)	
ECA 918	pECD1343	pBBR1MCS3, <i>zur-Streptag</i> , (<i>ApaI/ HindIII/ SpeI</i>)	
ECA 919	pECD1344	pBBR1MCS3, <i>zur</i> , (<i>ApaI/ HindIII/ SpeI</i>)	

Konstrukte für Promotor-Aktivitätsmessung

ECB132	pECD1556	pBBR 1 MCS3:: <i>lacZ</i>	A. Heinz, 2015
ECB 50	pECD1474	pBBR1 MCS3, <i>zurp::lacZ</i>	diese Arbeit
ECB 51	pECD1475	pBBR1 MCS3, <i>rmet0129p::lacZ</i>	
ECB 52	pECD1476	pBBR1 MCS3, <i>rmet5743p::lacZ</i>	
ECB 53	pECD1477	pBBR1 MCS3, <i>rmet 5744p::lacZ</i>	

2.2. Kultivierungsbedingungen

2.2.1. Nährmedien

Die nachfolgenden Medien wurden zur Kultivierung von *Escherichia coli* und *Cupriavidus metallidurans* verwendet. Alle Medien wurden im Autoklaven bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Zusätze wurden nach entsprechender Kühlzeit bis auf ca. 50-60 °C hinzugefügt.

2.2.1.1. Vollmedien für *E. coli*

BD Difco™ LB Broth, Lennox-Medium (Becton Dickinson, Heidelberg)

20 LB-Medium ad 1 Liter H₂O dest.

Difco™ LB-Agar, *lysogenic broth* Lennox-Agarplatten (Becton Dickinson, Heidelberg)

35 g LB-Agar ad 1 Liter H₂O dest.

Dieses Flüssig- bzw. Festmedium mit 5 g/l NaCl diente zur Anzucht der verschiedenen *E. coli*-Stämme.

2. Materialien & Methoden

Nähragar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

23 g Nähragar ad 1 Liter H₂O dest.

Für die Anzucht von *E. coli* und *C. metallidurans* in Konjugationsexperimenten wurde dieses Festmedium genutzt.

2.2.1.2. Minimalmedium

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

20 x Komponente A	20 x Komponente B
800 ml H ₂ O _{bidest.}	900 ml H ₂ O _{bidest.}
121,14 g Tris-HCl	8,59 g Na ₂ SO ₄
ad pH 7,0 (HCl)	2,29 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
<u>danach Zugabe von:</u>	ad 1 Liter H ₂ O _{bidest.}
93,6 g NaCl	0,6 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O
29,8 g KCl	4,0 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
21,4 g H ₄ Cl	
0,024 g Eisen-Ammonium-Citrat	
2 ml 10 x Spurenelementlösung nach Pfennig (1974)	
ad 1 Liter H ₂ O _{bidest.}	

10 x Spurenelementlösung SL6 (Pfennig, N., 1974)

0,20 g CoCl ₂ x 6 x H ₂ O	0,03 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,10 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
0,01 g CuCl ₂ 2 x H ₂ O	0,03 g Na ₂ Mo ₄ x 2 H ₂ O	
0,30 g H ₃ BO ₃	0,188 g NiCl ₂ x 6 H ₂ O	ad 1 Liter H ₂ O dest.

Zur Kultivierung von *C. metallidurans* wurden die Komponenten A und B im Verhältnis 1:1 in einfacher Konzentration eingesetzt. Natriumgluconat diente als Kohlenstoffquelle zu 2 g/l für die Anzucht von *C. metallidurans*. Im Gegensatz dazu waren 2 g/l Glycerin und 3 g/l Casaminosäurehydrolysat (Becton Dickinson, Heidelberg) die einzigen Kohlenstoffquellen in diesem Minimalmedium für *E. coli*. Zur Herstellung von Tris-MM-Festmedium wurden 20 g/l BactoTM-Agar (Difco, Augsburg) vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

2. Materialien & Methoden

2.2.2. Medienzusätze

Schwermetallsalze

Sterile, wässrige 1 M Stammlösungen der Metallsalze CoCl_2 , CdCl_2 , NiCl_2 und ZnCl_2 wurden für die Einstellung der gewünschten Endkonzentrationen im Medium direkt oder in verdünnter Form eingesetzt.

Chelator

Zur Erzeugung von Kationenmangelbedingungen wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als 0,5 M leicht basische, wässrige Lösung dem sterilen Medium bzw. den Reaktionsansätzen hinzugefügt, um eine entsprechende Konzentration zu erreichen.

Antibiotika und die Medienzusätze IPTG, AHT sowie X-Gal

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden nach Ausubel *et al.* 1994 hergestellt. Diese, wie auch die genutzten Medienzusätze Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Anhydrotetracyclin (AHT) sowie 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), lagerten bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Der Zusatz erfolgte nach Abkühlen des Mediums zur im Folgenden aufgeführten Endkonzentration.

Tabelle 4: Antibiotika und deren Stamm- bzw. Endkonzentrationen im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	125 g/l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	125 mg/l
Kanamycin	50 g/l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	50 mg/l (<i>E. coli</i>) 1,5 g/l (<i>C. metallidurans</i>)
Tetracyclin	12,5 g/l Ethanol (50 % v/v)	12,5 mg/l
Chloramphenicol	10 g/l Ethanol (99 % v/v)	10 mg/l
weitere Zusätze		
Anhydrotetracyclin (AHT)	1 mg/ml	max. 200 $\mu\text{g/l}$
IPTG	40 mg/ml ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$)	40 mg/l
X-Gal	48 mg/ml DMF	48 mg/l

2. Materialien & Methoden

2.2.3. CAS-Platten

Dieses Festmedium basierend auf Chromazurol S diente der Charakterisierung des Aufnahmevermögens von Eisen aus dem umgebenden Medium. Die Zusammensetzung basiert auf (Louden *et al.* 2011) in abgewandelter Form für das Tris-MM von *Cupriavidus*. Zunächst wurde eine sterile CAS-Lösung hergestellt. Hierfür wurden 10 ml einer 1 mM FeCl₃ und eine 40 ml Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HDTMA)-Lösung unter Rühren zu in 50 ml dest. Wasser gelöst, 60,5 mg Chromazurol S gegeben. Dabei bildete sich ein blauer bis grüner Chromazurol S- Fe³⁺ - Komplex aus, der durch HDTMA stabilisiert wurde. Das Tris-gepufferte Minimalfestmedium wurde nach obiger Angabe hergestellt und autoklaviert, wobei 0,1 Vol. an dest. Wasser weniger hinzugefügt wurde. Das Auffüllen erfolgte mit der sterilen CAS-Lösung bei 60 °C.

2.2.4. Anzuchtbedingungen für die verwendeten Stämme

2.2.4.1. *E. coli*

Die verschiedenen *E. coli*- Stämme wurden in LB_{Lennox}-Medium mit den entsprechenden Antibiotika als Selektionsdruck angezogen. Dabei dienten 4 ml Übernachtskulturen in sterilen Reagenzröhrchen als Vorkultur für größere Anzuchten oder auch als Material für Isolationen von Plasmiden. Kultivierungen bis zu einem Liter wurden in sterilen Erlenmeyerkolben realisiert, wobei das Medium-Gefäßvolumen maximal 1:5 betrug. Die *E. coli*-Flüssigkulturen wurden auf einem Rundschüttler (HS500, IKA Labortechnik, Staufen) für schräg angebrachte Kulturröhrchen bzw. bei Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde mittels SpektrometerTM 3000 plus (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) anhand der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

2.2.4.2. *C. metallidurans*

Der *C. metallidurans*-Stamm AE104 und seine von ihm ausgehenden Mutanten und Derivate wurden in Tris-Minimalmedium mit 2 g/l Natriumgluconat bei 30 °C in Kulturröhrchen (4 ml) oder in Erlenmeyerkolben mit und ohne Seitenarm kultiviert. Dabei wurde das schon erwähnte Volumen-Gefäß-Verhältnis beachtet. Für eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff wurden die Kulturen auf einem Rotationsschüttler (Janke & Kunkel, IKA[®] Labortechnik, Staufen) KS 500 (250 rpm) bzw. KS 501 digital (200 rpm) oder im

2. Materialien & Methoden

Wasserbadschüttler (HAT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 250 rpm angezogen. Da dem Derivat von CH34 beide Megaplasmide (pMOL28/30) fehlen, wurde auf die Zugabe von erhöhten Metallkonzentrationen bei der Standardkultivierung verzichtet. Die entsprechenden Antibiotika-Zusätze erfolgten nach Tabelle 3.

Der Fortschritt des Zellwachstums erfolgte generell über das SpektrometerTM 3000 plus bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Zelldichte bei Aufnahmeexperimenten, Transkriptionsmessungen und Wachstumskurven wurde mit einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett Manufacturing Company, inc., USA) bestimmt. Als Referenz diente jeweils das unbeimpfte Medium.

2.2.5. Stammhaltung

Die *E. coli*- Stämme wurden auf LB_{Lennox}- und die *C. metallidurans*-Stämme auf Tris-MM-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika zur Haltung der in *cis*-bzw. *trans*-agierenden Plasmide kultiviert. Dabei wurde *E. coli* bei 37 °C und *C. metallidurans* bei 30 °C angezogen und deren Platten maximal für 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Sicherung von Plasmidkonstrukten sowie Mutanten und *C. metallidurans*-Stämmen mit Plasmiden erfolgte die Erstellung von Glycerinkulturen. Dabei wurden Zellen einer Übernachtskultur (*E. coli*) bzw. Kulturen in der spätexponentiellen Phase (*C. metallidurans*) geerntet, mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und für mind. 20 min auf Eis inkubiert. Die Langzeitlagerung fand bei – 80 °C statt.

2.2.6. Reinheitskontrolle

Die verwendeten Stämme wurden nach routinemäßiger Kultivierung auf einem Festmedium anhand ihrer einheitlichen Koloniemorphologie und spezifischen PCR-Reaktionen überprüft.

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Wachstumskurve

Die Wachstumskurven erfolgten in 10 ml Tris-gepuffertem Minimalmedium in Seitenarmkölbchen im Wasserbad bei 30 °C. Die Zellen wurden zunächst von einer frischen Tris-MM Agarplatte über Nacht bis zu einer optischen Dichte von ca. 2,0 angezogen. Dabei

2. Materialien & Methoden

wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen in der frühen stationären Phase befanden. Die Mittelkultur wurde 5 %ig angeimpft und für 24 h kultiviert. Die Hauptkultur wurde mit 2 % angeimpft und das Wachstum über 30 h mit dem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett Manufacturing Company, Inc., USA) verfolgt. Zum Vergleich der einzelnen Stämme wurde nach der Regressionsgeraden von Schwuchow (1995, Formel 1) die optische Dichte (KE) in das Trockengewicht ($\mu\text{g/ml}$) umgewandelt und nachfolgend die Wachstumsrate μ und die Verdopplungsrate (Formel 2-3) bestimmt.

Formel 1:

$$\text{Pro } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 4,83681 + 2,38008 \times \text{KE} - 1,568 \times 10^{-6} \times \text{KE}^2 + 6,462 \times 10^{-6} \times \text{KE}^3 + 8,785 \times 10^{-9} \times \text{KE}^4$$

Formel 2:

$$\mu = \frac{\Delta \ln(\text{TG})}{\Delta t}$$

Formel 3:

$$\text{td} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

2.3.2. Wachstumsendpunktbestimmungen

Für Wachstumsendpunktbestimmungen wurde das Wachstum unter steigenden Konzentrationen von CdCl_2 , CoCl_2 und ZnCl_2 in Tris-Minimalmedium untersucht. Dafür wurden die Stämme ähnliche der Wachstumskurve über eine Vor- und Mittelkultur zu einem Punkt in der spät stationären Phase angezogen. Die Hauptkultur wurde 10 %ig (0,2 ml auf 1,8 ml) mit der erhaltenen Mittelkultur beimpft und für 20 h bei 30 °C und bei 200 rpm schüttelnd inkubiert. Dabei wurde die optische Dichte bei 600 nm herangezogen, um etwaige Abweichungen in der Zelldichte auszugleichen. Das erreichte Wachstum der Kulturen (200 μl) wurde bei 600 nm in einem 96 *well plate* (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit dem Tecan infinity 200 (Tecan Group Ltd., Schweiz) ermittelt. Aus den ermittelten Daten erfolgte die Bestimmung des IC_{50} -Wertes und des *b-values*. Dabei gibt der IC_{50} -Wert die Metallkonzentration an, bei der ein halbmaximales Wachstum möglich war. Der *b-value* beschreibt die Steigung an diesem Punkt der Sigmoidalkurve. Die zur Bestimmung der Parameter verwendete Formel 4 stellt eine abgewandelte Form von (Scholtz & Pace 1997) dar. Graphisch wurde der natürliche Logarithmus aus $\text{OD}_{\text{MM}} / (\text{OD}_{\text{c}} - 1)$ gegen die eingesetzte Metallkonzentration aufgetragen. Der IC_{50} -Wert stellt sich als Schnittpunkt mit der Y-Achse dar.

2. Materialien & Methoden

Formel 4:
$$OD(c) = \frac{OD(MM)}{(1 + \text{EXP}[(c - IC50)/b])}$$

2.3.3. CAS-Assay

Zum Nachweis von Fe- Aufnahmekapazitäten wurden die jeweiligen *Cupriavidus*-Stämme zu einer synchronen spätstationären Phase in einer 24 h-Mittelkultur angezogen. Diese war 5 %ig mit einer Vorkultur in der frühstationären Phase beimpft. Auf eine CAS-Agarplatte wurden 2,5 µl einer 10⁻⁴-Verdünnung aufgetragen und bei 30 °C über mehrere Tage kultiviert. Nachfolgend wurde der Hof um die Kolonie dokumentiert und quantifiziert.

2.3.4. Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Zn⁶⁵

Um die Dynamik der Aufnahmekapazität an Zink der einzelnen *Cupriavidus*-Stämme zu beschreiben wurde nach Nies & Silver 1989 das Aufnahme-Experiment in abgewandelter Form mit der Filtrierungsmethode durchgeführt.

Die Zellen wurden in Tris-gepuffertem Minimalmedium ohne Zusatz von Eisencitrat und SL6 (Pfennig 1974) und mit 1 mM MgCl₂ (Kirsten *et al.* 2011) bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Dabei wurde die 10 ml-Hauptkultur 4-5%ig aus einer Vorkultur in der frühen stationären Phase beimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Mit einer optischen Dichte von 1,0 bis max. 1,25 (180 - 200 KE) erfolgte die Ernte bei 4 °C durch Zentrifugation (3600 x g, 15 min) in einem 50 ml Greiner (Bio-Rad GmbH, München). Die Zellen wurden zweimal mit dem eiskalten Waschpuffer [10 mM Tris-HCl pH 7,0] gewaschen und anschließend in diesem zu einer OD₆₀₀ von 0,5 gelöst. Jeder Stamm wurde zweimal zu 1,6 ml für eine technische Reproduktion der erhaltenen Daten aliquotiert. Zum Abschluss der Aufnahme-Experimente wurde die Dichte mit dem Klett-Summerson-Colorimeter bestimmt, wobei sich aufgrund der eingestellten OD₆₀₀ ca. 100 KE ergaben. Diese Zelldichte in KE wurde für anschließende Berechnungen und zur Bestimmung des Trockengewichts verwendet (Formel 1). Die Vermessung der auf Eis gelagerten Zellen erfolgte innerhalb der nächsten 3-5 Stunden.

Zu Beginn der Messung wurden Zellen für 2 min bei 30 °C auf einem Thermoblock inkubiert. Die Messung startete durch die Zugabe von 1 µM Zn⁶⁵Cl₂ (37 MBq, PerkinElmer, Massachusetts, USA) zu ca. 30 000 *counts per minute* (cpm) je 300 µl Probenvolumen. Nach definierten Zeitintervallen (0,25; 0,5; 1, 2 min) wurden 300 µl über einen NC 45-Filter

2. Materialien & Methoden

(Schleicher und Schüll, Dassel) filtriert. Unspezifisch gebundenes Zink wurde durch zweimalige Waschung des Filters mit 6 ml 10 mM Tris-HCL mit 10 mM MgCl₂ entfernt. Die Filter wurden mit 4 ml Ready Safe™ Liquid Scintillation *Cocktail for Aqueous Samples* (Beckmann Coulter, NC, USA) in einem Mini-Poly-Q-Röhrchen im Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb® 2810 TR (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) vermessen. Die gemessene Radioaktivität bei einer Zählzeit von 2 min wurde in cpm angegeben. Als Extremwerte wurden ungefilterte 300 µl Probenvolumen und ein Ansatz ohne Zellen gemessen. Die Bestimmung des aufgenommenen Zinks je Zeitpunkt lässt sich nach Formel 5 berechnen.

$$\text{Formel 5: } \frac{\text{nmol } ^{65}\text{Zn}^{2+}}{\text{mg TG}} = \frac{0,3 \cdot X_{\text{cpm}}}{\text{max. cpm}} / (\text{TG (mg)} * 0,3)$$

2.4. Molekulargenetische Methoden

2.4.1. DNA-Isolation

Für die Isolation von DNA wurden verwendete Geräte und das H₂O dest. zur Elution bei 121 °C für 20 min autoklaviert, um vorhandene DNasen zu inaktivieren. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C. Die Zellen für die DNA-Isolation konnten durch 5 min Zentrifugation bei RT und 12000 rpm (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, ca. 6-8000 x g) vom Medium abgetrennt werden.

2.4.1.1. Isolation von genomischer DNA aus *C. metallidurans*

Für die Isolation der Gesamt-DNA aus *C. metallidurans* (AE104) wurden 750 µl einer 4 ml Vorkultur verwendet. Das nach dem Zentrifugationsschritt erhaltene Zellpellet wurde für die Isolation mittels *GenJet Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Elution der DNA erfolgte mit 200 µl sterilem dest. Wasser. Die erhaltene genomische DNA wurde qualifiziert sowie quantifiziert und diente sowohl als Template für DNA-Amplifikationen als auch für Southern-Experimente.

2. Materialien & Methoden

2.4.1.2. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mittels des *GenJet* Plasmid *Miniprep* Kit's (Thermo Fisher Scientific, USA) erfolgte die Plasmid-DNA-Isolation in der superhelikalen ccc-Form aus einer 4 ml *E. coli*-Vorkultur nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA fand in 30 bzw. 50 µl dest. Wasser statt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde für Restriktionsreaktionen, Sequenzierungen und für Transformationen von *E. coli* - Stämmen verwendet.

2.4.2. DNA-Techniken

2.4.2.1. Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Die Restriktion von 0,8 – 1,5 µg Plasmid- bzw. genomischer DNA (Southern) erfolgte nach Herstellerangaben. Die Spaltung fand bei der für das verwendete Enzym entsprechenden Temperatur (25 °C bzw. 37 °C) über Nacht in dem entsprechenden 1x Reaktionspuffer mit 1-2 U Enzym bzw. 20 U für Southernexperimenten statt. Für Restriktionen mit zwei Enzymen wurde der NEB *Double Digest Finder* (<https://www.neb.com/tools-and-resources>) hinzugezogen, um die optimalen Bedingungen für die enzymatische Restriktion herauszufinden.

2.4.2.2. DNA-Reinigung und Konzentrierung

Die Reinigung von DNA aus PCR- oder Restriktionsansätzen von Enzymen und Bestandteilen des jeweiligen Puffers erfolgte über das *GenJet PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). Chaotrope Salze sorgten hierbei für die Denaturierung der Proteine und die Bindung der DNA an die Silika-Membran. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution in 30-50 µl dest. Wasser.

2.4.2.3. DNA-Reinigung aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA in einem 1 %igen Agarosegel erfolgte die Isolation des fragmententhaltenen Agarosebereichs zügig über einem UV-Tisch. Unter Verwendung eines Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden) bzw. Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg) und des QIA quick[®] Gel Extraktion Kit's (QIAGEN, Venlo, NL) wurde die Reinigung nach Herstellerangaben durchgeführt. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl dest. Wasser aufgenommen.

2. Materialien & Methoden

2.4.2.4. Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Mengen wurden durch Vergleich der Intensitäten in einem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel mit Hilfe des Markers als Referenz bestimmt. Dies galt im Besonderen für Plasmid- und Fragment-DNA in Ligationsansätzen. Für eine genaue Bestimmung der Konzentration diente der NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Anhand der Extinktion bei OD₂₆₀ und der Schichtdicke des Probevolumens konnte die Konzentration bestimmt werden. Dabei entspricht die OD₂₆₀ bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Die angegebenen Quotienten OD_{260/280} bzw. OD_{260/230} wiesen auf die Qualität des Isolates hin und gaben Auskunft über Lösemittel- und Proteinverunreinigungen.

2.4.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA erfolgte die Auftrennung über ein 0,8 - 1 %iges Agarosegel in einer horizontalen Flachbett-Elektrophorese (Easy Cast™ Electrophoresis System, Thermo-Fischer Scientific, USA). Die Agarose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde in 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA (pH 8,0)] durch Erhitzen gelöst. Nach einer Abkühlzeit auf 50 °C erfolgte die Zugabe von 50 µg Ethidiumbromid (250 ng/µl, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) je 100 ml Agarose. Nach Verfestigung wurden die DNA-Proben mit 0,2 Volumen 5 x DNA-Ladepuffer [40 % (v/v) Glycerin, 0,1 g/l SDS, 0,1 M EDTA, ± 2,5 g/l Bromphenolblau (BPB)] versetzt und in vorgefertigte Geltaschen eingefüllt. Das Auftragungsvolumen betrug für analytische Zwecke 8 µl und für präparative 20 – 80 µl. Die Auftrennung erfolgte bei 80 - 120 V (Biometra® Standard Power Pack P25, Göttingen bzw. Phero-stab 300 Electrophoresis Powersupply, Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen) bis zur ausreichenden Auftrennung der DNA-Fragmente. Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Signale wurden unter UV-Licht mit dem UV-Transilluminator in Kombination mit dem Image-Master (INTAS UV-Systeme, Göttingen) visualisiert und dokumentiert.

2.4.2.6. DNA- Größenstandards

Die Größenbestimmung von linearen DNA-Fragmenten im Agarose-Gel wurde mit folgenden kommerziell angebotenen DNA-Markern realisiert:

- Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder (Thermo Scientific, USA) mit den Größen:

2. Materialien & Methoden

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 2000 sowie 3000 bp.

- Quick-Load ® 1 kb DNA-Ladder (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) der Größen: 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10 000 bp.
- DNA Molecular Weight Marker VII, Dig-labeled (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim): 81, 359, 492, 710, 718, 992, 1164, 1482, 1515, 1882, 1953, 2799, 3639, 4899, 6106, 7427, 8576 bp.

2.4.2.7. Dephosphorylierung von DNA

Für eine effiziente Ligation wurde der gespaltene Vektor mittels der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Dabei erfolgte die Reaktion in 20 µl mit einfacher Pufferkonzentration an NEB *CutSmart*® *buffer* und 1 U an *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP, New England Biolabs, Ipswich, USA) für mindestens 1h bei 37 °C nach Herstellerangaben. Das Enzym wurde bei 65 °C inaktiviert.

2.4.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Gesamtvolumen von 20 bzw. 30 µl fand die Ligation zwischen Vektor und DNA-Fragment, deren Verhältnis ca. 1:5 betrug, über Nacht mit einem Temperaturgradienten (auf Eis bei RT) oder bei 4 °C statt. Zuvor wurde das Fragment-Vektorgemisch für 10 min bei 45 °C inkubiert, um die kohäsiven Enden freizulegen. Es folgte die Abkühlung auf Eis und die Zugabe des T4-Ligase-Puffers in einfacher Konzentration und 1 U T4-DNA-Ligase (Thermo Fischer Scientific, USA).

2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen Vervielfältigung von DNA-Material, um genetische Sachverhalte zu untersuchen bzw. für präparative Zwecke DNA zur Verfügung zu stellen. Die verwendeten Primer (Anhang: Tabelle: 17) wurden über Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Morrisville, NC, USA) erstellt und über die metabion GmbH (Planegg/Steinkirchen) in lyophilisierter Form bezogen. Eine 100 pmol/ µl Primer-Stammlösung und eine 10 pmol/ µl Arbeitslösung wurden mittels sterilem H₂O bidest. erstellt und bei -20 °C gelagert.

2. Materialien & Methoden

Die *Q5 high fidelity* DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Schwalbach im Taunus) wurde wegen der 3'-5' Exonukleaseaktivität für die Durchführung präparativer PCR-Reaktionen an der GC-reichen Template-DNA genutzt. Für analytische PCR-Analysen oder PCR-Fragmente, die in EMSA-Experimenten verwendet wurden, waren mit der *Taq*-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt worden. Das Reaktionsendvolumen betrug jeweils 50 µl und deren Zusammensetzung ist im Folgenden aufgeführt.

analytische PCR (<i>Taq</i>)	µl	präparative PCR (<i>Q5</i>)	µl
Template-DNA	2	Template-DNA	1
dNTP –Mix (je 10 mM)	1	dNTP –Mix (je 10 mM)	1
10 x PCR-Puffer	5	5 x <i>Q5</i> -Puffer (GC-reich)	10
		5 x <i>Q5</i> Enhancer-Puffer	10
Primer I (10 pmol/ µl)	1	Primer I (10 pmol/ µl)	2,5
Primer II (10 pmol/ µl)	1	Primer II (10 pmol/ µl)	2,5
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (1U/ µl)	1	<i>Q5</i> DNA-Polymerase (1U/ µl)	0,5
H ₂ O bidest.	39	H ₂ O bidest.	22,5

Als Template-DNA diente isolierte genomische DNA (1:25/ 50), Plasmid-DNA (1:25) oder DNA aus *E. coli.*- bzw. *C. metallidurans*-Zellen. Letztere wurden zuvor in 50 µl H₂O bidest. resuspendiert und anschließend bei 95 °C für 10 min aufgeschlossen. Der Überstand nach einem Zentrifugationsschritt enthielt die Template-DNA.

Für eine Optimierung der PCR-Resultate bei GC-reichen Templates wurde bei analytischen PCR-Reaktionen DMSO (5 % (v/v)) und / oder Betain (1 M) hinzugegeben (Musso *et al.* 2006). Die Reaktionen wurden in einem PCR-Block (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen) nach folgenden Protokollen durchgeführt. Dabei richteten sich die *Annealing*-Temperatur nach dem jeweiligen eingesetzten Primerpaar und die Extentionszeit nach dem zu erwarteten PCR-Produkt.

2. Materialien & Methoden

		Taq-Polymerase		Q5 high fidelity Polymerase	
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	98 °C	30 s
2.	Denaturierung	95 °C	30 s	98 °C	10 s
3.	Anealing	X °C	30 s	X °C	30 s
4.	Extention	72 °C	60 s/ kbp	72 °C	30 s/ kbp
5.	Zyklen	Schritt 2-4: 28-30 x		Schritt 2-4: 28-30 x	
6.	Nachsynthese	72 °C	5 min	72 °C	2 min
7.	Pause	8 °C	∞	8 °C	∞

2.4.4. Quick-Change site-directed Mutagenese (modifiziert)

Die *Quick-Change site-directed Mutagenese* (Stratagene Cloning Systems, Heidelberg) diente dem Austausch von bis zu zwei Basenpaaren, um einen Aminosäuren-Austausch in einer Zur-Variante zu erzeugen. Die Durchführung erfolgte in modifizierter Form nach Zheng *et. al* 2004. Hierfür wurde das Templateplasmid aus einem dam⁺- *E. coli*-Stamm (XL1 blue) für eine PCR mit der Taq-Polymerase eingesetzt. In dieser erfolgte die Amplifizierung des gesamten Plasmides (pASK-IBA 3/7⁺::zur, ca. 3 kbp) mittels zweier zueinander teilweise komplementären Primern, die den Basen-Austausch beinhalten. Die PCR durchlief folgendes Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	7 min	Zyklen	Schritt 2-4: 16 X	
Denaturierung	95 °C	1 min	Nachsynthese	72 °C	1 h
Annealing	61 °C	1 min	Pause	8 °C	∞
Extention	72 °C	5 min			

Eine Restriktion mit *DpnI* sorgte für die Degradierung der methylierten Template-DNA. Nach Prüfung der PCR über eine Gelelektrophorese und der Plasmidisolierung erfolgte der direkte Einsatz für die Transformation CaCl₂-kompetenter Zellen. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung sichergestellt.

2. Materialien & Methoden

2.4.5. Sequenzierung über kommerziellen Anbieter

Zur Sicherstellung der Korrektheit von Konstrukten und Vektoren wurden alle verwendeten Plasmide durch die Microsynth AG (Lindau) sequenziert. Ein 15 µl Sequenzieransatz in einem Mikro-Schraubdeckelröhrchen (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht) beinhaltete 30 pmol des Sequenzier-Primers und bis zu 1,5 µg Plasmid-DNA. Zur Auswertung der Sequenzier-Rohdaten wurden DNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank (Nation Center for Biotechnology Information) herangezogen und mittels Clone Manager 9 professional (Scientific & Educational Software, USA) durch Sequenzalignments verarbeitet.

2. Materialien & Methoden

2.4.6. Erstellung von Deletionsmutanten über das *cre-lox*-System nach

(Marx & Lidstrom 2002)

Die Erstellung markerloser Mutanten wurde am Beispiel der Deletion von *zur* im Folgenden beschrieben.

Mittels der Primer für die *cre-lox*-Deletionen (Anhang: Tabelle 17) erfolgten per PCR die Amplifizierung von ca. 300 bp stromauf- und abwärts der codierenden Sequenz und das Einfügen der benötigten Restriktionsschnittstellen. Unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NotI*, *NcoI*, *AgeI* und *ApaI* wurden die sequenzierten PCR-Fragmente in dem Ausgangsplasmid pECD1002, einem Derivat von pCM184 (Scherer & Nies 2009), an den *multi cloning sites* eingebracht und somit im Falle des Vektors für die Deletion von *zur* pECD1337 erzeugt. Dieses enthielt neben der stromauf- und abwärtigen Region des Zielgens u. a. eine Kanamycin-Resistenzkassette mit flankierenden *loxP*-Motiven, denen sich die zwei *multicloning sites* anschlossen. Es ist anzumerken, dass die *loxP*-sites im Vergleich zu pCM184 einer Veränderung unterzogen wurden und die somit resultierende *loxP*-Narbe nicht mehr durch die Cre-Rekombinase erkannt werden konnte (Scherer & Nies 2009). Dies ist notwendig, um höherrangige Deletionen zu erzeugen. Das erstellte Plasmid wurde über den transformierten *E. coli*-Stamm S17/1 in den gewünschten *C. metallidurans*-Stamm per Konjugation eingebracht. Als Selektionsmarker dienten die Kanamycin-Kassette als Nachweis der erfolgten Rekombinationsereignisse und die *tet*-Kassette für das Vorhandensein des Vektor-Rückgrads. Des Weiteren wurde die codierte Levansucrase als Selektionsdruck für das zweite Rekombinationsereignis genutzt. Dieses Exoenzym spaltet die enthaltene Saccharose im Medium zu Levan und belastet so vermutlich das Periplasma gramnegativer Bakterien (Pelicic *et al.* 1996). Nach der Integration von pECD1337 und zwischenzeitlicher Bildung eines Cointegrates geht die erhaltene *tet*-Resistenz samt Vektor-Rückgrad verloren und das Zielgen mit Start- sowie Stopcodon wurde durch die *kan*-Kassette mit flankierenden *loxP*-sites ersetzt. Durch Expression der Cre-Rekombinase über pCM157 erfolgte die Erkennung der beiden *loxP*-Motive und die Exzision der Kanamycin-Kassette. Die zurückbleibende *loxP*-Narbe konnte nicht weiter durch die Cre-Rekombinase erkannt werden. Die erfolgreiche Deletion wurde über PCR Fragmentgrößenanalyse und Southern Blot nachgewiesen.

2. Materialien & Methoden

2.4.7. Bestätigung der *Cupriavidus*-Mutanten via DNA-DNA-Hybridisierung

(Southern 1975)

Für den Nachweis der Deletion von Genen in AE104 wurde neben einer spezifischen PCR auch die Hybridisierung des Zielbereichs mit einer mit Digoxigenin markierten Sonde genutzt, um einen größeren Sequenzbereich abzudecken.

2.4.7.1. Herstellung der DIG-markierten Sonde

Zunächst wurde ein ca. 300 bp großes DNA-Fragment der proximalen Region des untersuchten Gens (*furA*: 5', *furB* und *zur*: 3') unter Verwendung der *cre-lox*-Primer amplifiziert. Nach der Reinigung des PCR-Fragmentes erfolgte die DIG-Markierung über das DIG-DNA *Labeling and Detection Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) über ein *random priming* mit Digoxigenin-11-dUTP. Hierfür wurde zunächst 1 µl gereinigtes PCR-Produkt in 15 µl Gesamtvolumen bei 100 °C für 10 min inkubiert und nachfolgend auf Eis abgekühlt, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Nach Zugabe von jeweils 2 µl Hexanukleotid-Mix (10 x) und dNTP-labeling Mix (10 x) sowie 2 U Klenow-Enzymen (1 µl) wurde über Nacht bei 37 °C die markierte DNA-Sonde erstellt. Die Reinigung der Sonde erfolgte per Ethanol-Fällung bzw. *GenJet PCR Purification Kit* (Quiagen). Vor dem Einsatz wurde die DNA der markierten bzw. unmarkierten Sonde durch 10 min bei 100 °C und nachfolgender Inkubation auf Eis einzelsträngig. Die Sonde wurde in der Hybridisierungslösung mehrfach verwendet und bei -20 °C gelagert.

2.4.7.2. DNA-DNA-Hybridisierung

Dabei wurden je nach Isolat 30 - 40 µl genomische DNA (0,8 – 1,2 µg) mit ausgewählten Restriktionsenzymen (*furA*: *NotI*; *furB*: *MunI*, *NotI*; *zur*: *SphI*, *NotI*) in einem Ansatz von 80 µl über Nacht bei 37 °C verdaut. Es folgte die Auftrennung über ein 0,8 %iges Agarosegel bei 80 V und max. Stromstärke. Als Größenstandard dienten 7 µl Dig labeled DNA *Molecular Weight Marker VII* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Die BPB-Front diente als Indikator für die jeweiligen Inkubationszeiten. Der erfolgte Verdau wurde unter dem UV-Licht bewertet. Es folgte die schwenkende Inkubation des Agarosegels in 0,25 N HCl-Lösung, bis sich die BPB-Front gelb färbte. Nachfolgend wurde in Denaturierungspuffer [0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl] und danach in Neutralisierungspuffer [0,5 M Tris-HCl pH 7,5 und 3 M NaCl] für jeweils 20 min geschwenkt. Zwischen den

2. Materialien & Methoden

einzelnen Schritten wurde mit dest. Wasser gespült. Dies führte zur Spaltung der aufgetrennten DNA-Fragmente in kleinere Bruchstücke und zu einzelsträngiger DNA. Der Transfer auf eine Nylonmembran (QIAGEN, Hilden), welche zuvor 20 min in dest. Wasser, 10 min in 10 x SSC-Puffer [0,15 M Na-Citrat pH 7; 1,5 M NaCl] und anschließend kurz wieder mit dest. Wasser inkubierte, wurde durch einen Kapillarblot über Nacht oder einem Vakuum-Blot innerhalb von 2 h und 50 mBar realisiert. Auf die getrocknete Membran wurden jeweils 0,5 µl markierte und unmarkierte Sonde als Kontrolle der gelabelten Sonde bzw. der Hybridisierung aufgetragen. Durch 5-minütige Inkubation unter UV-Licht erfolgte die kovalente Bindung der DNA mit der Membran. Zunächst wurde die Membran 1 h bei 65 °C mit einer Prähybridisierungslösung [15 ml: 5 x SSC; 1 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim); 0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin; 0,02 % (w/v) SDS] behandelt. Die Inkubation mit der Sonde erfolgte in 5 ml Hybridisierungslösung [Prähybridisierungslösung mit 5 µl Sonde] bei 65 °C über Nacht. Zunächst wurde die Membran 2 x 5 min mit Waschpuffer 1 [2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS] bei RT und nachfolgend 2 x 15 min mit Waschpuffer 2 [0,1 x SSC 0,1 (w/v) SDS] bei 65 °C inkubiert.

2.4.7.3. Detektion der DIG-markierten Sonde

Die Nylonmembran wurde mit Waschpuffer 3 [0,1 M Maleinsäure pH 7,5 0,15 M NaCl 0,01 % (v/v) Tween 20] für 1 min äquilibriert und mit 50 ml Blockierungspuffer [0,1 M Maleinsäure pH 7,5; 0,15 M NaCl; 1 % (w/v) *Blocking* Reagenz (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)] für 30 min blockiert. Anschließend wurde die Membran im gleichen Puffer mit 2 µl Anti-DIG-AP-(Fab-Fragment)-Konjugat (1:25000; Roche Diagnostics GmbH) für weitere 30 min behandelt. Der überschüssige Antikörper wurde mittels zweier Inkubationsschritte mit je 50 ml Waschpuffer 3 für 15 min entfernt. Die Membran wurde mit Puffer 3 [0,1 mM Tris-HCL pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl₂] inkubiert. Es folgte die Benetzung der Nylonmembran mit der Substratlösung [495 µl Puffer 3 mit 5 µl CSPD (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)] für 5 min bei RT. Nach Entfernung überschüssiger Substratlösung erfolgte das Einschweißen in Folie und die Inkubation bei 37 °C (15 min). Anschließend wurde für mindestens 2 h ein Röntgenfilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) exponiert und nachfolgend entwickelt.

2. Materialien & Methoden

2.4.8. DNA-Transfer und Selektion von Klonen

2.4.8.1. Erzeugung CaCl₂-kompetenter Zellen

Zur Erzeugung CaCl₂-kompetenter Zellen (Dagert & Ehrlich 1979) wurden 100 ml LB Lennox 2 %ig mit einer LB-Vorkultur der *E. coli*-Stämme XL1 blue, DH5α, S17/1 oder BL21 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm erfolgten alle weiteren Schritte bei 4 °C bzw. auf Eis. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Hettichzentrifuge: 4 °C, 10 min., ca. 3400 x g) geerntet und das Pellet in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen mit 2 ml der CaCl₂-Lösung versetzt und bei 4 °C über Nacht gelagert. Für die Aufbewahrung bei – 80 °C wurden die Zellen mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 25 % (v/v) versetzt und zu je 100 µl aliquotiert.

2.4.8.2. Transformation von chemisch-kompetenten Zellen nach Sambrook *et al.* 1989

Zum Transformieren von CaCl₂-kompetenten Zellen wurden 1 µl Plasmidisolat bzw. 10-20 µl Ligationsansatz 30 min ruhend auf Eis miteinander inkubiert. Dem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 90 s folgte eine kurze Ruhephase auf Eis. Zur Regeneration und Expression der Gen-vermittelten Resistenz wurden die Zellen 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurde auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika und Zusätzen über Nacht bei 37 °C selektiert.

2.4.9. Konjugation als Transfer zwischen *E. coli* und *C. metallidurans*

Der Transfer erfolgte vom plasmidhaltenden S17/1 *E. coli* zum *C. metallidurans*-Stamm. Hierfür wurden jeweils 200 µl einer *E. coli* Übernachtskultur und einer *C. metallidurans*-Vorkultur auf einer Nähr-Agarplatte plattiert und über Nacht bei 30 °C kultiviert. Darauf folgend wurde per Impföse oder Abschwemmung mit 1 ml Tris-MM die gewünschten Klone auf Tris-MM-Agar mit den entsprechenden Zusätzen übertragen und für weitere 3-5 Tage inkubiert. Auf Grund der Auxotrophien des verwendeten *E. coli*-Stammes war ein Wachstum auf dem *C. metallidurans*-spezifischen Medium für *E. coli* nicht möglich. Des Weiteren wurden Antibiotikakonzentrationen verwendet, bei denen der S17/1-Stamm nicht mehr wachsen konnte, jedoch der entsprechende *C. metallidurans*-Stamm mit dem erworbenen Resistenzgen. Die Resistenzen und somit die Aufnahme des Vektors wurde durch eine nochmalige Übertragung auf Selektivmedium überprüft.

2. Materialien & Methoden

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Protein-Expression und -Reinigung

Für die rekombinante Expression wurde das *Strep-tag*^{®II} *purification system* durch die Verwendung der Plasmide pASK-IBA7⁺ sowie 3⁺ genutzt. Die Aminosäuresequenz des *Strep-tag*^{® II} WSHPQFEK befindet sich je nach verwendetem Vektor am N- bzw. C-terminalen Ende des Fusionsproteins mit weiteren Aminosäuren, die auf dem Linker oder der Verwendung des plasmidinternen Start- und Stopcodons beruhen. Durch die relativ kurze *Strep-tag*-Sequenz wird die Affinitätschromatographie unter physiologischen Bedingungen ermöglicht, eine *Strep-tag* beruhende Metallbindung ausgeschlossen und weder die Proteinlokalität noch dessen Faltung negativ beeinflusst. Eine Anhydrotetracyclin (AHT) - abhängige Induktion der Genexpression ist durch den verwendeten *tet*-Promotor realisiert. Zusätzlich wird durch die Verwendung von pASK-IBA 7⁺ die Abspaltung des *Strep*-tags mittels Faktor Xa ermöglicht.

2.5.1.1. Zellanzucht, Induktion und Zellernte

Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wurde mit den jeweiligen Expressionsvektoren transformiert. Mittels einer Übernachtskultur (LB, 37 °C, 200 rpm) wurden die LB-, Tris-MM *E. coli*-Hauptkulturen 2 %ig im Erlenmeyer-Kolben angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,5 - 0,8 erfolgte die Induktion mit 0,07 - 0,2 µg/ml AHT für weitere 2-3 h schüttelnd bei 16, 30 bzw. 37 °C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (V < 0,5 l: 20 min, 4500 x g und 4 °C Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg; V < 0,5 l: 30 min, 3840 x g, 4 °C Sorvall-Zentrifuge SLA3000, Thermo Scientific) geerntet. Eine Lagerung der Pellets fand bis zur Verwendung bei – 20 °C statt.

2.5.1.2. Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung für Proteinreinigung

Rohextrakt für Proteinreinigung

Das Zellpellet wurde mit 3 ml Puffer W (100 mM Tris-HCL pH 8,0), 150 mM NaCl) je Gramm Feuchtgewicht resuspendiert. Des Weiteren dienten 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor und 10 µg/ml DNaseI zum Abbau der genomischen sowie Plasmid-DNA. Die Zellen wurden per Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) mit 10 Zyklen á 30 s

2. Materialien & Methoden

mit der Intervalleinstellung 70 % und 80 W Leistung auf Eis aufgeschlossen. Das Rohextrakt wurde von den Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 20800 x g, 4 °C für 20 min (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg) abgetrennt

2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

2.5.2.1. Kalkulation anhand OD₆₀₀/ KE

Anhand der Optischen Dichte kann eine gleichmäßige Nutzung von Zellmaterial gewährleistet werden, z. B. für die Auftragung von Proteinproben auf eine denaturierende PAGE oder bei der Berechnung der spezifischen Aktivitäten bei Genexpressionsanalysen. Für *E. coli* - Zellen wurde die Formel 6 und für *C. metallidurans* Formel 1 verwendet.

Formel 6:
$$\text{Protein} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = 0,2943 \times \text{OD600}$$

2.5.2.2. Bestimmung mittels BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Rohextrakten wurde mit dem *Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination* (Sigma-Aldrich, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Bestimmung basiert auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺. Anhand einer Kalibrationskurve mit *bovin albumin serum* (BSA) erfolgte die Feststellung der Proteinkonzentration bei 562 nm im Tecan infinite 200 (Tecan Group, Schweiz).

2.5.2.3 Bestimmung nach Bradford (1976)

Mittels einer einfachen Roti[®]-Quant-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) wurde der Fortschritt bei der Proteinreinigung und beim Pufferwechsel über eine PD10-Säule überprüft. Dabei wurden 25 µl Fraktionslösung mit 200 µl 5fach verdünnter Roti[®]-Quant-Lösung versetzt. Anhand der Blaufärbung konnte jede Fraktion auf enthaltenes Protein geprüft werden.

2. Materialien & Methoden

2.5.2.4. Bestimmung am NanoDrop® ND-1000

Mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und den theoretischen Parametern Extinktionskoeffizient und der Molekularmasse wurde die Konzentration gereinigter Proteine bei OD₂₈₀ bestimmt. Durch das Expasy-Server tool Protparam (Walker 2005) wurden diese Werte anhand der Aminosäuresequenz bestimmt. Tabelle 4 zeigt die Aminosäureanzahl, den Extinktionskoeffizienten und das theoretische Molekulargewicht der einzelnen Proteine und Proteinderivate.

Tabelle 4: Theoretische Werte der untersuchten Proteine

Protein \ Tag		Native	N	C	Faktor Xa	
FurA	As	143	173	169	158	
	Mr	16432	19878	19323	18093	Da
	ε	4720	10220	10220	4720	M ⁻¹ cm ⁻¹
FurB	As	157	184	180	169	
	Mr	17853	20955	20400	19169,6	Da
	ε	4720	10220	10220	4720	M ⁻¹ cm ⁻¹
Zur	As	169	199	195	184	
	Mr	18481	21928	21373	20142,6	Da
	ε	7365	12865	12865	7365	M ⁻¹ cm ⁻¹
Zur C119S	As	169	199	195	184	
	Mr	18465	21912	21357	20126,5	Da
	ε	7240	12740	12740	7240	M ⁻¹ cm ⁻¹
Rmet3456	As	149	179	175	164	
	Mr	17031	20477,8	19923,2	18692,8	Da
	ε	6335	11835	11835	6335	M ⁻¹ cm ⁻¹

*Theoretische Werte für die gereinigten Proteine mit C-terminalen (C), N-terminalen (N) *Strep*-tag sowie nach der Spaltung mit Faktor Xa bei N-terminalen markierten Varianten.

2.5.3. Konzentrierung von Proteinen

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen ohne Erhöhung der Pufferkonzentration wurde auf die Ultrazentrifugationseinheit Vivaspin 20 10.000 MWCO PES mit einer Porengröße von

2. Materialien & Methoden

10 kDa (Sartorius AG, Göttingen) zurückgegriffen. Die Säulen wurden vor dem Einsatz mit 2 x 20 ml des verwendeten Puffers (EMSA-Reaktionspuffer bzw. Puffer W) zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, 4 °C, 10 min., 4500 x g). Alle proteinenthaltenden Fraktionen aus Reinigung bzw. Pufferwechsel wurden vereinigt und bis zum entsprechenden Volumen (ca. 0,8 – 1,2 ml) konzentriert. Auf Grund des eingebauten *DeadStop*-Reservoirs war ein Trockenlegen der Säule und somit des Proteins ausgeschlossen. Zur Wiederverwendung wurden die Säulen mehrfach mit Puffer W und 70 % (w/v) Ethanol gewaschen und in 20 % (w/v) Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.5.4. Pufferwechsel

Der Pufferwechsel erfolgte meist vom Elutionspuffer der *Strep*-tag-Reinigung zum EMSA-Reaktionspuffer (ohne DTT). Hierfür wurde die PD10 *Desalting column* (GE Healthcare, UK) verwendet. Die Säule wurde zuvor mit 2 Vol. EMSA-Reaktionspuffer äquilibriert. Die Proteinprobe wurde aufgetragen und durchlief die Säule, wobei die kleineren Salzmoleküle schneller durch die Säulenmatrix wanderten. Dabei war das Probenvolumen kleiner 3,5 ml. Anschließend erfolgte die Auftragung des Zielpuffers zu je 500 µl. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden mittels Roti-Quant[®]-Schnelltest ermittelt und vereinigt.

2.5.5. Lineare denaturierende SDS - PAGE (Laemmli 1970)

Für die Auftrennung von Proteinen im denaturierenden Zustand wurde die lineare denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli (1970) als Mini- bzw. Maxigel für die 2D-Gele genutzt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 5 vorzufinden. Die Proteinproben wurden mit 0,2 % (v/v) 5 x SDS-Ladepuffer (Tris-HCL pH 6,8, 20 g/ l SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,01 g/l Bromphenolblau (BPB) sowie 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Je 25 µg Protein an *E. coli* - Rohextrakt bzw. analog nach der Formel 6 (2.5.2.1.) für ganze Zellen sowie 0,5-10 µg gereinigtes Protein wurden aufgetragen. Von *C. metallidurans* wurde Zellmaterial eingesetzt, was 100 µg TG entspricht (Formel 1). Als Größenstandards dienten der *Streptag*® Proteinmarker PAGE RulerTM Unstained Broad Range Protein Ladder (#26630) mit den Größen 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 250 kDa sowie Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder (#26619) mit den Größen 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa, beide von der Firma Thermo Scientific (USA).

2. Materialien & Methoden

Tabelle 5: Zusammensetzung der denaturierenden PAGE als Mini- bzw. Maxigel (2D-Gele)

Gelzusammensetzung:	<u>2 D-Gele</u>	<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel*</u>	<u>Einheit</u>
1 Gel	10 %	12,5%	15 %	1,83 %	
Acrylamid/ Bisacrylamid (30/ 0,8 %)	12,5	2,5	3	0,33	ml
1,88/ 0,625* M Tris pH 8,8/ 6,8*	7,5	1,2	1,2	0,4	ml
0,5 % (w/v) SDS	7,5	1,2	1,2	0,4	ml
H ₂ O bidest.	10	1,1	0,6	0,87	ml
TEMED	25	5	5	2	µl
10 % (w/v) APS	150	30	30	10	µl

Die Polymerisierung wurde durch die Zugabe des Polymerisierungskatalysators TEMED und dem Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Es folgte das luftblasenfreie Einbringen zwischen zwei Glasplatten und die Überschichtung mit 70 % Ethanol bzw. destilliertem Wasser, um eine saubere Trennlinie zu erzeugen. Nach vollständiger Polymerisierung wurde nach dem Trenn- das Sammelgel mit Kamm für die Formung der benötigten Geltaschen gegossen. Die Glasplatten mit den Gelen wurden in die Laufapparatur (Mini PROTEAN[®] Tetra Cell, Bio-Rad) eingespannt und der 1 x Elektrodenpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS) über den Anoden- bzw. Katodenraum verteilt. Nach Entfernung des Kamms konnten die denaturierten Proteinproben aufgetragen werden und die Elektrophorese erfolgte bei 13 mA/ Gel und maximaler Spannung.

2.5.6. Native PAGE

Die nichtdenaturierende PAGE (Tabelle 6) wurde für die Auftrennung der löslichen aktiven Proteine genutzt, um in EMSA-Experimenten die Interaktion zwischen Protein und DNA zu verfolgen. Die 15 µl Probenreaktion wurde mit 0,21 Vol. des Endvolumens an Beschwerungslösung (10 % (w/v) Saccharose, 10 % Glycerin und 0,1 % (w/v) BPB) versetzt und anschließend auf eine 8 bzw. 10 %ige Native-PAGE aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 13 mA/ Gel und maximaler Spannung in 1 x Elektrodenpuffer (0,1M Tris-Base, 0,1M Glycin).

2. Materialien & Methoden

Tabelle 6: Zusammensetzung der nicht-denaturierenden PAGE (nativ)

Gelzusammensetzung:	<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel</u>	<u>Einheit</u>
	8%	10 %	8 %	
40 % (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	1,12	1,5	0,4	ml
2,5 M Tris-HCL pH 8,5	0,2	0,2	0,2	ml
H ₂ O bidest.	4,28	3,9	1,4	ml
TEMED	5	5	2	µl
10 % (w/v) APS	40	40	15	µl

2.5.7. Färbemethoden für Polyacrylamidgele

2.5.7.1. Gesamt - Proteinfärbung mit Coomassie- *blue* (Weber & Osborn 1969)

Die Proteine in denaturierenden Polyacrylamidgelen wurden mittels Coomassie-blue angefärbt. Hierfür wurden die Gele nach erfolgreicher Elektrophorese mindestens 1h in der Coomassie-Färbelösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 0,005 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250, 42,5 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] rotierend inkubiert. Nachfolgend konnte nicht-gebundener Farbstoff mit einer Entfärbelösung [10 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure] entfernt werden. Für die 2D-Gele wurde bei der Coomassie-Lösung auf Coomassie Brilliantblau G-250 verzichtet.

2.5.7.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach Rabilloud *et al.* 1988 und Nesterenko *et al.* 1994 in modifizierter Form durchgeführt. Die zu färbende PAGE wurde zunächst durch die rotierende Inkubation in einer Ethanol-Methanol 50/ 12 %ige (v/v) -Lösung über Nacht fixiert. Es folgte ein Waschschrift (1 min, 50 % (v/v) Ethanol) und die Inprägnierung mittels 50 ml Präinkubationslösung (1,6 mM Na₂S₂O₃) für weitere 2 min. Das Gel wurde dreimal mit dest. Wasser gewaschen und 20 min in einer frischen Silbernitratlösung [50 ml: 100 mg AgNO₃ (*analytical grade*, Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg), 250 µl 37 % (v/v) HCHO] inkubiert. Durch 3-4-maliges Waschen mit dest. Wasser konnte überschüssiges Silbernitrat entfernt werden. Die Entwicklung bzw. Umsetzung der Silberionen zu elementarem Silber wurde in einer frischen Entwicklerlösung [50 ml: 3g NaCO₃, 0,5 mg Na₂S₂O₃, 35 µl 37 % (v/v) HCHO] bis zur Visualisierung der Proteine bzw. DNA durchgeführt. Die Reaktion in

2. Materialien & Methoden

dem zuvor mit dest. Wasser gewaschenem Gel wurde in einer 50 %igen Methanol, 12 %igen (v/v) Essigsäure-Lösung gestoppt.

2.5.7.3. DNA- Visualisierung mittels Ethidiumbromidalternativen

Als Alternative zur Anfärbung mittels Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml, 5 min) wurden die nicht als karzinogen geltenden Substanzen Midori Green *direct* sowie *advanced* (NipponGenetics, Düren) genutzt. Während Midori Green *direct* zu den EMSA-Reaktionen gegeben werden konnte, war *advanced* für das *poststaining* ausgelegt. Grundsätzlich wurde das Anfärben der Nativ-PAGE nach Herstellerangaben forciert. Dabei wurden 12-20 µl des Midori Green-Farbstoffes in 50 ml 0,7 M Tris-HCL pH 8,5, was dem Puffer des Gels entsprach, für 5-10 min inkubiert. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgten über einem UV-Tisch (INTAS UV-Systeme, Göttingen).

Eine weitere Möglichkeit ist das Anfärben mittels Methylenblau. Hierfür wurde das Gel in einer 300 mM Natriumacetat-Lösung pH 5,2 mit 0,03 % (w/v) Methylenblau für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung schüttelnd mit dest. Wasser, bis die Signale der DNA klar vom Hintergrund unterscheidbar waren. Eine komplette Entfärbung war über Nacht mit dest. Wasser möglich, um das Gel für weitere Färbemethoden vorzubereiten.

2.5.8. Elektrophoretischer Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

Der Proteintransfer diente als Vorarbeit zur Detektion des Proteins mittels Anti-*Streptag* Antikörper-Peroxidasekonjugats. Der Transfer wurde mittels Semi-Dry-Blot in der Blotapparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell bzw. Trans-Blot[®]Turbo[™] Transfer-System, Bio-Rad Laboratories, USA) durchgeführt. Nach erfolgreicher Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten entnommen, mit Wasser gespült und mit der Nitrocellulose-Membran (Porablot NCP, Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren) für 10 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris-HCL, 0,192 M Glycin, 20% (v/v) Methanol) inkubiert. Vier auf Gelgröße zugeschnittene Lagen Blotting-Papier (BF4, 550g/m², VWR International GmbH, Dresden) wurden in Towbin-Puffer getränkt. Es folgte eine blasenfreie Schichtung von zwei Whatman-Papieren, der Nitrocellulosemembran, dem Gel und zwei weiteren Whatman-Papieren. Der Transfer konnte bei konstanter Strom- und Spannungsstärke (3 mA/cm² Gelfläche, 15 V) durchgeführt werden. Die Effizienz wurde durch

2. Materialien & Methoden

Coomassiefärbung des Gels geprüft und die Membran konnte gleich weiterverarbeitet bzw. über Nacht blockiert werden.

2.5.9. Streptag[®] II Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Ein spezifischer Nachweis des *Strep-tag*[®] II an rekombinant erstellten Proteinen wurde durch das Streptactin[®]-Peroxidase-Konjugates realisiert. Nach erfolgreichem Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindestellen mittels *bovin albumin serum* (BSA, Roth) über Nacht bei 4 °C, rotierend in der Blockierungslösung [1 x PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl), 3% (w/v) BSA und 0,5 % Tween 20]. Die Membran wurde nachfolgend 3 x 5 min mit 20 ml PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen. Die Inkubation mit dem StrepTactin[®]-Peroxidase-Konjugates (1:100, Waschpuffer ohne BSA) wurde in 10 ml Wasch-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA und 10 µl des verdünnten Konjugates schüttelnd für eine Stunde bei RT durchgeführt. Es folgten zwei einminütige Waschschrte mit je 15 ml Waschlösung und anschließend einmal mit dem 1 x PBS-Puffer. Die Membranlagerung fand in 1 x PBS statt. Zur Detektion des gebundenen Streptactin[®]-Peroxidase-Konjugates erfolgte im Dunkeln eine 2-3-minütige Inkubation nach der Vereinigung von Lösung A [5 ml, 100 mM Tris-HCL pH 8,0 mit 22 µl p-Cumarsäure und 50 µl Luminol] und Lösung B [5 ml, 100 mM Tris-HCL pH 8,0 mit 4 µl 30 % H₂O₂). Für die Herstellung der Lösungen wurde eine 90 mM Cumarsäure- und eine 250 mM Luminol-Stammlösung in DMSO genutzt. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschlagen und ein Röntgenfilm (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, UK) in einer Filmkassette exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte mittels Entwickler und Fixierer (Adefo Chemie GmbH, Dietzenbach) nach Herstellerangaben.

2.5.10. Erstellung eines UV-VIS-Spektrums

Die Erstellung von UV-VIS-Spektren der produzierten und gereinigten Proteine erfolgte im inaktiven EMSA-Reaktionspuffer, der kein DTT beinhaltet. Die Messung wurde in einer Quarz-Küvette (Helma Analytics, Müllheim) im UVICON 930 Double Beam UV/VIS Spektralphotometer (Tegimenta, Schweiz) gegen den Puffer im Wellenbereich von 200 – 900 nm durchgeführt. Die Extinktion des Puffers wurde von der Extinktion der proteinhaltigen Lösung abgezogen.

2. Materialien & Methoden

2.5.11. *Electrophoretic Mobility Shift-Assay* (Shin et al. 2007)

Für die Protein-DNA-Interaktionsstudien wurden in einem 15 µl Reaktionsansatz gereinigtes Protein unterschiedlicher Konzentration, welches sich im verwendeten Puffer befand, mit 0,2 pmol (0,01333 µM) des jeweiligen zu untersuchenden Promotorbereichs für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Konzentration an DNA-Molekülen wurde anhand der DNA-Konzentration und der Molekülmasse basierend auf der Sequenzlänge bestimmt. Der Reaktionspuffer bestand aus 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM KCl, 5 % (w/v) Glycerin und 1 mM Dithiothreitol (DTT). Weitere optionale Zusätze waren bis zu 100 µM ZnCl₂ und max. 100 µM EDTA. Nach der Inkubation wurden 4 µl des 5 x Nativ-Ladepuffers [10 % (w/v) Saccharose, 10 % Glycerin und 0,1 % (w/v) BPB] zu jeder Reaktion hinzugegeben und über eine 10 %ige mit oder eine 8%ige Nativ-PAGE ohne Sammelgel aufgetrennt. Als Größenstandard diente der Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder (Thermo Scientific, USA). Anschließend erfolgte die Visualisierung der DNA mittels Ethidiumbromid-, Metylenblau oder als Midori Green-Färbung (*advanced* oder *direct*, NIPPON GENETICS EUROPE GmbH, Düren). Durch eine nachfolgende Silberfärbung wurden sämtliche Protein- und auch DNA-Bestandteile angefärbt.

2.5.12. Proteom-Analyse in 2D-PAGE

Um den Einfluss der Deletion von *zur* auf Proteinebene zu ermitteln, wurden die Proteome der beiden Stämme AE104 und Δ*zur* über eine zweidimensionale PAGE analysiert.

2.5.12.1. Zellanzucht, Ernte und Aufschluss

Für die Gewinnung des Rohextraktes wurde mit Hilfe einer Vorkultur in der frühen stationären Phase 150 - 200 ml Hauptkultur 1 %ig Tris-MM mit 25 µM ZnCl₂ beimpft und im Seitenarm-Erlenmeyerkölbchen schüttelnd (250 rpm, KS 500) bei 30 °C über Nacht kultiviert. Die Ernte der beiden *C. metallidurans*-Stämme erfolgte bei einer Zelldichte von 190 KE bzw. bei OD₆₀₀ = 0,8 durch Zentrifugation (20 min, 3600 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 5 ml Probenpuffer [3 % (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS); 7,4 M Harnstoff; 2 M Thio-Harnstoff; 20 mM Tris, 2 % (w/v) Brij 35; 25 µl Carrier Ampholyt (Serva), 40 mM DTT und 1 mM PMSF] versetzt und mit der French Press mit drei Durchgängen bei 1000 psi aufgeschlossen. Ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 8 °C und 3600 x g (Hettich Zentrifuge) sowie eine weitere Zentrifugation (TL100

2. Materialien & Methoden

Ultracentrifuge, Beckmann Coulter, USA, 20200 x g, 45 min, 4 °C) trennten das Rohextrakt vom Zellbruch. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte aufgrund des Aufschlusspuffers mit dem 2D Quant-Kit (GE Healthcare, USA) anhand der Extinktion bei 480 nm (SpektrometerTM 3000 plus) und einer Regressionsgeraden mit BSA.

2.5.12.2. Isoelektrische Fokussierung und 2. Dimension

Für die 2D-Gele wurden je Stamm 300 µg Protein mit dem 2D Clean up Kit (GE Healthcare, USA) nach Herstellerangaben basierend auf einer TCA-Fällung gereinigt und in 200 µl Ladepuffer [7 M Harnstoff, 2 M Thio-Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 20 mM DTT, 0,5 % IPG-Puffer 3-10 (GE Healthcare, UK), 2,5 µl ServalytTM 3-10 Iso-Dalt, ca. 0,2 (w/v) BPB] aufgenommen. In dieser Proteinlösung wurde ein nicht linearer SERVA IPG *BlueStrip* 3-10 (11 cm, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) mit einer SERVA HPETM IPG-Cover Fluid-Überschichtung (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) über Nacht bei RT inkubiert. Hierfür diente eine Rehydrationskammer. Es folgten zwei Inkubationen der IEF-Streifen in Äquilibrationslösung [50 mM Tris pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 2 % (w/v) SDS und 0,01 % (w/v) BPB] für 15 min mit 2 % (w/v) DTT gefolgt von 5 % (w/v) Iodacetamid. Die Auftrennung der Proteine im IEF-Streifen (1. Dimension) erfolgte im Pharmacia Biotech Multiphor II (Schweden) mit HPE-IPG-Overlay nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Programm (EPS 3501 XL Power Supply, Amersham Biosciences/ GE Healthcare, UK).

Tabelle 7: Programmlauf für isoelektrische Fokussierung

Schritt	Spannung (V)	Art	Stromstärke (mA)	Leistung (W)	Zeit (h)
1	300	Gradient	1	5	0,01
2	300	Stufe	1	5	10,5
3	3500	Gradient	1	5	3
4	3500	Stufe	1	5	3,25

Nach 16,5 h haben 20,2 kWh auf die IEF-Streifen gewirkt und sorgten für die isoelektrische Fokussierung. Dies ist an der Wanderung des Bromphenolblaus an die Kathode zu erkennen. Anschließend wurden die IEF-Streifen 5 min im 1 x SDS-Ladepuffer inkubiert und in einer Hoefer Electrophoresis Unit SE 600 Serie (Hoefer Inc., USA) durch eine 10 %ige

2. Materialien & Methoden

denaturierende Maxi-PAGE in 1 x Elektrodenpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS) aufgetrennt. Da die Elektrophorese-Kammer aktiv gekühlt wurde (Multi Temp III (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden), konnte bei max. Stromstärke und bis zu 250 V aufgetrennt werden. Bei der anschließenden Färbung und Entfärbung mit Coomassie wurde nur Coomassie Brilliantblau R250 verwendet. Für die Auswertung der 2D-PAGE diente das Programm Decodon Delta 2D 4.5 (Decodon GmbH, Greifswald).

2.6. Enzymologische Methoden

2.6.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von Genen unter verschiedenen Metallüberschuss bzw. -mangelbedingungen und in diversen Stammhintergründen wurden Operon-*lacZ*-Fusionen basierend auf pECD794-1 erzeugt. Dabei integrierte das Suizidplasmid über die ca. 300 bp große DNA-Sequenz des 3'-Endes des zu untersuchenden Gens. Somit befand sich ein promotorloses *lacZ*-Gen stromabwärts des zu untersuchenden Gens.

2.6.2. Anzucht der *C. metallidurans*-Stämme

Zunächst wurden Vorkulturen in Tris-Minimalmedium der zu untersuchenden Stämme erstellt, welche sich in der frühen stationären Phase (ca. 300 KE, $OD_{600} = 2,0$) befanden. Zur Haltung der Plasmide und im Besonderen von pECD794-1 wurden die entsprechenden Antibiotika (Kan/ Tet) in ihrer entsprechenden Konzentration eingesetzt. Die Hauptkultur erfolgte in Seitenarm-Klettkolben (300 ml) in einem Volumen von ca. 40 ml, bei der die Zelldichte auf 30 KE eingestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 250 rpm (KS 500, HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) für 4-6 h, bis sich die Zelldichte verdoppelt hatte. Nach Erreichen der 60 KE wurden die Kulturen zu 4 ml aufgeteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $CdCl_2$, $NiCl_2$ sowie EDTA für weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurden für jeden Stamm und jede Konzentration zweimal 500 μ l Zellen in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 4 °C und 20800 x g (Eppendorf Zentrifuge R5417, Eppendorf AG, Hamburg) gerntet, bei - 20 °C das Zellpellet gelagert und die optische Dichte bei 600 nm (SpektrometerTM 3000 plus) bestimmt. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde am nächsten bzw. übernächsten Tag durchgeführt.

2. Materialien & Methoden

2.6.3. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach der Beschreibung von (Nies 1992), die in diesem Abschnitt wiedergegeben wird. Die gelagerten Zellpellets wurden mit 950 μ l Puffer Z [60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 und 50 mM β -Mercaptoethanol (frisch), pH 7,0] gelöst (Vortex Heidolph Relax 2000, Heidolph (Kehlheim), VF2 Janke Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen). Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 50 μ l Permeabilisierungslösung [0,25 % (w/v) Cetyltriethylammoniumbromid (CTAB), 0,5 % (w/v) Na^+ -Deoxycholat] für 10 min bei RT aufgeschlossen. Die enzymatische Reaktion startete mit der Zugabe von 100 μ l Substratlösung [4 mg ONPG/ ml Puffer Z] und inkubierte im Wasserbad bei 30 °C. Bei entsprechender Gelbfärbung wurde mit 500 μ l 1M NaCO_3 -Lösung der pH auf 11 erhöht und somit die Reaktion gestoppt. Eine Zentrifugation von 15-20 min bei 4 °C und 20800 x g sorgte für einen klaren Überstand, deren Extinktion bei 420 nm (SpektrometerTM 3000 plus) bestimmt wurde. Nach der Formel 7 erfolgte die Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität in U/ mg Trockengewicht. Dabei ist 1 Unit als Aktivität der Bildung von 1 nmol o-Nitrophenol je Minute bei 30 °C definiert. Die Bestimmung des Trockengewichtes wurde anhand der ermittelten Zelldichte über die Formel 1 nach Schwuchow, 1995 kalkuliert. Da diese Formel von KE-Einheiten ausgeht, wurde durch eine Eichkurve die Umrechnung der optischen Dichte von Klett zur OD_{600} im Bereich von 30 –100 KE ermöglicht.

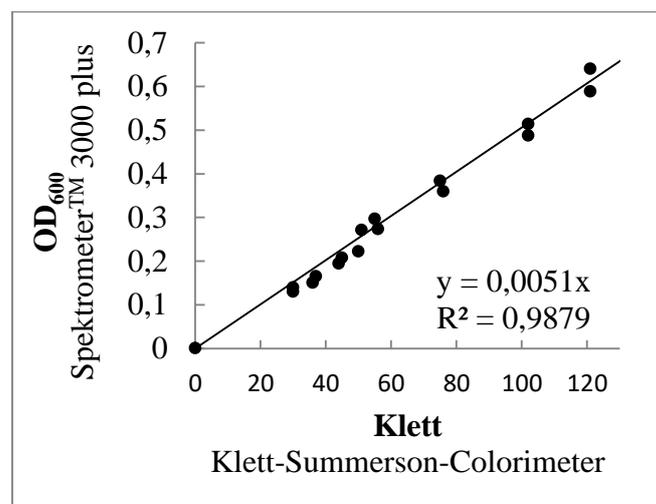


Abb. 3: Umrechnungseichgerade zwischen OD_{600} und Klett-Einheiten. Die optische Zelldichte mehrerer *C. metallidurans*-Kulturen (β -Galaktosidase-Assay) wurde sowohl mit dem SpektrometerTM

2. Materialien & Methoden

3000 plus als auch mit dem Klett-Summerson-Colorimeter bestimmt. Die OD₆₀₀ und KE-Werte sind gegeneinander aufgetragen worden.

Formel 7:
$$\frac{U}{\text{mg TG}} = [355,6 \times \frac{\Delta\text{OD}420}{t(\text{min.})} \times \frac{1000}{V} \times 1000] / \text{TG } (\mu\text{g/ml}) \times 1000$$

TG: Trockengewicht in $\mu\text{g/ml}$ bestimmt nach Eichgerade (Schwuchow, T. 1995)

V: Probenvolumen (hier 500 μl)

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der Deletion der einzelnen Fur-Orthologen auf die Physiologie des *Cupriavidus*-Stammes AE104

3.1.1. Erstellung und Verwendung von markerlosen Deletionsmutanten

Markerlose Deletionsmutanten von Genen der *fur*- und *merR*-Familie wurden mittels des *cre lox*-Systems (Methode: 2.4.6.) erstellt, um den Einfluss der einzelnen Regulatoren auf die Metallhomeostasis und speziell auf die des Schwermetalls Zink zu beurteilen. Für weitere Untersuchungen der Transkription einzelner möglicher Zielgene und Komplementationsexperimente dienten diese Stämme als Grundlage. In Abb. 4 ist die Erstellung einer markerlosen Deletionsmutante am Beispiel des Genbereichs von *zur* schematisch skizziert. Die Kombination aus *furB* und *zur* war die einzige Kombination, die in *C. metallidurans* per mit dem *cre-lox*-System erstellt werden konnte.

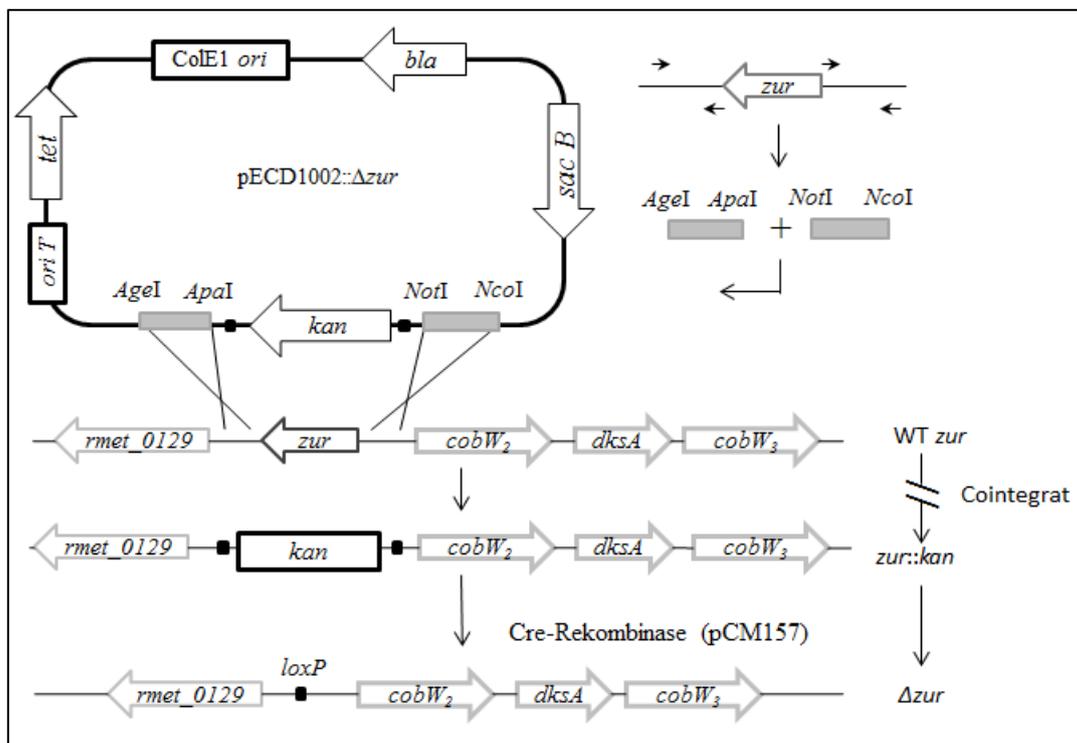


Abb. 4: Erstellung einer Gen-Deletion basierend auf dem *cre-lox*-System in AE104 am Beispiel des Genbereichs von *zur* (modifiziert nach Marx & Lidstrom, 2002). Für die *cre-lox*-Vektoren (Tabelle 2) wurde von dem Rekombinationsvektor pECD1002 ausgegangen. Dieser beinhaltet ähnlich

3. Ergebnisse

pECD1003 (Scherer & Nies 2009) eine mutierte *loxP*₆₆ und *loxP*₇₁-Region, jedoch kein *lacZ*. Der Genbereich von *zur* wurde inklusive Start- und Stopcodon unter Verwendung von pECD1337 im Wildtyp AE104 deletiert. Überprüfung des Stammes erfolgte über PCR und Southern.

Des Weiteren wurde eine Überprüfung der Mutanten per PCR und Southern durchgeführt, bei der die Sonde einen Teil der amplifizierten Sequenzen beinhaltete (Daten nicht gezeigt).

Somit wurden die Einzelmutanten Δ *met3456*, Δ *met2302*, Δ *furA*, Δ *furB*, Δ *zur* sowie die Doppelmutante Δ *furB* Δ *zur* von Stamm AE104 erzeugt. Im Fall von Δ *zur* war die Zugabe von 100 μ M EDTA bei der Kultivierung des *C. metallidurans*-Stammes für das zweite Rekombinationsereignis förderlich. Die Kombination aus *furB* und *zur* war die einzige Kombination, die in *C. metallidurans* per *cre-lox*-System erstellt werden konnte.

3.1.2. Geringe physiologische Einflussnahme resultierte aus der *fur/zur*- Deletion

Zunächst wurde der Effekt der einzelnen *fur*- bzw. *zur*-Deletionen auf das Wachstum hinsichtlich eines Wachstumsdefizits gegenüber des Wildtyps in Tris-MM analysiert. AE104 zeigte einen Übergang von der *lag*-Phase in die exponentielle Phase nach ca. 4 h und erreichte nach 22 h die stationäre Phase mit 300 Klett (Abb. 5A). Diesem Wachstumsverhalten folgten ebenfalls die Deletionsmutanten von Δ *furB*, Δ *zur* und die Doppelmutante Δ *furB* Δ *zur*. Nur für Δ *furA* wurde eine verlängerte *lag*-Phase von $6,86 \pm 0,27$ h (Abb. 5A, B, D) im Vergleich zum Wildtyp (A) beobachtet. Diese wurde anhand der logarithmischen Auftragung des Trockengewichts gegen die Zeit im Bereich der exponentiellen Phase (linearer Bereich) bestimmt. Hierfür diente die Regressionsgerade $f(X_{WT}) = 0,177X + 2,8728$, die das Wachstum für den Wildtyp im Zeitintervall 5-22 h beschreibt und $f(X_{\Delta furA}) = 0,1885X + 1,4287$ für Δ *furA* im Intervall von 15-24 h. Alle erwähnten Stämme erreichten signifikant (Abb. 5 D, p-Wert) vergleichbare Wachstumsraten (μ) bzw. Verdopplungszeiten (t_d), was eine ähnliche Fitness der Zellen in der exponentiellen Phase suggeriert (Abb. 5 D).

Auch die Deletion von *zur* im Stammhintergrund der Δ e4-Mutante, DN578 (Δ *zntA* Δ *cadA* Δ *dmeF* Δ *fieF*), zeigte keinen Unterschied im Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5 C). DN578 codiert die vier Effluxsysteme ZntA und CadA (P_{IB2}-typ ATPasen) sowie DmeF und FieF (CDF-Proteine) nicht mehr.

Der Wachstumsunterschied der Δ *furA* Mutante wurde bei den Wachstumsendpunktbestimmungen durch die Normalisierung der verwendeten Stämme anhand der optischen Dichte in der Mittelkultur einbezogen.

3. Ergebnisse

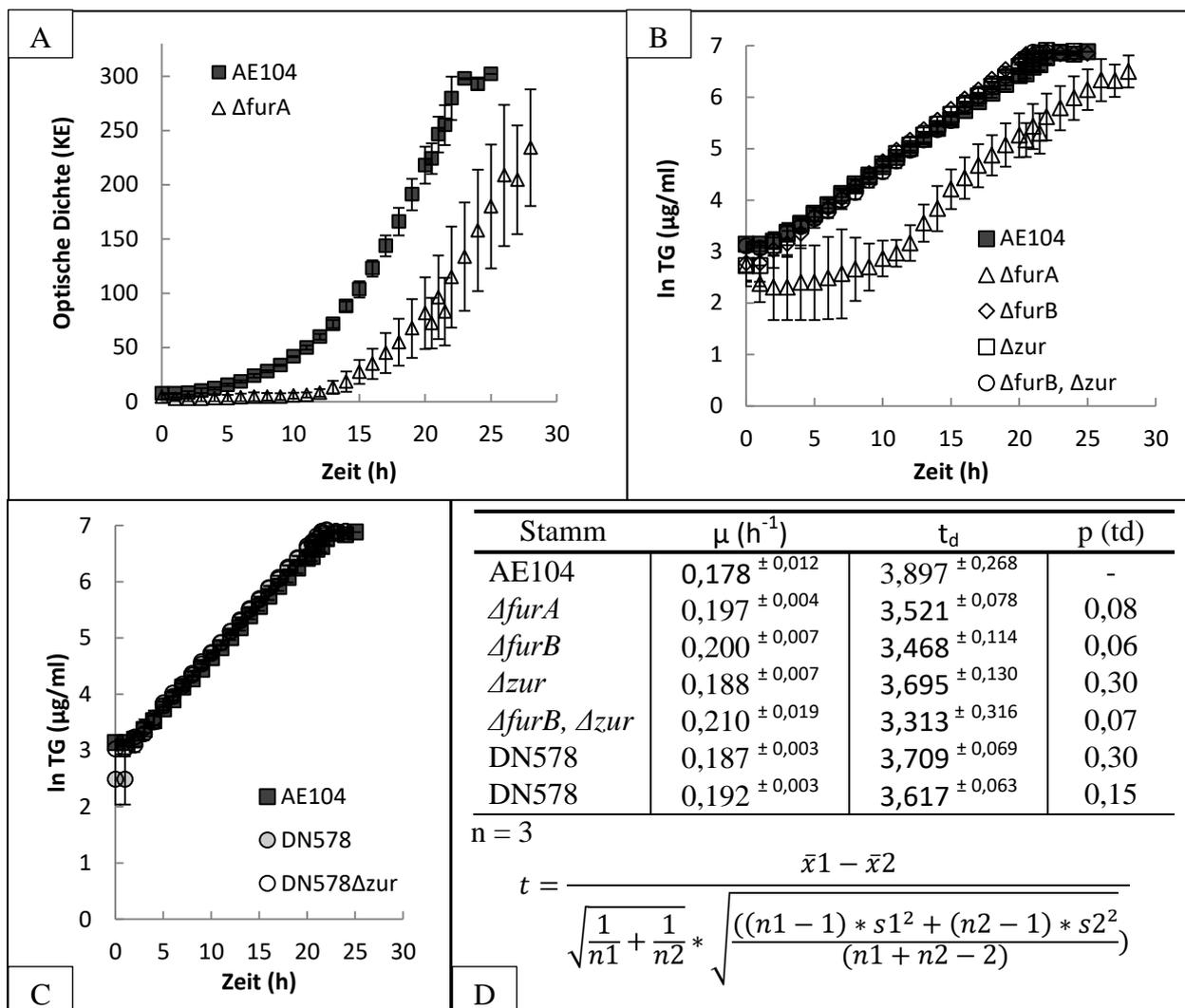


Abb. 5: Wachstumskurven in Tris-MM (10 ml) der Stämme AE104 (■), $\Delta furA$ (Δ), $\Delta furB$ (◇), Δzur (□) und der Doppelmutante $\Delta furB \Delta zur$ (○) sowie DN578 (●) und DN578 Δzur (○, C). Die untere Formel (D) beschreibt die Ermittlung des t-Wertes, der für die Bestimmung des p-Wertes als Signifikanzindikator genutzt wurde. Die gemittelte Verschiebung der Wachstumsphase von $\Delta furA$ zu AE104 beträgt $6,86 \pm 0,27$ h.

In der Wachstumsendpunktbestimmung erfolgte die Untersuchung des Einflusses der einzelnen Deletionen auf die Schwermetallresistenz gegenüber Cobalt, Cadmium und Zink in Flüssigkulturen (μM ; Abb. 6A-C). In Tris-MM ohne Zusätze betrug die optische Dichte von AE104 $0,67 \pm 0,02$ ($\lambda_{600 \text{ nm}}$ Tecan Infiniti[®]). Generell nahm das Wachstum mit steigender Schwermetallkonzentration ab. Dies führte im Falle von Cobalt und Cadmium (Abb. 6 B, C) zu einer sigmoidalen Wachstumskurve, jedoch nicht bei den Wachstumsexperimenten mit Zink (Abb. 6 A). Hier wurde eine stetige Abnahme des Wachstums mit steigender Zinkkonzentration beobachtet. Der $\Delta furA$ -Stamm zeigte bei allen drei untersuchten Schwermetallresistenzen ein signifikantes Wachstumsdefizit bei erhöhter

3. Ergebnisse

Metallkonzentration. Diese Beobachtung beruhte jedoch nicht auf der verlängerten *lag*-Phase des Stammes, die im Vorfeld beobachtet wurde, da ein ähnliches Wachstum im Vergleich zu den anderen Stämmen ohne Metallzusätze vorlag ($0,65 \pm 0,01$).

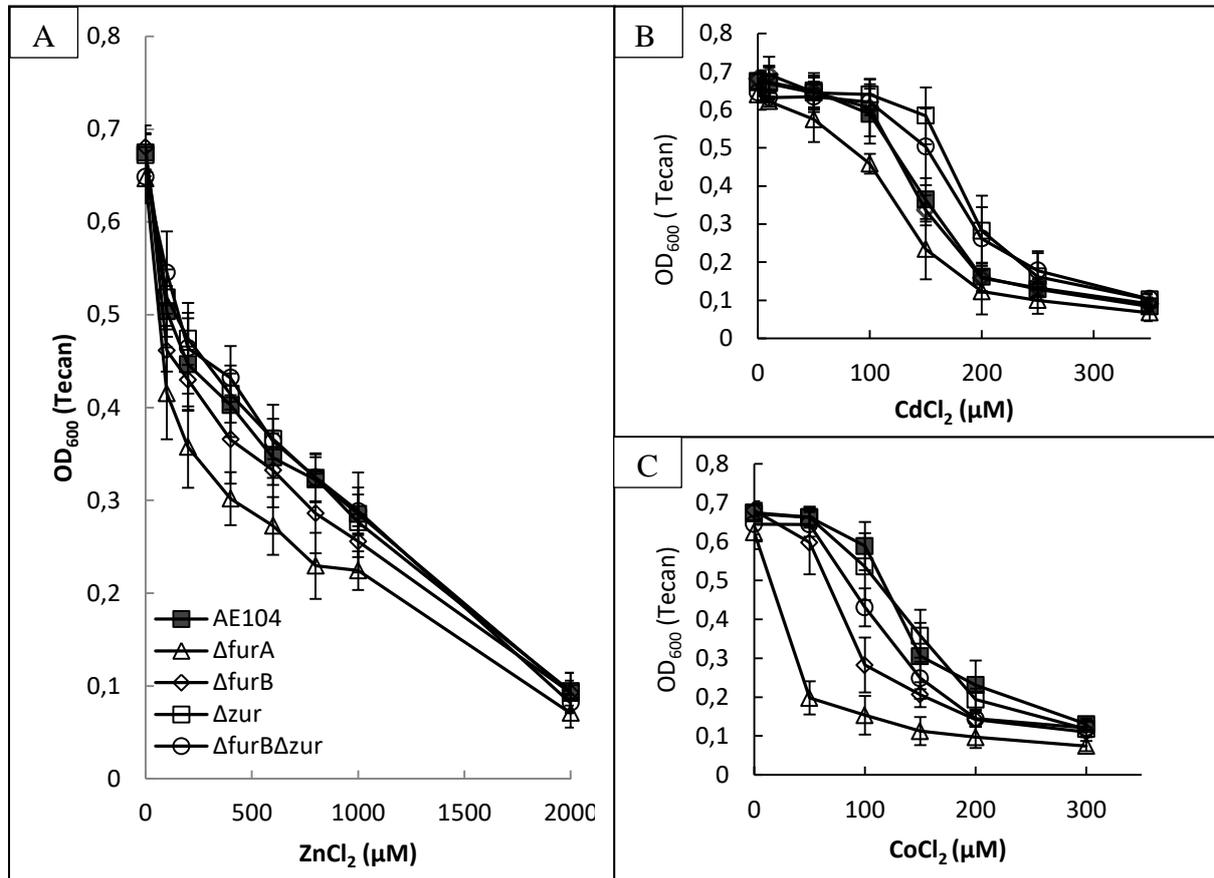


Abb. 6: Schwermetallresistenz des Stammes AE104 sowie der Mutanten $\Delta furA$, $\Delta furB$, Δzur und $\Delta furB\Delta zur$ durch Wachstumsendpunktbestimmung in Flüssigmedium gegen Zink (A), Cadmium (B) und Cobalt (C).

Um schwache signifikante Effekte bezüglich der Metallresistenz zu charakterisieren, erfolgte die Bestimmung des IC₅₀-Wertes (Tabelle 8) mit *b-value* nach $OD(c) = OD0 / \{1 + EXP[(c - IC_{50})/b]\}$. Erstere beschrieb die Metallkonzentration, die nötig war, um ein halbmaximales Wachstum zu erreichen. Der *b-value* beschreibt hier die Steigung am Punkt des halbmaximalen Wachstums. Im Falle von $\Delta furA$ erfolgte die IC₅₀-Bestimmung anhand einer polynomen Regressionsfunktion aufgrund fehlender Datenpunkte im Bereich von 0 – 50 μM Co²⁺.

Dabei ergab sich für den Wildtyp AE104 ein IC₅₀-Wert von 622 ± 103 für Zink, 151 ± 16 für Cadmium und 170 ± 19 μM für Cobalt. Die IC₅₀-Werte von $\Delta furA$ waren mit 391 ± 48 μM Zink, 133 ± 7 μM Cadmium und $\leq 33 \pm 3$ μM Cobalt signifikant geringer. Die Deletion von *zur* wies

3. Ergebnisse

keinen signifikanten Einfluss auf die Zinkresistenz auf, jedoch einen höheren IC₅₀-Wert für Cd²⁺. Dies war auch bei der Doppelmutante $\Delta furB\Delta zur$ vorzufinden. Des Weiteren ist eine verringerte Resistenz gegenüber Cobalt bei $\Delta furB$ zu erkennen. Die Doppelmutante $\Delta furB\Delta zur$ vereinigte den Phänotypen der Einzelmutanten bezüglich der Cd²⁺ und Co²⁺ - Resistenz, jedoch nicht den von Zink.

Somit beeinflusst die Deletion von *furA* die Metallhomeostasis von Cobalt und Zink am stärksten, gefolgt von $\Delta furB$. Das Fehlen von *Zur* sorgt für keine Resistenzminderung gegenüber Zink, jedoch kann es den leichten Effekt von $\Delta furB$ gegenüber Zink kompensieren. Eine gesteigerte Cd²⁺-Resistenz, womöglich durch induzierte Effluxsysteme, sind die Antwort der Deletion des Zink-Regulators.

Tabelle 8: Resistenzbestimmung der Stämme AE104, $\Delta furA$, $\Delta furB$, Δzur und $\Delta furB\Delta zur$ gegenüber Zn²⁺, Cd²⁺ und Co²⁺. Die IC₅₀-Werte wurden anhand der Wachstumsendpunktbestimmungen in Abb. 6 determiniert.

		ZnCl ₂ (μM)	n	CdCl ₂ (μM)	n	CoCl ₂ (μM)	n
AE104	IC50	622 ± 103	6	151 ± 16	6	170 ± 19	5
	b-value	599 ± 31		31 ± 6		37 ± 8	
$\Delta furA$	IC50	391 ± 48	4	133 ± 7	5	≤ 33* ± 3	6
	b-value	384 ± 65		37 ± 14		-	
$\Delta furB$	IC50	471 ± 94	5	145 ± 28	6	99 ± 8	6
	b-value	515 ± 57		33 ± 14		45 ± 30	
Δzur	IC50	690 ± 65	7	200 ± 16	7	163 ± 18	8
	b-value	540 ± 147		31 ± 12		32 ± 14	
$\Delta furBC$	IC50	651 ± 91	4	192 ± 16	5	136 ± 16	6
	b-value	467 ± 114		33 ± 13		39 ± 14	

* Bestimmung des IC₅₀-Wertes anhand des Graphen, nicht nach OD (c) = OD (0) / (1 + EXP(c - IC₅₀/b)). Signifikante Unterschiede zu AE104 dick hervorgehoben (T-Test: p < 0,05). Bei $\Delta furA$ mit CdCl₂ p = 0,054).

Einen genaueren Einblick auf den Einfluss der Δzur - Mutante auf die Dynamik der Zinkaufnahme erfolgte durch Aufnahmeexperimente mit dem radioaktiven Zn⁶⁵-Isotop nach der Filtrierungs-Methode. Hierbei wurde die Zinkaufnahmekapazität innerhalb von 2 min von ganzen Zellen zwischen der *zur*-Mutante und dem jeweiligen Stammhintergrund (AE104/DN578) verglichen (Abb. 7). Im Stammhintergrund AE104 konnte kein Unterschied zu Δzur beobachtet werden. Selbst durch die Deletion der Gene für die P-typ ATPasen und CDF-Transporter wurde kein Unterschied festgestellt. Allein die Aufnahme nach 1 min des Stammes DN578 Δzur gegenüber AE104 zeigte einen signifikanten, verringerten Wert (0,06 ± 0,01 nmol ⁶⁵Zn/ mg TG, n = 6, p = 0,035). Gegenüber des Ausgangsstammes DN578 konnte

3. Ergebnisse

nicht von einem signifikanten Wert ausgegangen werden ($p = 0,099$). Zusammenfassend konnte kein Effekt auf die Zinkaufnahme durch Δzur anhand der Aufnahmeraten (Zn/ min in einer Zelle) beobachtet werden. Ähnlich der Daten von Kirsten *et al.* 2011 zeigte die Deletion von $zurT$ keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp in Tris-MM mit 1 mM $MgCl_2$.

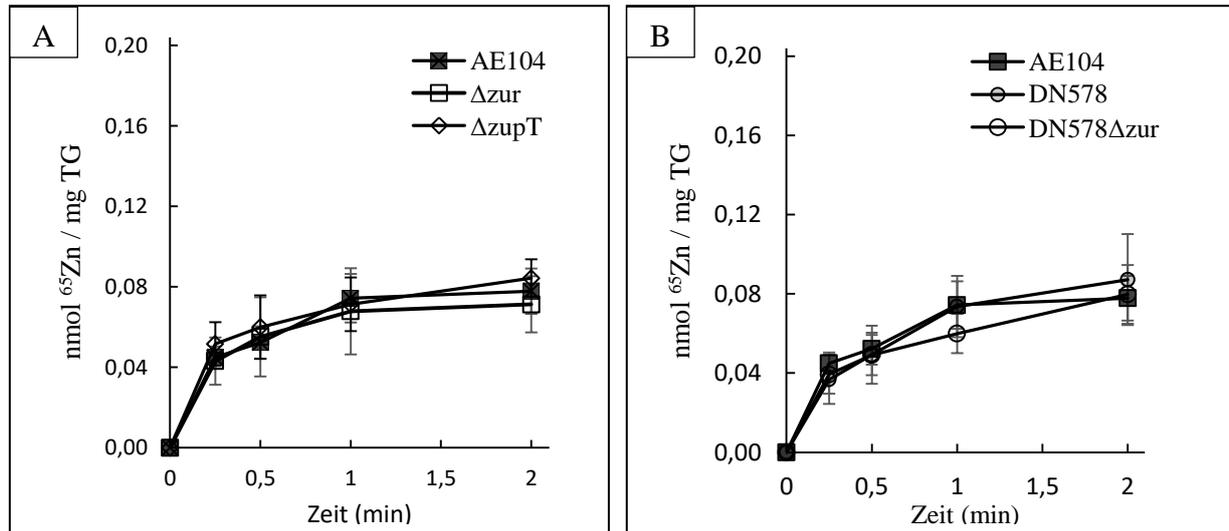


Abb. 7: Effekt der Deletion von zur auf die Aufnahmedynamik von Zink im Stammhintergrund AE104 (A) und der 4-fach Mutante DN578 (B). Als weitere Kontrolle neben den Ausgangsstämmen wurde die Mutante $\Delta zurT$ mitgeführt. Die Aufnahmemessung erfolgte mit in modifizierten Tris-MM (ohne Fe-Citrat und SLC6, 1 mM $MgCl_2$) kultivierten Zellen nach der Filtrierungsmethode mit $1 \mu M Zn^{65}Cl_2$ in einem Zeitintervall von 2 min. Die Datenerhebung wurde mit $n \geq 3$ und je einem technischen Replikat durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Zinkaufnahme (Zn/ min) im Zeitintervall von 0,25 - 1 min je Zelle ($0,6 pg TG = 1 Zelle$, Herzberg *et al.*, 2016) ermittelt: AE104: $10,4 \pm 6 \times 10^3$ ($n = 5$); Δzur : $10,2 \pm 4 \times 10^3$ ($n = 4$); $\Delta zurT$: $10,9 \pm 5 \times 10^3$ ($n = 4$); DN578: $11,3 \pm 6 \times 10^3$ ($n = 4$); DN578 Δzur : $16,0 \pm 8 \times 10^3$ ($n = 6$).

3.1.3. Einfluss der drei fur -Orthologen auf die Eisenaufnahme über das Siederophor

Staphyloferrin B

Um den Einfluss der Eisenaufnahme aus dem umgebenden Medium zu untersuchen und somit den wahren *ferric uptake* Regulator von dem Zinkabhängigen zu unterscheiden, erfolgte der Chromazurol S (CAS)-Assay. Die Mobilisierung von Fe^{3+} aus dem Chromazurol S-Fe (III)-Komplex über die Produktion, Sekretion des Siderophores Staphyloferrin B und dessen Aufnahme durch den TonB-Rezeptor wurde durch einen Farbwechsel des umgebenden Mediums veranschaulicht. Dabei zeigte der eisenhaltige Komplex eine blau-grüne Farbe im Gegensatz zum gelben Chromazurol S-Komplex (Louden *et al.* 2011). Die Unterbrechung des

3. Ergebnisse

Syntheseweges des Polycarboxylat-typ Siderophores (Olsson-Francis *et al.* 2010; de Lorenzo & Neilands 1986, $\Delta iucA$) resultierte im Verlust der Fe^{3+} -Aufnahme. Dagegen wurde eine gesteigerte Siderophoresekretion durch das Fehlen des Rezeptors ($\Delta aleB$) beobachtet (Abb. 8 A). Fur A ist der Regulator der Eisenaufnahme über dieses Siderophore (Diplomarbeit - Schwarzenberg, 2007), dessen Gendeletion in einem zweifachen Hofdurchmesser ($42^{\pm 2,8}$ mm) im Vergleich zu AE104 ($20^{\pm 1,4}$ mm) resultierte. Dieser Effekt war in dieser Arbeit mit dem *trans* agierenden *furA* unter dessen nativem Promotor (pBBR1MCS2::*furA*, maximaler Hofdurchmesser von $18^{\pm 4,2}$ mm) kompensierbar. In Momentaufnahmen war dies nach 5 Tagen (A-C) sowie in zeitlicher Abhängigkeit (Abb.8 E) ersichtlich. Die Deletionen von *zur* und *furB* als Einfach- bzw. Doppelmutante ($\Delta furB$, *zur*) hatten keinen Einfluss auf die Eisenaufnahme (Abb. 8 C).

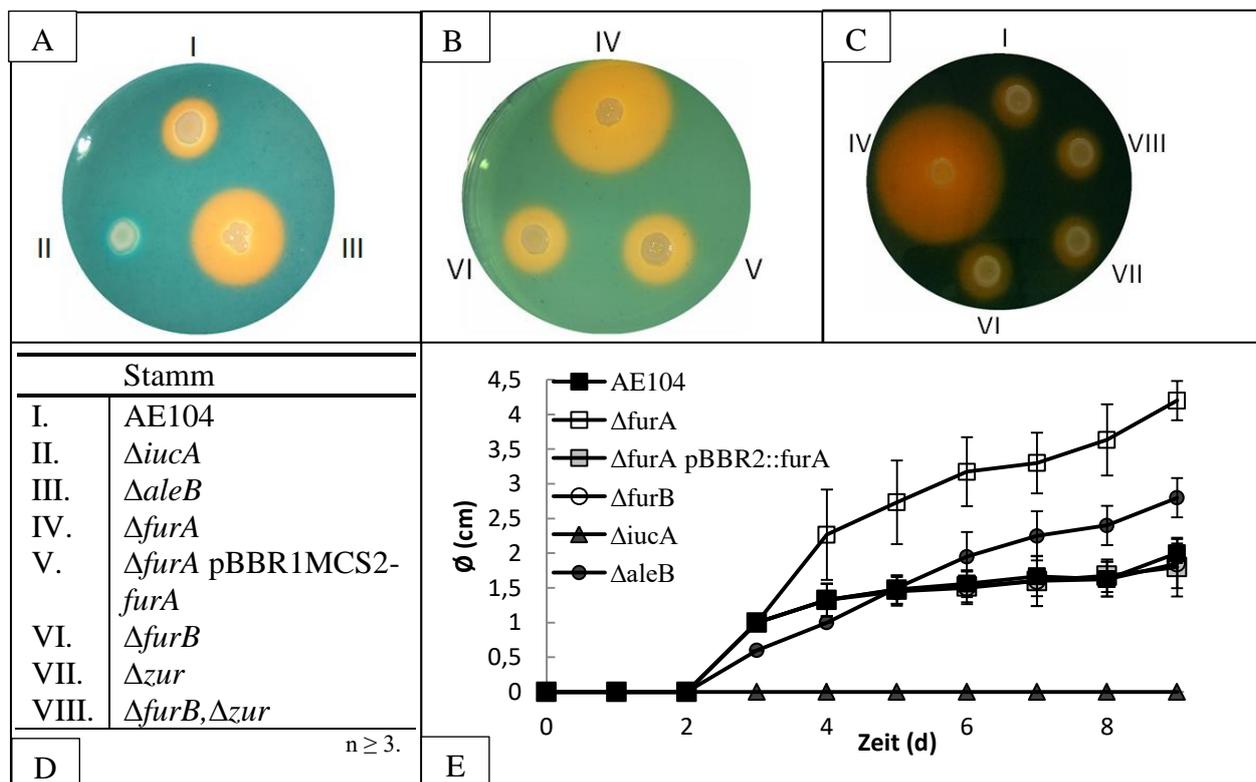


Abb. 8: Fe(III)-Mobilisierungs-Assay aus dem umgebenden Medium per Chromazurol S mit den Kontrollstämmen AE104, $\Delta iucA$, $\Delta aleB$ (A) und der *fur*- bzw. *zur*- Mutanten sowie der Komplementation von $\Delta furA$ mittels pBBR1MCS2-*furA* (B, C) nach 5 Tagen Inkubation bzw. zeitabhängig (E). Je 2 μ l einer Mittelkultur wurden auf eine CAS-Platte aufgetragen und bei 30 °C inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1.4. Einfluss der Fur-Orthologen auf das Expressionsmuster bekannter

Transportsysteme

Über Reporterfusionen wurde die Transkription verschiedener Import- sowie Exportsysteme (Tabelle 9, 10) untersucht, die mehr oder weniger einen Einfluss auf die Zinkhomeostasis haben könnten. Hierfür wurde das Suizidplasmid pECD794-1 als Grundlage genutzt, um ein promotorloses *lacZ*-Gen stromabwärts des zu untersuchenden Gens zu integrieren. Die so erhaltene Transkriptionsfusion sorgte für die Transkription des untersuchten Gens sowie des *lacZ* auf der gleichen mRNA. Somit ergab die Synthese der stabilen β -Galaktosidase ein Maß für die Expressionsrate der untersuchten Gene. Hierbei ist zum einen zu erwähnen, dass die Dynamik der Transkription durch die stabile β -Galaktosidase nicht widerspiegelt wurde, sondern nur eine generelle Darstellung der verminderten bzw. verstärkten Expression in Summe möglich war. Zum Zweiten sind polare Effekte durch die Integration der 10 kbp des Vektors stromabwärts des zu untersuchenden Gens nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund waren die Reporterfusionen so gewählt, dass die Operonstruktur nicht unterbrochen wurde.

Verglichen wurden die Aktivitäten der dreistündig inkubierten Kulturen unter Metallstress (Zink, Cobalt und Nickel) und metalllimitierenden Bedingungen (EDTA) gegenüber den Normbedingungen in Tris-MM. Des Weiteren wurden die Aktivitäten der einzelnen Mutanten mit dem Wildtyp AE104 verglichen. Tabelle 9 fasst die erhobenen Daten zu den bekannten Metallimportsystemen in *C. metallidurans* zusammen.

Bei den Importsystemen konnte eine generell geringere Aktivität im Vergleich zu Tris-MM bei der Inkubation mit Zink bestimmt werden. Zusätze von Co^{2+} und Ni^{2+} sowie unter kationenlimitierenden Bedingungen, hervorgerufen durch 200 bzw. 500 μM EDTA, zeigten keine Effekte im Vergleich zur Inkubation ohne Zusätze bei Genen unspezifischer Transporter wie *corA*₁₋₃, *zntB* sowie bei dem bekannten Metall-Phosphatkompleximporter *pitA*. Grundsätzlich war die Grundaktivität bei $\phi(\text{pitA-lacZ})$ relativ hoch mit 237-272 U/mg TG. Dagegen fielen die Raten bei den *corA*-Genen (31-46 U/ mg TG) bzw. *zntB* (12 ± 1 U/mg TG) relativ gering aus. Unter den gewählten Transportern konnte keine Änderung der Expressionsrate, hervorgerufen durch die Deletion von *furA*, *furB* und *zur*, beobachtet werden. Allein die Aktivitäten mit dem Konstrukt pECD794-1::*zupT-lacZ* sind in dieser Gruppe der Importsysteme gesondert zu betrachten.

3. Ergebnisse

Ohne Zugabe von Metallen oder EDTA wurde eine geringe Aktivität von *zupT-lacZ* beobachtet (21 ± 3 U/ mg TG), die durch Zugabe von Zink, wie bei den schon erwähnten unspezifischen Transportern, zu einer verringerten Aktivität (14 ± 2 U/ mg TG) führte. Durch Kultivierung unter limitierender Kationenkonzentration erfolgte eine starke Hochregulation um das Dreifache. Dagegen hatten die Schwermetalle Co^{2+} und Ni^{2+} keinen Effekt auf die Expressionsrate.

Hinsichtlich des Einflusses der einzelnen Deletionen der drei *fur*-Orthologen wurde neben den schon erwähnten Effekten durch Zink-Zusatz und Eliminierung eine 12fach verstärkte Aktivität der *zupT*-Transkription in Δzur unter Normbedingungen (251 ± 30 U/ mg TG) festgestellt. Somit hatte Zur einen reprimierenden Effekt auf die Transkription von *zupT*. Des Weiteren weist die bestehende Reprimierung durch Zink (150 ± 7 U/ mg TG) in Δzur auf eine weitere Regulationsebene hin. Die Induktion von $\phi(zupT-lacZ)$ unter Metalllimitierung (EDTA) war im Stammhintergrund von Δzur nicht zu beobachten, was für eine maximale Expressionsrate von *zupT* durch die Deletion des Regulators spricht.

Die Komplementation in *trans* durch pBBR1MCS3 - basierende Vektoren erfolgte durch das native Zur und einer mit C-terminalen *Strep*-tag markierten Version. Dies war mit einer N-terminalen Variante nicht möglich. Eine konstitutive Expression der *zur*-Varianten erfolgte unter dem *lacI*-Promotor in *C. metallidurans* auf Grund des fehlenden Repressors $\text{LacI}_{E. coli}$. Effekte beruhend auf dem Vektor und der Inkubation mit $0,65 \mu\text{g/ ml}$ Tetracyclin zur Haltung des Plasmides wurden durch das Fehlen signifikanter Unterschiede zum Ausgangsstamm Δzur mit Leervektor pBBR1MCS3 ausgeschlossen.

3. Ergebnisse

Tabelle 9: Expressionsanalyse möglicher zinkabhängiger Importsysteme in $\Delta fur/zur$

		β-Galaktosidaseaktivität (U/mg TG) der Genfusionen:						
Stamm	Bedingung	MM	200 μM	500 μM	200 μM	500 μM	200 μM	200 μM
		ohne ZA	Zn ²⁺	Zn ²⁺	EDTA	EDTA	Co ²⁺	Ni ²⁺
<i>pitA-lacZ</i>								
AE104		237 ^{±28}	103 ^{±17}	95 ^{±19}	254 ^{±25}	240 ^{±18}	221 ^{±17}	245 ^{±22}
$\Delta furA$		272 ^{±36}	126 ^{±26}	89 ^{±9}	244 ^{±18}	241 ^{±11}	188 ^{±14}	217 ^{±28}
$\Delta furB$		242 ^{±27}	124 ^{±15}	89 ^{±15}	260 ^{±23}	247 ^{±10}	199 ^{±10}	244 ^{±14}
Δzur		258 ^{±16}	115 ^{±20}	81 ^{±18}	256 ^{±29}	237 ^{±16}	205 ^{±16}	251 ^{±6}
<i>corA₁-lacZ</i>								
AE104		44 ^{±2}	27 ^{±5}	19 ^{±5}	37 ^{±5}	37 ^{±2}	34 ^{±3}	34 ^{±9}
$\Delta furA$		42 ^{±4}	24 ^{±2}	21 ^{±3}	37 ^{±3}	38 ^{±3}	36 ^{±1}	40 ^{±3}
$\Delta furB$		36 ^{±7}	25 ^{±7}	21 ^{±5}	36 ^{±3}	37 ^{±3}	34 ^{±3}	37 ^{±5}
Δzur		40 ^{±3}	25 ^{±4}	21 ^{±4}	35 ^{±7}	36 ^{±3}	33 ^{±3}	39 ^{±5}
<i>corA₂-lacZ</i>								
AE104		42 ^{±10}	33 ^{±6}	28 ^{±6}	47 ^{±13}	44 ^{±12}	41 ^{±8}	48 ^{±9}
$\Delta furA$		54 ^{±8}	43 ^{±4}	36 ^{±7}	50 ^{±4}	51 ^{±6}	48 ^{±3}	55 ^{±7}
$\Delta furB$		46 ^{±4}	36 ^{±2}	34 ^{±3}	47 ^{±5}	46 ^{±6}	45 ^{±3}	47 ^{±11}
Δzur		51 ^{±4}	39 ^{±1}	34 ^{±4}	48 ^{±10}	52 ^{±6}	58 ^{±9}	58 ^{±5}
<i>corA₃-lacZ</i>								
AE104		31 ^{±5}	23 ^{±8}	17 ^{±6}	33 ^{±6}	32 ^{±6}	31 ^{±4}	30 ^{±8}
$\Delta furA$		37 ^{±4}	27 ^{±1}	24 ^{±3}	38 ^{±4}	36 ^{±6}	33 ^{±3}	38 ^{±4}
$\Delta furB$		32 ^{±3}	23 ^{±2}	21 ^{±3}	34 ^{±3}	32 ^{±5}	31 ^{±4}	34 ^{±4}
Δzur		33 ^{±7}	25 ^{±4}	22 ^{±3}	35 ^{±5}	34 ^{±3}	37 ^{±4}	40 ^{±6}
<i>zntB-lacZ</i>								
AE104		12 ^{±1}	8 ^{±1}	6 ^{±2}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	11 ^{±1}
$\Delta furA$		13 ^{±1}	10 ^{±1}	8 ^{±1}	12 ^{±2}	12 ^{±2}	12 ^{±1}	12 ^{±2}
$\Delta furB$		11 ^{±1}	8 ^{±1}	5 ^{±1}	11 ^{±1}	11 ^{±1}	11 ^{±1}	11 ^{±1}
Δzur		12 ^{±1}	8 ^{±1}	6 ^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	10 ^{±3}
<i>zupT-lacZ</i>								
AE104		21 ^{±3}	14 ^{±2}	12 ^{±2}	65^{±9}	76^{±8}	22 ^{±3}	25 ^{±4}
$\Delta furA$		28 ^{±2}	18 ^{±1}	16 ^{±1}	71^{±7}	71^{±4}	24 ^{±2}	29 ^{±6}
$\Delta furB$		23 ^{±3}	15 ^{±3}	12 ^{±2}	65^{±7}	76^{±9}	21 ^{±3}	28 ^{±4}
Δzur		251 ^{±30}	150 ^{±7}	134 ^{±22}	259 ^{±21}	257 ^{±20}	230 ^{±31}	256 ^{±23}
Δzur^a pBBR1MCS3::zur (N)		220 ^{±41}	166 ^{±39}	114 ^{±27}	261 ^{±25}	269 ^{±32}	-	-
Δzur^b pBBR1MCS3::zur (C)		12 ^{±2}	8 ^{±2}	8 ^{±2}	69^{±9}	71^{±13}	-	-
Δzur^c pBBR1MCS3::zur		25 ^{±5}	11 ^{±3}	11 ^{±2}	94^{±7}	98^{±8}	-	-
Δzur^d pBBR1MCS3		237 ^{±26}	144 ^{±20}	119 ^{±13}	256 ^{±20}	264 ^{±6}	-	-
$\Delta furB, zur$		226 ^{±22}	183 ^{±13}	169 ^{±12}	196 ^{±29}	214 ^{±21}	245 ^{±22}	205 ^{±22}

Die Reporter-genfusion wurde mittels pECD794-1 basierter Vektoren, welche ca. 300 bp des 3' Endes des zu untersuchenden Gens (*pitA*, *corA*₁₋₃, *zntB* und *zupT*) samt Stopcodon enthalten, durchgeführt. Die Komplementation des Stammes Δzur erfolgte durch pBBR1MCS3 (d) mit der Gensequenz von *zur* (c) sowie mit N-terminalen (a) bzw. C-terminalen *Strep*-tag (b). Signifikante Unterschiede zum Ausgangsstamm, welche einen Faktor außerhalb des Bereiches $0,5 \geq X \geq 1,5$ gegenüber AE104 und $p \leq 0,05$ des t-Test aufwiesen, sind grau hinterlegt. Des Weiteren sind Hochregulationen

3. Ergebnisse

(fett) und Runterregulationen (kursiv) gegenüber der Aktivität in Tris-MM ohne Zusätze dargestellt.

Zum Zweiten beinhalteten die Varianten zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus bzw. C-Terminus (MTMITPSAQLTLTKGNKSWVPGP bei Zur und Zur-*Strep*-tag) durch die Nutzung des ATG_{lacZ} 's sowie durch den *Strep*-tag samt Linker (MASWSHPQFEKIEGRRDRGPEF, N-terminal; VDLQGDHGLSAWSHPQFEKA, C-terminal), der aus pASK-IBA 3⁺ bzw. 7⁺ stammte. Ein negativerer Einfluss auf die Stabilität von *Strep*-tag Zur kann in der Verteilung der zusätzlichen Aminosäuren nur am N-Terminus gesehen werden. Die Auftragung von jeweils 100 µg aufgeschlossenen Zellmaterials einer Vorkultur für den β-Galaktosidase-Assay (AE104 pECD794-1:*zupT:lacZ* pBBR1MCS3::*zur*;::*strep*-tag:*zur*;::*zur*-*strep*-tag; oder Leervektor) zeigte auf einer denaturierenden PAGE (12,5 %, Anhang: Abb. 38) keine Akkumulation der jeweiligen Zur-Variante (N- bzw. C-terminal). Stattdessen konnten mittels *Strep*-tag-Nachweis in allen Proben drei Signale detektiert werden. Zum einen ein 17 kDa Peptid, das der Laufhöhe des *Biotin carrier* Proteins (Rmet3064; 16 kDa) aus *C. metallidurans* entspricht. Ein weiteres Signal bei 68 kDa und ein recht schwaches bei 39 kDa wurden detektiert. Das Chaperon DnaK (Rmet2922; 69,79 kDa) kann eine Begleiterscheinung der Überproduktion von Proteinen sein. Da ebenfalls diese Signale bei dem Stamm mit Leervektor sowie mit der unmarkierten Zur-Variante erschienen, können sie nicht als Resultat der Expression des Zielgens (*zur*) gesehen werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass auf eine Avidin-Behandlung und somit eine Kaschierung weiterer Proteine verzichtet wurde. Eine posttranslationelle Kontrolle der Zur-Kopienzahl auf einem niedrigen Niveau kann die Beobachtungen erklären, ohne die Effekte der Komplementation in Frage zu stellen. Die zu erwartenden Größen lagen bei 22,99 kDa für die C-terminale Variante und für *Strep*-tag-Zur bei 23,43 kDa. Eine Aufreinigung von *Strep*-tag Zur inklusive Konzentrierung aus *C. metallidurans* war möglich. Jedoch wurde nur ein sehr schwaches Signal auf einer denaturierenden PAGE detektiert (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den Importsystemen weisen die Gene für die P-typ ATPasen einen gegenteiligen Effekt betreffend der Inkubation unter Zn²⁺ limitierender und überschüssiger Bedingungen beim β-Galaktosidase Assay auf (Tabelle 10). Dabei wurde die Expression von $\phi(cadA:lacZ)$ und $\phi(zntA:lacZ)$ unter EDTA bis um ca. 30 % reprimiert und erhöhte Konzentrationen an Zink erzeugten höhere Aktivitäten im Vergleich zur Inkubation in Tris-MM. Die starke Hochregulation von *zntA* bei Zusatz von Zn²⁺ fiel bei *cadA* in einem wesentlich geringeren Maße aus. Die Induktion von *zntA* war um das 5fache höher gegenüber

3. Ergebnisse

der Tris-MM-Kultivierung. Bei $\phi(cadA:lacZ)$ wurde eine 2fach erhöhte Aktivität durch Zugabe von Zink herbeigeführt. Dieser Sachverhalt wurde 2003 schon in der Dissertation und der Veröffentlichung im selben Jahr durch Legatzki beschrieben. Somit ist eine Induktion von *zntA* statt *cadA* ein Indiz für eine temporär erhöhte Zinkaufnahme.

Tabelle 10: Expressionsanalyse bekannter zinkabhängiger Exportsysteme in $\Delta fur/zur$

		β -Galaktosidaseaktivität (U/mg TG) unter den Bedingungen:						
Stamm	Bedingung	MM	200	500	200	500	200	200
	(c in μ M)		Zn ²⁺	Zn ²⁺	EDTA	EDTA	Co ²⁺	Ni ²⁺
<i>zntA-lacZ</i>								
AE104		38 ^{±5}	197^{±13}	189^{±19}	25 ^{±5}	25 ^{±6}	50^{±4}	45 ^{±3}
$\Delta furA$		53 ^{±10}	188^{±9}	180^{±13}	31 ^{±4}	30 ^{±3}	43 ^{±5}	60 ^{±11}
$\Delta furB$		42 ^{±9}	198^{±14}	168^{±14}	26 ^{±5}	28 ^{±7}	56 ^{±10}	41 ^{±8}
Δzur		94 ^{±11}	209^{±17}	186^{±16}	69 ^{±5}	68 ^{±7}	89 ^{±6}	113 ^{±22}
$\Delta furB, zur$		96 ^{±14}	302^{±19}	272^{±37}	57 ^{±5}	58 ^{±6}	97 ^{±9}	92 ^{±15}
<i>cadA-lacZ</i>								
AE104		17 ^{±2}	30^{±3}	29^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	15 ^{±1}	35^{±8}
$\Delta furA$		57 ^{±9}	54 ^{±5}	56 ^{±6}	35 ^{±7}	37 ^{±5}	43 ^{±3}	94^{±6}
$\Delta furB$		16 ^{±3}	29 ^{±2}	30 ^{±3}	10 ^{±2}	10 ^{±2}	14 ^{±3}	38^{±4}
Δzur		17 ^{±1}	22 ^{±2}	23 ^{±1}	11 ^{±1}	11 ^{±2}	14 ^{±2}	39^{±10}
$\Delta furB, zur$		11 ^{±2}	23 ^{±1}	24 ^{±2}	9 ^{±1}	9 ^{±1}	11 ^{±1}	22^{±2}

Reporterengenfusion erzeugt mittels pECD794-1 basierter Vektoren, welche ca. 300 bp des 3' Endes von *zntA* bzw. *cadA* samt Stopcodon enthalten. Signifikante Unterschiede zum Ausgangsstamm, welche einen Faktor außerhalb des Bereiches $0,5 \geq X \geq 1,5$ gegenüber AE104 und $p \leq 0,05$ des t-Test aufwiesen, sind grau hinterlegt. Eine gesteigerte (fett) und eine verringerte Expression (kursiv) gegenüber der Aktivität in Tris-MM wurde graphisch hervorgehoben.

Die Deletion von *zur* erzeugte eine generelle erhöhte Aktivität des $\phi(zntA-lacZ)$ Konstruktes unter normalen, metalllimitierenden Bedingungen und bei erhöhten Ni²⁺ bzw. Co²⁺-Konzentrationen. Unter Zusatz von ZnCl₂ wurden ähnliche Induktionsraten erzeugt, die allein auf dem Zusatz beruhten. Daneben hatte Δzur keinen Einfluss auf die Expressionsrate von $\phi(cadA:lacZ)$, jedoch die Deletion von *furA* mit einer Steigerung um das 2fache. Die Deletion von *furB* zusätzlich zu Δzur hatte einen Effekt auf die Expression von *zupT* und *zntA*. Des Weiteren zeigten konzentrationsabhängige Experimente (Abb. 33) mit Δzur eine Reprimierung für $\phi(zupT-lacZ)$ ähnlich der in AE104. Die maximale Induktion durch EDTA wurde nach 200 μ M in AE104 erreicht (80 U/ mg TG) und 100 μ M ZnCl₂ führten zur maximalen Reprimierung (ca. 10 U/ mg TG). In Δzur wurde die maximale Expression ebenfalls mit 200 μ M EDTA erreicht (240 U/ mg TG). Von diesem hohen Expressionsniveau sank die Aktivität durch die Zugabe von Zink, wobei sie sich mit 400-500 μ M ZnCl₂

3. Ergebnisse

halbierte. Eine ähnliche Beobachtung der konzentrationsabhängigen Expression erfolgte für $\phi(zntA-lacZ)$. Die maximale Reprimierung wurde mit 50 μM EDTA erreicht und die Aktivität von Δzur lag bei der 2fachen Aktivität des Wildtyps (30 U/ mg TG). Dagegen war die maximale Induktion mit 50-100 μM ZnCl_2 erreicht und ab 500 μM beeinflusste die hohe Konzentration das Wachstum negativ und somit die gemessenen Aktivitäten. Da das Zellwachstum während des Experimentes nicht beeinflusst wurde, sind dies Indizien für eine weitere Regulationsebene neben der Regulation durch Zur.

3.2. Rekombinante Expression & Reinigung von FurA, FurB sowie Zur_{CH34}

Zur Analyse der Proteine und für Protein-DNA-Interaktionsstudien erfolgte die rekombinante Expression der drei *fur*-Orthologen im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) über die Expressionsvektoren pASK-IBA 3⁺ bzw. 7⁺. Hierfür wurde die jeweilige Gensequenz ohne Start- und Stopcodon über *EcoRI* und *SalI* bzw. *PstI* (*furB*) eingebracht, womit eine Induktion der Expression unter dem *tet*-Promotor durch Anhydrotetracyclin (AHT) möglich war. Diese konstruierten Plasmide dienten im Falle von *zur* als Grundlage für die schon erwähnten und auf pBBR1MCS3 basierenden Komplementationsvektoren.

Die resultierenden Proteine enthielten einen N- (pASK-IBA 7⁺) bzw. C-terminalen (pASK-IBA 3⁺) *Strep*-tag II (WSHPQFEK). Dies führte zu zusätzlichen Aminosäuren im Falle von pASK7⁺ (MASWSHPQFEKIEGRRDRGPEF, N-Terminus; VDLQGDHGL, C-Terminus) und pASK 3⁺ (VDLQGDHGLSAWSHPQFEK, C-Terminus; MGDRGPEF, N-Terminus) und somit zu einem erhöhten Molekulargewicht. Dabei unterschied sich die native von der N- bzw. C-terminalen markierten Form (Nativ/N-/C-) bei FurA (16,43/ 19,88/ 19,32 kDa), FurB (17,85/ 20,96/ 20,4 kDa) und Zur (18,48/ 21,93/ 21,37 kDa). Nur das Zur-Protein zeigte in einer denaturierenden PAGE zwei Signale mit einem Intensitätsverhältnis (oberes zu unteres) von $0,37 \pm 0,12$ zu $0,63 \pm 0,12$, die beide auch per Anti-*Strep*-tag-Nachweis unabhängig der Lokalität der Markierung detektiert werden konnten (Abb. 9). Dies war bei gereinigten Proteinen über eine Streptactin[®]-Säule, aber auch bei aufgeschlossenen Zellen nach der Induktion mit AHT der Fall (Abb. 9). Dagegen zeigte die jeweilige Expression von *Strep*-tag-FurA und *Strep*-tag-FurB in 12,5 %igen denaturierenden Gelen jeweils ein Signal (17,66 $\pm 0,37$ bzw. 19,71 $\pm 0,62$ kDa). Die massenspektrometrische Auswertung (Anhang, Abb. 37)

3. Ergebnisse

bestätigte die beiden *Strep*-tag Zur-Varianten (21,891 und 21,793 kDa; Verhältnis von 0,43:0,57).

Unterschiedliche Anzuchtbedingungen mit veränderter Temperatur (16; 30; 37 °C), AHT-Konzentration (0-0,2 µg/ml), Medium (LB und MM *E. coli* [Anhang: Abb. 34]) und unter Zinklimitierung (EDTA) bzw. Zusatz (ZnCl₂) führten zu keiner Eliminierung eines der Signale. Auch Inkubationen des gereinigten Proteins mit EDTA, ZnCl₂, Harnstoff sowie enzymatische Dephosphorylierung (Anhang, Abb. 35) resultierten in keiner Umwandlung der einen Proteinvariante von *Strep*-tag Zur auf einer denaturierenden PAGE zur anderen.

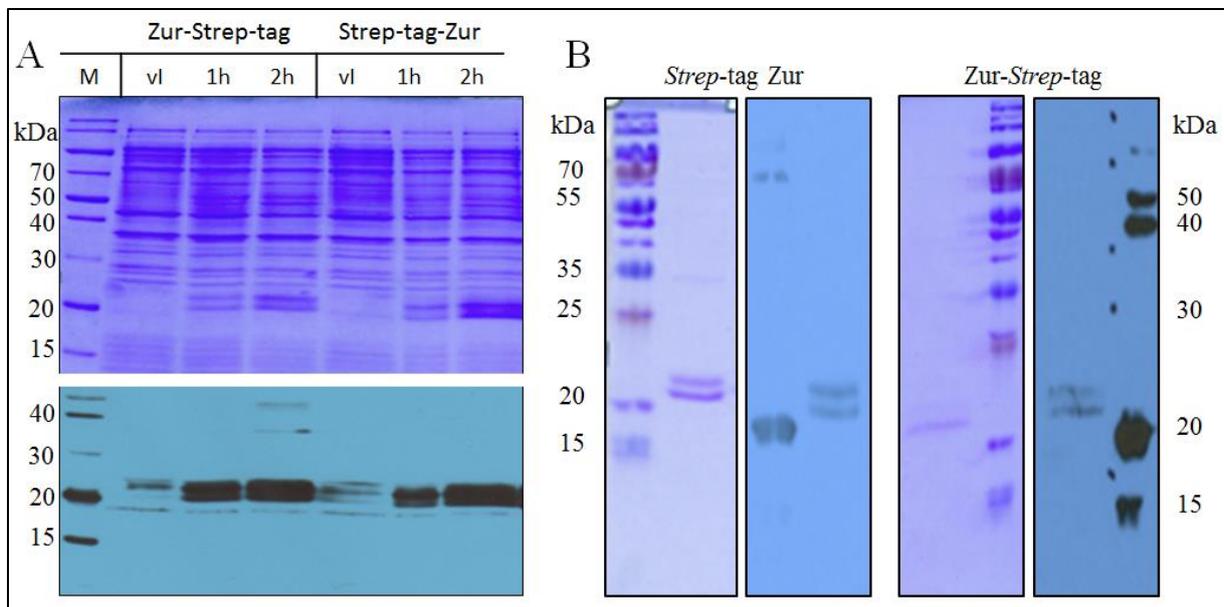


Abb. 9: Produktion von *Strep*-tag-Zur und Zur-*Strep*-tag in BL21 (DE3) (A) sowie gereinigtes Zur-Protein mit N- bzw. C-Terminalen *Streptag* (B) auf einer 12,5 %igen denaturierenden PAGE. Produktion der Zielproteine erfolgte in LB bei 30 °C. Aufgetragen sind jeweils 25 µg Protein aus aufgeschlossenen Zellen (A, Formel 6, 2.5.2.1.) vor Induktion (vI) und 1 bzw. 2 h nach der Induktion mit 0,2 µg/ml AHT bzw. jeweils 1 µg gereinigtes Protein (B). Es fand bei der Produktion von Zur-Varianten keine Behandlung mit Avidin statt und somit verblieben die *biotin carrier*-Bindestellen frei (A). In der Proteinreinigung wurde Avidin eingesetzt (B). Als Größenstandard diente der PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (SM26630). Proteine wurden mit Coomassie angefärbt und das synthetisierte Zielprotein sowie das *biotin carrier* Protein (ca. 19 kDa) über eine *Strep*-tag-Detektierung visualisiert.

Zum Ausschluss von Kontaminationen und Proteindegradation erfolgten massenspektrometrische Analysen der isolierten *Strep*-tag-Zur- Proben aus der denaturierenden PAGE. Bei beiden Signalen handelte es sich um das *Strep*-tag-Zur-Protein mit einer Abdeckung des Proteins von 86,87 %. Die massenspektrometrische Analyse

3. Ergebnisse

[Ultraflex-II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonic, Bremen)] der tryptisch verdauten Proteinproben wurde durch Frau Dr. Schierhorn durchgeführt. In Abb.10 ist das theoretische Fragmentmuster bestehend aus 16 Peptiden und der Vergleich zwischen den erhaltenen Daten der weiter bzw. weniger stark emigrierten Zur-Variante sowie den theoretischen Werten (ExPasy: ProtParam) dargestellt. Sowohl der C-Terminus (SHGDASAHVDLQGDHGL; 1715,8 Da) als auch der N-Terminus (MASWSHPQFEK; 1348,5 Da) wurden identifiziert. Das Signal für den N-Terminus mit 1216,6 Da weist, wie auch das bestimmte kleinere Molekulargewicht des unverdauten Proteins im Vergleich zum theoretischen Wert (21,796 kDa), auf eine Entfernung des Methionin₁ als Form der Prozessierung in *E. coli* hin. Gleiches galt für das N-terminal markierte Fur A und FurB (19,746 kDa bzw. 20,827 kDa). Das weniger emigrierte Zur zeigte ein größeres Molekulargewicht von Fragment 15 (2542,4 Da), welches das zweite konservierte Cystein-Motiv C156 xx C159 sowie H147 beinhaltet. Auswirkungen beruhend auf C119 und C122 konnten auf Grund der Schnittstellen von Trypsin nicht beobachtet werden. Somit war ein Unterschied von max. 14,14 Da festzustellen, der evtl. durch beteiligte Aminosäuren der Zinkbindung entstand.



3. Ergebnisse

B

Nr.	Zur/U	Zur/O	EXPasy	Nr.	Zur/U	Zur/O	EXPasy
1	-	-	529,3	9	1158,6	1158,7	1158,6
2	-	-	532,2	10	1209,6	1209,6	1209,5
3	544,1	544,1	544,3	11	1216,6	1158,7	1216,6
4	600,2	600,2	600,3	12	1484,9	1484,9	1484,8
5	611,1	611,1	611,3	13	1715,8	1715,9	1715,8
6	637,4	637,4	637,4	14	2406,2	2406,4	2406,2
7	706,4	706,4	706,4	15	2528,2	2542,4	2528,2
8	1012,5	1012,6	1012,5	16	3376,7	3376,9	3376,8

Abb. 10: Massenspektrometrische Analyse von *Strep*-tag Zur. Die beiden *Strep*-tag Zur Varianten in einer 12,5 %igen denaturierenden PAGE wurden durch Frau Dr. Schierhorn einem Trypsin-Verdau unterzogen und anschließend die Cysteine mit Iodacetamid modifiziert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels Ultraflex-II TOF/TOF *mass spectrometer*. Im Folgenden sind die detektierten Massen (>500 Da) der oberen bzw. unteren Proteinvariante mit denen der theoretischen Werte gegenübergestellt und diese wiederum den jeweiligen Fragmenten von *Strep*-tag Zur zugeordnet (ExPasy Peptidcutter tool: Gasteiger *et al.* 2005; PeptideMass: (Wilkins *et al.* 1997)). In beiden Proben identifizierte (schwarze, durchgezogene Linie), nicht-identifizierte (gestrichelte Linie) Massen und Peptide mit unterschiedlichem Molekulargewicht in den beiden Proben (rote Linie) sind gekennzeichnet.

Dagegen wies das unverdaute und visuell unterscheidbare Protein ein um 98 Da erhöhtes Molekulargewicht auf. Eine offensichtliche Diskrepanz zeigte sich, da ein Unterschied von ca. 100 Da in einer 12,5 %igen denaturierenden PAGE unter Normalbedingungen nicht unterscheidbar wäre und die Proteingrößenbestimmung anhand der Marker eine größere Differenz vermuten lassen. Die Größenbestimmung anhand von mind. 3 unabhängigen Gelen ergab einen Größenunterschied von 1,63 kDa bei *Strep*-tag-Zur ($21,12 \pm 0,42$ kDa und $19,48 \pm 0,45$ kDa). Die C-terminale Version wies einen Unterschied von 1,87 kDa ($21,88 \pm 1,52$; $20,00 \pm 0,44$ kDa) auf. Auf Grund des Unterschiedes in dem C156- und C159-enthaltenen Trypsinfragmentes 15 wurde die 4 Cystein-Koordination des strukturellen Zinks als Ursache herangezogen. Der Aminosäureaustausch von C119 zu Serin störte das strukturelle Zinkmotiv und *Strep*-tag-Zur C₁₁₉S wies nur eine Molekulare Masse von 21,785 kDa (Abb. 36, Abb. 37, Anhang) auf. Daher ist das strukturelle Zink und seine Koordination eine mögliche Ursache der beiden Varianten.

Zur Untersuchung des Einflusses des *Strep*-tags von Zur (N-Terminal) wurde mittels Faktor Xa dieser entfernt. Für die Abspaltung fand die Reaktion im Puffer W bei RT über Nacht statt. Eine Abspaltung im EMSA-Reaktionspuffer war nicht möglich, da weitere

3. Ergebnisse

unspezifische Spaltungen forciert wurden. Abb. 11 zeigt *Strep*-tag Zur vor der Reaktion mit Faktor Xa und das unmarkierte Zur. Nach der Abspaltung des 1,803 kDa Fragmentes wurden wiederum zwei Signale erkannt, bei denen das weniger emigrierte Peptid auf Höhe des kleineren Signals von *Strep*-tag Zur verlief und ein kleineres Protein ($19,8 \pm 0,2$; $18,4 \pm 0,5$ kDa) wurde detektiert. Somit konnte wiederum die Unabhängigkeit der beiden Varianten vom *Strep*-tag bestätigt werden.

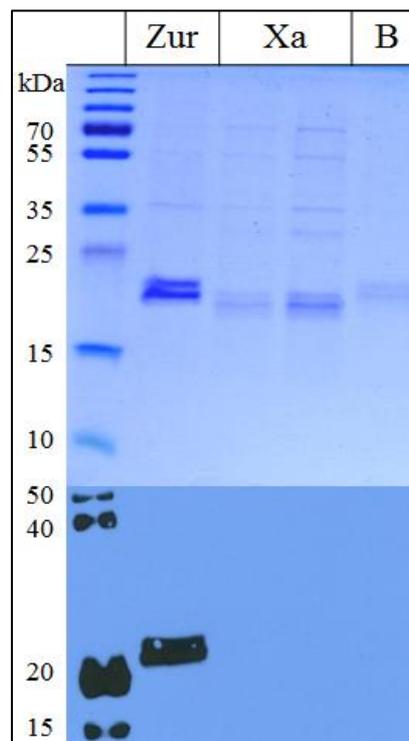


Abb. 11: Abspaltung des *Strep*-tag von Zur mittels Faktor Xa. Das Peptid im EMSA-Reaktionspuffer wurde in Puffer W (1:100) verdünnt und mit 16 U je mg Zur für 16 h bei RT inkubiert. Entfernung des Enzyms durch Resin und anschließende Trennung mittels *Strep* Tactin® - Säule. Je 2 µg *Strep*-tag Zur, gespaltenes Zur und an der Säule gebundenes Protein (B) sind auf einer 12,5 %igen denaturierenden PAGE aufgetragen. Eine Coomassie-Färbung bzw. ein *Strep*-tag-Nachweis erfolgte im Anschluss des Laufs.

UV-VIS-Spektren der N-terminalen markierten Varianten wurden für die weitere Charakterisierung der drei Fur-Orthologen herangezogen. Alle drei zeigten im inaktiven EMSA-Reaktionspuffer bei 414 nM einen Peak (Abb. 12). Dies galt für alle drei Fur-Orthologen. Dabei war der Peak bei *Strep*-tag Fur B am geringsten, obwohl die zweitgrößte Konzentration ($31,2 \mu\text{M}$) an Protein eingesetzt wurde. Die Korrektheit der Konzentrationsbestimmungen konnte an Hand der Absorbtion bei 280 nM nachgewiesen

3. Ergebnisse

werden. So steigt die Absorbtion von FurA (Abs. 280 nm: 0,115) zu Zur (Abs. 280 nm: 0,466) über FurB (Abs. 280 nm: 0,255). Im Kontrast zu FurB und Zur weist FurA einen Peak bei 330 nM und eine Schulter bei 450 nM auf. Bei der aeroben Proteinreinigung wurde nur bei diesen Proben eine leichte Braunfärbung des Säulenmaterials und des späteren Isolates beobachtet. Eine Koaufrreinigung von Eisen (III) unter aeroben Bedingungen wäre eine mögliche Erklärung dieses Spektrums für FurA. Dies konnte für FurB und Zur nicht beobachtet werden.

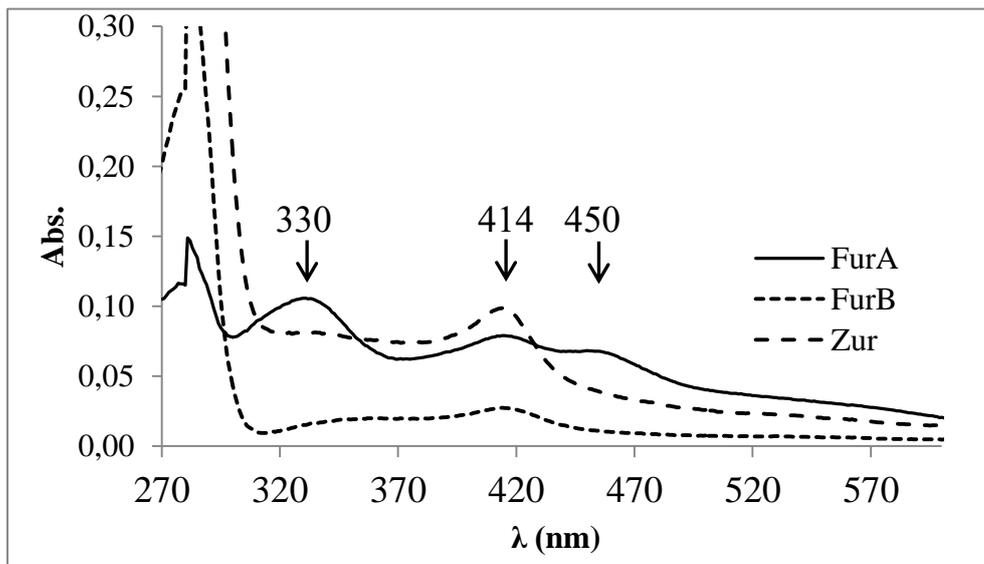


Abb. 12: UV/ VIS-Spektrum der N-terminalen markierten Versionen von FurA, FurB und Zur. Messung in QS-Küvetten rekombinant produzierter und gereinigter Proteine im EMSA-Reaktionspuffer (ohne DTT). Die Proteinkonzentrationen betragen 6,54 μM *Strep*-tag FurA, 31,2 μM *Strep*-tag FurB und 55,04 μM *Strep*-tag- Zur. Spektrenpeaks wurden mit Pfeilen bei 330, 414 und 450 nm für FurA markiert.

3. Ergebnisse

3.3. Interaktion von Zur mit Promotorsequenzen seines Regulons

Mit dem gereinigten Zur-Protein mit N-terminalen *Strep*-tag erfolgten die ersten *in vitro*-Studien. Ein funktionelles Protein unter aeroben Bedingungen, das für Zur der Fall war, kann hier als Zeichen für die Verwendung eines oxidativ-inerten Kofaktors gesehen werden. Somit spricht dies für eine Abgrenzung zu den eisenabhängigen Regulatoren, deren Kofaktor Fe^{2+} dem Protein unter dieser Bedingung nicht zu Verfügung stehen würde. Das gereinigte und konzentrierte Protein wurde in den EMSA-Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCL pH 7,8, 50 mM KCL, 5 % (v/v) Glycerin) überführt. In diesem erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration, anhand derer das Volumen für die entsprechende Stoffmenge bestimmt wurde. Die Interaktionsstudien zwischen der zu untersuchenden Promotorregion (13,3 nM) und den jeweiligen Konzentrationen an Protein erfolgten in 15 μl aktiven Reaktionspuffer mit 1 mM DTT als *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Eine Interaktion zwischen Protein und DNA resultiert hier in einer geringeren Laufweite des DNA-Fragmentes.

3.3.1. Zur bindet an die Promotorregion von *zupT*

Allein die Inkubation mit aktivem Zur führte zur Retardierung des Signals für ein 563 bp *zupTp*-Fragment auf eine Laufhöhe von ca. 900 bp (Abb. 13). Dabei wurde kein Einfluss der gewählten EDTA bzw. ZnCl_2 -Konzentrationen auf die beobachtete Interaktion festgestellt. An dieser Stelle ist anzumerken, dass ein 90facher Überschuss an Zur-Monomer bzw. 45facher an Zur-Dimeren im Vergleich zur eingesetzten *zupTp*-Molekülanzahl eingesetzt wurde. Dagegen konnte inaktives Zur (95 °C, 10 min), BSA und ein cytoplasmatisches Protein aus *S. coelicolor* keine Interaktion mit der vorgelegten DNA eingehen.

3. Ergebnisse

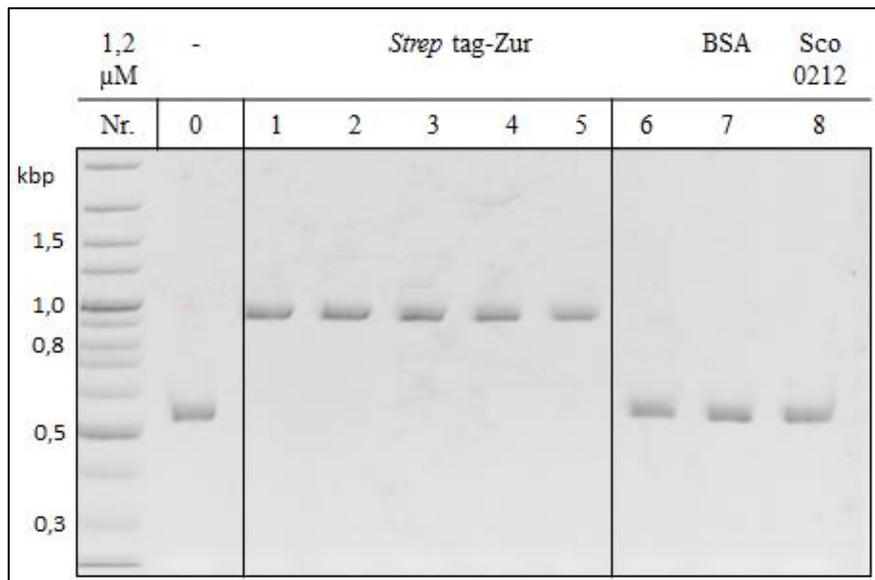


Abb. 13: Interaktion von *Strep-tag Zur* mit der Promotorregion von *zupT* in einem EMSA-Experiment. In einem Reaktionsvolumen von 15 μl , 0,0133 μM des 563 bp großen *zupT*_{P_{NotI/NcoI}}-Fragmentes wurden ohne (0) und mit einem Überschuss von 1,2 μM *Strep tag-Zur* (ca. 90fache an Zur-Monomer, 1-6) für 30 min bei 30 °C in dem aktiven EMSA-Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCL pH 7,8, 50 mM KCL, 5% Glycerol und 1 mM DTT) inkubiert. Als Kontrolle diente das denaturierte (10 min, 95 °C) Protein (6), BSA (7) und das rekombinant exprimierte, gereinigte lösliche Protein Sco0212 (8) aus *S. coelicolor*. Zusätzliche Inkubationen mit 100 μM ZnCl₂ (3, 5) bzw. EDTA (4: 50 μM , 5: 100 μM , 6: 500 μM) wurden durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung über eine 10%ige Native-PAGE. Als Größenstandard diente der 100 bp plus DNA ladder (Fermentas). Die DNA wurde durch ein 5 minütiges Ethidiumbromidbad mit anschließender Aufnahme unter UV-Licht visualisiert.

Die erfolgten EMSA-Experimente kamen in dieser Arbeit ohne die Verwendung eines Kompetitors auf Protein- (BSA) bzw. DNA-Ebene (Poly dIdC oder Lachsspermium) aus. In der Literatur (Shin *et al.* 2007; Schröder *et al.* 2010) werden diese Komponenten zur Sicherstellung der spezifischen Bindung genutzt. Anhand des EMSA-Designs in dieser Arbeit wurde auf diese Zusätze verzichtet und stattdessen auf Kontrollexperimente verwiesen, die die Interaktionsspezifität bestätigten. Da die Visualisierung der Retardierung bzw. der Interaktion zwischen Protein und DNA über eine nachträgliche Anfärbung der DNA z. B. mit Midori Green erfolgte, wurde auf zusätzliche Protein- bzw. DNA-Moleküle verzichtet, um ein eindeutiges Signal der retardierten DNA zu erzeugen. Die dadurch erhaltene klare Abgrenzung von gebundener, ungebundener DNA und Protein war hierbei essentiell für die Auswertung. Somit wurde eine Interaktion bzw. Retardierung durch das Verschwinden des Signals auf der üblichen Laufhöhe und dem Erscheinen auf der retardierten Laufhöhe definiert. Als Kontrolle dienten EMSA-Experimente unter den gleichen Bedingungen mit *Strep-tag Zur* z. B. gegen die Promotorregion von *fieF* (Anhang: Abb. 39). Keine der hier

3. Ergebnisse

verwendeten Proteinkonzentrationen führte zu einer Retardierung der DNA. Diese Promotorsequenzen enthielten keine der Zur-Box aus *zupTp* ähnlichen Sequenzen, jedoch das Palindrom ATTAATCC T GGATTAAT 45 nt stromaufwärts des Gens. Daher war eine Retardierung nur bei spezifischen DNA-Molekülen möglich. Des Weiteren wurde keine Retardierung der Promotorregion von *zupT* mit *Strep*-tag FurA bzw. FurB erzielt (Daten nicht gezeigt).

Konzentrationsabhängige Experimente betreffend der Proteinkonzentration gaben einen Einblick in die Bindungsaffinität von Zur gegenüber der Promotorregion von *zupT*. Dabei wurde wie zuvor die N-Terminal markierte Variante *Strep*-tag Zur verwendet, da zum einen der *Tag* anhand von Sekundärstruktur-Vorhersagen (Phyre2-Serva, (Kelley *et al.* 2015) keinen Einfluss auf die Dimerisierung und DNA-Bindung hat. Schon (Shin *et al.* 2007) arbeitete mit einer N-Terminalen markierten Version. Nicht-denaturiertes *Strep*-tag Zur (ohne BME und 95 °C) wies auf einer denaturierenden PAGE ein Signal bei ca. 40 kDa auf, was dem Dimer entsprechen würde. Ein weiterer Grund war der experimentelle Nachweis, dass mit C-terminalem markiertem und unmarkiertem Zur (N-Terminal, Faktor Xa) keine höhere Affinität zu beobachten war (Anhang, Abb. 40).

Um die Interaktion von Zur mit der Promotorregion weiter zu verifizieren, wurden weitere EMSA-Experimente mit Proteingradienten und unterschiedlichen Bedingungen an freiem Zink herangezogen. Dabei war es dem markierten *Strep*-tag Zur nach der Reinigung und dem Pufferwechsel möglich, die vorgelegten 0,2 pmol bzw. 13,33 nM an *zupTp* bei entsprechender Proteinkonzentration zu binden. Dem Fakt der stabilen Bildung von zwei Zur-Varianten wurde Rechnung getragen durch das Einbringen eines Korrekturfaktors, der das Verhältnis des oberen gegenüber dem unteren Signal von *Strep*-tag Zur in einer denaturierenden PAGE widerspiegelt. Trotz der stabilen Ausbildung der zwei Formen im Verhältnis von nahezu 0,3-0,5 wurde über die Zeit ein Umwandlungsprozess der oberen zur unteren wahrgenommen. Dies war ersichtlich bei Proben, die nicht bei -80 °C gelagert wurden.

Unter Annahme der Bindung eines Zur-Dimers je DNA-Molekül bzw. Zur-Box wurden folgende Kd-Werte durch die Auftragung der logarithmierten Dimerkonzentration (mit Korrekturfaktor) an Zur gegen $\log(I/1-I)$, wobei I das Maß an gebundener DNA darstellt, bestimmt. Diese Daten wurden für die einzelnen EMSA-Experimente erhoben und korrelierten mit den graphischen Daten aus Abb. 14.

3. Ergebnisse

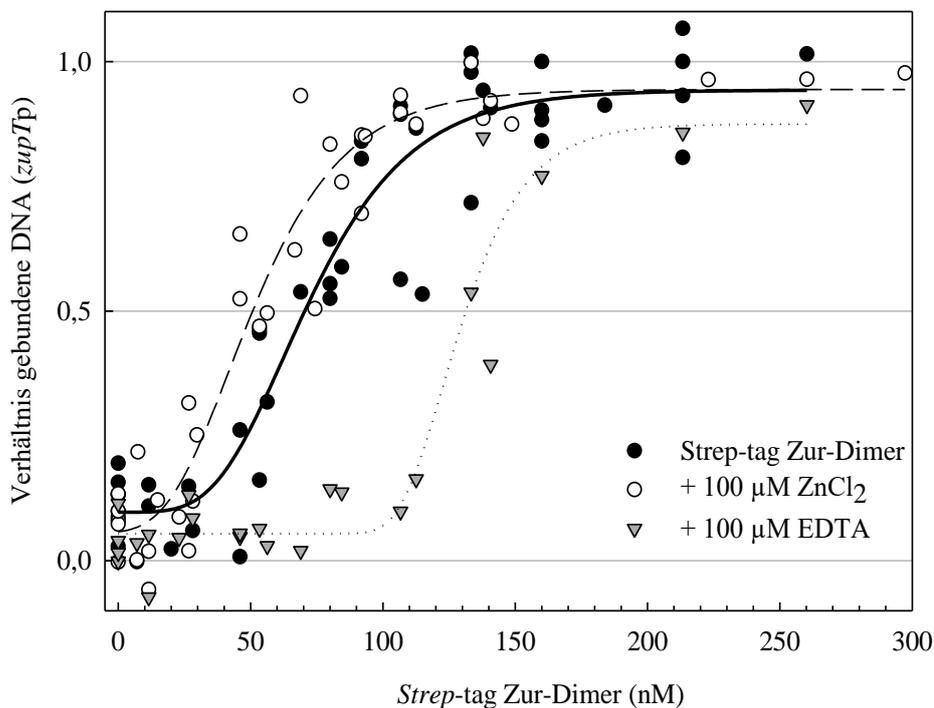


Abb. 14: Abhängigkeit der Interaktion von *Strep-tag Zur* und *zurTp* unter Zinkmangel sowie -überschuss. Aufgetragen wurde das Verhältnis der gebundenen DNA gegenüber der eingesetzten Zur-Dimer-Konzentration von unabhängigen EMSA-Experimenten ohne Zusätze (●, n = 6), mit 100 μM ZnCl₂ (○, n = 6) und 100 μM EDTA (▼, n = 3). Die Auswertung erfolgte mittels GelQuant.NET von biochemlabsolutions.com und SigmaPlot 4.5. Die Bestimmung der Affinitätskonstante K_d unter Voraussetzung der Bindung eines Dimers je Zur-Box ergab sich aus dem Schnittpunkt der sigmoidalen Funktion 5. Ordnung zum halbmaximalen Verhältnis gebundener DNA (y = 0,5). Die EMSA wurden bei 30 °C für 30 min inkubiert und über eine 10%ige Nativ-PAGE mit anschließender Anfärbung der DNA-Bestandteile visualisiert und ausgewertet.

Ohne Zusätze von Zink und dem Chelator EDTA wurden durchschnittlich $70,76 \pm 6$ nM Protein benötigt, um eine halbmaximale Retardierung der vorgelegten 13,3 nM *zurTp* zu erreichen. Dagegen war der K_d-Wert mit $51,96 \pm 10$ nM geringer bei der Präsenz von 100 μM ZnCl₂. Die Verringerung der Kationenkonzentration und somit auch der Konzentration an freiem Zink durch den Chelator EDTA führte zu einem erhöhten Wert ($126,18 \pm 28,4$ nM). Somit war die Bindungsaffinität von *Zur* zu *zurTp* durch die vorhandene Zinkkonzentration modellierbar. Dies war bei einem Zink sensierendem Protein zu erwarten. Die Streuung der Daten resultierte dabei aus der Qualität, dem Alter und der Lagerungsart des Proteinisolates sowie der Elektrophorese und den anschließenden Färbeprozessen.

3. Ergebnisse

3.3.2. Das Zur-Bindemotiv in *C. metallidurans*

Bei näherer Betrachtung der Promotorregion von *zupT* wurde eine palindromische Sequenz identifiziert. Die Verifizierung dieses *inverted repeats* als Bindemotiv wurde in EMSA-Experimenten mit unterschiedlichen Promotorvarianten bestätigt (Abb. 15). Die Promotorregionen wurden unter Verwendung der Primer (Tabelle 17, Anhang) *PzupT* Box1-6 sowie dem jeweiligen äußeren Primer (*PzupT* NotI bzw. NcoI) amplifiziert. Für eine vollständige Bindung durch Zur war neben der gesamten palindromischen Sequenz (Region 0, 5, 6) das Vorhandensein des flankierenden AT-reichen Bereichs (Region 1, 3) für eine Interaktion mit Zur notwendig. Durch zusätzliche 9 Nukleotide (GC-reich) lag die Bindestelle nicht am Rand des DNA-Fragmentes im Fall von *zupT*_{Box3}. Somit erzeugte eine artifizielle Erweiterung der Promotorregion keinen Unterschied in der nicht vorhandenen Interaktion im Vergleich zu Fragmenten, die mit dem *inverted repeat* abschlossen (Region 1).

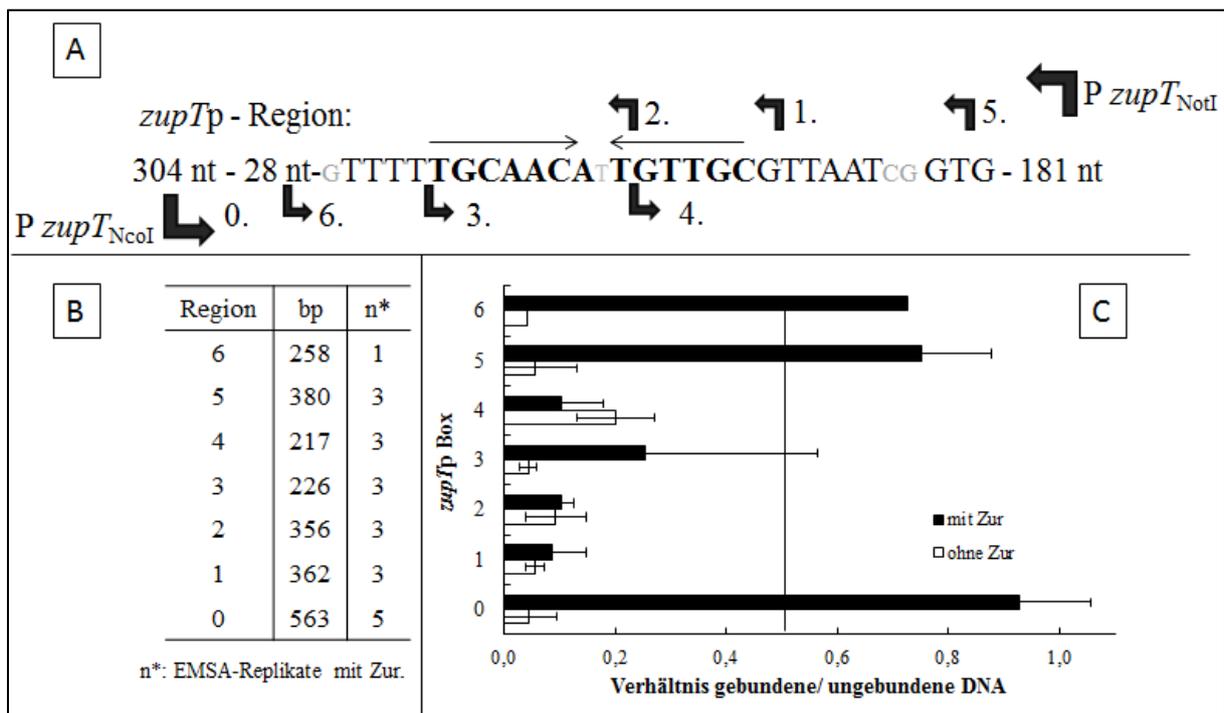


Abb. 15: Interaktionsstudien zwischen Zur und *zupT*-Varianten (A). Die EMSA-Experimente erfolgten zwischen 20 pmol Strep-tag Zur und 0,2 pmol der Promotorregionen von *zupT*. Die DNA-Fragmente wurden mittels PCR unter Verwendung der Zur-Box-Primer und den außenliegenden cre-lox-Primern *zupT*_{NcoI} (Region 0) und *zupT*_{NotI} (181 nt stromabwärts des Startcodons) erstellt. Die Interaktion zwischen Protein und den 217 - 563 bp (B) langen DNA-Fragmenten wurde in einer Midori Green bzw. silbergefärbten nativen PAGE anhand dem Verhältnis zwischen retardierter und ungebundener DNA bestimmt (C).

3. Ergebnisse

3.3.3. Identifikation weiterer Zur-Bindemotive

Anhand des markanten Zur-Motivs in *zupTp* wurden weitere mögliche Motive mit geringer Abweichung zum idealen *inverted repeat* identifiziert (Abb.16). Darunter war die eigene Promotorregion von *zur* sowie die von *rmet1098 (cobW₁)* und *rmet0125(cobW₃)*, deren Produkte als *cobalamin biosynthesis*-Proteine (*cobW*) annotiert sind.

		Abw.
<i>zupTp</i> -	TTTT TGCAACA T TGTTGCGTTAAT	1 nt
<i>cobW₁</i> _{ip^{distal}} -	GAA TGCAACA A GGTTGCATTTAA	1 nt
<i>cobW₁</i> _{ip^{proxi}} -	TCTG TTTGCAACA A TGTTGCATTAACC	-
<i>cobW₃</i> _p -	TACAG TCGCAACT T TGTTGCATCAACAT	2 nt
<i>zurp</i> -	TGTTGG TGCAACT G AATTGCATCGGGTA	1 nt

Abb. 16: Weitere Zur-Bindemotive in den Promotorsequenzen von *zur*, *cobW₁* und *cobW₃*. Dargestellt sind die ähnlichen palindromischen Sequenzen mit flankierender Sequenz, die in der Promotorregion von *zupT*, *zur*, *cobW₁* sowie *cobW₃* vorzufinden sind. Die Promotorregion von *cobW₁* weist einen am Startcodon näher liegenden (proximal) und einen weiter entfernten (distal) *inverted repeat* auf. Des Weiteren sind die Abweichungen zur perfekten palindromischen Sequenz angegeben.

Vertreter der COG0523 G3E-Familie mit GTPase-Domäne, zu denen die *CobW₁₋₃* zählen, werden als mögliche Metall-Chaperons gehandelt. Zum einen wurde ein 49 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons von *cobW₁* befindlicher 7:1:7 *inverted repeat* mit AT-reicher Flankierung gefunden. Acht Nukleotide weiter vom Gen entfernt beginnt eine zweite ähnliche Sequenz, wobei der erwähnte flankierende Bereich zueinander komplementär ist. Somit weist diese Sequenz einen größeren *repeat* auf. Jedoch ist das Thymidin durch ein Guanidin an Position 1 des zweiten Teils ausgetauscht. Zusammenfassend besitzt die Promotorregion von *cobW₁* eine Verdopplung der vermuteten Zur-Box.

Durch EMSA Experimente mit *Strep*-tag Zur wurde eine Interaktion mit *cobW₁*p festgestellt. Hierbei wurde ein 405 bp DNA-Fragment so stark retardiert, dass es eine um 63 % verkürzte Wanderstrecke auf einer 8 %igen nicht-denaturierenden PAGE aufwies (Abb. 17). Im Vergleich dazu wurde der Lauf von *zupTp* um 50% (10%ige PAGE) verzögert. Dies suggerierte die mehrfache Bindung von Zur-Dimeren und somit das Vorhandensein zweier separater und aktiver Bindemotive. Durch Bindestudien mit verschiedenen Bereichen des

3. Ergebnisse

Promotors von *cobW*₁, die ganz oder teilweise beide möglichen Bindestellen abdeckten, wurde die aktive Bindung beider Motive bestätigt.

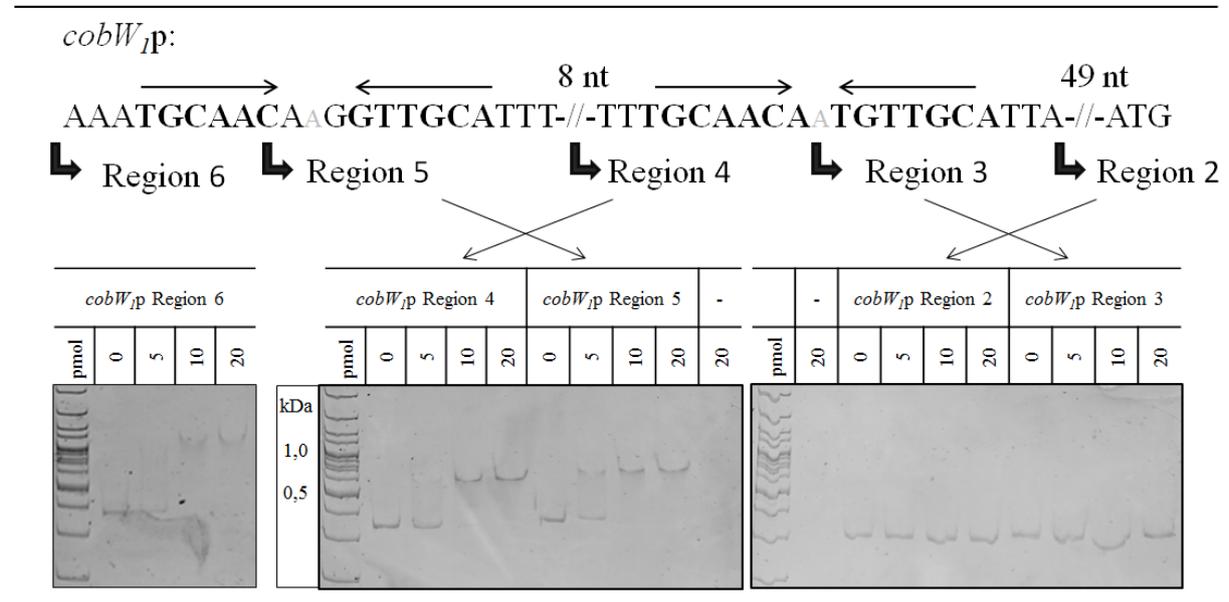


Abb. 17: Identifikation der Zur-Bindemotive in *cobW*₁p. EMSA-Experimente erfolgten mit 0,2 pmol der verschiedenen *cobW*₁p-Varianten (0,01333 μ M) mit 0-20 pmol Strep-tag-Zur (0- 1,33 μ M) in einem Endvolumen von 15 μ l. Die Promotorregion wurde unter Verwendung der Primer PcobW1 1-6 sowie dem reversen Primer PcobW1.8 erstellt. Nach der 30 minütigen Inkubation im EMSA-Reaktionspuffer mit 100 μ M ZnCl₂ bei 30 °C wurden die Proben über eine 8 %ige Nativ-PAGE aufgetrennt und mittels Midori-Green direct Poststaining konnte die DNA unter UV-Licht visualisiert werden.

DNA-Fragmente, die nur das erste Bindemotiv vollständig besaßen, zeigten zwar eine Interaktion, jedoch wurde die Wanderstrecke im Gegensatz zum Vorhandensein beider Motive nur um 50 % in der nativen PAGE gemindert. Zur Bindung des *zinc uptake regulators* wird ein vollständiger *repeat* benötigt. Dies ist ersichtlich, da die Hälfte des ersten *repeats* (Region 3) zu keiner Interaktion führte und ein 1,5faches Bindemotiv (Region 5) denselben Verlauf des ersten Motivs hatte. Ein konzentrationsabhängiges Experiment deutete für beide Motive auf eine ähnliche Affinität für Zur hin (Abb. 18). Grund hierfür ist das Nichtauftreten von Intermediaten. Anhand eines EMSA-Nativ-Gels wird ein K_d für die gesamte Promotorregion von ca. 61 nM Zur-Dimer unter Normalbedingungen angenommen, also ähnlich der Promotorregion von *zupT*.

3. Ergebnisse



Abb. 18: Bindestudie von Strep-tag Zur zu *cobW*₁p. Gezeigt ist ein EMSA-Experiment von verschiedenen Konzentrationen an Strep-tag Zur als Dimer und bereinigt mit dem Korrekturfaktor von 0,4 (Verhältnis Zur-Varianten) gegen *cobW*₁p (13,3 nM, 405 bp). Visualisierung der Interaktion erfolgte in einer 10 %igen Nativ-PAGE mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle wurden nur Protein (P) und nur die DNA (0) sowie ein Größenstandard aufgetragen (100 bp Plus DNA-Ladder). Maximale Retardierung mit 80 nM Zur-Dimer. Die graphische Auswertung mittels GelQuantNET beurteilte den Kd-Wert mit 61 nM Protein.

Des Weiteren konnte die Regulation von *cobW*₁ und seinen 5 in einem Operon liegenden Nachbargenen durch Zur anhand einer Operon-*lacZ*-Fusion bestätigt werden. Die gemessene β -Galaktosidaseaktivität des Konstruktes $\phi(rmet1102-lacZ)$ zeigte eine stark erhöhte Expressionsrate von dem nur unter metalllimitierenden Bedingungen induziertem Operon (25 ± 3 U/ mg TG) in der Δzur -Mutante. Dabei wurde eine 300 - 400fache erhöhte Expression beobachtet (Tabelle 11). Des Weiteren konnte durch EMSA-Experimente eine Interaktion von Strep-tag Zur zu der Promotorregion von *zur* selbst und *cobW*₃ (*rmet0125*) beobachtet werden. Die jeweilige vorgelegte DNA (13,3 nM) wurde durch ca. 115 nM Strep-tag Zur-Dimer (10 pmol Zur-Monomer; Korrekturfaktor: 0,3446) vollständig gebunden (Abb. 41). Außerdem scheint über das Bindemotiv im bidirektionalen *zur*-Promotor das stromaufwärtsliegende Gen *rmet0129* ebenfalls über Zur reguliert zu sein. Ein 17faches stärkeres Signal der Reporterfusion $\phi(rmet0129-lacZ)$ in Δzur wurde gegenüber AE104 bestimmt. Eine grundsätzliche Reprimierung (ca. 40 %) der Transkription erfolgte durch den Einfluss von Zink, was einer Regulation durch Zur entsprechen würde. Jedoch unter Kationenmangel (EDTA) konnte kein gegenteiliger Effekt erzeugt werden (Tabelle 11).

3. Ergebnisse

Tabelle 11: Expressionsanalyse (*lacZ*) von *rmet0129* und *rmet1102* in AE104 und Δ *zur*

		β -Galaktosidaseaktivität (U/mg TG) der Genfusionen:							
Bedingung	Stamm	MM	200 μ M	500 μ M	200 μ M	500 μ M	200 μ M	200 μ M	50 μ M
		ohne ZA	Zn ²⁺	Zn ²⁺	EDTA	EDTA	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cd ²⁺
<i>rmet0129-lacZ</i>									
	AE104	25 ^{±2}	15 ^{±2}	15 ^{±3}	25 ^{±3}	26 ^{±1}	22 ^{±1}	26 ^{±5}	23 ^{±6}
	Δ <i>zur</i>	445^{±48}	347^{±24}	303^{±67}	385^{±61}	375^{±39}	373^{±25}	411^{±43}	396^{±24}
<i>rmet1102-lacZ</i>									
	AE104	1 ^{±0,1}	0,9 ^{±0,2}	0,9 ^{±0,1}	15,9^{±1,3}	20,4^{±1,6}	1,4 ^{±0,2}	1,3 ^{±0,3}	1,2 ^{±0,2}
	Δ <i>zur</i>	393^{±93}	377^{±79}	326^{±77}	423^{±59}	431^{±67}	379^{±58}	382^{±57}	346^{±103}

Reportergenfusionen wurden in AE104 und Δ *zur* mit den Plasmiden pECD 1444 (*rmet1102*, n = 3/5) sowie 1448 (*rmet0129*, n = 3) erzeugt. Jede Messung wurde mit einem technischen Replikat durchgeführt. Signifikante Unterschiede zum Ausgangsstamm AE104 und der Inkubation ohne Zusätze sind grau hinterlegt. Eine gesteigerte (fett) und herabgesetzte (kursiv) Expression wurden kenntlich gemacht.

Indizien für eine Autoregulation von *zur*, welche schon aus anderen Organismen bekannt ist, konnten durch *cis*-agierende Vektoren (pBBR3:*lacZ*; A. Heinz 2014) mit Promotor-Genfusion gesammelt werden (Tabelle 12). Hierzu wurde die *zur*-Promotorregion stromaufwärts des promotorlosen *lacZ*-Gens mit ATG und nachfolgendem *Xba*I-Restriktionsmotiv kloniert. Die Untersuchung erfolgte unter den Standardbedingungen für den β -Galaktosidase-Assay in dieser Arbeit.

Tabelle 12: Bestimmung der Promotoraktivität von *zur*

		β -Galaktosidaseaktivität (U/mg TG) der Promotorfusionen:							
Bedingung	Stamm	MM	50 μ M	100 μ M	200 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M	200 μ M
		ohne ZA	Zn ²⁺	Zn ²⁺	Zn ²⁺	EDTA	EDTA	EDTA	Ni ²⁺
<i>pBBR3:lacZ</i>									
	AE104	11 ^{±1}	10 ^{±0}	10 ^{±0}	8 ^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±0}	12 ^{±1}	9 ^{±1}
	Δ <i>furA</i>	7 ^{±1}	5 ^{±1}	3 ^{±1}	2 ^{±0}	7 ^{±1}	7 ^{±1}	7 ^{±1}	4 ^{±2}
	Δ <i>furB</i>	6 ^{±0}	5 ^{±1}	5 ^{±1}	2 ^{±2}	6 ^{±1}	6 ^{±1}	6 ^{±1}	5 ^{±3}
	Δ <i>zur</i>	7 ^{±0}	6 ^{±1}	5 ^{±0}	4 ^{±0}	7 ^{±0}	7 ^{±0}	7 ^{±0}	5 ^{±0}
<i>pBBR3:zurp:lacZ</i>									
	AE104	14 ^{±2}	15 ^{±7}	21 ^{±3}	15 ^{±5}	18 ^{±1}	22 ^{±1}	22 ^{±2}	13 ^{±2}
	Δ <i>furA</i>	27 ^{±11}	26 ^{±10}	24 ^{±7}	13 ^{±5}	32 ^{±12}	32 ^{±12}	32 ^{±15}	23 ^{±7}
	Δ <i>furB</i>	20^{±1}	19 ^{±3}	21 ^{±4}	10 ^{±5}	24^{±2}	25 ^{±1}	27^{±1}	15 ^{±1}
	Δ <i>zur</i>	27^{±5}	31^{±6}	43^{±12}	28^{±9}	31^{±6}	34^{±4}	34^{±5}	25^{±2}

n = 3 mit je einem technischen Replikat. Bei Δ *furA* *pBBR3:zurp:lacZ* n = 6. Durch Einbringen der Promotorregion von *zur* über *Sac*II und *Xba*I in *pBBR3:lacZ* wurde *pBBR3:zurp:lacZ* erzeugt.

3. Ergebnisse

Der Leervektor wies in den verschiedenen Stammhintergründen eine geringe Basisaktivität (≤ 12 U/ mg TG) als Negativkontrolle auf. Eine grundsätzlich leicht gesteigerte Aktivität unter Berücksichtigung der Standardabweichung wurde nur in Δzur beobachtet (≥ 25 U/mg TG). Eine Abhängigkeit der Aktivität des Promotors zur Metallverfügbarkeit war für AE104 nicht zu beobachten. Bei den Konstrukten in $\Delta furA$ sowie $\Delta furB$ stand eine zu große Streuung der Daten der Deutung eines Effektes entgegen.

Unter Verwendung der erkannten *zur*-Boxen (*zurT*, *cobW*_{1,3}, *zur*) erfolgte ein Screening der beiden Chromosomen I und II sowie der Plasmide pMOL28 und pMOL30 durch das *Fast Investigation Tool for Bacterial & Archeal Regulons* (<http://archea.u-psud.fr/fitbar>; Oberto 2010). Das gesamte Genom wurde unter Verwendung der DNA-binde Matrix von Fur *E. coli* und des *Entropy-weighted* PSSM – Algorithmus gescannt. Neben den erwähnten Sequenzen konnten noch zwei weitere Sequenzen identifiziert werden, die jedoch in codierenden Bereichen lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um *rmet1459* (gGCAACt c TGTTGCct) und *rmet2763* (TGCAACA g cGTcGCA), einem möglichen Transmembranprotein und dem TorD Chaperon. Weitere interessante Promotorregionen wurden per Sequenzabgleich (NCBI) mit Teilstücken der Zur-Region identifiziert. *In vitro* und *In vivo*-Studien untermauerten keine Beteiligung dieser Gene am Zur-Regulon. Die folgende Tabelle 13 zeigt hierbei die Promotoren mit Zur-Bindemotiv-ähnlicher Sequenz. Die Resultate der *in vitro*- Experimente (EMSA) und der Expressionsanalyse mittels Reporterfusionen in AE104 und der *fur*-/ *zur*-Mutanten sind im Anhang (Tabelle 18) vorzufinden. Als Indiz einer unterschiedlichen Expression wurde die Blaufärbung der Kulturen auf MM_{X-Gal} (s) mit und ohne EDTA herangezogen. Unter den Kandidatengeneten waren Alkoholdehydrogenasen und die Region von *furB*. Für keinen der Kandidaten konnte eine Interaktion mit Zur (EMSA) nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

Tabelle 13: Promotorsequenzen mit ähnlichen Zur-Bindemotiv. Experimentelle Untersuchung zur Zugehörigkeit zum Zur-Regulon an Hand von EMSA-Experimenten und indirekter Expressionsanalyse mittels Reporterengenfusion auf MM_{X-Gal} siehe Tabelle 18 (Anhang)

Promotor	<i>rmet</i>	Protein
TGAAGCAAGTTGA T TCAACAAGGA	0545	Alkoholdehydrogenase
TCCGGCGTTGTTTCGAACGGTAAA	1102	Carboanhydrase
TTTCGCAACT T TGTTGATG	1569	Alkoholdehydrogenase
TTTCCCAACTTTTGCATCCA	3880	Alkoholdehydrogenase
TTTGCTTCAACGAT -/- GATCAAGCAAGTTGCTC	4281	Alkoholdehydrogenase
TGCAACA A CGTTGAAGTA	5744	hypoth. Protein
	5747	hypoth. Protein
-TGCAACA A TGTTGCA-		Zur-Box

3.4. Vergleich des löslichen Proteoms von AE104 und Δ zur

Neben der physiologischen Charakterisierung der Δ zur-Mutante, der Untersuchung des Einflusses auf das Expressionsmuster potentieller Regulon-Kandidaten wurde über 2D-Gele nach Unterschieden in der Proteinzusammensetzung der löslichen Fraktion zwischen AE104 und der Mutante gesucht. Die Überlagerung der denaturierenden PAGE von AE104 und Δ zur (Decodon, Abb. 20, Anhang: Abb. 42) zeigte durch Auffinden erhöhter Konzentrationen an OmpC-Protein (gi|94312165) in der löslichen Fraktion mit einem Molekulargewicht von 41,9 kDa einen weiteren resultierenden Effekt der Deletion von *zur*. Dieses Protein wurde in zwei separaten Proteinspots identifiziert.

Das theoretische Molekulargewicht von Rmet3234 (OmpC) korrespondiert mit 41,95 kDa mit den gefundenen Identifikationen. Es ist stromabwärts der Gene *tatA*, *B* und *C* des Typ I Sekretionssystem als 4. Gen codiert. Die Konstruktion einer Reporterengenfusion mit pECD794-1:*rmet3234* resultierte in keinem unterschiedlichen Expressionsmuster der Δ zur-Mutante gegenüber AE104 (Abb. 19). Eine starke Expression war auf MM-Agar mit X-Gal zu beobachten, die durch zusätzliche 100 μ M ZnCl₂ gesteigert wurde. Polareffekte beruhend auf der Insertion des Plasmides sind auf Grund der Orientierung des nachfolgenden Gens in entgegengesetzter Richtung auszuschließen. In der Promotorregion von *rmet3234* konnten zwei *inverted repeat*-ähnliche Sequenzen beobachtet werden, die jedoch nicht mit denen von *zurTp* zu vergleichen sind.

3. Ergebnisse

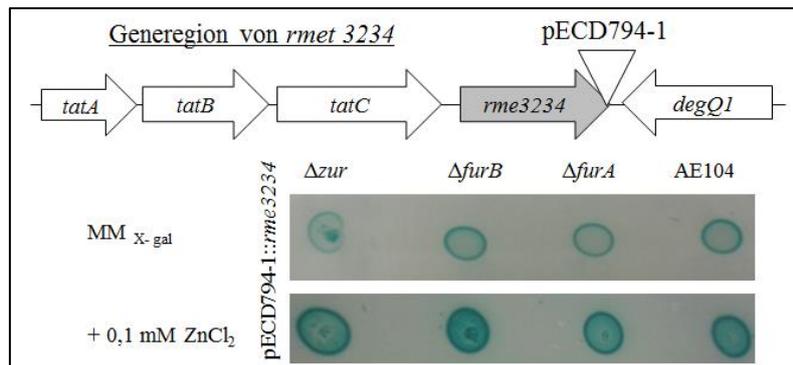


Abb. 19: Operonstruktur von *rmet3234* sowie Expressionsmuster der Reporterfusion $\phi(rmet3234:lacZ)$ in AE104 und dessen Mutanten. Jeweils 2 μ l einer Vorkultur (spätexponentielle Phase) der Stämme AE104, $\Delta furA$, $\Delta furB$ und Δzur mit pECD1440 wurde auf MM x -gal mit und ohne 100 μ M $ZnCl_2$ für 5 Tage bei 30 °C kultiviert.

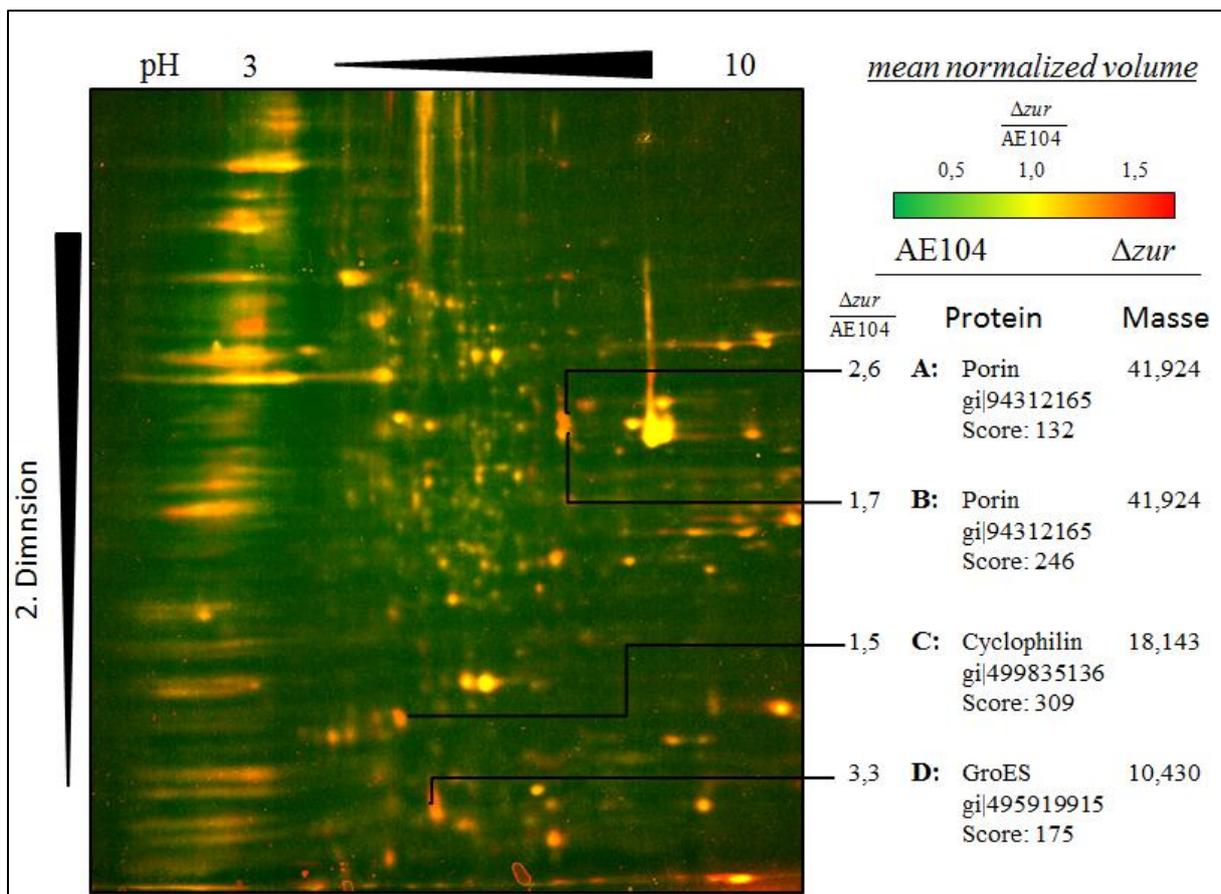


Abb. 20: Vergleich des Proteoms der zytoplasmatischen Fraktion von AE104 und Δzur . Dargestellt ist eine Überlagerung zweier 2D-Gele á 300 μ g Rohextrakt von AE104 und der *zur*-Mutante durch Decodon Delta 2D (weiteres Paar im Anhang). Zellen wurden in Tris-MM von einer Vor- zur 200 ml Hauptkultur (+ 25 μ M $ZnCl_2$) mit OD600 = 0,8 angezogen. Die Auftrennung der 1. Dimension erfolgte in einem nicht linearen IEF-Streifen 3-10 und die 2. Dimension in einer 10 %igen denaturierenden PAGE. Proteinspots, die in der Mutante stärker vertreten sind und einen höheren

3. Ergebnisse

$\Delta_{zur}/AE104$ normalized mean value – Quotienten ($\geq 1,5$) besitzen, erscheinen rot. Die Proteine der Spots A-D wurden durch Frau Dr. Schierhorn tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Angegeben sind Treffer mit den höchsten Identifikationswerten (Score). So wurden OmpC-Porine (Spot A und B) mit einer Molmasse von ca. 42 kDa als markanter Unterschied zwischen dem AE104 und Δ_{zur} -Stamm identifiziert.

3. Ergebnisse

3.5. Rmet3456 ist der MerR-Regulator für ZntA-physiologische Betrachtung

Neben dem bekannten Regulator für Zinkimport, Zur, konnte ZntR als MerR-Regulator (Brocklehurst *et al.* 1999) der Zink-abhängigen ATPase ZntA in vielen Organismen identifiziert werden (Xiong *et al.* 2011; Chaoprasid *et al.* 2015). Kandidaten für die Regulation der Schwermetall-Exportsysteme wurden unter den 16 codierten MerR-Regulatoren *C. metallidurans* identifiziert. Dabei wiesen die Proteinsequenzen von PbrR, Rmet2302 und Rmet3456 höhere Übereinstimmungen mit ZntR aus *E. coli* auf (Mergeay *et al.* 2003). PbrR ist mit der Bleiresistenzdeterminante PbrA auf pMOL30 (Taghavi *et al.* 2009) codiert und wurde in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet. Zum Nachweis des Einflusses der chromosomal codierten PbrR-ähnlichen Proteine wurden Mutanten basierend auf dem *cre-lox* System erstellt und über eine PCR mit spezifischen Primern zur jeweiligen Region überprüft.

Ein generelles Wachstumsdefizit beruhend auf der Deletion von *rmet2302* bzw. *rmet3456* konnte in Wachstumskurven in Tris-MM nicht beobachtet werden (Abb. 21). Die bestimmte Wachstumsrate bzw. Verdopplungszeit wies keine signifikanten Unterschiede zu AE104 auf.

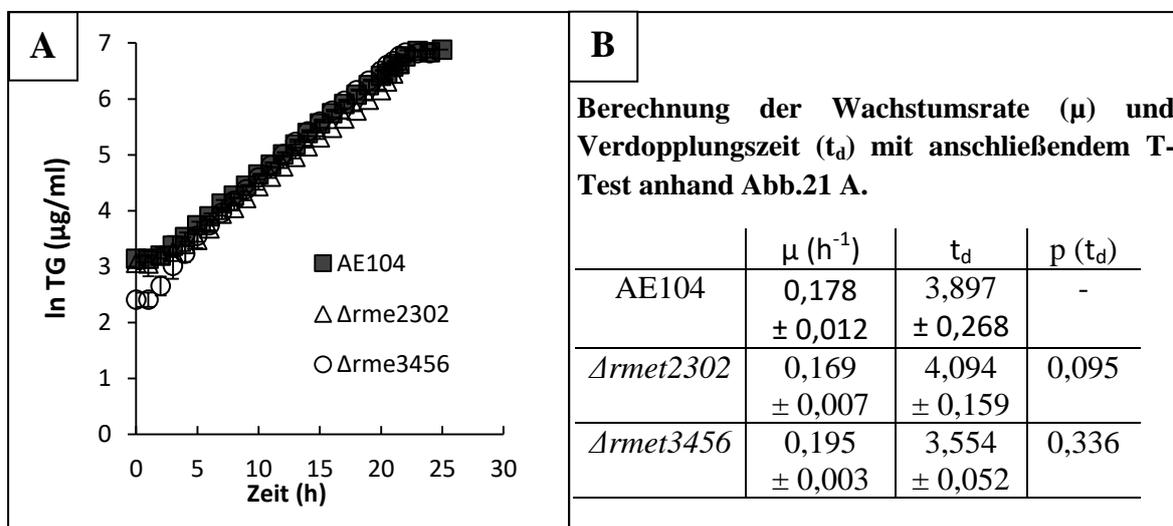


Abb. 21: Wachstumskurve der Stämme AE104 und der Mutanten $\Delta rmet2302$ sowie $\Delta rmet3456$ in Tris-MM (A). Aufgetragen sind der natürliche Logarithmus des Trockengewichtes, berechnet anhand der gemessenen KE-Einheiten, gegen die Zeit. Ermittelte Wachstums- und Verdopplungszeit sowie p-Wert für Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante.

3. Ergebnisse

Die Beeinflussung der Schwermetallresistenz gegenüber Zink, Cadmium und Cobalt wurde in Wachstumsendpunktbestimmungen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Für Cobalt konnte keine Veränderung zum Wildtyp-Phänotyp beobachtet werden. Beide Deletionsmutanten $\Delta rmet2302$ und $\Delta rmet3456$ zeigten mit den IC_{50} -Werten von 456 ± 43 und $118 \pm 26 \mu M$ eine geminderte Resistenz gegenüber Zink (Abb. 22, Tabelle 14). AE104 erzielte in diesem Experiment einen IC_{50} von $622 \pm 103 \mu M$. Da allein die Deletion von *rmet2302* eine Beeinflussung der Cadmiumresistenz mit IC_{50} $279 \pm 19 \mu M$ (AE104: $151 \pm 16 \mu M$) zur Folge hatte, wurde es als Regulator des stromaufwärts liegenden Gens *cadA* für die P_{IB2} -typ ATPase CadA gesehen. Aus diesem Grund rückte Rmet3456 für die Regulierung der zinkregulierten ATPase ZntA in den Fokus.

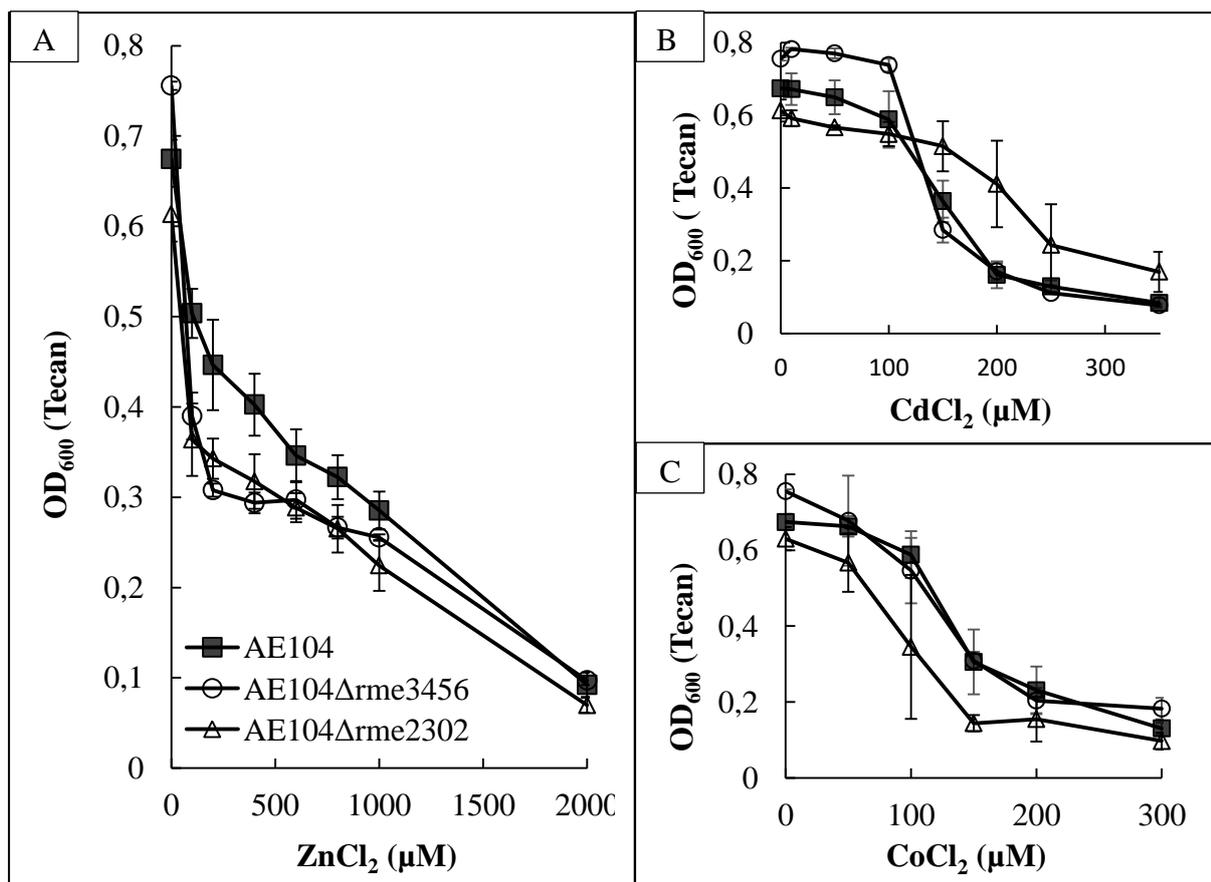


Abb. 22: Schwermetallresistenz des Stammes AE104 sowie der Mutanten $\Delta rmet2302$, $\Delta rmet3456$ durch Wachstumsendpunktbestimmung in Flüssigmedium gegen Zink (A), Cadmium (B) und Cobalt (C).

3. Ergebnisse

Tabelle 14: Resistenzbestimmung (IC₅₀) der Stämme AE104, $\Delta rmet3456$ anhand der Wachstumsendpunktbestimmungen in Tris-MM (Abb. 22) gegenüber Schwermetallen

		ZnCl ₂ (μM)	n	CdCl ₂ (μM)	n	CoCl ₂ (μM)	n
AE104	IC ₅₀	622 ± 103	6	151 ± 16	6	170 ± 19	5
	<i>b-value</i>	599 ± 31		31 ± 6		37 ± 8	
$\Delta rmet3456$	IC ₅₀	118 ± 26	7	144 ± 3	7	136 ± 7	7
	<i>b-value</i>	209 ± 53		13 ± 1		35 ± 13	
$\Delta rmet2302$	IC ₅₀	456 ± 43	4	279 ± 19	5	142 ± 27	3
	<i>b-value</i>	851 ± 462		67 ± 18		43 ± 18	

Abb. 23 zeigt in Aufnahmeexperimenten mit Zn⁶⁵, wie zuvor für die *zur*-Mutante, die Aufnahmedynamik im Vergleich zu AE104. Im Vergleich zu AE104 konnte eine signifikant gesteigerte Aufnahme von Zink innerhalb von 2 min beobachtet werden. Dabei wurde eine doppelt so hohe Akkumulation in $\Delta rmet3456$ mit 0,176 nmol/ mg TG nach 2 min bestimmt. Ein Fehlen des Aktivators für die Expression von Zn-Exportsystemen würde zu dieser gesteigerten Akkumulation von Zink führen.

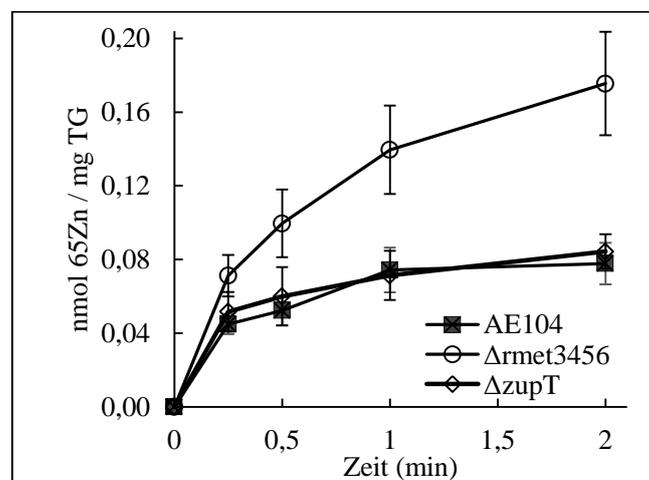


Abb. 23: Aufnahmeexperiment mit radioaktivem Zn⁶⁵-Isotop der Stämme AE104, $\Delta zupT$ sowie $\Delta rmet3456$. Die Zn-Aufnahmerate von $\Delta rmet3456$ betrug im Zeitintervall (t: 0.25 - 1 min) $32,9 \pm 11 \times 10^3$ Zn/ min pro Zelle (n = 8 als technisches Replikat) und grenzt sich somit von AE104 ($10,4 \pm 6 \times 10^3$ Zn/ min pro Zelle) ab.

Die phänotypischen Beobachtungen konnten durch Messung von Reporterfusionen der beiden chromosomal codierten P-typ ATPasen erklärt werden (Tabelle 15). Die Deletion von *rmet3456* beeinflusste bei diesen Expressions-Analysen von *cadA* und *zntA* beide P-Typ ATPasen in einer gegensätzlichen Art und Weise. Grundsätzlich wurde, wie schon erwähnt, durch Zink die Expression von *zntA* stark (5fach) und von *cadA* minimal (2fach) induziert. In $\Delta rmet3456$ wurde eine geringe basale Expression von 3 - 4 U/mg TG unabhängig von der

3. Ergebnisse

Verfügbarkeit bzw. Mangel von Zink und weiteren Kationen beobachtet. Durch die konstitutive Expression in *trans* von *rmet3456* unter dem *lacI*-Promotor von *E. coli* wurde die Expressionsrate unter Norm- und metalllimitierenden Bedingungen sowie erhöhten Konzentrationen an Cobalt, Cadmium sowie Nickel vollständig rekonstituiert. Unter Zinkeinfluss konnte eine Wiederherstellung der Induktionsfähigkeit beobachtet werden, die jedoch nicht das Niveau des Wildtypstammes erreichte.

Tabelle 15: Aktivität der Reportergenfusionen von *zntA* und *cadA* in $\Delta rmet3456$.

		β-Galaktosidaseaktivität (U/mg TG) unter den						
		Bedingungen:						
Bedingung	MM c (μM)	200 Zn ²⁺	500 Zn ²⁺	200 EDT A	500 EDT A	200 Co ²⁺	200 Ni ²⁺	200 Cd ²⁺
Stamm								
<i>zntA-lacZ</i>								
AE104	38 ^{±5}	197^{±13}	189^{±19}	25 ^{±5}	25 ^{±6}	50 ^{±4}	45 ^{±3}	-
<i>Δrmet3456</i>	3 ^{±0}	4 ^{±1}	4 ^{±1}	3 ^{±0}	3 ^{±0}	3 ^{±1}	4 ^{±1}	13 ^{±2}
+ pBBR1MCS3:: <i>rmet3456</i>	31 ^{±5}	80^{±18}	57^{±22}	20 ^{±3}	20 ^{±3}	27 ^{±5}	40 ^{±7}	81 ^{±27}
+ pBBR1MCS3	4 ^{±1}	5 ^{±1}	5 ^{±0}	4 ^{±1}	4 ^{±0}	4 ^{±1}	5 ^{±1}	18 ^{±2}
<i>cadA-lacZ</i>								
AE104	17 ^{±2}	30^{±3}	29^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	15 ^{±1}	35^{±8}	-
<i>Δrmet3456</i>	36^{±1}	291^{±38}	289^{±24}	23^{±1}	24^{±1}	31^{±2}	67^{±4}	490 ^{±143}
+ pBBR1MCS3:: <i>rmet3456</i>	22 ^{±2}	88^{±32}	72^{±34}	15 ^{±1}	15 ^{±1}	18 ^{±3}	45^{±10}	295 ^{±145}
+ pBBR1MCS3	32^{±3}	223^{±33}	196^{±50}	26^{±2}	26^{±3}	30^{±3}	55^{±8}	562 ^{±162}

Reportergenfusion erzeugt mittels pECD1333 bzw. pECD1334 von *zntA* bzw. *cadA*. Signifikante Unterschiede zum Ausgangsstamm, welche einen Faktor außerhalb des Bereiches $0,5 \geq X \geq 1,5$ gegenüber AE104 und $p \leq 0,05$ des t-Test's aufwiesen, sind grau hinterlegt. Eine gesteigerte (fett) und eine verringerte Expression (kursiv) gegenüber der Aktivität in Tris-MM wurde graphisch gekennzeichnet. Datenerhebung für die Stämme AE104/*Δrmet3456* sowie mit Komplementations- und Leervektor für $\phi(lacZ:cadA)$ mit $n = 3/3/4/4$ und $\phi(lacZ:zntA)$ mit $4/3/4/4$ inklusive eines technischen Replikats.

Im Gegensatz dazu sorgte der Wegfall von *Rmet3456* für eine leichte Induktion um Faktor 2 von *cadA* in Tris-MM ohne Zusätze, mit EDTA sowie Co²⁺ und Ni²⁺. Unter dem Einfluss von zusätzlichen 200 bzw. 500 μM ZnCl₂ wurde die Expression von *cadA* um das 8-9fache induziert, die zuvor im Wildtyp nur eine 2fache Steigerung erfahren hatte. Durch die Komplementierung mit pBBR1MCS3::*rmet3456* wurde eine regulierte Expression von *cadA* wieder hergestellt, wobei die Expressionsrate unter Zinkeinfluss durch den *trans*-agierenden Vektor nicht auf Wildtypniveau gedrückt werden konnte. Die beobachteten Effekte basierten

3. Ergebnisse

auf dem Vorhandensein von *rmet3456*, da der Leervektor pBBR1 MCS3 sowohl für $\phi(lacZ::zntA)$, als auch $\phi(lacZ::cadA)$ keine Änderung im Expressionsmuster der Mutante herbeiführte.

3.6. Bindung von Rmet 3456 an die Promotorregion von *zntA*

Nachführend wurde die Regulation von *zntA* durch Rmet3456 mittels eines *in vitro* Interaktionsexperimentes (EMSA) nachgewiesen. Hierfür erfolgte die Expression in BL21-Zellen mittels pASK-IBA 7⁺. Mit dem rekombinant exprimierten Rmet3456 und dessen Isolation über den N-Terminalen *Strep*-tag (Anhang: Abb. 43) wurde die Affinität zur Promotorregion von *cadA* und *zntA* untersucht (Abb. 24). Dafür wurden die Promotorregionen über die Primer CS06 *rmet2302_NotI*/ CS07 *rmet2302_NcoI* bzw. P 691 *oo/rmet2302 XbaI* (*cadAp*: 318 bzw. 476 bp) sowie *znt649ou_MunI/oo_NdeI* (*zntAp*: 376 bp) per PCR zur Verfügung gestellt. Wie zuvor in den Reaktionen mit Zur wurden gleiche Mengen an DNA (13,3 nM) unter gleichen Bedingungen und bis zu dem 5fachen der maximalen Proteinkonzentration der Zur-Experimente eingesetzt und über eine Nativ-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde eine Interaktion zwischen dem Protein und der Promotorregion von *zntA* festgestellt. Ab einer Proteinkonzentration von 1,3 μM verschwindet das Signal für *zntAp* auf der entsprechenden Laufhöhe von ca. 400 bp. Gleichzeitig tritt verstärkt oberhalb der 500 bp-Markierung ein diffuses Signal auf. Eine vollständige Retardierung von *zntAp* wurde mit 1 – 1,67 μM Rmet3456 - Dimer erzeugt. Das diffuse Signal ist durch die Midori Green-Färbung als die retardierte DNA gekennzeichnet. Das Protein selbst wurde auf der Höhe der 300 bp – Marke anhand der Kontrolle nur mit Protein (P) identifiziert. Als Negativkontrolle erfolgte ein EMSA zwischen dem untersuchten Protein und *zupTp*, was zu keiner Retardierung der beigefügten DNA führte (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde mit gleichen Konzentrationen an *Strep*-tag Rmet3456 keine Interaktion zu *cadAp* beobachtet, die im Verhältnis zu der von *zntAp* stand. Hier wurde trotz des Einsatzes von 6,67 μM Protein, also dem 13,3fachen der vorgelegten DNA, keine Interaktion festgestellt. Somit bindet Rmet3456 unter den gegebenen Bedingungen an *zntAp*, jedoch nicht an *cadAp*

3. Ergebnisse

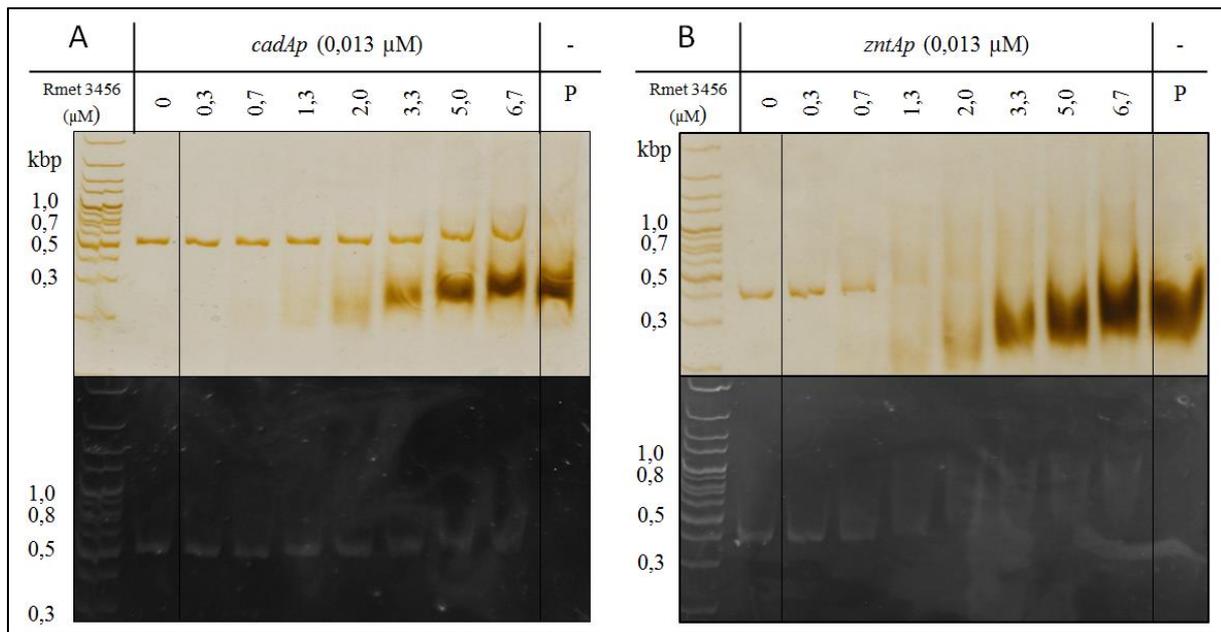


Abb. 24: EMSA zwischen *Strep*-tag Rmet3456 und den Promotorregionen von *cadA* und *zntA*. Die Inkubationsansätze (15 μl) mit Proteinkonzentrationen (Monomer) zwischen 0 und 6,7 μM, 0,013 μM DNA-Fragment und 100 μM ZnCl₂ wurden über eine 10 %ige Nativ-PAGE aufgetrennt. Nachfolgend wurden deren Bestandteile mit Midori Green und per Silberfärbung sichtbar gemacht. Exemplarisch ist ein Replikat von dreien zu sehen. Als Kontrolle sind nur die DNA und die maximale Proteinkonzentration aufgetragen und als Größenstandard der GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

4. Diskussion

4.1. Stabilität der Zinkhomeostasis erfolgt durch zytoplasmatische Regulatoren

Die Kontrolle des Schwermetalltransportosoms erfolgt über Proteine, die Zink im Zytoplasma sensieren und die Transkription der Transportsysteme aktivieren oder supprimieren. In *C. metallidurans* werden hierfür Vertreter der Fur-, MerR- und ArsR- Familien codiert, die die Transportwege hinsichtlich des Zinks regulieren. Welche Regulatoren es für Zink sind, wurde in dieser Arbeit bestimmt. Weitere regulatorische Proteine, die Zweikomponentensysteme, sensieren Schwermetalle im Periplasma und leiten die Information über die Freigabe von alternativen Sigmafaktoren, wie σ^E , an das Zytoplasma. Diese sorgen für eine bessere Erkennung alternativer Promotorsequenzen durch die RNA-abhängige Polymerase und ein divergentes Transkriptom sowie Proteom resultiert hieraus. *C. metallidurans* codiert für 11 *extracytoplasmatic function* (ECF)-Sigmafaktoren. Untere ihnen sind RpoI für den Fe-Siderophormetabolismus und RpoE für die vollständige Metallresistenz des Bakteriums zuständig (Große *et al.* 2007). Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Kontrolle des Zytoplasmas.

Die bekanntesten zinkabhängigen Regulatoren sind der *zinc uptake regulator* Zur für den Import und der MerR – Regulator ZntR für den Efflux. Outten (Outten *et al.* 1999; Outten & O'Halloran 2001; Hitomi *et al.* 2001) beschrieb durch deren Zinkaffinität mit Kd-Werten im subfemtomolaren Bereich (Halbmaximale Induktion durch ZntR: $11,15^{\pm 1,5} \times 10^{-16}$ M freies Zn, Halbmaximale Reprimierung durch Zur: $2,0^{\pm 0,1} \times 10^{-16}$ M freies Zn) ein Sensieren von weniger als einem freien Zn^{2+} – Ion pro Zelle für *E. coli*. Hierüber wurde auf eine intrazelluläre Konzentration von freiem Zink im fM-Bereich geschlossen. Dies steht im Widerspruch mit experimentell ermittelten Werten, die im Bereich von 10^{-5} - 10^{-9} M lagen (Eide 2006). So stieg die Konzentration an freiem Zink des *E. coli* Stammes BW25113 von 1-2 nM auf 45 nM durch einen Zinkschock (100 μM , Wang *et al.* 2012). Mögliche Kontaminationen bei der Probenpräparation wären laut Eide (2006) denkbar. Die vermutete geringe Konzentration an ungebundenem Zink soll über Chaperone erklärt werden, welche den Transport vom Importsystem zum entstehenden Metalloprotein kanalisieren und die Problematik der hohen Affinität des Regulators im Vergleich zu Metalloproteinen löst. In der Zusammenstellung von Hitomi *et al.* (2001) lagen die Kd-Werte potentieller Zielproteine im pM-Bereich und darüber. So liegt er für eine Zn-abhängige Carbonic Anhydrase bei $10^{-11,4}$ M,

4. Diskussion

ähnlich dem Metallothionin. Metallthionine gelten durch ihre labile Zinkbindung als Schutz für zytoplasmatische Zinktoxizität und als Pool für synthetisierte Metalloenzyme in der Zelle (Choi & Bird 2014). Die Bereitstellung an intrazellulären Transportwegen ist für die Zellen kostenintensiv und Eide (2006) monierte hier den Fakt, dass wenige Chaperone den Einbau des Zinks in vielen unterschiedlichen Proteinen vermitteln sollen mit Ausnahme derer, die auf Grund ihrer hohen Priorität ihre eigenen besitzen. Er beschreibt eine Oszillation des Gehalts an freiem Zink in der Zelle. Bei Zinkmangel erfolgt eine Aktivierung der Import- und Reprimierung der Exportsysteme mit einem resultierenden Überschuss an Zink, welcher die Gegenreaktion wiederum induziert. Dies wurde auch in dieser Arbeit beobachtet (Tabelle 9, Tabelle 10). Eine auflösendere Sicht auf die Zelle und ihr Zytoplasma kann hier die widersprüchlichen Daten der hochaffinen Regulatoren und der Zielproteine mit geringerer Affinität vereinen. In diesem Szenario werden die hochaffinen Regulatoren im Rahmen ihrer jeweiligen Kd-Werte durch Sensierung ihrer unmittelbaren Umgebung auch in einem Zytoplasma mit einer höheren Gesamtkonzentration an Zink ihre Aufgabe in dem oszillierenden Prozess der Erhaltung der Zinkhomeostasis einnehmen.

4.2. Zur ist der zinkspezifische Aufnahmeregulator aus der Fur-Familie

Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 18 Zur-Orthologe (Choi & Bird 2014) identifiziert, charakterisiert und deren Regulon teilweise aufgedeckt. So hemmt Zur in *E.coli* (Patzer & Hantke 1998, 2000), *S. aureus* (Lindsay & Foster 2001), *P. aerogenosa* (Ellison *et al.* 2013), *S. coelicolor* (Shin *et al.* 2007), *A. tumefaciens* (Bhubhanil *et al.* 2014) die Transkription und Expression des hoch affinen Importsystems *znuABC*. In *X. campestris* (Tang *et al.* 2005) und *C. glutamicum* reguliert Zur neben dem erwähnten Transportsystem auch die Effluxsysteme der CDF- und P_{IB2}-ATPasen im aktiven Sinne (Huang *et al.* 2008; Teramoto *et al.* 2012). *C. metallidurans* codiert drei Vertreter dieser Proteinfamilie, die der Fe- bzw. Zn-Homeostasis zuzuordnen sind.

4. Diskussion

Anhand des nachfolgenden phylogenetischen Stammbaums (Abb. 25) bekannter Zur und Fur Proteine aus gramnegativen Bakterien wird eine Einordnung von Zur in die Gruppe der Zinkaufnahme-Regulatoren und Trennung zu FurA und FurB von *C. metallidurans* nahegelegt. Die Proteinähnlichkeit zwischen FurA und FurB beträgt 55,9 %. Dagegen liegt sie zu Zur bei 25 % bzw. 23,5 %. Die höchste Ähnlichkeit für FurA bzw. FurB besteht zwischen dem *ferric uptake regulator* aus *N. meningitidis* mit 53,85 % bzw. 43,75 %. Des Weiteren konnte die größte Proteinübereinstimmung zwischen Zur_{CH34} mit dem Zur_{*N. meningitidis*} mit 24 % beobachtet werden. Somit zeigt sich generell eine strikte, getrennte Zuordnung der drei Fur-Orthologen in die eisen- bzw. zinkabhängigen Regulatoren der Proteobakterien. Auch die Mitglieder der Fur-Familie aus der Ordnung der Firmicutes (*B. subtilis* und *S. aureus*) lassen sich in dieser Einordnung etablieren. Dagegen scheint bei den Vertretern der Aktinomyceten (*S. coelicolor* und *M. tuberculosis*) die klare Zuordnung zu den genannten Gruppen nicht möglich zu sein. Jedoch zeigten jeweils Zur_{*S. coelicolor*} und Zur_{*M. tuberculosis*} bzw. Fur_{*S. coelicolor*} und Fur_{*M. tuberculosis*} erhöhte verwandtschaftliche Beziehungen zueinander.

4. Diskussion

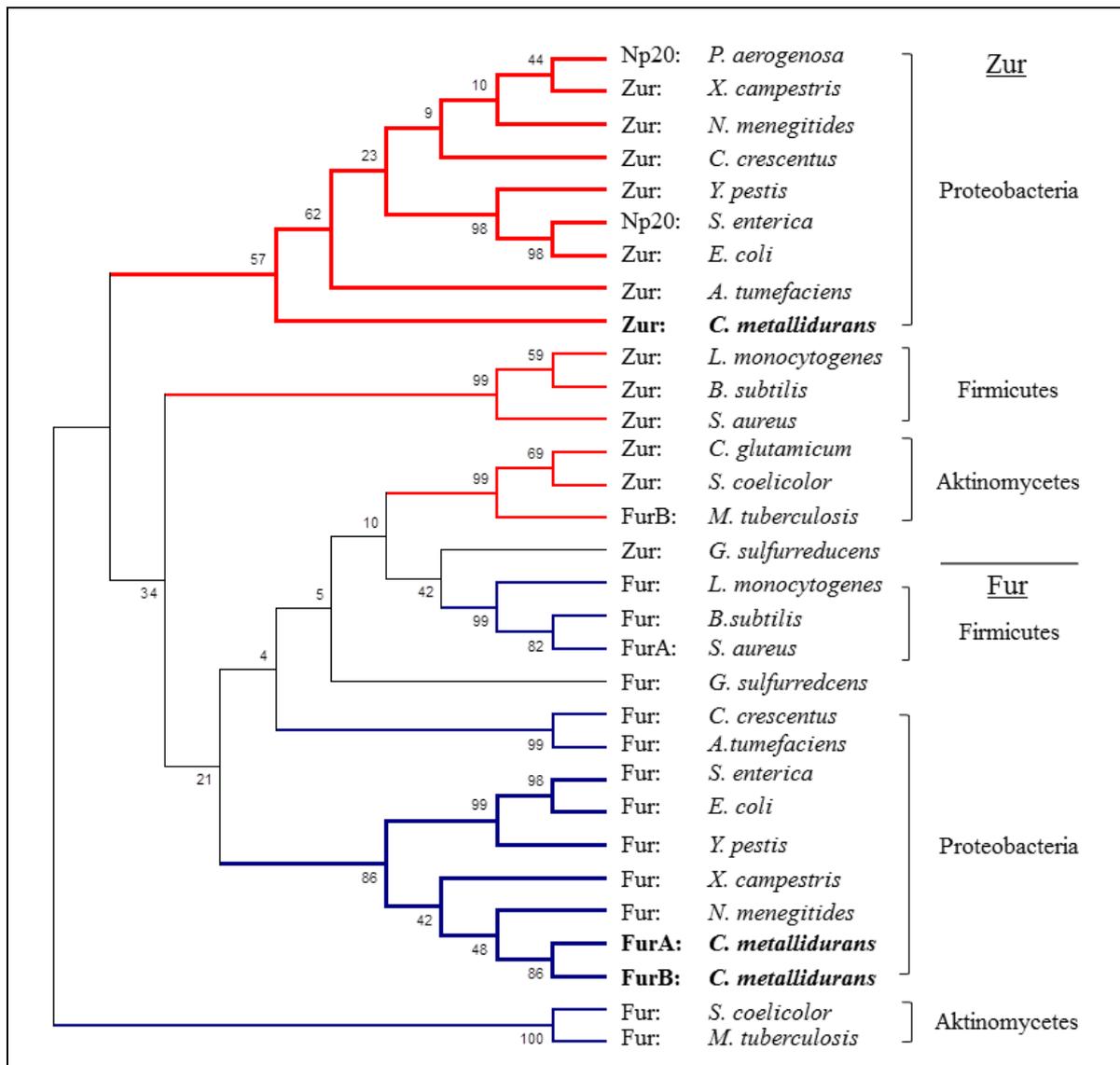


Abb. 25: Ein Phylogenetischer Stammbaum bekannter zinc (rot) bzw. ferric (blau) uptake-Regulatoren grampositiver und -negativer Bakterien sowie der drei Fur-Orthologen von *Cupriavidus metallidurans* ist gezeigt. Alignment der 31 Proteinsequenzen und deren evolutionären Analyse erfolgte über Mega 6 (Tamura *et al.* 2013) und *clustalW* nach der *Miximum Parsimony* Methode basierend auf der SPR Algorithmus-Matrix (M. Nei & S. Kumar 2000). Der Analyse standen 97 Positionen zur Verfügung. Dargestellt sind die phylogenetischen Distanzen der einzelnen Proteincluster und die *bootstrap*-Zahlen (Felsenstein 1985) als Maß der Konsistenz der jeweiligen Zuordnung.

Die Sequenzen der Zur- und Fur- Proteine ausgewählter gramnegativer Bakterien zeigen zum einen die generell konservierten Aminosäuren T47, R50, L54, das Motiv TVYR_L93, G100, G168 und G180, die in jedem Mitglied der Fur-Familien mit kleinen Ausnahmen vorzufinden sind (Anhang Abb. 44). Des Weiteren ist das erste stark und das zweite CxxC-Motiv weniger konserviert. Es kann, wie im Fall von Fur *C.crescentus* und Fur *X. campestris*, vollständig fehlen oder

4. Diskussion

nur teilweise, wie im Fall von Fur *Pseudomonas*, vorliegen. Bei ausgewählten Eisenaufnahmeregulatoren von *E. coli*, *Salmonella enterica* und *Yersinia pestis* liegt ein CxxxxC-Motiv nahe dem C-Terminus vor, das eine Gemeinsamkeit mit dem FurA_{CH34} jedoch nicht mit FurB_{CH34} darstellt. Alle vier Cysteine (CxxC- bzw. CxxxxC-Motive) sind laut Literatur an der Bindung des strukturellen Zn²⁺ beteiligt und bilden *site I*. Des Weiteren ist im Vorfeld des ersten CxxC - Motivs ein histidinreiches Motiv, bestehend aus 5 (FurI *N. punctiformes*, Zur *S. aureus*, Zur *B. subtilis* bzw. FurB *M. tuberculosis*) bzw. 4 (Zur aus *Geobacter sulfurreducens* und *S. coelicolor* A3 (2) Histidinen bei Zur-Proteinen aus grampositive Bakterien, stark verbreitet. Ihre Eisen regulierenden Vertreter zeigten generell eine verringerte Anzahl an Histidinen in dieser Region. Bei den Proteobakterien (Abb. 26, Anhang) fällt diese Region histidinärmer aus und ein HHXH-Motiv wurde beobachtet, wobei ein Aspartat (D) an der dritten Stelle unter den Fur-Orthologen konserviert ist. FurA und FurB *C. metallidurans* zeigten ein solches HHDH-Motiv. Dagegen ist unter den Vertretern der Subfamilie der Zur-Proteine der gramnegativen Mikroorganismen die histidinreiche Region stark aufgelöst. Zur_{CH34} besitzt ein HSH mit zwei weiteren Histidinen im Abstand von einer bzw. zwei Aminosäuren und beweist somit wiederum eine Abtrennung zu FurA, FurB_{CH34} und allen anderen näher verwandten Fur-Orthologen. Den beiden Histidinen des HHXH, die näher an den Cysteinen lokalisiert sind, wird eine Beteiligung an der Ausbildung des zweiten Zn²⁺-Bindemotivs neben einem Glutamat und einem weiteren Cystein nachgesagt [*S. coelicolor*: (Shin *et al.* 2011); *M. tuberculosis*: (Lucarelli *et al.* 2007); *E. coli*: z. B. (Gilston *et al.* 2014)]. Somit kann anhand der Primärstruktur eine Zuordnung von FurA_{CH34} und FurB_{CH34} zu den Eisenregulatoren und eine Abtrennung von Zur_{CH34} gemacht werden.

Im Sequenzabgleich, der im Anhang (Abb. 44) vorzufinden ist und auf dessen Daten die Nummerierung der genannten Aminosäuren beruht, wurden auch Positionen festgestellt, die in *ferric uptake regulators* konserviert sind, jedoch nicht in den dazugehörigen zinkabhängigen Proteinen. Dabei handelt es sich um: Y72, K45, H65, Q95, F107, E108, E115, Q160, I163 und Y179, die in FurA und mit Abweichung in FurB *C. metallidurans* vorkommen, jedoch in Zur *C. metallidurans* teilweise gegen Aminosäuren mit unterschiedlicher Eigenschaft ersetzt wurden. Des Weiteren ist die Aminosäure Glutamat (D94) nach dem TVYR_L-Motiv im Bereich der N-terminalen DNA-Bindedomäne mit ihrem HTH-Bereich bei den Zur-Proteinen der Proteobakterien konserviert vorzufinden. Dies galt nicht für eisenabhängige und Vertreter der grampositiven Bakterien. Nichtsdestotrotz ist die grundsätzliche Sekundärstruktur mit 6 α -Helices und 5 β -sheets sowie dem *helix turn helix*-

4. Diskussion

Motiv in allen Mitgliedern vorhanden. Diese ist in dem Sequenzvergleich der drei Fur-Orthologen von *C. metallidurans* und dem Fur und Zur aus *E. coli* (Abb. 26) veranschaulicht.

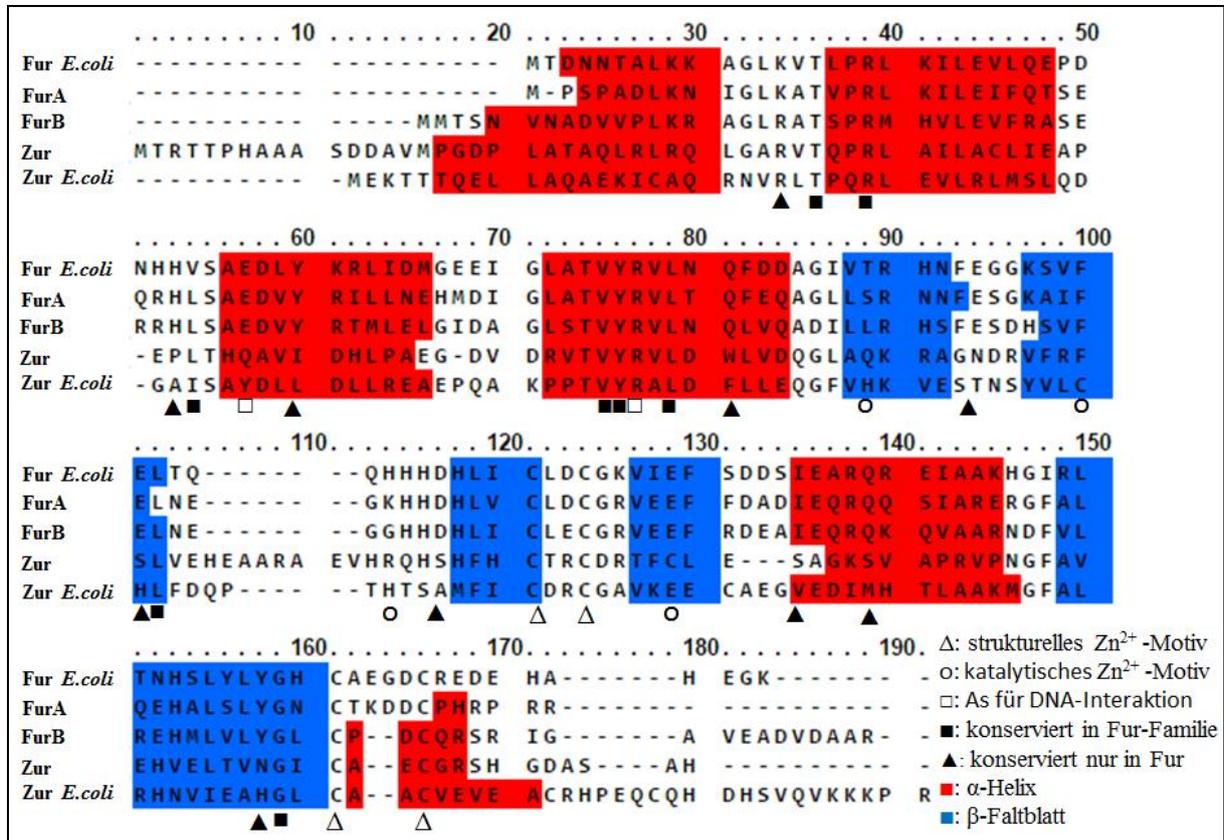


Abb. 26: Alignment der drei Fur-Orthologen aus *C. metallidurans*, FurA, FurB und Zur sowie als Repräsentanten Fur und Zur aus *E. coli*. Das Alignment erfolgte mittels Praline *multiple sequence alignment* (V.A. Simossis & Heringa 2003) mit der *Exchange-weight* Matrix Blosum62. Des Weiteren wurde die Sekundärstruktur (PSIPRED, Pirovano & Heringa 2010) vorhergesagt. Die α -Helices sind rot und die β -Faltblattstrukturen blau hervorgehoben. Außerdem wurden die vier konservierten Cysteine, die an der Ausbildung des Bindemotivs für das strukturelle Zink beteiligt sind, mit Δ markiert. Das katalytische Zn-Motiv (H77, C88, H96, E111; Gilston *et al.* 2014) aus *E. coli* wurde mit (o) sowie die beiden an der DNA-Interaktion beteiligten Aminosäuren Y45 und R65 mit (□) gekennzeichnet. Zusätzlich wurden Aminosäuren, die nur in Fur-Proteinen (▲) oder generell in Vertretern der Proteinfamilie (■) konserviert sind, markiert.

Grundsätzlich koordiniert der *zinc uptake regulator* neben seinem strukturellen Zink durch die vier konservierten Cysteine (*C. metallidurans*: C119, C122, C156, C159) der Fur-Familie das katalytische Zn²⁺ in einer Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefel-Umgebung. So wird die zweite Bindestelle (*siteB*) in *E.coli* durch H77, C88, H96 und E111 gebildet. Diese Umgebung für die tetrahedrale Koordination des Zinks ist ebenfalls in den Regulatoren verschiedener gramnegativer Bakterien wiederzufinden (Abb. 44, Anhang Alignment). FurB, das Zur aus *M. tuberculosis*, koordiniert neben dem strukturellen Zink (C86, 89, 126, 129) das

4. Diskussion

zweite Zinkion in seiner *site I* ebenfalls über zwei Histidine (H81, H83 in der Dimerisierungsdomäne), einem Cystein (C76) und einem Aspartat (D62) statt des Glutamats. Ein drittes Bindemotiv wurde durch Lucarelli *et al.* (2007) beschrieben (H80, H82, E101, H118). Dieses hat eine strukturelle oder katalytische Funktion oder geht als Resultat der Kristallisierung hervor. Studien am Zur *S. coelicolor* wiesen ebenfalls drei Zn^{2+} -Koordinationszentren (Site I: D65, C79, H85, H87; Site II: C90, C93, C130, C133 sowie Site III: H84, H86, E105, H122) auf (Shin *et al.* 2011).

In Betrachtung der bekannten Koordinationszentren für Zink weisen die zinkabhängigen Regulatoren eine höhere Cystein-Anzahl als ihre eisenabhängigen Vertreter auf. Dies ist ebenfalls der Fall für Zur CH_{34} (Tabelle 19). Jedoch besitzt *C. metallidurans* neben der Cystein-Umgebung die genannten Aminosäure-Motive nicht in dieser konservierten Form. Homolog zu Glutamat (E111) der *siteB* von Zur *E. coli* dient womöglich das Cystein 127 als S-Ligand. Zur Ausbildung einer Koordination ähnlich der Zn^{2+} *site III* aus grampositiven Bakterien könnten für die N-Liganden die Histidine der H-reichen Region vor dem ersten C119xxC122-Motiv (H111, H114, H116) und das H147, welches in allen Fur-Orthologen von *C. metallidurans* und der Zur grampositiver Bakterien vorkommt, dienen. In der Region des C79 wären das H103 oder E102 bzw. E104 mögliche Liganden. Daher können über die Primärstruktur mögliche essentielle Aminosäuren identifiziert werden, die eine zu bekannten Zn^{2+} -Motiven vergleichbare Koordination ermöglicht. Die Überlagerung von Zur CH_{34} und dem Zur *E. coli*-Dimer mit dessen gebundener DNA verdeutlicht in Abb. 27 die Koordination des strukturellen Zinks (blau) und des sensorischen Kofaktors (rot) sowie die räumliche Struktur der Dimersierungseinheit (C-Terminus) und der DNA-Binde-Domäne.

4. Diskussion

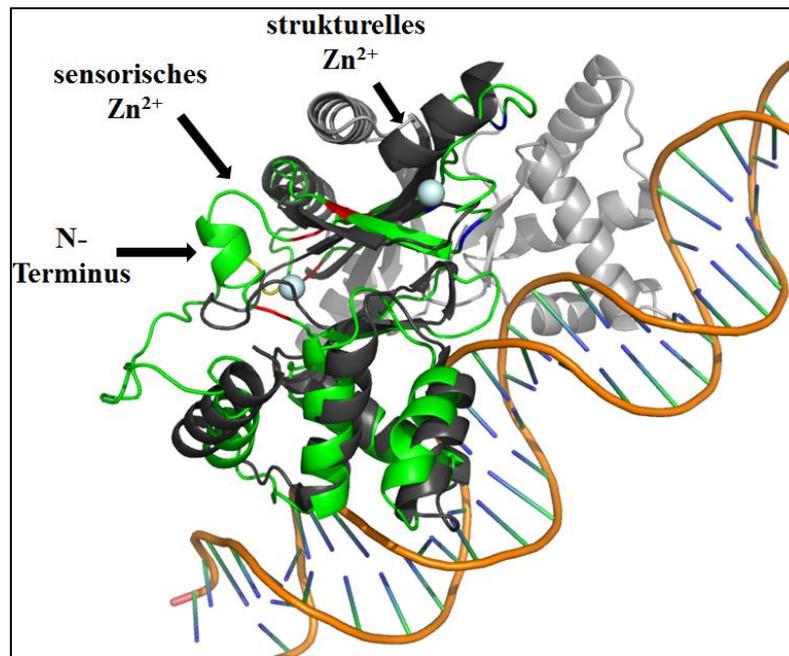


Abb. 27: Überlagerung der vorhergesagten Tertiärstruktur von Zur_{CH34} (grün) und der Kristallstruktur des Zur_{E.coli}-Dimers (grau) mit zwei gebundenen Zn²⁺ eines Monomers als Regulator-DNA-Komplex (*znuABCp*) wurde dargestellt. Auf die Darstellung des zweiten Zur_{E.coli}-Dimers sowie der beiden Zn²⁺ des zweiten Monomers wurde zur Übersichtlichkeit verzichtet (Gilston *et al.* 2014; PDB-file: 4MTD). Die Strukturvorhersagen von Zur_{CH34} erfolgten anhand der Primärstruktur über den Phyre²-Server (Kelley *et al.* 2015). Die Überlagerung und Darstellung wurde mittels PyMOL™ Molecular Graphics System (Version 1.8.2.0, Schrödinger/ LLC) durchgeführt. Das Bindemotiv des strukturellen Zinks (blau: C119, C122, C156, C159) und die mögliche Koordination des sensorischen Zn²⁺ (rot: E102, H114, H116, H147) sowie die ersten drei Aminosäuren des N-Terminus (gelb) wurden dargestellt.

Neben der theoretischen Zink-Koordination ist das Auffinden des redox-inerten Kofaktors Zink und die Verfügbarkeit dieses in Protein-DNA-Interaktionsstudien unter aeroben Bedingungen ein Beweis für die bisherige Zuordnung von Zur_{CH34}. Untersuchungen der Metallzusammensetzung der in dieser Arbeit erstellten Proteinisolate (*Strep*-tag-FurA, *Strep*-tag-FurB und *Strep*-tag-Zur) durch Martin Herzberg (AG Nies) ergaben ein Verhältnis von 0,45 Fe²⁺ je Monomer FurA und 0,82 Zn²⁺ je FurB Molekül. Für Zur wurden 0,94^{±0,04} Zn²⁺ Mol (Isolation ohne EDTA) und 0,71^{±0,01} Zn²⁺ Mol (Isolationswaschpuffer: 1 mM EDTA) je Mol Zur bestimmt. Die Störung des strukturellen Zn-Bindemotivs durch den Aminosäureaustausch C₁₁₉S resultierte in einem Auffinden von Biometallen nur noch in Spuren (Verhältnis Me²⁺/ Zur C₁₁₉S: 0,02 Fe; 0,03 Zn). Zur Analyse wurde eine 0,1 bzw. 0,025 mg/ml Proteinlösung (1,5 ml) hergestellt, dessen Proteine zuvor mit analytischer Salpetersäure (70 %) bei 70 °C für 2 h mineralisiert wurden. Die Endkonzentration an HNO₃ betrug 2 %. Es folgte die Analyse per ICP-MS unter Mitführen des inaktiven EMSA-

4. Diskussion

Reaktionspuffers, in dem die Proteine gelöst waren (Herzberg *et al.* 2016). So korrelierte die Koaufrreinigung von Eisen in Isolaten von FurA mit seinem UV/VIS-Spektrum (Abb. 12) und dessen Funktion als Hauptregulator der Eisenaufnahme z. B. über das Siderophore Staphyloferrin B (Schmidt *et al.* 2014). Eisen steht unter aeroben Bedingungen für *in vitro*-Studien nicht zur Verfügung und muss durch das redoxstabilere Mangan ersetzt werden (Coy & Neilands 1991).

In diesem Zusammenhang ist die Bindung von Cadmium in geringen Konzentrationen ebenfalls zu erwähnen, welches in Protein-DNA-Interaktionsstudien und Trypsinsensitivitäts-Assays förderlich war. Michaud-Soret *et al.* 1997 zeigte für Fur *E. coli* zum einen die Prozessierung durch die Abspaltung von M₁, welche auch für die synthetisierten Fur-Orthologen aus *C. metallidurans* galt. Des Weiteren wurde eine 2. Variante durch das Fehlen eines Proteaseinhibitors (PMSF) und fehlender Temperaturkontrolle beim Zellaufschluss durch Ultraschall forciert. Diese um 823 Da kleinere Variante beruhte auf der tryptischen Abspaltung von 9 Aminosäuren des N-Terminus. Für die in dieser Arbeit rekombinant synthetisierten Proteine wurde nur für Zur_{CH34} bei gleicher Probenbehandlung eine Doppelbande auf einem SDS-Gel identifiziert. Diese Varianten wurden auch beim Auftragen von Proteinen aufgeschlossener, denaturierter Proteine gesehen. Ein Proteaseinhibitor wurde vor dem Zellaufschluss zu den Zellen hinzugefügt, der selbst auf Eis und unter Einhaltung von Kühlzeiten durchgeführt wurde. Beide Varianten zeigten kein divergentes Trypsinmuster bzw. eine Abspaltung am N- bzw. C-Terminus. Des Weiteren entsprach die weiter migrierte Variante dem theoretischen Molekulargewicht. Außerdem resultierte die Störung des strukturellen Zinkmotivs in Zur C119S in einem Signal der theoretischen Größe entsprechend ($\Delta = 11$ Da: 21,796 kDa *Strep*-tag Zur-M₁; 21,785 kDa *Strep*-tag Zur-M₁ C119S). Somit wurde von einer kofaktorfreen und einer zinkhaltigen Variante ausgegangen, welche durch einen Korrekturfaktor in die Protein-DNA Interaktionsstudien einfluss. Unter Annahme eines Verhältnisses der aktiven zur inaktiven Variante von 0,4 und einem Metall/ Zur- Verhältnisses von 0,8 wäre von einer Bindung von 2 Zn²⁺ je Zur-Molekül auszugehen. Frühere Fur - Isolationen detektierten das strukturelle Zink mit einem Verhältnis von 0,5 – 0,8 Zn²⁺ je Fur *E. coli* (Michaud-Soret *et al.* 1997) bzw. 0,9-1,0 für Fur *B. subtilis* (Ma *et al.* 2012; max. 3 Zn/ Fur). Für den zinkabhängigen Regulator wurden $2,84 \pm 0,14$ Zn/ Zur *E. coli* bzw. $0,72 \pm 0,07$ bei Einwirkung von 25 mM EDTA (Gilston *et al.* 2014) detektiert. Zur *S. coelicolor* wies 2,4 Zn²⁺ und 1,2 für Apo-Zur auf (Shin *et al.* 2011). Der Austausch eines Cysteins des Zinkmotivs

4. Diskussion

hatte auch bei Gilston einen negativen Einfluss auf die Zinkbindung. Ähnliche Zink/Regulator-Verhältnisse wurden für FurB_{CH34} bestimmt, jedoch nicht für FurA.

Gilston (2014) stellte des Weiteren die Bedeutung der Aminosäuren Tyr 45 und Arg65 von Zur_{E.coli} hervor für die Interaktion mit dem DNA-Doppelstrang und dem Bindemotiv, der Zur-Box. Letztere ist in allen untersuchten Regulatoren der Fur-Familie konserviert (Zur_{CH34}: R75), Erstere jedoch nur unter den zinkabhängigen Regulatoren. Laut Gilston ist die Aminosäure Tyr45 unter den *ferric uptake* Regulatoren durch Glutamat (E) ersetzt. Dies trifft für FurA (E₃₆) und FurB (E₄₂) zu, die eine höhere Proteinähnlichkeit zueinander aufweisen als zu Zur und mit den Fur-Proteinen von gramnegativen Bakterien klustern. Dagegen weist Zur_{CH34} kein Tyrosin (Y) an besagter Region auf, sondern ein Glutamin (THQ₅₆). Des Weiteren besitzen alle eisenabhängigen Regulatoren ein vorgelagertes Histidin, so auch FurA (H₃₂) und FurB (H₃₈) und alle zinkabhängigen eine unpolare AS, wie Alanin (A), Valin (V) oder Prolin (P, Zur_{CH34}). An dieser Position zeigte das untersuchte Zur_{CH34} Übereinstimmung mit den Zinkregulatoren von *P. aerogenosa*, *X. campestris* und *C. crescentus*. Jedoch befindet sich mit H₅₅ ein Histidin in dieser Region, das bei den γ -Proteobakterien fehlt und bei Zur_{C. crescentus} mehr dem N-Terminus zugewandt ist. D78 ist eine weitere Aminosäure, die bei den Zur-Proteinen vorkommt, jedoch nicht bei eisenabhängigen Regulatoren. An anderer Stelle weicht Zur_{CH34} stark von den Zinkregulatoren ab, so bei dem nicht vorhandenen Cystein an Position 114 (*E. coli*, C88) des Fur/Zur-Alignments (Abb. 44).

Zusammenfassend grenzt sich Zur_{CH34} entschieden von den Fur-Proteinen ab. Des Weiteren wurden die Zinkbindemotive, die von *E. coli*, *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* bekannt sind, nicht in dem erwarteten Maße vorgefunden. Daher verbleibt das Zur aus *C. metallidurans* ein interessanter Regulator, dessen Rolle in der Zinkhomeostasis in dieser Arbeit beleuchtet wurde. Die Koordination des 2. sensorischen Zinks muss jedoch durch Zur-Varianten mit den Aminosäureaustauschen potentieller Kandidaten verifiziert werden. Hierfür sind in Abb. 27 die Aminosäuren E102, H114, H116 und H147 rot markiert.

4.3. Einflussnahme der zur-Deletion auf die Zinkhomeostasis in *C. metallidurans*

Durch die Charakterisierung von Einzel-*fur*-Mutanten wurde zunächst die Zuordnung der einzelnen *fur*-Orthologen und deren Bedeutung für die gesamte Zinkhomeostasis beleuchtet

4. Diskussion

(3.1.2.). So war FurA eindeutig der Fe-Aufnahme zuzuordnen und sein verwandtes FurB der Regulation unter Eisenmangel (C. Schmidt *et al.* 2014). Weitere Analysen der Expression bekannter Transportsysteme zeigte die wahre Funktion von *rmet0128* und dessen Determinierung als das Zur von *C. metallidurans*.

Phänotypisch wurden in dieser Arbeit bis auf eine leichte Resistenzsteigerung gegenüber Cadmium keine gravierenden Unterschiede beruhend auf der Deletion von *zur* beobachtet. Im Vergleich zu Kirsten *et al.* 2011 (AE104: ca. $0,19 \pm 0,03$ nmol Zn⁶⁵/ mg TG) wurden etwas geringere Aufnahmeraten nach 2 min für AE104 mit $0,08 \pm 0,01$ nmol Zn⁶⁵ je mg TG sowie für $\Delta zupT$ bestimmt. Eine moderate Standardabweichung für AE104, $\Delta zupT$ sowie der *zur*-Mutante lagen in dieser Arbeit vor. Die verbleibenden Aufnahmesysteme (PitA, CorA₁₋₃, sowie ZntB) scheinen das Aufnahmeniveau von Zink zu kompensieren. Herzberg *et al.* beschrieb 2016 eine Kaskade an sekundären Zinkaufnahmesystemen, die absteigend von PitA über ZupT ihren Anteil an der Metallaufnahme beitragen und sich gegenseitig in einem bestimmten Rahmen substituieren. Begründet liegt diese Sichtweise auf der Beobachtung des Zinkaufnahme-Assays mit Zn⁶⁵ im Stammhintergrund von $\Delta fief$, $\Delta dmef$, $\Delta zntA$, $\Delta cada$, welcher keine Zinkakkumulation bei fehlenden Exportsystemen in AE104 zuließ. Durch die kurze Inkubation (2 min) mit der radioaktiven Zn⁶⁵-Lösung (Endkonzentration: 1 μ M) wurde eine nicht-toxische Konzentration für die 4fach-Mutante verwendet, deren IC₅₀ bei $7,1 \pm 0,7$ μ M Zn²⁺ (Scherer & Nies 2009) liegt. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen führte die Deletion von *zur* *A. tumefaciens* zu einer gesteigerten Anreicherung an Zink in der Zelle (5fache, (Chaoprasid *et al.* 2015) und einer geringen Akkumulation an Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ (Bhubhanil *et al.* 2014). Ähnliche Akkumulationen von Zink wurden in *X. campestris* (Tang *et al.* 2005) festgestellt. Eine phänotypische Steigerung der Zinksensitivität, wie im Fall von *L. monocytogenes* (Dowd *et al.* 2012a), wurde in *C. metallidurans* durch sein umfangreiches, chromosomal codiertes Arsenal an Transportsystemen ausgeglichen.

Auf Transkriptebene sorgte die Deletion des *zinc uptake regulators* im Wildtyp AE104 für eine gesteigerte und unkontrollierte Expression des zinkabhängigen Transporters ZupT (12fach). Demgegenüber steht die gesteigerte Expression der durch zinkinduzierten P_{IB2}-typ ATPase ZntA um Faktor 2,5, wobei die Expression der $\phi(cadA:lacZ)$ - Fusion durch die Deletion von *zur* unberührt blieb. Die erhaltenen Operon-*lacZ*-Fusionsresultate wurden ebenfalls durch die unveröffentlichten *gene array* -Daten von Frau Dr. C. Große, G. Schleuder und Prof. Dr. D. H. Nies zwischen AE104 und Δzur bestätigt (Tabelle 20).

4. Diskussion

Abbildung 28 zeigt hierbei eine Übersicht der Gene, die eine gesteigerte [$\log_{10}(\Delta zur/AE104) > 0,3$] bzw. eine verminderte Expression [$\log_{10}(\Delta zur/AE104) < 0,3$] im Vergleich zwischen der Mutante und AE104 erfahren haben. Dabei wurde ein 3,78facher mRNA - Level von *zupT* und ein 1,44 facher für *zntA* unter Einfluss der 0,3 μM ZnCl_2 , die im Standardmedium vorherrschend sind, bestimmt. Unter erhöhter Zinkkonzentration (100 μM) war der Expressionslevel von *zupT* gleich, was dies als maximale Aktivität des Promotors unter Fehlen des Regulators Zur kennzeichnet. Außerdem zeigte *zntA* unter diesen Bedingungen eine geringere zinkbasierte Induktion in Δzur im Vergleich zu AE104 ($\log_{10}(\Delta zur/AE104) = -1,03$). Dies beruht auf der schon vorliegenden Induktion, hervorgerufen durch die Deletion von *zur*, wodurch die Induktion von *zntA* durch das zusätzliche Zink nicht in dem Rahmen des Wildtyps ausfiel. Ein solcher Effekt konnte an den Reporterfusionmessungen (Tabelle 10, 3.1.4) nicht gesehen werden, da hier nur ein Gesamteffekt der Expression wahrgenommen wurde.

Die Induktion von *zntA* und die Erkenntnis von Scherer und Nies (2009) über die ähnlichen Transportraten für Zink und Cadmium der P_{IB2} -ATPasen ZntA, CadA und PbrA [*turn over number* (Metall je Sek. und Protein): ZntA/ CadA/ PbrA: $0,057^{\pm 0,025}$ / $0,085^{\pm 0,053}$ / $0,062^{\pm 0,023}$ (Zn); $0,028^{\pm 0,012}$ / $0,057^{\pm 0,020}$ / $0,035^{\pm 0,018}$ (Cd)] erklären den leichten Einfluss auf die Cadmiumresistenz in Δzur . Auch Legatzki zeigte 2003 die Komplementierung eines $\Delta zntA \Delta zitB$ -*E.coli*-Stammes in *trans* durch *zntA* und *cadA*. Beide sorgten für eine ähnliche Verringerung der Cadmium- und Zinkakkumulation. Eine Induktion von ZntA, welche durch den MerR-Regulator ZntR bei dessen Zinkbindung injiziert wurde, erzeugte somit einen verstärkten Zink- sowie Cadmiumexport. Auch durch die Deletion von ZntR_{CH34} (Rmet3456) wurde die Resistenz gegenüber Zink und Cadmium (3.5.) gesenkt sowie eine Akkumulation an Zink in der Zelle festgestellt.

4. Diskussion

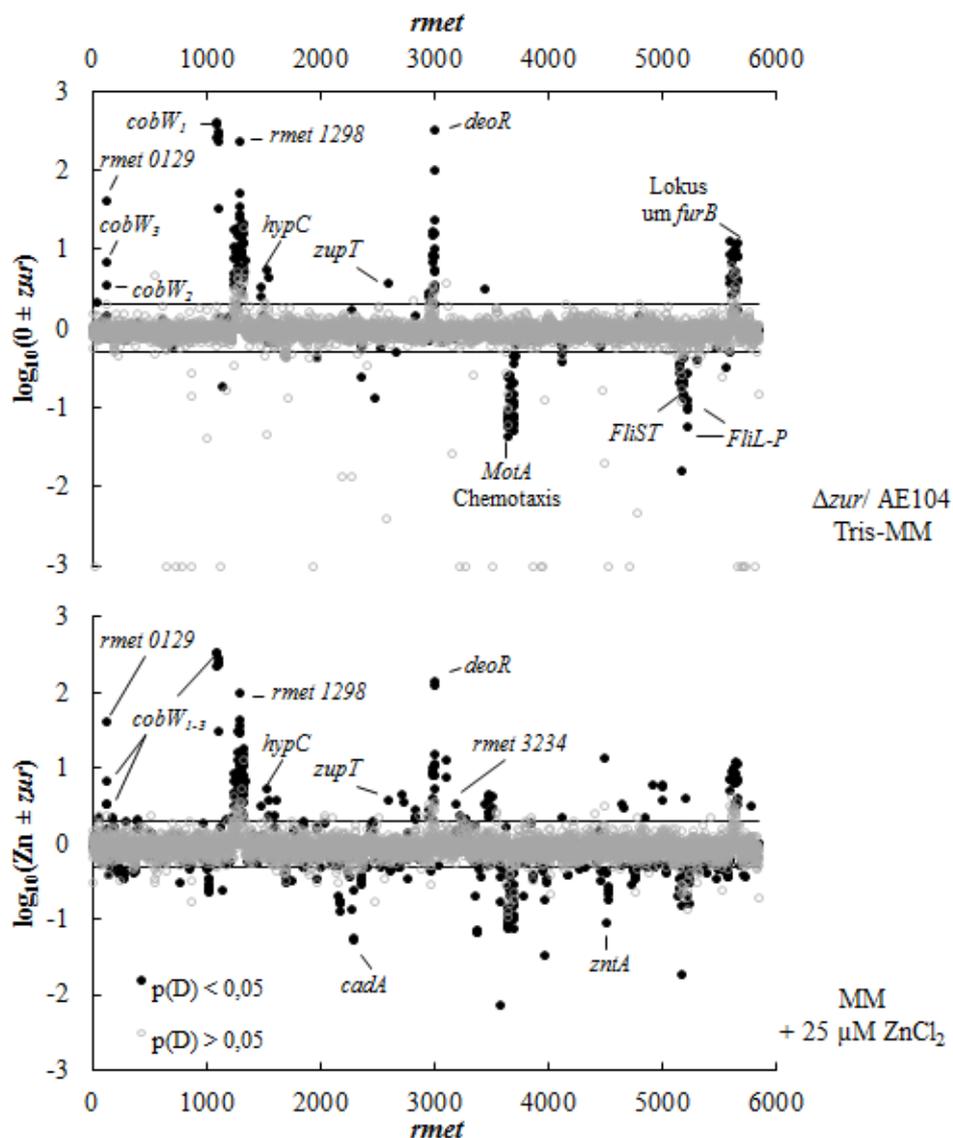


Abb. 28: Übersicht der Gene Array-Daten zwischen Δzur und AE104. Die Datenerhebung erfolgte durch Frau Dr. C. Große und G. Schleuder (2014, unveröffentlicht) unter Verwendung von AE104 und des in dieser Arbeit erstellten Δzur -Stammes. Die Hauptkulturen wurden mit einer 30 h VK (frühe stationäre Phase) inokuliert und bis zu 100 KE ($OD_{600} = 0,5$) bei 30 °C angezogen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit und ohne 100 μM $ZnCl_2$ mit anschließender Zellernte. Die Ansätze wurden als biologisches Triplikat durchgeführt. Aufgetragen wurde das logarithmierte Verhältnis des mRNA-Levels zwischen Δzur und AE104 gegen die Gennummer. Über den d-Wert [$d = (r_1 - r_2) / (s_1 + s_2)$] und unter der Annahme einer Binominalverteilung wurde ein t-Test durchgeführt (FG = 4). Signifikante ($p < 0,05$; •) und nicht signifikante Daten ($p > 0,05$; ○) wurden kenntlich gemacht. Des Weiteren wurde ein Grenzbereich bei $0,3 < \log_{10}(\Delta zur/AE104) < -0,3$ gesetzt, was einer um mindestens Faktor 2 verstärkten bzw. geminderten Expression entspricht.

Die vorangegangenen Daten zeigen einen erhöhten Import von Zink über ZupT durch die Deletion von *zur*, welcher nachfolgend durch ZntA und CadA kompensiert wurde. Die CDF-Proteine, weitere Mitglieder der Herzberg-Resistenzreihe sowie mögliche noch unbekannte

4. Diskussion

Transporter tragen ihren Beitrag zum Erhalt des Zinkgleichgewichts der Zelle bei. Der fehlende Effekt der Δzur -Mutante basiert daher auf der Komplexität der Zinkhomeostasis. Oft wurde in der Literatur eine Sensitivität gegen Kationenmangel beschrieben, welche als Resultat einer überschießenden Aktivität von Efflux-Systemen oder als Verdrängung weiterer essentieller Biometallen zu sehen ist. Des Weiteren waren ähnlich der *lacZ*-Fusionsmessungen neben *zupT* bekannte sekundäre Transporter (*corA₁₋₃*, *pitA*, *zntB*) für den unspezifischen Import sowie die primären Transporter MgtA und MgtB durch die Deletion des Regulators nicht affektiert, jedoch lag eine basale Expression für die untersuchten sekundären Transporter vor und somit eine gewisse Transportkapazität. MgtA transportiert in *S. typhimurium* neben Mg^{2+} auch weitere Kationen, unter anderem auch Zink (Snively *et al.* 1989). In *C. metallidurans* sorgen MgtA und MgtB für den Fitnesserhalt in der $\Delta 7$ -Mutante nach der Deletion von $\Delta pitA$, *zupT*, *corA₁₋₃*, *zntB* und *hoxN* (Große *et al.* 2016). Die $\Delta zur/ AE104$ -gene array-Daten wiesen einen 1,5fach erhöhten Expressionslevel für *pitA* unter Zinkstress in der Mutante auf. Dieser war gering, aber anhand des Datensatzes signifikant. Grundsätzlich konnte die zinkabhängige Reprimierung der Sekundärtransporter, mit Reporterfusionen durch Kirsten *et al.* (2011) und in dieser Arbeit beobachtet werden. Unter anderem wirken divalente Kationen inhibierend auf die Aktivität der β -Galaktosidase. So sorgte die zusätzliche Inkubation des Enzyms aus *Lactobacillus crispatus* mit 1 mM $ZnCl_2$ für einen Abfall der Aktivität um 23 % (Kim & Rajagopal 2000). In den hier vorliegenden Experimenten wurde im Medium eine Konzentration von maximal 0,5 mM verwendet, welches vor der Reaktion mit dem Substrat im Reaktionspuffer entfernt wurde. Daher ist der Einfluss durch die Inkubation mit Schwermetallen betreffend der Inhibierung der β -Galaktosidase sowie der Hemmung des Zellwachstums der Zellen als minimal einzuschätzen. Außerdem hatten die verschiedenen Bedingungen auf alle verwendeten Stämme den gleichen Einfluss.

Die Gen-Array-Daten zeigten die zinkabhängige Reprimierung bis auf *corA₂* unter 100 μM Zinkeinfluss nicht. Als Grund hierfür kann die niedrigere Konzentration (100 statt 200 μM), aber auch der Zeitpunkt der Probenentnahme gesehen werden (10 min gegen 3 h). Jedoch sollte eine Antwort auf mRNA-Level durch Zink in einem kleinen Zeitfenster vonstattengehen.

Außerdem wurde dem Aufnahmeregulator Zur_{CH34} teilweise eine selbstregulierende Funktion nachgewiesen. Gene für Zur, die in einem Operon mit Zinktransportsystemen codiert werden,

4. Diskussion

unterliegen eher einer Autoregulation als isolierte Gene (Panina *et al.* 2003). Demgemäß wurde die Transkription von *zur* in *C. diphteria* unter Zinkmangel in einer autoregulatorischen Weise moduliert und unter Zinkmangel auf ein moderates Niveau gesenkt (Smith *et al.* 2009). Eine *trans*-agierende Promotorgenfusion wies eine konstitutive Expression des im Wildtyp und der Komplementationsmutante durch Zn^{2+} induzierbaren *zur*-Promotors in Δzur auf. Zwar war *zur* stromabwärts eines *arsR* like Genes codiert, jedoch lag ein gemeinsames Co-Transkript nicht vor. Die Promotorreporterfusion von *zurp* wies in dieser Arbeit eine ca. zweifache Expression der β -Galaktosidaseaktivität in der Mutante im Vergleich zu AE104 bei moderater Standardabweichung auf. Für die Deletion von *furB* konnte auf Grund der Datenstreuung keine Aussage gemacht werden.

Das in 2D-Analysen der löslichen Fraktion in der *zur*-Mutante vermehrt auffindbare Porin Rmet3234 mit einer Größe von 41,95 kDa wurde auch in Δzur unter Zinkstress verstärkt transkribiert (Gene-Array: Große & Nies 2014, unveröffentlicht). Auf MM_{X-Gal} konnte kein Unterschied zwischen der Reporterfusionsexpression zwischen AE104 und der *fur*-Deletionsmutante unterschieden werden. Da das nachfolgende Gen von *rmet3234* entgegengesetzt orientiert ist, ist die gleichmäßige Blaufärbung der Kolonien nicht als Resultat von Polareffekten zu vermuten. Auch weitere Gene für Porine waren unter Zinkstress durch $ZnCl_2$ hochreguliert (Anhang: Tabelle 20). Im Tris-MM war die Expression zwischen Mutante und AE104 nicht beeinflusst. Dies weist auf einen indirekten Einfluss von Zur_{CH34} auf die Expression des Porins und somit als Antwort auf die veränderte Zinkhomeostasis durch die Transporter ZupT und ZntA unter Zinkstress hin. Generell führte der Einfluss von Zink zu einer geringeren Expression des Porins in den beiden Stämmen. Somit hat die Deletion von *zur* nur unter Zinkzusatz Einfluss auf das Gen *rmet3234*, also Bedingungen unter denen der Regulator als Repressor wirkt. Ähnliche Resultate konnten für die äußeren Membranproteine *Rmet1628*, *3144*, *4994* und *5288* beobachtet werden. In Ag^+ -resistenten *E. coli*-Stämmen wurde der Mangel an Porinen in der äußeren Membran einer synergistischen Wirkung gegenüber Effluxsystemen für eine hohe Schwermetallresistenz zugesprochen (Li *et al.* 1997).

Ein denkbare Szenario die verstärkte Porinsynthese durch die *zur*-Deletion zu rechtfertigen, ist die Detoxifizierung des Periplasmas durch eine gesteigerte passive Transportkapazität über Porine. Diese ist nach der Entlastung des Zytoplasmas durch den gesteigerten Zn^{2+} -Transport über ZntA notwendig. Damit steht dieser Fall im Gegensatz zu dem äußeren Zinkstress bei

4. Diskussion

Zinkzusatz ins umgebende Medium. Die Expression von Porinen wird laut Literatur durch Änderung der Osmolarität im Periplasma oder bei Temperaturstress und resultierenden missgefalteten Proteinen gesteigert. So findet durch die Regulation der Histidinkinase EnvZ und dem Responsregulator OmpR eine veränderte Expression bzw. ein Tausch zwischen OmpF und OmpC bei veränderter Osmolarität oder Nährstoffmangel (Liu & Ferenci 1998) in der äußeren Membran von *E. coli* (Nikaido 2003) statt. Eine erhöhte Expression von Porinen in der äußeren Membran resultierte in einer gesteigerten RpoE-Aktivität bei Untersuchungen von Meccas *et al.* (1993) in *E. coli*-Zellen. Der alternative Sigmafaktor RpoE ist über das Protein der inneren Membran RseA gebunden, welches durch Proteolyse (DegS) den Sigmafaktor ins Zytoplasma freigibt (Ades *et al.* 2003). Die Bildung des Antisigma - RpoE-Komplex wird durch das periplasmatische Chaperon RseB stabilisiert und sensiert so periplasmatischen Stress z. B. in Form von akkumulierenden ungefalteten Porinen. Die Analysen von Egler *et al.* (2005) über die Effekte des alternativen Sigmafaktors RpoE, welcher durch die Schwermetalle Zn^{2+} und Cu^{2+} in *E. coli* induziert wird, zeigte eine Senkung der Schwermetallresistenz in der Deletionsmutante. Die Deletion des Sigmafaktors RpoE in *E. coli* resultierte in einem niedrigen mRNA-Level von *ompC* und *ompA* sowie in einem sensitiven Phänotypen gegenüber Cu^+ , Cd^{2+} und Zn^{2+} .

In die Richtung des Abbaus von ungefaltetem Protein würde die toxische Wirkung erhöhter Zinkkonzentrationen in der Zelle und die Lokalität von *rmet3234* stromabwärts der *tatABC*-Gene des sec-unabhängigen Typ I Transportes gehen. Die Expression wurde nicht durch die Deletion von *zur* beeinflusst. Eine direkte Regulation und damit die Zugehörigkeit zum Zur-Regulon ist trotz *inverted repeat* (TGTTGCTTCACAACA und GTAAACCGCGTTTACG) in *rmet3234p* eher auszuschließen, da zwar die *zur*-Deletion unter Zinküberschuss Einfluss auf das Porin hat. Dies war jedoch nicht der Fall unter Normbedingungen in Tris-gepuffertem Minimalmedium.

Das Porin Rmet5715 zeigte ebenfalls eine gesteigerte Expression in Δzur bei einer zink-unabhängigen Expression in AE104. Dagegen weisen die *outer membran*-Faktoren Rmet4596, Rmet4834 und Rmet5118 eine entgegengesetzte Regulation (Tabelle 21) auf. Sie sind durch Zinkzugabe induziert und die Deletion von *zur* resultierte in einer Reprimierung der Expression. Darunter ist das TolC-Protein, das 21 % Proteinähnlichkeit mit TolC *E. coli* teilt. Das Gen *rmet4596* auf Chromosom 2 ist als evolutionär verbliebene Kopie der *czcCBA*-Determinante stromaufwärts von *zntA* lokalisiert (von Rozycki & Nies 2009). Nach Paulsen

4. Diskussion

und Saier (1997) sorgen die β -barrel-Strukturen der Porine (*outer membran factor*) unabhängig des zugrundeliegenden Zytoplasmamembrantransporters für einen substratspezifischen Weitertransport. Dabei kann eine Verbindung über *membran fusion proteins* zu RND-, ABC- oder MFS-Transportern ausgebildet werden.

Zusammenfassend kontrolliert und stabilisiert Zur_{CH34} die Zinkhomeostasis in *C. metallidurans* über den Zinkimporter ZupT. Seine Deletion beeinflusste durch den verstärkten Import die Effluxsysteme der inneren und äußeren Membran als Resultat der Detoxifizierung des Zytoplasmas.

4.4. Die Charakterisierung des Zur-Regulons

Neben der vorangegangenen Regulation der Zinkimportsysteme, wie *znuABC* in gramnegativen Bakterien oder dem Sekundärtransporter *zupT* in *C. metallidurans* wurde auch eine Aktivierung der Efflux-Systeme *zra* (P-typ-ATPase) und *zrf* (CDF) in *C. glutamicum* durch Zur beobachtet (Teramoto *et al.* 2012). In *C. metallidurans* liegt ein indirekter Einfluss auf ZntA über das identifizierte ZntR vor. Des Weiteren umfasst das Zur-Regulon neben Transportsystemen der Membran weitere Gene für zytoplasmatische Proteine. Darunter sind zum einen Paraloge zinkhaltiger Proteine, aber auch mögliche Chaperons zu nennen (Haas *et al.* 2009). Abb. 29 zeigt die vier experimentell bestätigten Promotoren mit deren Operonstruktur, die zum Zur-Regulon von *C. metallidurans* zählen. Des Weiteren ist das Expressionslevel des Wildtyps und Δ *zur* in MM zueinander und unter dem Einfluss von 100 μ M ZnCl₂ dargestellt (Gene Array: Große & Nies 2014, unveröffentlicht).

An erster Stelle steht die gezeigte Kontrolle des Promotors von *zupT*. Die Bedeutung von ZupT liegt neben dem Erhalt der 70 000 Zn²⁺ je Zelle des *zinc repository*'s (Δ *zupT*: 20 000 Zn²⁺/ Zelle ;Herzberg *et al.* 2014) in der kontrollierten Zuführung von Zink für Metalloproteine. Bei fehlendem Zinkimport durch ZupT wird so die zinkhaltige DNA-Polymeraseuntereinheit RpoC in Δ *zupT* ungefaltet akkumuliert. In dem Gene Array ist die Transkription von *rmet3333* (*rpoC*) nicht beeinflusst. Somit vermittelt ZupT die Verfügbarkeit von Zink unter metalllimitierenden Bedingungen. Unter Zinkstress wird dieser Zinkbypass durch Zur unterbunden.

4. Diskussion

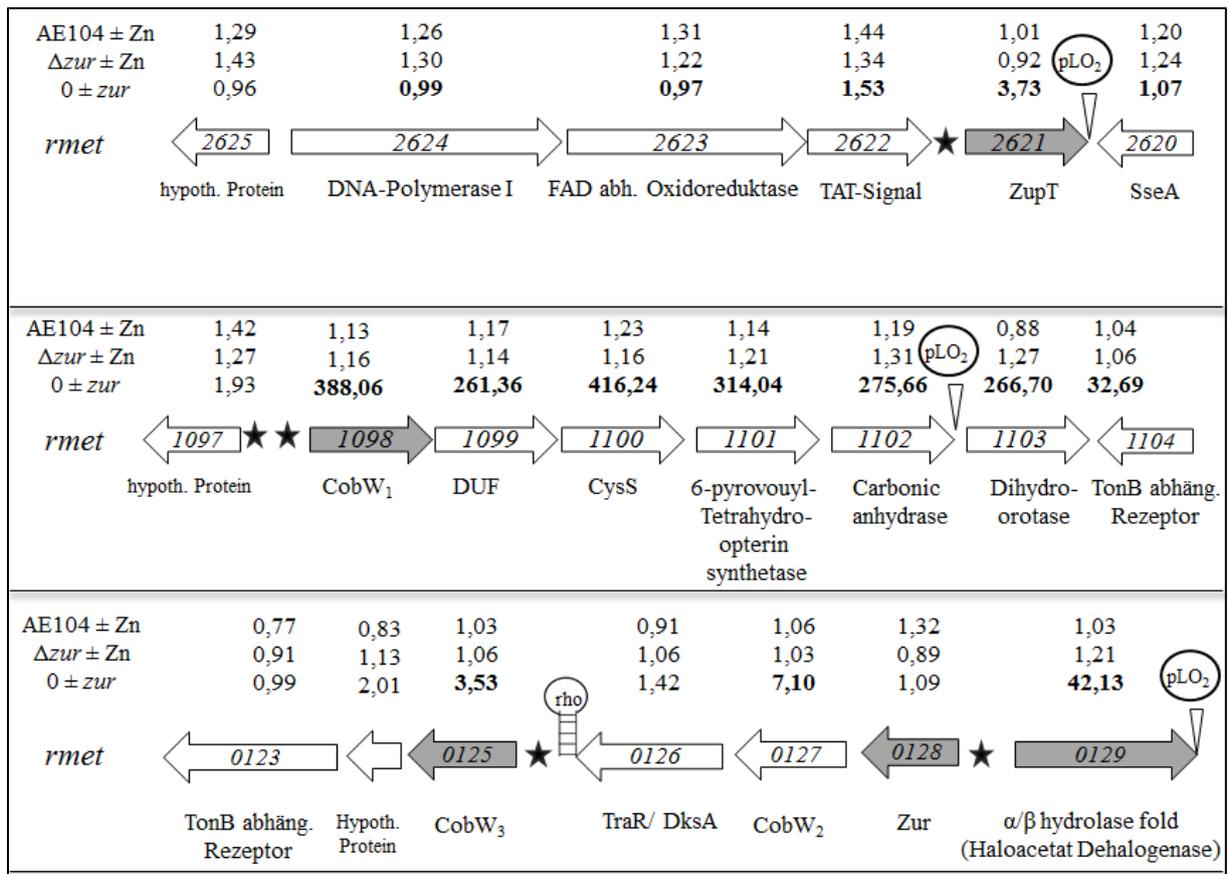


Abb. 29: Darstellung der durch Zur_{CH34} regulierten Operonstrukturen. Gezeigt ist der Locus von *zupT*, *cobW₁* sowie zur mit stromabwärtsliegendem *cobW₃*. Alle vier Gene besitzen in ihrer Promotorregion ein Zur-Bindemotiv (Stern), dessen aktive Bindung in *in vitro*-Experimenten gezeigte wurde. Die Gene-Array-Daten (Große & Nies, 2014, unveröffentlicht) zeigen den Einfluss von 100 μM ZnCl₂ auf die Genexpression in AE104 und Δzur (±Zn) sowie der Deletion in Tris-MM (0±zur). Des Weiteren sind die Lokalisation gemessener Genreporterfusionen basierend auf pECD794-1 (pLO2) sowie die Rho-abhängige Terminationssequenz stromabwärts von *rmet0126* dargestellt.

An zweiter Stelle sind die *cobW₁₋₃* annotierten Gene zu nennen, die als mögliche Chaperone des intrazellulären Metalltransports fungieren und womöglich die Schnittstelle zwischen ZupT und z. B. dem zinkhaltigen Zielprotein RpoC bilden, das in direkter Einflussnahme zu ZupT steht. CobW₂ und CobW₃ sind stromabwärts von *zur* codiert, wobei *cobW₂* zur Operonstruktur von *zur* zählt und *cobW₃* eine eigene Zur-Box in der 5'-Region besitzt. CobW₁ ist als erstes Gen eines durch Zur supprimierten hexacistronischen Operons codiert. Der TonB-abhängige Rezeptor als 7. Gen ist entgegengesetzt codiert und die Gene-Array-Daten zeigten hier eine abrupte Senkung des mRNA-Levels zum vorherigen Gen (1/8). Auf der anderen Seite des *cobW₁*-Promotors wird ein hypothetisches Protein vermutet, welches nicht durch Zur reguliert wird. Somit stehen die zwei identifizierten Zur-Bindemotive nur dem *cobW₁*-Operon als strikte Regulationsdomäne des starken Promotors zur Verfügung.

4. Diskussion

Anhand der *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine ähnliche Bindekapazität von Zur zu beiden Motiven suggeriert.

Die Funktion von Metallochaperons ist von Cu- und Ni- Chaperons weitreichend untersucht worden. CopZ sorgt für die Weiterleitung von Cu⁺ von der Import-P_{IB1}-ATPase CopA an das höher affine CopY, dem Suppressor des *cop*-Operons und der Efflux P_{IB1}-typ ATPase CopB (Cobine *et al.* 2002; Magnani & Solioz 2005). Dabei löst sich das mit Zink beladene CopY durch Übertragung von zwei Cu⁺ von dem Promotor, unter anderem in *Enterococcus hirae*. Ein ähnliches Prinzip der Aktivierung liegt bei der Reifung der Zn/ Cu- SOD vor (Review: Culotta *et al.* 2006). Die Chaperons HypA für die Ni²⁺-Insertion (Watanabe *et al.* 2015) und HypC als assessorisches Chaperon für den Zusammenbau des Fe-(CN)-CO-Komplexes (Soboh *et al.* 2013) wurden als essentielle Teile der Ni/Fe-Hydrogenasereifung beschrieben. Diese Beispiele zeigen die Rolle von Chaperons, die am intrazellulären Transport oder als Insertasen an der Bildung von Metalloenzymen mitwirkten. Als mögliches Zink-Chaperon wurden die Mitglieder des Zur-Regulon YciC *E.coli* (Gaballa & Helmann 1998) und Zrg *C. diphtheriae* (Smith *et al.* 2009) gesehen. YciC wurde in diesem Zusammenhang dem Zinktransportpfad geringer Affinität von YciAB zugeordnet. Die als *cobW* annotierten Gene suggerieren eine Anteilnahme an der Cobalaminbiosynthese. Die Daten dieser Arbeit zeigten *in vitro* die Bindung von Zur an den *cobW*₁-Promotor, dem Promotor von *zur* sowie stromabwärts den von *cobW*₃ (3.3.3, S. 69). Des Weiteren bewiesen Messungen mit Reporterfusionen den Einfluss von Zur auf die jeweilige Promotorsequenz des *cobW*₁-Operons (3.3.2, S.71) und dem Umfeld des *zur*-Promotors. Dies korreliert mit den *Gene array*-Daten, jedoch hatte die Inkubation mit Zink keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der drei *cobW*-Gene. In *B.subtilis* beeinflusst Zur den *low-affinity* Transportweg von YciABC und den Transport hoher Affinität des ABC-Transporters YciHIA. Die Expression von YciC war unter Zinkeinfluss reprimiert (Gaballa & Helmann 1998; Gaballa *et al.* 2002). Die Affinität von Zur zum Promotor von *yciC* betrug 6 nM Zur-Monomer unter ähnlichen Bedingungen (Gabriel *et al.* 2008) und bei ebenfalls zwei Zur-Motiven in der Promotorregion. Im Vergleich dazu wurden 61 nM Zur-Dimer als die Konzentration für eine halbmaximale Retardierung der Promotorregion von *cobW*₁ bestimmt. Dabei ist anzumerken, dass mit 50 pM DNA im Vergleich zu den 13,3 nM dieser Arbeit nur ein Bruchteil zu retardierende Promotor-DNA vorgelegt wurde. Im Fall von *yciC* wurde eine AT-reiche 9-1-9 Zur-Konsensus-Bindemotiv, dessen flankierende Bereiche ebenfalls die Affinität beeinflussen, identifiziert. YciC selbst hat eine Proteinähnlichkeit zu CobW₁ von ca. 55 % und galt schon damals als mögliches

4. Diskussion

Chaperon, das den Transport geringer Affinität unterstützte. Ähnliches galt für Zrg (DIP1486, Proteinähnlichkeit zu *cobW₁*: 42,5 %), dessen Promotoraktivität durch die Deletion des einzigen Vertreters der *fur*-Familie in *C. diphteria*, Zur, konstitutiv wurde (Smith *et al.* 2009). Durch die Zugehörigkeit zum Zur-Regulon werden CobW₁₋₃ der COG0523-Proteine zugeordnet, die als mögliches Zinkchaperon fungieren. Grundsätzlich weisen die Vertreter dieser Proteinfamilie eine N-Terminale GTPase-Domäne mit dem Walker A und B-Motiv sowie eine CxC Metallbindemotiv auf. Der C-Terminus erscheint im phylogenetischen Rahmen variabel, der einen histidinreichen Bereich endständig oder zentral besitzen kann, oder auch nicht. Erste Untersuchungen durch M. Schüttau (Diplomarbeit, 2013) wiesen eine Expression unter Metallmangel auf, was mit der Regulation über Zur korreliert. Weiterführende Untersuchungen deuteten eine Grundlevel exprimierung von *cobW_{2,3}* sowie *zur*, welche durch EDTA und Zink modifizierbar war. Des Weiteren führte die Deletion von *cobW₂* und *cobW₃* zu einer Resistenzminderung gegenüber Cobald (Masterarbeit: L. Bauer 2013). Auf Proteinebene wurde die Bindung von zwei Zn²⁺ bzw. 1 Ni²⁺ je CobW₁- und 6 Zn²⁺ je CobW₃-Monomer sowie eine geringe Affinität zu Ni, Co und Cd bestimmt. Die erhöhte Chaperonexpression, welche neben Zn auch Ni mit geringerer Affinität binden, könnte zu einer Diskriminierung von Nickel in der Zelle führen. Eine Verdrängung durch erhöhte Zinktransportraten spielt dabei auch eine Rolle. Eine Folge hiervon kann die beobachtete verstärkte Expression der Gene für die Ni²⁺-abhängigen Hydrogenasen auf Grund der Verfügbarkeit des Kofaktors sein (Abb. 28 Gene Array). Die lösliche und membrangebundene Hydrogenase sind in CH34 aktiv und in seinem plasmidfreien Derivat inaktiv (Herzberg *et al.* 2015). Eine Minderung des Zinkeinstroms bzw. des Zinkgehalts durch die Deletion von *zupT* resultierte in einer Wiederherstellung der Hydrogenaseaktivität in AE104.

Die 5 anderen Gene des *cobW₁*-Operons codieren für Paraloge der zinkhaltigen Enzyme: Cysteinyl-t-RNA-Synthetase (Rmet1100), Carbonic-Anhydrase (Rmet1102), Dihydroorotase (Rmet1103) und zwei Enzyme des Pterin-Biosyntheseweges. Dazu zählen die 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthetase (Rmet1101) und das Genprodukt von Rmet1099, welches Ähnlichkeit mit GTP-Cyclohydrolase/ Fole2 (40% Proteinähnlichkeit zu PRK13674) hat. Ein sechstes Enzym wird am bidirektionalen Promotor von *zur* codiert, welches Ähnlichkeit mit Haloacetat-Dehydrogenasen (Esther Database: (Hotelier *et al.* 2004) hat und womöglich eine Alternative zu einem zinkhaltigen Enzym darstellt. Der DksA-Regulator stromabwärts von *zur-cobW₂* scheint durch die Deletion von *zur* geringfügig beeinflusst zu werden. Mit dem

4. Diskussion

ARNold-Server (Naville *et al.* 2011) konnte ein Rho-abhängiger Terminator (GCGGCCCG_{GTGATC} CGGGCCGC) stromabwärts von *dksA* (*rmet0126*) jedoch nicht zwischen *cobW*₂ und *dksA* festgestellt werden. Rmet0126 ist eines von vier Regulatoren dieser Familie in *C. metallidurans*, das vermutlich ähnlich den Entdeckungen durch (Blaby-Haas *et al.* 2011) eine zinkfreie Alternative des globalen Regulators mit seinem C4-Zinkfingermotiv darstellt. Dieser interagiert direkt mit der RNA-abhängigen Polymerase unter Bindung von ppGpp und verstärkt so die Transkriptionsinitiation von Genen der Aminosäuresynthese bzw. des - transports und senkt die rRNA-Gen-Transkription über Destabilisierung von RNAP-Promotorkomplexen. Im Gegensatz zu Rmet4453 (C_{REC}C-X₁₇-C_{TAC}), Rmet4470 und Rmet4602 (C_{CAC}C-X₁₇-C_{QEC}) besitzt das im *zur*-Operon codierte DksA diese Cystein-Liganden nicht (C_{EE}T-X₁₇-S_{LE}A).

Einen weiteren großen Anteil am Zinkpool in den Zellen stellen Ribosomen mit ihren zinkhaltigen Proteinen dar. Dieser ist durch die schiere Anzahl an Ribosomen je Zelle gegeben. Bei *C. metallidurans* wurden 7182 ± 905 Ribosomen je Zelle unter Betrachtung der 25 größten ribosomalen Proteine (Martin Herzberg *et al.* 2014) bestimmt. Ein Wechseln von den zinkhaltigen Proteinen zu dessen Paralogen unter Zinkmangel, denen das CxxC-Metallbindemotiv fehlt, sorgt so für ein Haushalten mit dem verfügbaren Zink und der Kanalisierung des Zn²⁺ zu weiteren essentiellen Proteinen (Gabriel & Helmann 2009). Die Paraloge selbst stehen oft unter Zur-Kontrolle (Panina *et al.* 2003). In *S. coelicolor* bindet Zur *in vitro* neben der Promotorregion von *znuA* und dem Gen für das Zincophor Coelibactin (Sco07682), die von *rpmG2* und *rpmF2*, den zinkfreien ribosomalen Paralogen zu L33 und L32 der S50-Einheit (Owen *et al.* 2007; Shin *et al.* 2011). Die K_d-Werte von EMSA-Experimenten waren für *znup* 74,85 nM, *rmpF2p* 68,29 nM ähnlich der von Zur_{CH34} gegenüber *zupTp* unter vergleichbaren Bedingungen (0,15 nM DNA und 0,34 – 1392 nM Protein). Dagegen war die Affinität zu *rpmG2p* mit K_D = 17,68 nM bzw. *sco7682p* mit 17,63 nM in EMSA-Experimenten höher. In den Gene Array-Daten wurde keine verstärkte Expression von ribosomalen Proteinen beruhend auf der Deletion von *zur*_{CH34} beobachtet. In *C. metallidurans* zählen ribosomale Proteine zu den Proteinen, die keine Paraloge als Resultat von evolutionären Duplikationen aufweisen, was bei 50 % der Proteine aus CH34 zutrifft (Janssen *et al.* 2010).

Die 4 Mitglieder des Zur-Regulons bzw. die 5 Bindemotive bilden eine strikte Konsensussequenz, die der von (Haas *et al.* 2009) für Proteobacteria und im Besonderen der

4. Diskussion

β -Proteobacteria gleicht (Abb. 30). Zur-Bindemotive von *S. coelicolor* (Shin *et al.* 2007), *C. glutamicum* (Schröder *et al.* 2010) oder *E. coli* (Gilston *et al.* 2014) weisen eine nicht so starke Konservierung auf. Bindemotive in der Promotorregion von codierten Alkoholdehydrogenasen in CH34 hatten eine gewisse Ähnlichkeit zur beobachteten Konsensussequenz. In *N. meningitidis* wies *adhP* eine Zur-Binderegion ähnliche Sequenz auf, die durch den Regulator gebunden wurde. Das Gen selbst unterlag einer Reprimierung unter Zinkmangel, währenddessen die 15 anderen Mitglieder des Regulons unter diesen Bedingungen verstärkt exprimiert wurden (Pawlik *et al.* 2012). Dagegen wurde für *adhA* in *C. glutamicum* keine differentielle Expression beruhend auf Δzur , trotz möglichem Bindemotiv, detektiert (Schröder *et al.* 2010). Durch *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnte keine Zugehörigkeit zum Zur_{CH34}-Regulon unter den gewählten Bedingungen von *rmet0545*, *rmet1569*, *rmet3880* und *rmet4281* festgestellt werden.

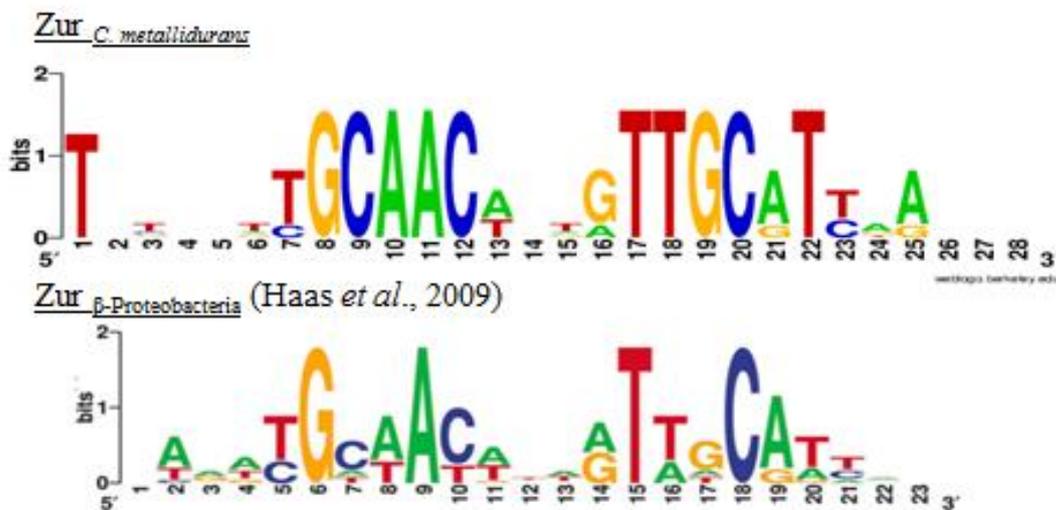


Abb. 30: Konsensussequenz des Bindemotivs von Zur in *C. metallidurans* und für β -Proteobakterien nach Haas *et al.* 2009.

Eine weitere Beobachtung der Deletion von *zur* war die Reprimierung von Motilitätsgenen der Flagellabildung (*rmet3680-3702*, *rmet3731-3744* und *rmet5252-5262*). Unter Fe-Limitierung werden diese verstärkt transkribiert (Olsson-Francis *et al.* 2010), wie auch in *N. meningitidis* (Grifantini *et al.* 2003). Eine logische Konsequenz wäre dies aus energetischen Gründen, um den kostenintensiven Metalltransport und die genannten Investitionen zu gewährleisten. So resultierte auch in *L. monocytogenes* eine reduzierte Motilität der Deletionsmutanten $\Delta zurR$ (Dowd *et al.* 2012b).

4. Diskussion

4. 5. Die Regulation des Zinkefflux über ZntR_{CH34} (Rmet3456)

Die Efflux-ATPase ZntA wird in *E. coli* (Brocklehurst *et al.* 1999) und weiteren Organismen (Singh *et al.* 1999) durch den MerR-Regulator ZntR reguliert. ZntR kontrolliert über seine Bindung bzw. Konformationsänderung an der jeweiligen Promotorsequenz die Expression des bekannten Transportsystems.

Das Gen *rmet3456* (*pbrR3*) codiert für einen der drei PbrR-Orthologen in *C. metallidurans*. Dieses bildet mit PbrR (Rmet5946) und PbrR₂ (Rmet2302) eine Subgruppe der blei-induzierten MerR-Regulatoren in CH34 (Mergeay *et al.* 2003). Die Expression der drei *pbrR*-Orthologen [*pbrR*, *pbrR*₂=*cadR*, *pbrR*₃ = *zntR*] wurde durch 0,8 mM Zink (0,5 h) in *MicroArray*-Analysen nicht induziert. Jedoch konnte *pbrR*₃ und *pbrR* durch Pb²⁺ (0,4 mM) und Cd²⁺ (0,5 mM) verstärkt transkribiert werden (Taghavi *et al.* 2009). Dagegen wird *cadR*/*rmet2302*/*pbrR*₂ konstitutiv exprimiert (Dissertation: Legatzki 2003). PbrR ist im divergenten *pbrABCD* \longleftrightarrow *RTUa*-Operon auf pMOL30 (Janssen *et al.* 2010) codiert und reguliert dieses. Rmet2302 wird als Regulator der Cd²⁺-induzierten P_{IB2}-typ ATPase CadA gehandelt. Eine Deletion der gesamten Sequenz sorgte für eine Cd⁺-Resistenzsteigerung durch die konstitutive Expression von *cadA* (Bachelorarbeit: D. Kleemann 2013, Anhang: Tabelle 22). Ursache hierfür war das Erzeugen einer Operonstruktur durch das Entfernen der Rho-abhängigen Terminationssequenz (GTGCA_{GACCG} TGCGC; ARNold-Server: Naville *et al.*, 2011) 39 bp nach dem Startcodon von PbrR₂. Zuvor zeigte Legatzki in ihrer Dissertationsarbeit (2003) keinen Einfluss einer Disruption auf die Schwermetallresistenz, das durch eine mögliche Funktionsüberschneidung weiterer MerR-Regulatoren herrührte oder das Resultat einer unvollständigen Disruption war. Jedoch codieren die Gene für die Cd²⁺-induzierte P_{IB2}-typ ATPase CadA und dem aktivierenden MerR-Regulator CadR in *P. putida* (Lee *et al.* 2001) eine ebenfalls divergente Genstruktur. Eine Disruption führte hier zu einer verminderten Resistenz gegenüber CdCl₂ (1,3 mM; WT: 1,7 mM), jedoch zu einem wesentlich geringeren Effekt als die Deletion von CadA (0,05 mM). Dies kann mit der grundsätzlichen Diskriminierung der Metallionen am Regulator durch dessen Koordinationsstruktur (Panella *et al.*, 2015) und dem Fakt der ähnlichen Transportraten der ATPasen PbrR, CadA und ZntA für Zn und Cd (Scherer & Nies., 2009) erklärt werden.

Das Sensieren und Binden von 4 Zink im ZntR *E. coli* –Dimer erfolgt über das Kofaktor-Bindemotiv am C-Terminus in der 5. Helix. Dabei bindet C114 und C124 das eine und C115

4. Diskussion

und H119 das andere Zink in einer linearen Zweiliganden-Koordinationsgeometrie (Changela *et al.* 2003). Das zweite Protomer des Dimers steuert über den Liganden C79 und einem Phosphat oder Sulfat-Anion die Verknüpfung zwischen den beiden Zinkatomen und deren tetrahedrale Koordination bei (Changela *et al.* 2003) und sorgt hierdurch für eine Diskriminierung von mono- und divalenten Metallionen. Im Gegensatz dazu koordinieren Cu⁺-Sensoren (CueR/ CupR) ihren Kofaktor über zwei Cysteine (Analog: C114, C124) und das Cystein der Divalenten-Regulatoren zu Beginn der α 5-Helix bzw. der Dimerisierungsdomäne ist meist durch ein Serin ersetzt (Ibáñez *et al.* 2015). Abb. 45 (Anhang) zeigt das Alignment aller 16 MerR-Regulatoren *C. metallidurans* gegenüber bekannter ZntR-Proteine und Cu⁺-Sensoren. Bis auf wenige Ausnahmen (Rmet0102, Rmet1167 und CueR) sind C114 und C124 in MerR-Orthologen konserviert. Das für die Koordination von Zn²⁺ essentielle C79 findet sich in CueR *E. coli*/CH34 (S/R) und CupR_{CH34} (S) sowie in SoxR_{CH34} (V) nicht vor. SoxR als Sauerstoffsensoren koordiniert sein 2Fe-2S-Kluster über 4 konservierte Cysteine (SoxR *E. coli*/ Rmet4538_{CH34}: C119/126, C122/129, C124/131, C130/137) des Metallbindeloops (Bradley *et al.* 1997). Rmet3456 zeigt im Gegensatz zu PbrR und PbrR₂ die Konservierung von H119 (*E. coli*) genauso wie ZntR von *A. tumefaciens* und *C. turicensis*. Die Regulatoren aus *P. putida* (CadR, Lee *et al.*, 2001) und *B. pertussis* (ZccR, (Kidd & Brown 2003) weisen in diesem Bereich ein Glutamin (Q) bzw. Aspartat (D) auf. Für die Sensierung von Zn, Co und Cd durch ZccR sind nicht nur die konservierten 3 Cysteine (C77, C112, C122) der bekannten ZntR (Analog *E. coli*: C79, C114 und C124) essentiell, sondern ein zu C79 9 As weiter auftretendes Histidin (H90) und das H140xH142-Motiv direkt am C-Terminus. Eine Ersetzung von C115 durch ein Histidin in ZntR *A. tumefaciens* oder ein Glutamat (E) im Fall von Rmet3456 bzw. Aspartat (D) im Fall von CadR *C. metallidurans* kann ebenfalls für eine tetrahedrale S3N(O)-Koordination der Zink-Atome führen. Somit wird in Rmet3456 eine Koordination des Zinks über C117, C128 und E118, H123 sowie C82 postuliert, um als beladener Regulator die Transkription zu aktivieren. Dies ist durch die Überlagerung von ZntR_{CH34} und ZntR *E. coli* in Abb. 32 veranschaulicht.

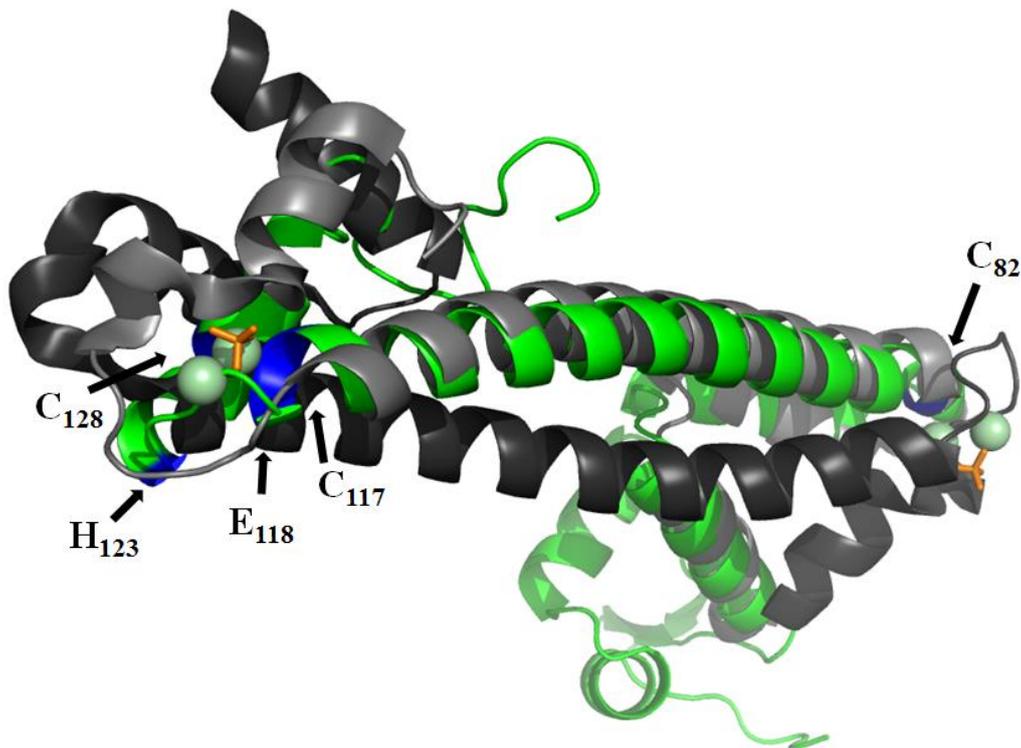


Abb. 31: Überlagerung des potentiellen ZntR aus *C. metallidurans*, Rmet3456 (grün) und der Kristallstruktur des ZntR *E. coli*-Dimers mit jeweils zwei gebundenen Zn (Changela *et al.* 2003; PDB-file: 1Q08) wurden dargestellt. Das vermutete Zinkbindemotiv H123, C117 bzw. E118 und C128 (vorderer Bereich) sowie C82 (hinten) für die Koordination des zweiten Zinkpaares sind blau gekennzeichnet. ZntR *E. coli* koordiniert jeweils über C114/ C124 sowie C115/ H119 in einer linearen Zwei - Liganden-Struktur pro Monomer zwei Zinkatome (Pennella & Giedroc 2005). Eine tetrehedrale Koordination für jedes Zinkatom wird über das C79 des zweiten ZntR-Monomers und einem Phosphat (orange) sichergestellt. Das Mg^{2+} der Kristallisierung wurde in dieser Abb. nicht gezeigt. Die Überlagerung und Darstellung wurde mittels PyMOL™ Molecular Graphics System (Version 1.8.2.0, Schrödinger/ LLC) unter Verwendung des Phyre²-Server (Kelley *et al.* 2015) für Tertiärstruktur von Zur_{CH34} durchgeführt.

Die durch ZntR gebundene Promotorregion, wie auch weitere Vertreter der MerR-Familie, weist einen atypischen Abstand zwischen der -35 und -10 Box von 19 - 20 bp auf. Die Bindung des Regulators als Dimer über die N-terminale DNA-Bindedomäne und die Bindung zweier Zn-Atome je Monomer führen zu einer Konformationsänderung. Diese sorgt für eine Verkürzung des Abstandes zwischen der -35 und -10 Box. Dieser bevorzugte Abstand von ca. 17 ± 1 bp (Harley & Reynolds 1987), so in der Promotorregion von *zur* und *cobW₁* vorzufinden (Tabelle 16), sorgt für eine bessere Erkennung durch die RNA-abhängige Polymerase (Brocklehurst *et al.* 1999; Outten *et al.* 1999) und zur Initiation der Transkription. Dieser Fakt wurde für mono- und divalente Kationen sensierende MerR-Orthologe, aber auch

4. Diskussion

für SoxR in der Literatur beschrieben (Brown *et al.* 2003; Mergey *et al.* 2003; Julian *et al.* 2009; Hobman *et al.* 2012).

Tabelle 16: Darstellung der Promotorregionen von MerR-regulierten Genen. Gezeigt sind die -35 und -10 Box, ihr Abstand in bp und die palindromischen Bereiche als Bindemotivkennzeichnung (unterstrichen) von *zntA* *E. coli* (Brocklehurst *et al.* 1999), *cadA* *P. putida* (Lee *et al.* 2001), *zccA* *B. pertussis* (Kidd & Brown 2003) und *pbrA*, *cadA* sowie *zntA* aus *C. metallidurans*. Als Beispiele für den bevorzugten Abstand von 17 bp wurde der Promotor von *cobW₁* und *zur* hinzugezogen.

Promotor/ Regulator	-35 Box	-10 Box	bp	
<i>cobW₁</i> / Zur <i>C. metallidurans</i>	TTGCAT	TAACCGATCGCCCGCAC	TTGGCA	17
<i>zurp</i> / Zur <i>C. metallidurans</i>	TTGCAT	CGGGTAGGGGCCTATGG	TTAAAT	17
<i>pbrAp</i> / PbrR <i>C. metallidurans</i>	TTGACT	<u>CTATAGTAACTAGAGGGTG</u>	TTAAAT	19
<i>cadAp</i> / Rmet2302	TTGACT	<u>CTATATCTACTAGAGGTTT</u>	TCTAAT	19
<i>zntAp</i> / Rmet3456	TTGACC	<u>CTGTAGCGACTAAAGGGTC</u>	TTCAAT	19
<i>zccAp</i> / ZccR <i>B. pertussis</i>	TTGACC	<u>CTATAGTAACTCCAGGGTG</u>	TGAAAT	19
<i>cadAp</i> / CadR <i>P. putida</i>	TTGACT	<u>CTATAGTGGCTACAGGGTGT</u>	TCACTT	19
<i>zntAp</i> / ZntR <i>E.coli</i>	TTGACT	<u>CTGGAGTCGACTCCAGAGTG</u>	TATCCT	20

Betreffend der Regulation der Zinkhomeostasis und dem Fokus auf den Zinktransportsystemen wurde Rmet3456 (PbrR₃ nun ZntR) untersucht. Das Produkt Rmet3456 auf dem Chromosom I (ehemals contig 710) wurde als möglicher Regulator der zinkinduzierten P_{IB2}-typ ATPase ZntA postuliert (Hobman *et al.* 2012; Taghavi *et al.* 2009). Beweisführend in dieser Arbeit hierfür waren Protein-DNA-Interaktionsstudien, die unter gleichen Bedingungen eine Bindung des N-terminal markierten Proteins an den Promotor von *zntA*, jedoch nicht von *cadA* (je 13,3 nM) zeigten. Ähnliche Resultate erzielte (Pruteanu *et al.* 2007) durch das Retardieren von 50 nM *zntAp* durch ZntR *E.coli* (0,65-26 µM). Dabei wurde auf die positiven Einflüsse von Zink- und DNA-Bindung auf die Stabilität des Proteins gegenüber Degradation als weitere Regulationsebene fokussiert. Dagegen wurde eine Interaktion zwischen *zntp* mit ZntR *S. aureus* *in vitro* im pM Bereich (K_d = 8 pM Zn²⁺), jedoch bei sehr geringer DNA-Konzentration (0,1 pM) festgestellt. Für die Interaktion zwischen Zur und *zupTp* war dagegen eine Magnitude niedriger die Konzentration anzulegen, um eine maximale Retardierung der DNA unter gleichen Bedingungen zu erzeugen. Einerseits wurde für ZntR_{*E.coli*} eine geringere Affinität im Vergleich zu Zur *E.colie* durch Outten 1999 bestimmt. Jedoch wurde in den Experimenten dieser Arbeit eine ausreichende Verfügbarkeit von freiem Zink verwendet. In der Literatur wird dies auf ein marginales Minimum durch die K_d-Werte

4. Diskussion

der Regulatoren in *E. coli* determiniert. Komplementierbare Daten von Reporterfusionen bewiesen in dieser Arbeit die Rmet3456-abhängige Expression von ZntA sowie die mögliche Substitution von ZntA durch CadA bei dessen fehlender Expression. Jedoch sorgte das in *trans* synthetisierte Rmet3456 für keine 100 %ige Rückführung der Expressionsraten von *zntA* und *cadA*. Dies kann mit der Kopienzahl des Vektors (pBBR1MCS3) begründet werden. Phänotypisch sorgte die Deletion des Regulators und deren Einfluss auf die Transkription der beiden chromosomal codierten Efflux-ATPasen für eine 2fache Akkumulation von Zink und eine verminderte Resistenz gegenüber Zink (IC_{50} ; WT: 622 ± 103 , $\Delta rmet3456$: $118 \pm 26 \mu M$ $ZnCl_2$) gegenüber des Ausgangsstammes. Die Sensitivität gegenüber Cd^{2+} und Co^{2+} war nicht beeinflusst. Ähnliche Effekte wurden durch die Deletion von *zntA* in AE104 durch Scherer & Nies 2009 beobachtet. Auch die Deletion des ZntR in *E. coli* führte zu einer Steigerung der Zinksensitivität des Bakteriums (Brocklehurst *et al.* 1999). Eine 4fache Akkumulation von Cadmium und 2fache von Zn^{2+} war das Resultat von $\Delta zntR$ in *A. tumefaciens* (Chaoprasid *et al.* 2015) Die verstärkte Synthese von CadA kompensiert dabei nicht den Verlust der transkriptionellen Aktivierung von *zntA*.

Zusammenfassend codiert *C. metallidurans* mit *rmet3456* für den Regulator der zinkinduzierten P_{IB2} -typ ATPase ZntA und gewährleistet so die Stabilität der Zinkhomeostasis über den Efflux.

4.6. Das bestätigte Modell der Regulation der Zinkhomeostasis in *C. metallidurans*

Anhand der Daten dieser Arbeit und dem derzeitigen Stand der Wissenschaft erstellt sich folgendes Modell der Zinkhomeostasis in *C. metalliduran* (Abb. 32). Für den unspezifischen Import des essentiellen Zinks besitzt das an schwermetallkontaminierten Standorten angepasste Bakterium die Transportwege über eine Reihe sekundärer Aufnahmesysteme, welche sich gegenseitig beeinflussen und kompensieren können. Diese Reihe beginnt mit dem Phosphattransporter PitA, gefolgt von ZupT und den drei MIT-Proteinen CorA₁₋₃. Des Weiteren wird dem vierten codierten Protein der MIT-Familie, ZntB, eine mögliche Beteiligung am Import postuliert. Grund hierfür war die Steigerung der Zinkresistenz durch die Deletion von *zntB* im Stammhintergrund einer $\Delta zupT\Delta pitA\Delta corA_{123}$ -Mutante.

4. Diskussion

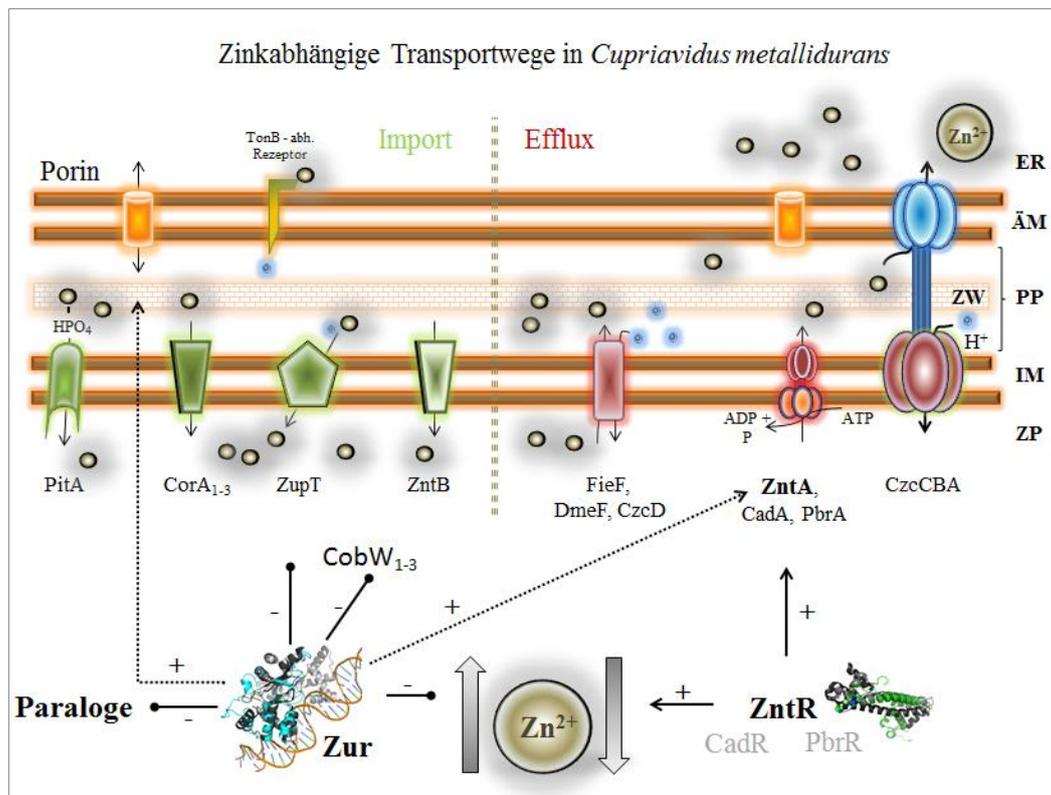


Abb. 32: Einflusses von Zur und ZntR auf die Zinkhomeostasis von *C. metallidurans*.

Expressionsanalysen der sekundären Transportsysteme zeigten für alle untersuchten Gene die Reprimierung durch Zink. Die verringerte Expression von *zntB* korreliert mit Herzbergs Feststellung (Herzberg *et al.* 2016). Allein *zupT* untersteht der Kontrolle des identifizierten Zinkaufnahmeregulators Zur. Weder die erhobenen Daten dieser Arbeit noch die Gene Array-Daten (Große 2014, unveröffentlicht) wiesen auf einen Einfluss von Zur auf die anderen Transporter des Imports hin. Gleichzeitig beeinflusst die Deletion des Repressors *zur* indirekt die zinkabhängige P_{IB2}-typ ATPase. ZntA selbst wird über den Aktivator ZntR, welcher durch *rmet3456* codiert ist, kontrolliert. Außerdem stehen die Transportkapazitäten von CadA, welche vermutlich durch CadR reguliert werden, in dem plasmidfreien Derivat von CH34 zur Verfügung. Ein indirekter Einfluss auf die äußere Membran als Resultat eines Ungleichgewichts zwischen Import oder Efflux wurde durch die erhöhte Expression von Porinen in Δzur unter Zinkstress gezeigt. Die durch Zur regulierte Beteiligung von CobW_{1,2,3} am intrazellulären Zn-Transport als Chaperon stellt ein realistisches Szenario ähnlich YciC aus *B. subtilis* dar. Bindungsfähigkeit zu Schwermetallen wurde für CobW_{1,3} bewiesen (L. Bauer 2013). Anhand der Regulation durch Zur kann ein Transport geringer Zinkaffinität ausgehend vom regulierten Transporter ZupT vermutet werden. Des Weiteren ist eine Umlagerung von essentiellm Zink durch Expression bzw. Reprimierung von alternativen zu

4. Diskussion

zinkhaltigen Enzymen unter der Kontrolle von Zur weit verbreitet. Das Zur-Regulon *C. metallidurans* umfasst diesbezüglich über die drei kontrollierten Promotoren sechs Gene.

Auf der Exportseite haben die Mitglieder der CDF-Familie (DmeF und FieF) neben den ATPasen durch ein breites aber divergentes Substratspektrum einen Anteil an der Detoxifizierung des Zytoplasmas. Dabei zeigte FieF neben anderen Kationen eine Spezifität für den Fe^{2+} -Efflux und DmeF sorgte unter anderem für das Co^{2+} - sowie das Ni^{2+} - und Cd^{2+} -Resistenzniveau des *Cupriavidus* –Wildtyps AE104 (Munkelt *et al.* 2004). Vertreter der ArsR/ SmtB-Familie wirken als Repressoren, die bei fehlender Metallbindung den Operator binden (Busenlehner *et al.* 2003). So kontrollieren Vertreter dieser Familie nicht nur den Transport des namensgebenden Arsenats ArsR (Liu *et al.* 2005), sondern auch Transportwege für Zn^{2+} und weiteren Metalle. In *B. subtilis* reguliert CzrA die P-Typ ATPase CadA und das CDF-Protein CzcD (Moore & Helmann 2005).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die zinkabhängige Regulation von Im- und Exportsystemen, die an der Stabilisierung der Zinkhomeostasis in *C. metallidurans* beteiligt sind, untersucht.

1. Zur, ein Vertreter der Fur-Familie, kontrolliert die Expression von *zupT*, dem wichtigsten Zink-Aufnahmesystem in *C. metallidurans*. Beweisführend waren hierfür: (i) Die konstitutive Expression von *zupT* in Δzur im Vergleich zu AE104 (nur unter metalllimitierenden Bedingungen) und der Komplementierung dieses Effektes durch *zur* in *trans*. Des Weiteren wurde (ii) die Promotorregion von *zupT* durch rekombinant synthetisiertes *Strep*-tag Zur in *in vitro*-Experimenten mit einer Affinität von ca. 52 ± 10 nM bei erhöhter Zinkkonzentration (100 μ M ZnCl₂) gebunden.
2. Eine 2. Regulationsebene zeigte sich in Verbindung mit *furB*, da in der Doppelmutante $\Delta zur \Delta furB$ die Expression von *zupT* im Vergleich zu Δzur beeinflusst war. Auch sind die Gene um *furB* in Δzur (Gene-Array: Große & Nies, unveröffentlicht) verstärkt exprimiert.
3. Zum Zur-Regulon zählen neben *zupT* 6 Gene für Paraloge zinkhaltiger Enzyme sowie *cobW*_{1,2,3}, die für mögliche Zinkchaperone codieren. Dies wurde durch (i) Expressionsanalysen sowie anhand der Interaktion (ii) von *Strep*-tag Zur mit dem bestätigten Zur-Bindemotiv in den Promotoren *zurp*, *cobW*_{1p} und *cobW*_{3p} bestimmt. Eine Beteiligung der Chaperone am Zinktransportweg über ZupT wurde postuliert.
4. Erste Anhaltspunkte für eine Autoregulation von *zur* wurden durch Promotorreporterfusionen gewonnen.
5. Das Gen *rmet3456* codiert für ZntR, dem Regulator der zinkinduzierten Efflux - ATPase ZntA. Die Deletion erzeugte eine (i) 2fach gesteigerte Akkumulation an intrazellulärem Zink, (ii) keine Expression von *zntA* und eine gesteigerte von *cadA*. Durch *rmet3456* (*trans*) wurde die Zinkinduzierbarkeit von *zntA* wiederhergestellt. *In vitro*-Experimente (iii) zeigten die Bindung des Promotors von *zntA* jedoch nicht von *cadA*.

6. Ausblick

Aufbauend auf diese Arbeit sollten eine weitere Untersuchung des *zinc uptake regulators* von *C. metallidurans* erfolgen. Zum einen ist die massenspektrometrische Untersuchung der beiden Zur-Varianten hinsichtlich ihrer Kofaktorbindung ratsam. Des Weiteren könnte eine rekombinante Expression in einem weiteren System zur Vermeidung der beiden Varianten führen. So kann die postulierte Ursache für die beobachteten Formen, das strukturelle Zink, bestätigt bzw. widerlegt werden.

An dieser Stelle sollte weiterhin die Funktion der CobW-Chaperone erforscht werden. Dies berührt vielleicht unter anderem den Einbau des strukturellen Kofaktors in Zur, der in anderen Veröffentlichungen stark gebunden wird und nur durch hohe Konzentrationen an EDTA (> 10 mM) herausgelöst werden konnte. Neben der Regulation von *cobW*₁ durch Zur wäre eine weitere Verbindung auf Proteinebene die Lösung der Zur-Varianten-Problematik. Die Co-Synthese des benötigten Chaperon sollte den Einbau des Kofaktors fördern und die postulierte unterschiedliche Zinkbindung positiv beeinflussen.

Außerdem erweitert eine Analyse essentieller Aminosäuren der Zn-Koordination, der Interaktion im Dimer und mit der DNA in diesem Regulator das Verständnis über dessen Funktionsweise. Dies kann über einen Austausch der Aminosäure E102, H103, E104, C127, H111, H114, H116, H147 sowie H55 und R75 (DNA-Interaktion), ähnlich in dieser Arbeit für C119, und die Charakterisierung der resultierenden Varianten realisiert werden.

Eine weitere Bestimmung der Affinitätskonstanten zu *zurp* und *cobW*_{3p} bestimmt die Wichtung der einzelnen Mitglieder des Regulons für Zur. Die bestätigten regulierten Promotoren ergaben eine stark konservierte Konsensussequenz. Laut Blaaby-Haas (2009) ist das Zur-Bindemotiv in Proteobacteria und speziell für die β -Klasse nicht so starr. *In vitro*-Untersuchungen mit Zur-Regionvarianten kann dieses Motiv lockern und den Blick für weitere Kandidaten frei machen. Dabei ist anzumerken, dass eine Untersuchung mit der Sequenz für β -Proteobacteria (FITBAR: Oberto 2010) keine weiteren Kandidaten erbrachte.

Zuletzt kann über hochauflösende EMSA Experimente betreffend des freien Zinks Zur *C. metallidurans* mit seiner Affinität eine erweiterte Sicht auf den freien Zinkpool in *C. metallidurans* und im Vergleich zu anderen Organismen gegeben werden. Dabei muss

6. Ausblick

zuvor die Problematik der Zur-Varianten gelöst bzw. eingebunden werden. Die Untersuchung der regulatorischen Überschneidung zwischen den Fur-Regulatoren ist ein weiteres Feld, bei dem der Einfluss auf die Eisenhomeostasis und den oxidativen Stress bewertet werden muss. Ein Indiz ist hier die verstärkte Expression der Gene in der Nachbarschaft von *furB*. An dieser Stelle sollte auch die Regulation der Alkoholdehydrogenasen, die nicht über Zur reguliert werden, im Fokus stehen. Durch die Identifikation des Fur-Bindemotivs kann eine überlappende Regulation zwischen FurA und FurB und eine Abgrenzung zu Zur bestimmt werden.

Des Weiteren codiert CH34 für 6 Regulatoren der ArsR/SmtB-Familie. Diese zählen zu der Subgruppe, die im Gegensatz zu ZiaR *Synechocystis* ihren Metallkofaktoren über das C-terminale $5\alpha/5\alpha\text{N}$ -Koordinationszentrum über eine $(\text{N/O})_4$ -Umgebung, ähnlich dem CzrA aus *S. aureus* (Busenlehner *et al.* 2003), binden. Dabei ähnelt das $\text{E}_\text{G}\text{H-X}_8\text{-E}_{\text{TMKK}}\text{E}$ von Rmet1799 dem $\text{D}_\text{I}\text{H-X}_8\text{-H}_{\text{HAN}}\text{H}$ -Motiv des Zn/Co-sensierenden Regulators, der das CDF-Protein CzrB (Kuroda *et al.* 1999) reguliert.

7. Anhang

7. Anhang

Tabelle 17: Verwendete Primer und deren Sequenz

Primer-Name	Sequenz 5' → 3'	Anmerkung
<i>cre-lox</i> Primer		
furI_AgeI furI_ApaI	AAA <u>ACCGGTGCTGACCAAGGACATGGCCTG</u> AAAGGGCCCCCGCTGCGGTACCCGC	3'-liegender Bereich von <i>furA</i> (337 bp)
furI_NcoI Rme2976 _{Not 480}	AAACCATGGATCCGATACGGCGTGATG AAAGCGGCCCGCGGGCGTGACTCCCTAGAGTAC	5'-liegender Bereich von <i>furA</i> (324 bp)
furII_AgeI Rme5746 _{Apa 975}	AAA <u>ACCGGTTATGTAGGCGGGTGGTGGG</u> AAAGGGCCCCACCCCGGATGTTGCTTACAG	3'-liegender Bereich von <i>furB</i>
furII_NcoI Rme5746 _{Not 482}	AAACCATGGCCGGAACCGGACGGTACAAGT AAAGCGGCCCGCGCGGATCTCACCCGCGGG	5'-liegender Bereich von <i>furB</i>
CS01- furIII_EF_AgeI CS02- furIII_ER_ApaI	AAA <u>ACCGGTCCACGCCCGTGGTTTCGA</u> AAAGGGCCCCACATCCAGACACCTTTAGA	3'-liegender Bereichs von <i>zur</i> (360 bp)
furIII_NcoI furIII_NotI	AAACCATGGATCAGGTGGCTTTGCGGA AAAGCGGCCCGCGCGAAGGATTTAACCATAGGC	5'-liegender Bereich von <i>zur</i> (276 bp)
Rm3456_AgeI Rm3456_ApaI	AAA <u>ACCGGTCTTCTGCTGGTTCAGGAAGGG</u> AAAGGGCCCCGGATGCAGCGGGACGGCATC	3'-liegender Bereich von <i>rmet3456</i>
Rm3456_NcoI Rm3456_NotI	AAA <u>CCATGGCGAGCGCGTGCTTTACGATG</u> AAAGCGGCCCGCGATGCCAGATCCCTGTAG	5'-liegender Bereich von <i>rmet3456</i>
Rm3456_uu Rm3456_oo	GTGACGTCGAGTTCGGTCAG GTCACAAGTAGTCCGGTGAG	Test <i>rmet3456</i> - Region
CS06-Rmet2302 _NotI CS07-Rmet2302 _NcoI	AAAGCGGCCCGCGGTTGCTTCCTATAAAAACTTG AAACCATGGCAACAAACGCTGCGGAAGAT	5'-liegender Bereich von <i>rmet2302</i>
CS04-Rmet2302 _AgeI CS05-Rmet2302 _ApaI	AAA <u>ACCGGTCGCATTCTTGCGGAGTCGG</u> AAAGGGCCCAGCTCGAGCGTGTCATCGG	3'-liegender Bereich von <i>rmet2302</i>
Expressions-Primer		
CS12- oexp_Rmet2976_f CS13- oexp_Rmet2976_r	AAAGAATTCCCGAGTCCGGCGGACCTCAA AAAGTCGACTCGTCTCGGTCTGTGGGGGC	Sequenz von <i>furA</i> ohne Start- und Stopcodon
CS17- Rmet_5746-f _{EcoRI} CS19- Rmet_5746-r _{PstI}	AAAGAATTCACCTCCAACGTGAATGCCGATG AAACTGCAGGCGCGCCGCGTTCGACGTCTGC	Sequenz von <i>furB</i> ohne Start- und Stopcodon

7. Anhang

Primer-Name	Sequenz 5' → 3'	Anmerkung
CS14- oexp_Rmet0128_f CS15- oexp_Rmet0128_r	AAAGAATTCACACGCACCACCCACATGCG AAAGTCGACGTGCGCGGATGCGTCGCCG	Sequenz von <i>zur</i> ohne Start- und Stopcodon
Rmet3456 EcoRI Rmet3456 SalI	AAAGAATTC GAGGCACTGACCATGCGTATCG AAAGTCGAC GTGTCGTGGGTGGCACTCGC	Sequenz von <i>rmet3456</i> ohne Start- und Stopcodon
Zur C118S fw Zur C118S rev	CCACTTTCACCTCCACACGCTGTGATCGTACG CAGCGTGTGGAGTGAAAGTGGCTATGCTG	Austausch C119S in Zur <i>c.met.</i>
Zur C121S fw Zur C121S rev	CACACGCTCCGATCGTACGTTTTGCCTAGAG CGTACGATCGGAGCGTGTGCAGTGAAAATGG	Austausch C119S in Zur <i>c.met.</i>
StrepLinker <i>ApaI</i> rm0128 <i>HindIII</i> Stop rme0128- <i>ApaI</i> Streptag <i>HindIII</i>	AAAGGGCCCCGATGGCTAGCTGGAGCCACCCGC GGGAAGCTTTTCAGTGCGCGGATGCGTCGCCG AAAGGGCCCTACACGCACCACCCAC GGGAAGCTTTTTCGAACTGCGGGTGGC	Klonierung von <i>strep</i> -tag- <i>zur</i> bzw. <i>zur</i> - <i>strep</i> -tag über <i>ApaI</i> , <i>HindIII</i> .
rm3456 <i>Stop-HindIII</i> rm3456 <i>Start-ApaI</i>	GGGAAGCTT CTAGTGTCGTGGGTGGCACTC AAAGGGCCC TGAGGCACTGACCATGCG	Klonierung von <i>rmet3456</i> mit Stopcodon in pBBR 1 MCS3

lacZ-Primer

rmet0129 <i>lacZ</i> PstI rmet0129 <i>lacZ</i> XbaI	AAACTGCAG CTTCATCGACAAGCTGCTGG AAATCTAGA CTAACGGAAGAATTCGAGC	3' Ende von <i>rmet0129</i>
rm0545_XbaI rm0545_PstI	AAATCTAGA GCGCGGCAGATTGGC AAACTGCAG CGGATGCGAGGATCGAACTG	3' Ende von <i>rmet0545</i>
rm1569_XbaI rm1569_PstI	AAATCTAGA ATCAATAGTCCGCCAGATGC AAACTGCAG GAGGTCACGCTGCTGCC	3' Ende von <i>rmet1569</i>
rm3880_XbaI rm3880_PstI	AAATCTAGA CCCATGCGTTCAGCGAGC AAACTGCAG GCGATGGGCGGTGC	3' Ende von <i>rmet3880</i>
rm4281_XbaI rm4281_PstI	AAATCTAGA AACGCTTATGGAGCGCTG AAACTGCAG CCGGCGCAGTCACTCGAC	3' Ende von <i>rmet4281</i>
rm1102_XbaI rm1102_PstI	AAATCTAGA CGTGGGAGCAACTGACATG AAACTGCAG CGGCAATGGGGTGTATTATCG	3' Ende von <i>rmet1102</i>
rme1298 <i>lacZ</i> PstI rme1298 <i>lacZ</i> XbaI	AAACTGCAGCAAGGGCTACTGCCTCTAC AAATCTAGACTTGTTCCCTCGGTGCTGTCAG	3' Ende von <i>rmet1298</i>
CS24-ZntA_XbaI CS25-ZntA_PstI	AAATCTAGACTCAGCCACAGGCCGTCAAAC AAACATATGGACCGATCAGGCGCACACCC	3' Ende von <i>zntA</i>
CS28-CadA _XbaI CS29-CadA_PstI	AAATCTAGACATTGTTTCATGCCGCCTTGAAC AAACATATGCTCAAGACCATCGAAAGCCTG	3' Ende von <i>cadA</i>
PitA Rm 5' PstI PitA Rm 3' XbaI	AAACTGCAGGTTTCGGTTGGCGGATTGT AAATCTAGACCTGGCTTGTTCATTGGGATTC	3' Ende von <i>pitA</i>
ZupT Rm 5' PstI ZupT Rm 3' XbaI	AAACTGCAGCCGCACACGAAATCCCGCAGG AAATCTAGAAGTCGCCACCGGCAGCTAAGC	3' Ende von <i>zupTp</i>
CorAI Rm PstI	AAACTGCAGCGAACAGCAGGACGAAGCG	3' Ende von <i>corA₁</i>

7. Anhang

Primer-Name	Sequenz 5' → 3'	Anmerkung
CorAI Rm XbaI	AAATCTAGAGGGGACCAGGAAGGCTATCAG	
CorAII Rm PstI	AAAGCATG C CCTGCGCAACGTGGTCTATCC	3' Ende von <i>corA</i> ₂
CorAII Rm XbaI	AAATCTAGAG C GAAACCGTCAGATCCAGCCC	
CorAIII Rm PstI	AAACTGCAGCGCCGAAGATGCCGAAGGTAT	3' Ende von <i>corA</i> ₃
CorAIII Rm XbaI	AAATCTAGAGTCCGCGTCCTAGCGATCCAG	
1750 Rm CDF2	ACCTCTAGAGCGAGCTACGCTGAGCGGC	3' Ende von <i>fieF</i>
1415 Rm CDF2	GGCCTGCAGGGTTCGGCTTGATGGTGTCGC	
2872 Rm CDF1	CGGCTGCAGGGCGCCAGAGCGGGACGGT	3' Ende von <i>dmeF</i>
3171 Rm CDF1	GTTTCTAGACTAGTGACGGTGGCCGCGAT	
Rm 3234 <i>lacZ</i> XbaI	GGGTCTAGAGTCAAATTAGA A ACTTGTGGCGCAG	3' Ende von <i>ompC</i>
Rm 3234 <i>lacZ</i> PstI	GGGCTGCAGGGTGGTGTGAACACCGTTG	
Rm 0549 <i>lacZ</i> SalI	AAAGTCGACGAAGAGTTCTCGCTGGTGCT	3' Ende von
Rm 0549 <i>lacZ</i> XbaI	AAATCTAGATGAATCGACTGCCAGCCTAC	<i>rmet0549</i>
Promotor-Primer		
<i>furCp1</i> XbaI_II <i>furCp3</i> SacII_II	AAATCTAGA CATGCGAAGGATTTAACCATAGGC AAACCGCGG CATGACTTTGTCTCCGGGCC	Promotor von <i>zur</i> mit SacII/ XbaI - Motiv
<i>furCp3</i> XbaI <i>furCp1</i> SacII_II	AAATCTAGA CATGACTTTGTCTCCGGGCC AAACCGCGG ATGGCGAAGGATTTAACCATAGGC	Promotor von <i>rmet 0129</i> mit SacII/ XbaI - Motiv
<i>rme5744p3</i> SacII (XbaI) <i>rmet5744p4</i> SacII_II	AAATCTAGA CATCCTTGTCTCCTGGTTGGC AAACCGCGG CACGCTGGTATTCCCCGG	Promotor von <i>rmet 5743</i> mit SacII/ XbaI - Motiv
<i>rmet5744p4</i> SacII (XbaI) <i>rmet5744p3</i> SacII_II	AAATCTAGA CACGCTGGTATTCCCCGG AAACCGCGG CATCCTTGTCTCCTGGTTGGC	Promotor von <i>rmet 5744</i> mit SacII/ XbaI - Motiv
EMSA-Primer		
cre 1098 MunI cre 1098 Not 2	AAACAATTGGTTACCCACTTCGGATACG AAAGCGGCCGCGGGGATTTGGTTTGCCCG	Stromaufwärts von <i>rmet1098</i>
cre <i>rme0125</i> Age cre <i>rme0125</i> Apa	AAAACCGGTTCGAATCCGGCGACTATGGCTG AAAGGGCCCGATGATCGATGTTGATGCAACAAA G	Promotor <i>rmet0125</i>
rm0545p1 rme0545p2	AGTACCCTTACGAGCATCGC CTTCAGTCCGGATACCTGCG	Promotor <i>rmet0545</i>
rme5744p1 rme5744p2	CCTGATGCCCCGTCTTTCATCC AGGTCTCGAACACCGAGGTAAC	Promotor <i>rmet5744</i>
rme1569p1 rme1569p2	GAGGGTGGGTTTGTGCATCGTGC GCTCCTTGGCTGTGAATACGG	Promotor <i>rmet1569</i>
ZupT 1 Nco_Alex ZupT 2 Not_Alex	AAACCATGGCGGTGCTGGGTCTGTATGGCG AAAGCGGCCGCGCACCCCGACTGAAAAGCTCA	Promotor <i>zupT</i>

7. Anhang

Primer-Name	Sequenz 5' → 3'	Anmerkung
ZupT_Box 1	ACGCAACAATGTTGCAAAAACGTG	partieller Promotorbereich von <i>zupT</i>
ZupT_Box 2	CAATGTTGCAAAAACGTGAAAGC	
ZupT_Box 3	AAACCGCGGGTGCAACATTGTTGCGTTAATCGG	
SacII		
ZupT_Box 4	AAACCGCGGGTTGCGTTAATCGGTGGCGC	
SacII		
ZupT_Box 5 XbaI	AAATCTAGACACCGATTAACGCAACAATGTTG	
ZupT_Box 6	AAACCGCGGGCGGACGTACGTACAATGCCGC	
SacII		
PzupT-2	GGTGTGCGTTAATCGGTGT	
PzupT-3	CGCCACAACGCAATTAGCCACAGATC	
cre 1098 MunI	AAACAATTGGTTACCCACTTCGGATACG	Stromaufwärts von <i>rmet1098 (cobW_I)</i>
cre 1098 Not2	AAAGCGGGCCGCGGGGATTTGGTTTGCCCG	
PcobW1-1	AAAGCTAGC CATGGGGATTTGGTTTGCCCGC	Varianten von <i>cobW_Ip</i>
PcobW1-2	AAACCGCGGG ACCGATCGCCCGCACTTGGG	
PcobW1-3	AAACCGCGGG ATGTTGCATTAACCGATCGCC	
PcobW1-4	AAACCGCGGG ATCTGTTTGCAACAATGTTGC	
PcobW1-5	AAACCGCGGG	
PcobW1-6	CAAGGTTGCATTTAAGATCTGTTTG	
PcobW1-7	AAACCGCGGG TGAAATGCAACAAGGTTGC	
PcobW1-8	CAGATCTTAAATGCAACCTTGTTGC	
CS06	AAAGCGGGCCGCGGTTGCTTCCTATAAAAACTTG	Promotor von <i>cadA</i>
Rmet2302_NotI		
CS07	AAACCATGGCAACAAACGCTGCGGAAGAT	
Rmet2302_NcoI		
znt691oo_NdeI	AAACATATGCGGGCTCGGCCAAGCTGT	Promotor von <i>zntA</i>
Rmet2302_XbaI	AAATCTAGACCCCGGATGCCATCATTAG	
znt649ou_MunI	AACAATTGGTCAAATTCATTGATTCTTGTTC	Promotor von <i>zntA</i>
znt649oo_NdeI	AAACATATGGAGCTTGGCCGATTTGCTGTC	

Prüf- u. Sequenzier-Primer

pASK u 292 up	CGGTAAACGGCAGACAAAAAAATG	Test pASK-IBA 3/ 7 ⁺
pASK fwd	AAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAATC	
pLO ₂ -lacZ-5519	GGCGAAAATCGTGTGTTGAGGC	Test pECD794-1
pLO ₂ -N	AACATCAAAGGCAAGAAAACATC	
T7 promoD	TAATACGACTCACTATAGG	Test pGemTeasy
pGem rev	ATATGGTCGACCTGCAGGCG	
AH33	TCGAATTTCTGCCATTCATCCGCT	Test pBBR1MCS2/3
AH35	GGCACCTCGCTAACGGATTC	
Kan 1909	CCTATGGAAGTGCCTCGGTGA	Test pECD1002
Kan 1362 up	GCATCGGGCTTCCCATACAAT	

7. Anhang

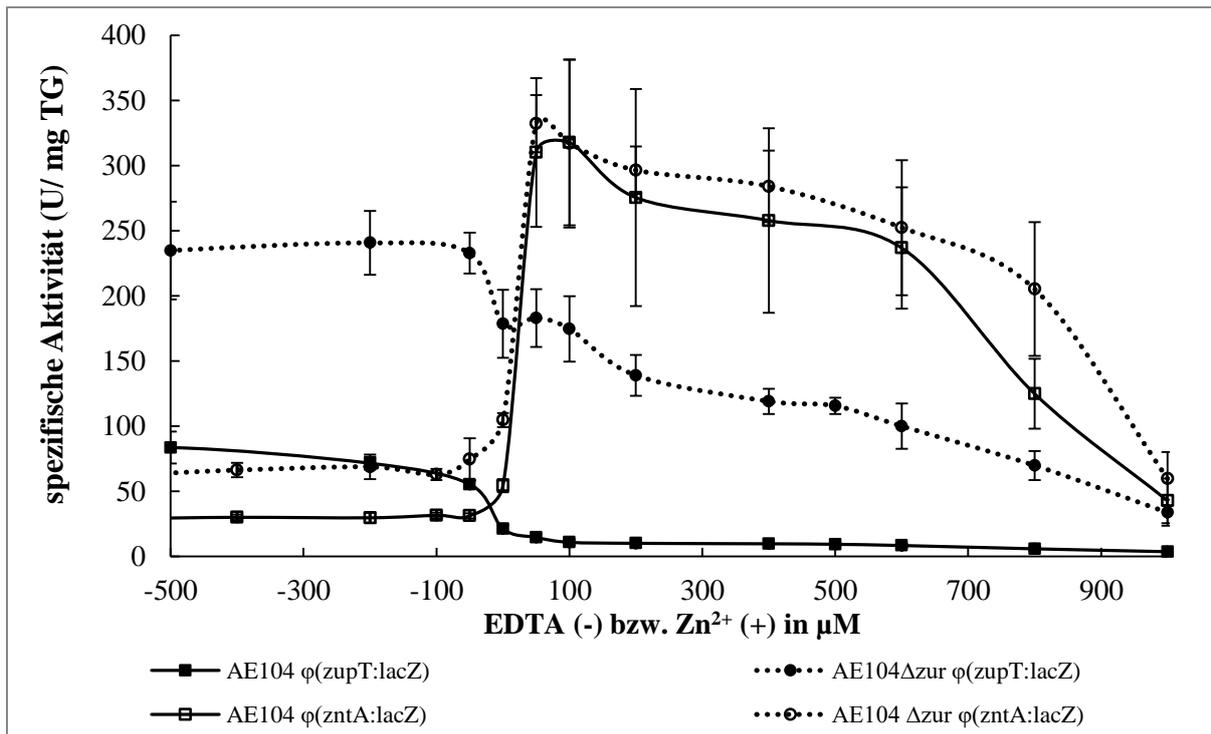


Abb. 33: Expressionsanalyse von *zntA* und *zupT* in Abhängigkeit zu freiem Zn²⁺. Datenerhebung erfolgte mittels der Reporterfusionen $\phi(zupT:lacZ)$ sowie $\phi(zntA:lacZ)$ im Stammhintergrund AE104 und Δzur und unter Zugabe von EDTA (negative) und ZnCl₂ (positive Werte) in die Hauptkultur nach deren Verdopplung. Jeder Messpunkt wurde mit $n \geq 3$ und einem technischen Replikat ermittelt.

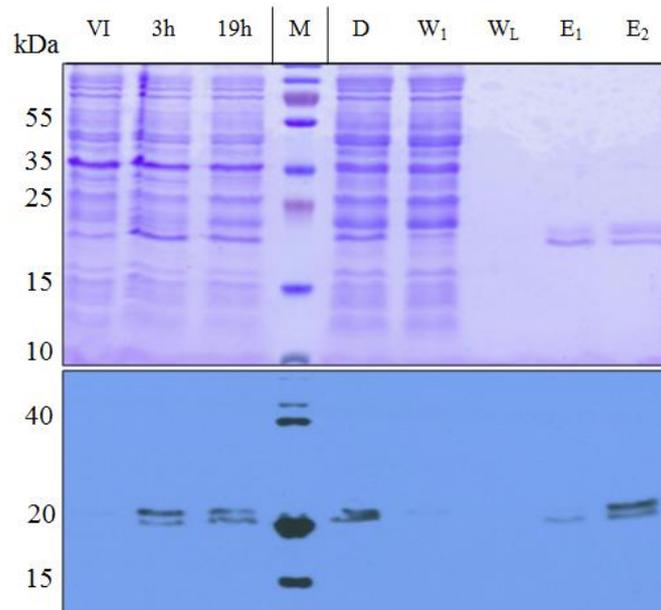


Abb. 34: Produktion von *Strep-tag Zur* in Minimalmedium (*E. coli*, ohne Fe-Citrat) bei 30 °C. BL21 pASK-IBA7⁺-*zur* wurde in Tris-MM für *E. coli* bis OD₆₀₀ = 0,5 angezogen, mit 0,1 µg/ml AHT induziert und für weitere 19 h bei 30 °C angezogen. Je 25 µg Protein entsprechendes Zellmaterial ganzer Zellen vor der Induktion (VI), nach 3h und 19h sowie 2 µg Protein einzelner Fraktionen der

7. Anhang

Reinigung über eine Streptactin-Säule (D: Durchfluss, W₁-W_L: 1. bzw. letzte Waschfraktion, E₁-E₂: Elutionsfraktionen) wurden über eine 12,5 %ige denaturierende PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Das Zielprotein wurde über eine *Strep*-tag Detektierung nachgewiesen. Des Weiteren wurden die Größenstandards (#26630) und (#26619) verwendet.

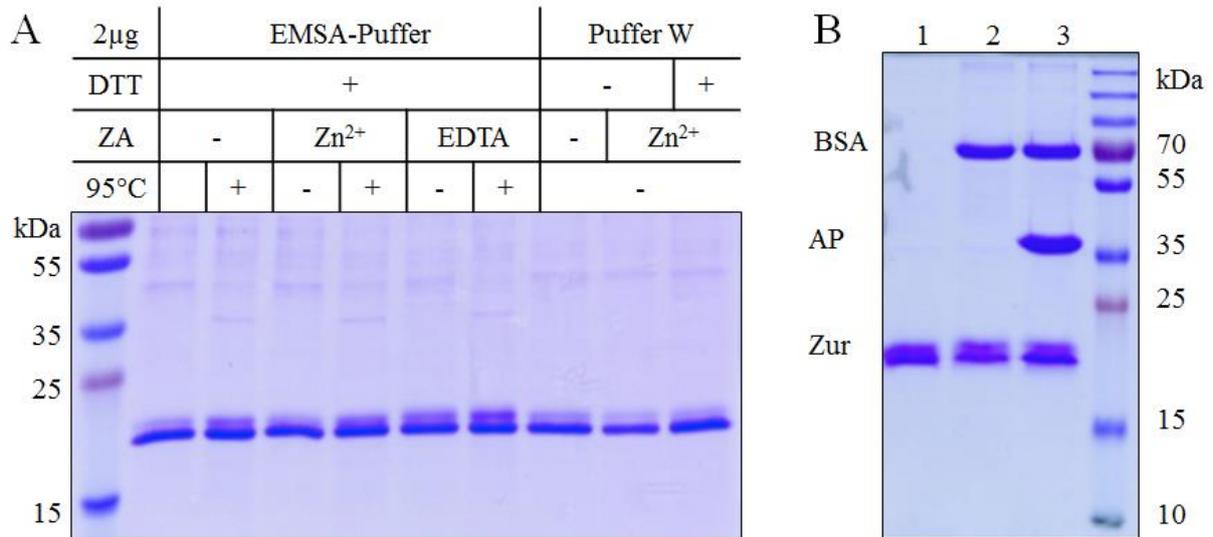


Abb. 35: Inkubations- (A) und Dephosphorylierungsexperiment (B) mit gereinigtem *Strep*-tag Zur für die Deutung der beiden Zur-Varianten. Gereinigtes *Strep*-tag Zur im EMSA-Reaktionspuffer bzw. Reinigungspuffer (Puffer W) wurden mit und ohne 1 mM DTT, 0,2 mM ZnCl₂ bzw. EDTA auf Eis über Nacht inkubiert. Je 2 µg nativ-belassene und eine denaturierte Proteinprobe (A: 95 °C/ 10 min) wurden aufgetrennt. Die Dephosphorylierung von 2 µg Protein erfolgte mit 4 U *fast* AP über 16 h (B). Als Kontrollen wurden unbehandeltes Protein (1) und ein Reaktionsansatz ohne alkalische Phosphatase mitgeführt. Über eine 12,5 %ige denaturierende PAGE wurden die Proteine aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Der Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (#26619) diente als Größenstandard.

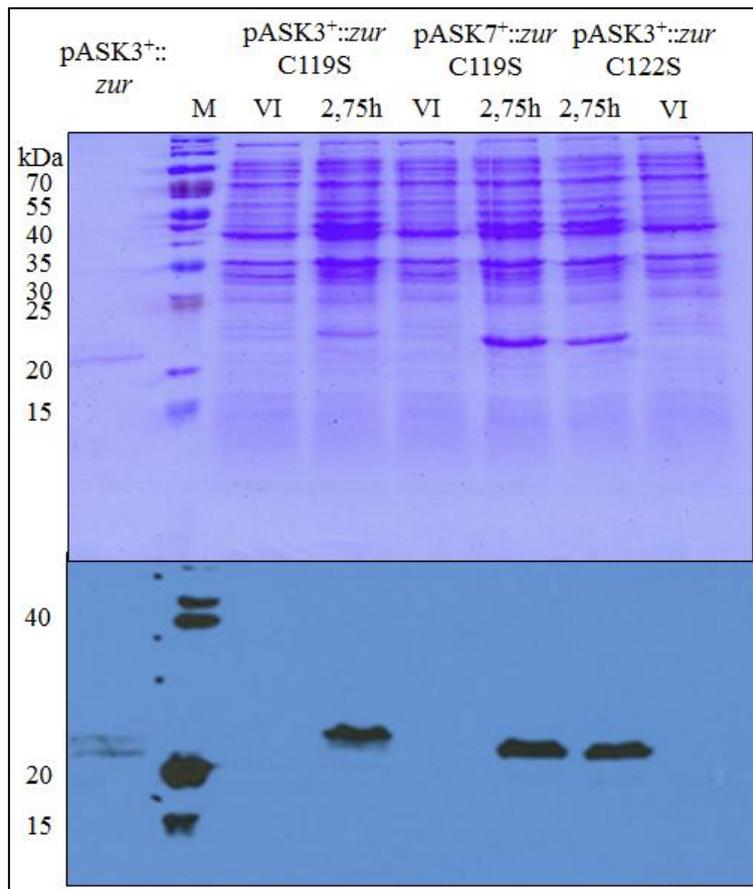


Abb. 36: Produktion von *Strep*-tag Zur mit C119S bzw. C122S- Aminosäureaustausch zeigte keine zwei Varianten. Expression von Zur C119S mit N- (pASK7⁺) bzw. C-Terminalen (pASK3⁺) *Strep*-tag sowie Zur-*Strep*-tag C122S in BL21-Zellen (LB, 37 °C). Aufgetragen sind 25 µg Zellmaterial auf einer 12,5 %igen denaturierenden PAGE mit den Größenstandards #26619 und 26630 (Thermo Scientific [USA]) sowie als Referenz Zur-*Strep*-tag (1 µg). Anfärbung von Protein mittels Coomassie und Detektierung des Zielproteins über den *Strep*-tag.

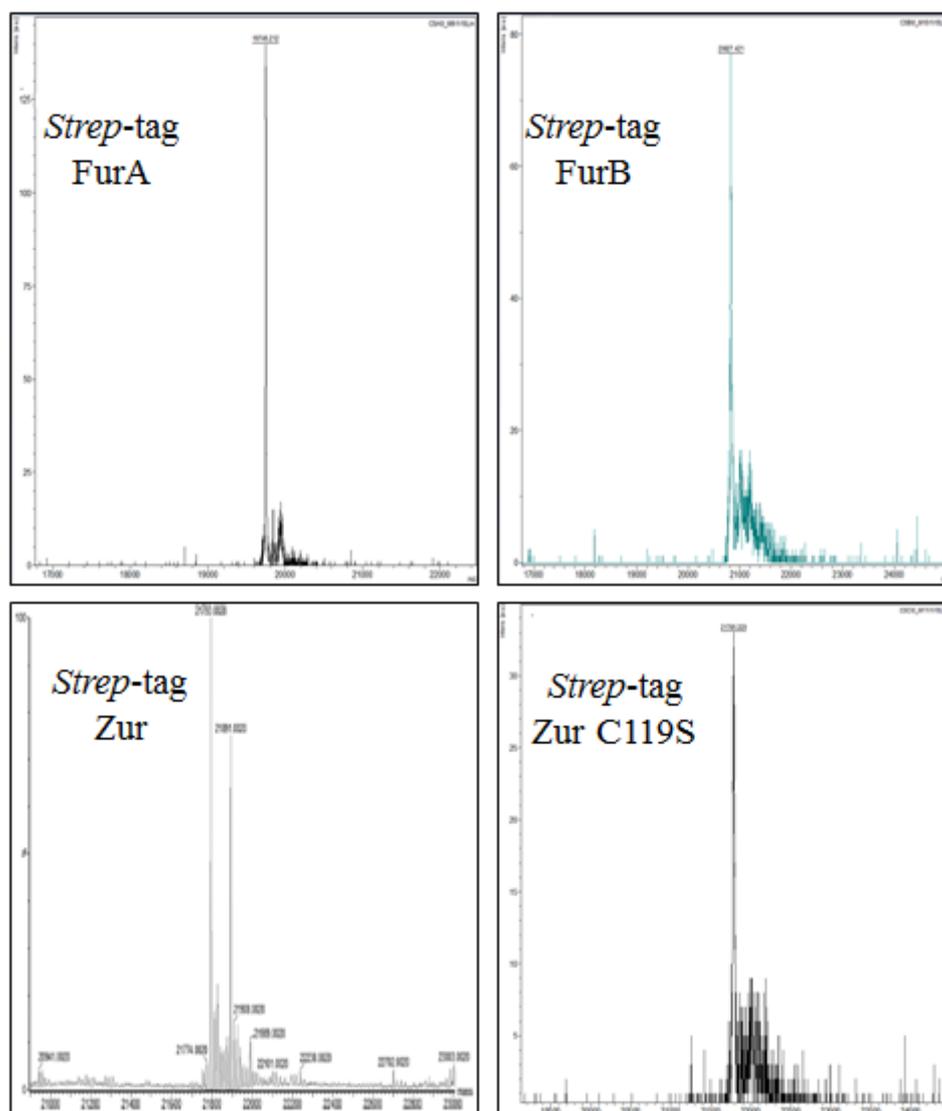


Abb. 37: Massenspektren der N-terminal markierten Varianten von FurA, FurB, Zur und der Variante Zur C119S. Frau Dr. Schierhorn analysierte die Proteinproben mit dem ESI-Q-TOF 2 mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Das Molekulargewicht für *Strep*-tag FurA (19,745 kDa), *Strep*-tag FurB (20,827 kDa), *Strep*-tag Zur (21,793/ 21,891 kDa) und *Strep*-tag Zur C₁₁₉S-Variante (21,785 kDa) wurden bestimmt.

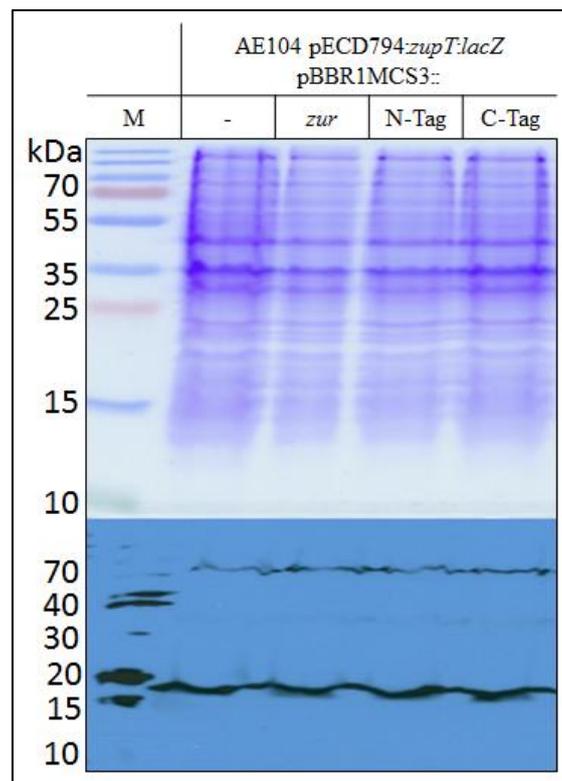


Abb. 38: Vergleich des Proteinmusters von AE104 pECD794:*zurT:lacZ* mit den Komplementationsvektoren pBBR1MCS3::*zur*, *strep-tag-zur* und *zur-strep-tag*. Jeweils 100 µg Zellen (TG) einer Vorkultur (ca. 300 KE) wurden denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine über eine 15 %ige denaturierende PAGE. Die Visualisierung der Proteine wurde mittels Coomassie-Färbung durchgeführt. Als Kontrollen wurden Zellmaterial eines Stammes mit Leervektor bzw. unmarkierter *Zur*-Variante sowie zwei Größenstandards (#26619/26630) mitgeführt. In allen Proben wurde über einen *Strep-tag*-Nachweis ein 17 kDa, 68 kDa und ein 39 kDa Protein detektiert.

7. Anhang

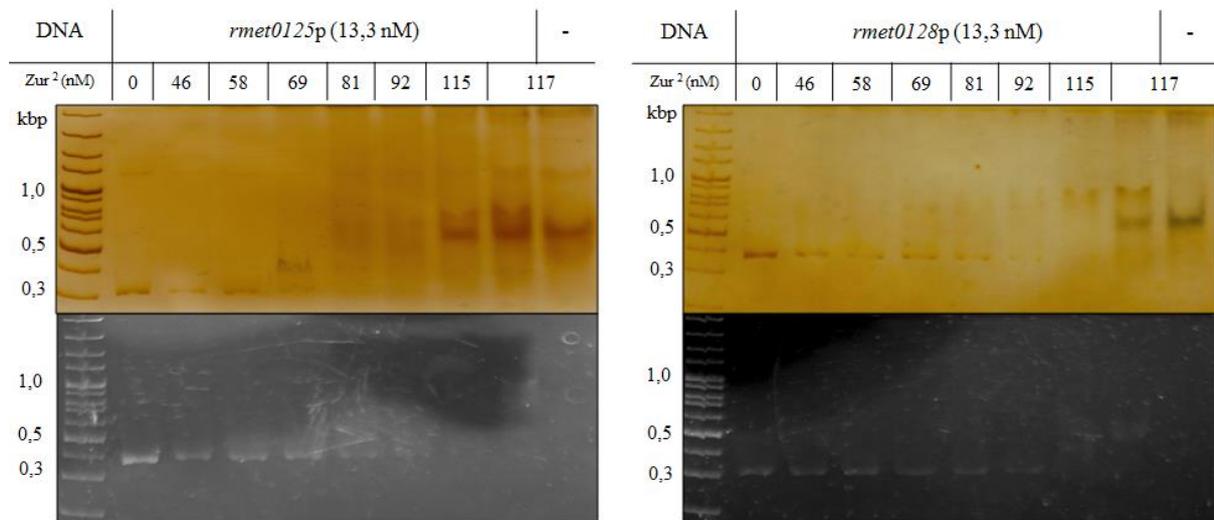


Abb. 41: Interaktionsstudie von *Strep*-tag Zur-Dimeren gegen die Promotorregion von *cobW*₃ (*rmet0125*, 295 bp) und *zur* (*rmet0128*, 295 bp). EMSA-Reaktionen wurden nach der Inkubation (30 °C/ 30 min, 100 µM ZnCl₂) über eine 10 %ige Nativ-PAGE aufgetrennt und deren Bestandteile über eine Midori Green- bzw. Silberfärbung visualisiert. Ab 90 bzw. 100 nM *Strep*-tag Zur-Dimer (Korrekturfaktor: 0,345) wurden ca. 100 % der vorgelegten DNA (13,3 nM) retardiert.

Tabelle 18: Involvierung der Gene mit möglichem Zur-Bindemotiv am Zur-Regulon anhand EMSA-Experimenten sowie deren Expressionsmuster. Für die Analyse der Genexpression erfolgte die Transformation mit pECD794-1 basierenden Plasmiden im Stammhintergrund AE104, $\Delta furA$, B und Δzur . PCR geprüfte Stämme wurden auf MM_{X-Gal} (s) mit und ohne 0,2 mM EDTA gepickt. Nach einer Kultivierung bei 30 °C für 5 Tage erfolgte die Bestimmung der Blaufärbung nach einer Skala von 0 (weiß) bis 5 (tief blau). Als Kontrolle wurde die Expression von $\phi(lacZ::zurT)$ in AE104 mit 3 und Δzur mit 5 auf MM bewertet. Der EMSA zwischen 13,3 nM Promotorregion und 1,3 µM *Strep*-tag Zur erfolgte unter Standardbedingungen mit 100 µM ZnCl₂. Über eine 10 %ige Nativ-PAGE fand die Auftrennung statt und per Silberfärbung wurde die DNA visualisiert.

<i>rmet</i>	Vektor	WT	$\Delta furA$	$\Delta furB$	Δzur	WT	$\Delta furA$	$\Delta furB$	Δzur	EMSA
0545	pECD1446	3	1	1	1	2	1	1	1	X
1102	pECD1444	0	0	0	5	5	5	5	5	<i>cobW</i> _{IP}
1569	pECD1445	1	1	1	1	1	1	1	1	X
3880	pECD1451	1	1	1	1	1	1	1	1	X
4281	pECD1450	0	0	0	0	0	0	0	0	X
5747	pECD1209	0	1	0	0	0	1	0	1	X
		MM _{X-Gal} , kan				+ 0,2 mM EDTA				

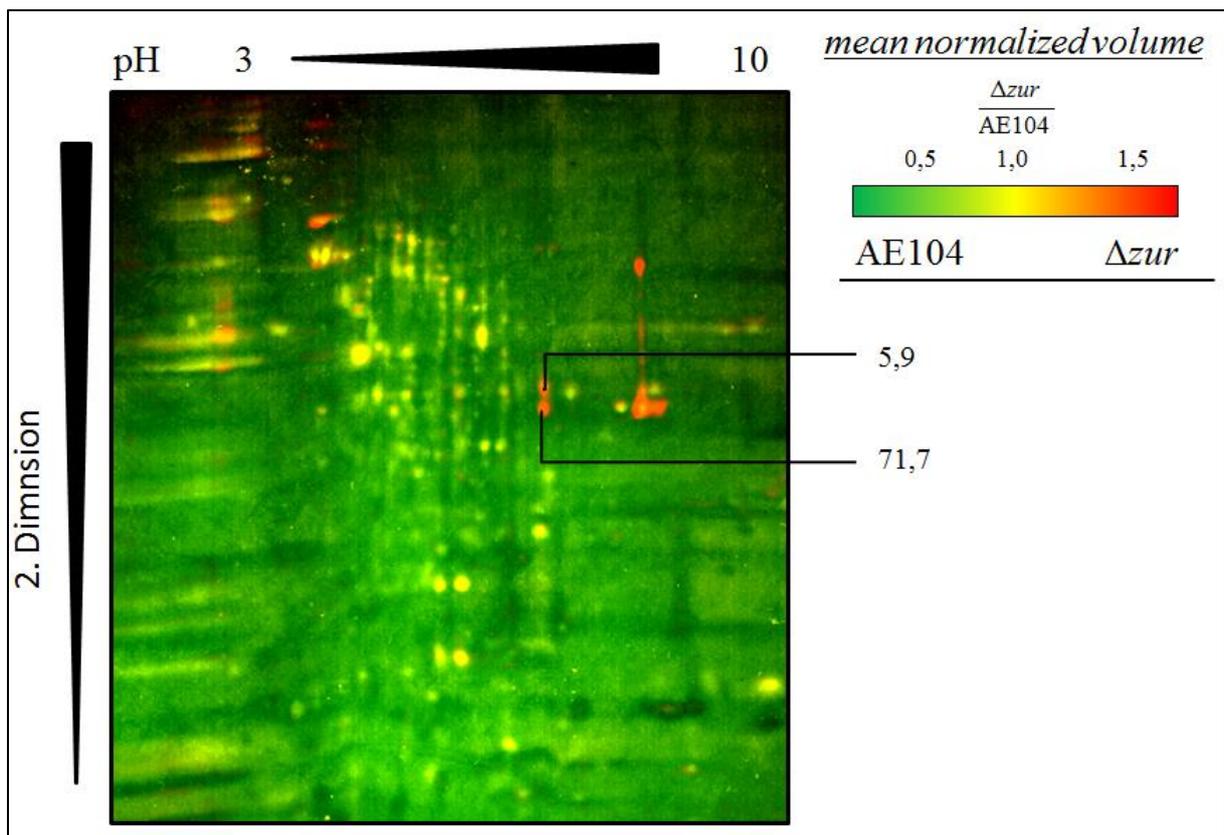


Abb. 42: Vergleich des Proteoms der zytoplasmatischen Fraktion von AE104 und Δzur . Dargestellt ist die Überlagerung zweier 2D-Gele á 300 μg Rohextrakt von AE104 und Δzur über die Software Decodon Delta 2D. Zellen wurden in Tris-MM von einer Vor- zur 200 ml Hauptkultur (+ 25 μM ZnCl_2) mit $\text{OD}_{600} = 0,8$ angezogen. Die Proteine wurden nach einer TCA-basierten Reinigung über einen nicht linearen IEF-Streifen 3-10 nach ihrem isoelektrischen Punkt (1D) und nachfolgend nach ihrer Größe (2D) aufgetrennt. Erhöhtes Vorkommen an Protein in der Probe der Mutante wurde rot dargestellt.

7. Anhang

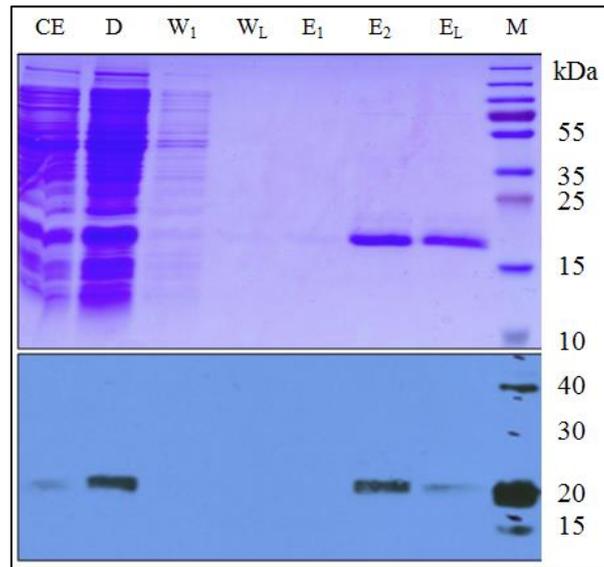


Abb. 43: Reinigung von Strep-tag Rmet3456. Expression in BL21 pASK-IBA7⁺-*rmet3456* in LB mit 0,2 µg/ ml AHT bei 37 °C. Isolation aus dem Rohextrakt (CE) über eine Streptactin-Säule. Über eine 12,5 %ige denaturierende PAGE wurden zu je 25 µg Protein der Rohextrakt, der Durchfluss (D) sowie die 1. Waschfraktion (W₁) und zu 20 µl die letzte und die Elutionsfraktionen (E) aufgetrennt. Es folgte eine Coomassie-Färbung und eine Strep-tag Detektierung.

Tabelle 19: Vergleich der möglichen Metallbindung über Cysteine und Histidine. Aufgetragen wurde das Verhältnis der enthaltenen Cysteine und Histidine zwischen Fur und Zur ausgewählter grampositiver und gramnegativer Bakterien.

Phylum	Stamm	Cysteine	Histidine
Aktinomycetes	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	6/5	6/8
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6/5	8/10
Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	4/7	9/6
	<i>Listeria monocytogenes</i> (Dalet, 1999; Rea, 2014)	4/6	7/8
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4/6	7/8
Proteobacteria			
α	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1/7	6/7
	<i>Caulobacter crescentus</i>	1/8	11/7
β	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	FurA: 4 FurB: 4 Zur: 6	7 8 11
	<i>Neisseria meningitidis</i>	4/7	9/10
	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	1/5	7/5
γ	<i>Escherichia coli</i>	4/9	12/9
	<i>Salmonella enterica</i>	4/9	12/9
	<i>Yersinia pestis</i>	5/8	11/9
	<i>Xanthomonas campestris</i>	0/7	12/11
δ	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	4,5,4/6	10,10,5/7

7. Anhang

Tabelle 20: Gene-Array-Daten ausgewählter Primär- und Sekundärtransporter in *C. metallidurans* (AE104) und der Deletionsmutante Δ_{zur} in Tris-MM und bei Zusatz von 100 μM ZnCl_2 (Gene Array 2014: Grosse & Nies, unveröffentlicht). Datenerhebung erfolgte zwischen AE104 und der in dieser Arbeit erstellten Δ_{zur} -Mutante in Tris- gepuffertem Minimalmedium bzw. unter Einfluss von zusätzlichem ZnCl_2 durch Frau Dr. Große und Mitarbeiter (unveröffentlicht). Die Hauptkultur wurde mit Zellen in der frühen stationären Phase inokuliert und bis 100 Klett ($\text{OD}_{600} = 0,5$) bei 30 °C kultiviert und anschließend für 10 min mit und ohne 100 μM ZnCl_2 induziert. Nach der Ernte wurden die Aktivitäten der Zellen mittels N_2 gestoppt. Die Daten beruhen auf drei biologischen Replikaten. AE104 \pm Zn bzw. $\Delta_{zur} \pm$ Zn vergleichen die Daten zwischen der Kultivierung mit und ohne Zink, $0 \pm zur$ zwischen der Mutante und AE104 in Tris – MM bzw. durch Zn $\pm zur$ in der Präsenz von 100 μM ZnCl_2 in der Hauptkultur. Werte kleiner 0,6 (kursiv und grau) zeugen von einer verringerten und Werte über 1,5 (fett) von einer gesteigerten Expression. Zum Vergleich wurden die bestimmten Aktivitäten der Reporterfusionen (ϕ_{lacZ}) dieser Arbeit angegeben.

<i>rmet</i>	Protein	AE104 \pm Zn*	$\Delta_{zur}\pm$ Zn*	0 \pm zur*	Zn \pm zur*	ϕ_{lacZ} - MM
2621	ZupT	1,01	0,92	3,78	3,73	12,49
1973	PitA	0,79	0,79	0,97	1,53	1,09
0036	CorA1	0,96	1,22	0,81	0,84	0,90
3052	CorA2	0,54	0,72	0,65	1,21	1,20
3287	CorA3	0,99	1,16	0,84	0,84	1,08
2211	MgtA	1,28	1,50	0,96	0,75	-
5396	MgtB	1,10	1,12	1,02	0,93	-
0549	ZntB	0,77	0,88	0,88	1,14	0,98
2303	CadA	18,85	6,46	1,08	0,06	0,98
4594	ZntA	15,61	9,27	1,44	0,09	2,47
3406	FieF	1,01	1,29	0,81	0,81	-
0198	DmeF	1,38	1,46	0,85	0,62	-

* Signifikante Effekte sind dick gedruckt. Gezeigt wurde das Verhältnis zwischen Δ_{zur} gegen AE104.

7. Anhang

Tabelle 21: Gene Array - Daten betroffener Gene für Porine und OMF – Proteine, deren Genexpression durch die Deletion von *zur* beeinflusst wurden. Die Daten beruhen auf drei biologischen Replikaten. AE104 ± Zn bzw. Δ*zur* ± Zn vergleichen die Ergebnisse zwischen der Kultivierung mit und ohne Zink, 0 ± *zur* zwischen der Mutante und AE104 in Tris – MM bzw. durch Zn ± *zur* in der Präsenz von 100 μM ZnCl₂ in der Hauptkultur. Werte kleiner 0,6 (kursiv und grau) zeugen von einer verringerten und Werte über 1,5 (fett) von einer gesteigerten Expression. Des Weiteren sind die theoretischen Molekulargewichte und die Aminosäureanzahl angegeben.

<i>rmet</i>	Protein	AE104 ± Zn	Δ <i>zur</i> ± Zn	0 ± <i>zur</i>	Zn ± <i>zur</i>	As	Mr (kDa)
1628	OmpC	0,26	0,26	0,99	3,75	354	37,79
3144	OmpC	0,07	0,08	0,83	13,35	362	38,56
3234	OmpC	0,55	0,55	1,07	3,28	401	41,95
4994	OmpC	0,16	0,15	0,96	5,95	381	40,57
5288	OMP	0,24	0,25	0,94	3,90	386	41,05
4596	CzcC2	6,01	4,46	1,08	0,18	431	45,77
4834	OmpP	2,08	2,28	0,88	0,42	353	36,25
5118	OmpC	1,11	2,09	0,53	0,48	355	37,81
5715	Porin/MFS	0,95	1,59	9,75	10,25	105	12,00

Tabelle 22: Einfluss der Deletion von *rmet2302* auf die Expression von *zntA* und *cadA*.

		β-Galaktosidaseaktivität (U/mg TG) unter den Bedingungen:						
Stamm	Bedingung	MM	200 μM Zn ²⁺	500 μM Zn ²⁺	200 μM EDTA	500 μM EDTA	200 μM Co ²⁺	200 μM Ni ²⁺
		<i>zntA-lacZ</i>						
AE104		38 ^{±5}	197^{±13}	189^{±19}	25 ^{±5}	25 ^{±6}	50 ^{±4}	45 ^{±3}
Δ <i>rmet2302</i> *		5 ^{±1}	28 ^{±1}	20 ^{±7}	3 ^{±0}	3 ^{±1}	10 ^{±3}	4 ^{±1}
<i>cadA-lacZ</i>								
AE104		17 ^{±2}	30^{±3}	29^{±1}	12 ^{±1}	12 ^{±1}	15 ^{±1}	35 ^{±8}
Δ <i>rmet2302</i> *		248^{±21}	122^{±15}	91^{±11}	232^{±8}	254^{±13}	249^{±18}	247^{±24}
+ pECD1002:: <i>rmet2302</i>		27 ^{±8}	51^{±3}	48^{±5}	20 ^{±3}	22 ^{±4}	20 ^{±3}	28 ^{±4}

Reportergenfusion erzeugt mittels pECD1333 bzw. pECD1334 von *zntA* bzw. *cadA*. Signifikante Unterschiede zu AE104, welche einen Faktor außerhalb des Bereiches $0,5 \geq X \geq 1,5$ aufweisen, sind grau hinterlegt. Eine gesteigerte (fett) und eine verringerte Expression (kursiv) gegenüber der Aktivität AE104 in Tris-MM wurden graphisch gekennzeichnet. Resultate für Δ*rmet2302** stammen aus der Bachelorarbeit von D. Kleemann (2013). Datenerhebung erfolgte für AE104 φ(*lacZ:cadA*) mit n = 3/2/2 und φ(*lacZ:zntA*) mit 4/3/4/4 inklusive eines technischen Replikats sowie der Komplementation von Δ*rmet2302* mit pECD1002::*rmet2302*.

7. Anhang

	 10 20 30 40 50
Zur	<i>E.coli</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>S.enterica</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>Y.pestis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>C.met</i>	MTRTT	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>C.cresc.</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Np20	<i>Paerog.</i>	MYKIA	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>XCV</i>	MTKHTHAPDL	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>E.coli</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>S.enterica</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>Y.pestis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
FurA	<i>C.met</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>N.meneng.</i>	-----	-----	-----	-----	-----
FurB	<i>C.met.</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>Paerog.</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>XCV</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>C.cresc.</i>	-----	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>N.meneng.</i>	-----	-----	-----	-----	-----
	 60 70 80 90 100
Zur	<i>E.coli</i>	LEVLRRLMSLQ	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>S.enterica</i>	LEVLRRLMSLQ	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>Y.pestis</i>	LEVLRRLMAQQ	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>C.met</i>	LAILACLIEA	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>C.cresc.</i>	RRVLELLLEA	-----	-----	-----	-----
Np20	<i>Paerog.</i>	RRVLELVNQS	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>XCV</i>	ANVLRRLIADA	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>E.coli</i>	LKILEVLQEP	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>S.enterica</i>	LKILEVLQEP	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>Y.pestis</i>	LKILEVLQNP	-----	-----	-----	-----
FurA	<i>C.met</i>	LKILELIFQTS	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>N.meneng.</i>	LKILDLFETH	-----	-----	-----	-----
FurB	<i>C.met.</i>	MHVLEVFRRAS	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>Paerog.</i>	VKILQMLDSA	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>XCV</i>	MRILELLEEQK	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>C.cresc.</i>	RVIARVLSA	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>N.meneng.</i>	EQVLDIVLQQ	-----	-----	-----	-----
	 110 120 130 140 150
Zur	<i>E.coli</i>	FVHKVESTNS	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>S.enterica</i>	FVHKVESTNS	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>Y.pestis</i>	FIHRVESANS	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>C.met</i>	LAQKRAGNDR	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>C.cresc.</i>	FAHRIESLNA	-----	-----	-----	-----
Np20	<i>Paerog.</i>	LVHRIASLNA	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>XCV</i>	FVHKLESVNA	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>E.coli</i>	IVTRHNFEGG	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>S.enterica</i>	IVTRHNFEGG	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>Y.pestis</i>	IVTRHNFEGG	-----	-----	-----	-----
FurA	<i>C.met</i>	LLSRNNFESG	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>N.meneng.</i>	ILQRHHFETG	-----	-----	-----	-----
FurB	<i>C.met.</i>	ILLRHSFESD	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>Paerog.</i>	LVVRHNFDDG	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>XCV</i>	LVLRHNFEGG	-----	-----	-----	-----
Fur	<i>C.cresc.</i>	IIERHDFRDG	-----	-----	-----	-----
Zur	<i>N.meneng.</i>	VLHKVAAVNG	-----	-----	-----	-----

7. Anhang

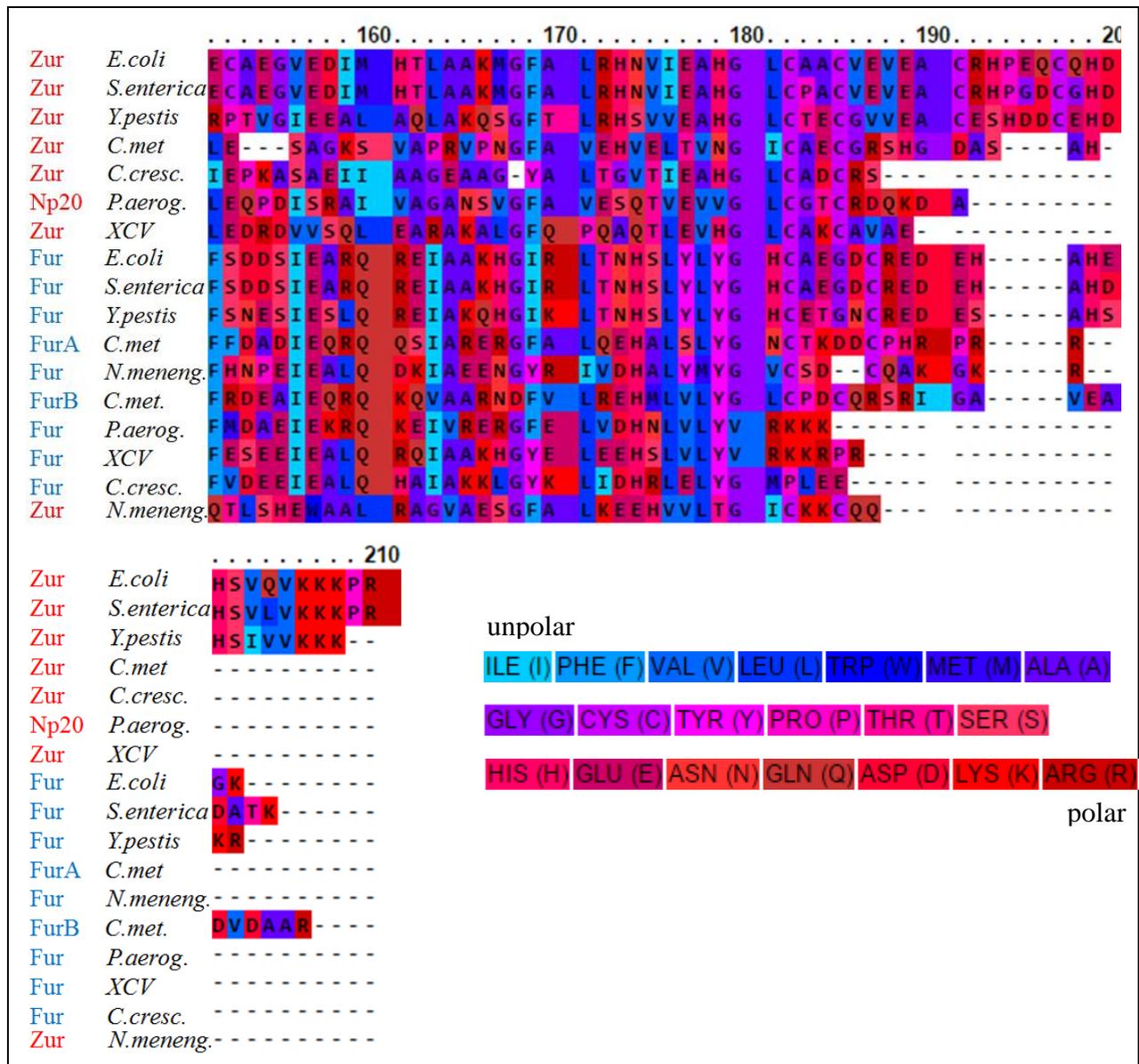


Abb. 44: Alignment der Proteinsequenzen des zinc bzw. ferric uptake regulator der gramnegativen Bakterien: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Caulobacter crecentus*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Neisseria meningitidis*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV) sowie von *C. metallidurans*. Sequenzalignment erfolgte über den PRALINE-Server (V A Simossis & Heringa 2003). Dargestellt ist das Alignment mit den polaren und unpolaren Aminosäuren.

8. Literaturverzeichnis

A.F. Wells (1984). Structural Inorganic Chemistry 5th ed., Clarendon Press, Oxford.

Ades, S. E., Grigorova, I.L. & Gross, C. A., 2003. Regulation of the alternative sigma factor sigma(E) during initiation, adaptation, and shutoff of the extracytoplasmic heat shock response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 185(8): 2512–9.

Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D. & Krishna, S. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *The Journal of experimental medicine*, 190(5): 717–724.

Ammendola, S., Pasquali, P., Pistoia, C., Petrucci, P., Petrarca, P., Rotilio, G. & Battistoni, A. (2007). High-Affinity Zn²⁺ Uptake System ZnuABC Is Required for Bacterial Zinc Homeostasis in Intracellular Environments and Contributes to the Virulence of *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 75(12): 5867–5876.

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research*, 5(1): 196–201.

Andrews, G.K. (2008). Regulation and function of Zip4, the *acrodermatitis enteropathica* gene. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 6): 1242–6.

Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C. J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C. & Nies, D. H. (2004). Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(22): 7499–7507.

Argüello, J. M., Eren, E. & González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals*, 20(3-4): 233–248.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*,

Bauer, L., (2013). Masterarbeit: Metall-Chaperone in *Cupriavidus metallidurans*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Benov, L. T., Beyer, W. F., Stevens, R. D., Fridovich, I. (1996). Purification and characterization of the Cu,Zn SOD from *Escherichia coli*. *Free radical biology & medicine*, 21(1): 117–21.

Benov, L. T. & Fridovich, I. (1994). *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 269(41): 25310–25314.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L. Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A. Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885): 141–7.

Bhatt, G. & Denny, T. P. (2004). *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *Journal of bacteriology*, 186(23): 7896–904.

8. Literaturverzeichnis

- Bhubhanil, S., Sittipo, P., Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R. & Mongkolsuk, S. (2014).** Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via *zur* and the zinc uptake genes *znuABC* and *zinT*. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 11): 2452–63.
- Bi, X., Feng, X., Yang, Y., Qiu, G., Li, G., Li, F., Liu, T., Fu, Z. & Jin, Z. (2006).** Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang County, western Guizhou, China. *Environment international*, 32(7): 883–90.
- Bialek, M. & Zyska, A. (2014).** The Biomedical Role of Zinc in the Functioning of the Human Organism. *Polish Journal of Public Health*, 124(3): 160–163.
- Blaby-Haas, C. E., Furman, R., Rodionov, D. A., Artsimovitch, I. & de Crécy-Lagard, V. (2011).** Role of a Zn-independent DksA in Zn homeostasis and stringent response. *Molecular microbiology*, 79(3): 700–15.
- Blaby-Haas, C. E., Flood, J. A., de Crécy-Lagard, V. & Zamble, D. B. (2012).** YeiR: a metal-binding GTPase from *Escherichia coli* involved in metal homeostasis. *Metallomics*, 4(5): 488.
- Blindauer, C. A. (2015).** Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 51(22): 4544–63.
- Bobrov, A. G., Kirillina, O., Fetherston, J. D., Miller, M. C., Burlison, J. A. & Perry, R. D. (2014).** The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. *Molecular Microbiology*, 93(4): 759–775.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248–54.
- Bradley, T.M., Hidalgo, E., Leautaud, V., Ding, H. & Demple, B. (1997).** Cysteine-to-alanine replacements in the *Escherichia coli* SoxR protein and the role of the [2Fe-2S] centers in transcriptional activation. *Nucleic acids research*, 25(8): 1469–75.
- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J. & Morby, A. P. (1999).** ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31(3): 893–902.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003).** The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3): 145–163.
- Bullock, W. O. (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques*, 5: 376–379.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2003).** The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3): 131–143.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. & Mondragón, A. (2003).** Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5638): 1383–7.
- Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R. & Mongkolsuk, S. (2015).** Roles of *Agrobacterium tumefaciens* C58 ZntA and ZntB and the transcriptional regulator ZntR in controlling

8. Literaturverzeichnis

Cd²⁺/Zn²⁺/Co²⁺ resistance and the peroxide stress response. *Microbiology (Reading, England)*, 161(9): 1730–40.

Choi, S. & Bird, A. J. (2014). Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(7): 1198–215.

Claudia Schwarzenberger (2007). Diplomarbeit: Eisenaufnahmesysteme in *Cupriavidus metallidurans CH34*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Cobine, P.A., George, G. N., Jones, C. E., Wickramasinghe, W. A., Solioz, M. & Dameron, C. T. (2002). Copper Transfer from the Cu(I) Chaperone, CopZ, to the Repressor, Zn(II)CopY: Metal Coordination Environments and Protein Interactions. *Biochemistry*, 41(18): 5822–5829.

Coleman, J. E. (1998). Zinc enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2): 222–234.

Coy, M. & Neilands, J. B.(1991). Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry*, 30(33): 8201–8210.

Culotta, V.C., Yang, M. & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7): 747–758.

D. Kleemann (2013). Bachelorarbeit: Einfluss von PbrR2 auf Metalltransporter in *Cupriavidus metallidurans*. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 6(1): 23–28.

deHaseth, P. L., Zupancic, M. L. & Record, M. T. (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *Journal of bacteriology*, 180(12): 3019–25.

Dowd, G. C., Casey, P. G., Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. G. M. (2012). Investigation of the role of ZurR in the physiology and pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *FEMS microbiology letters*, 327(2): 118–25.

Egler, M., Große, C., Grass, G., Nies, D. H. (2005). Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 187(7): 2297–307.

Eide, D. J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7): 711–722.

Ellison, M. L., Farrow III, J. M., Parrish, W., Danell, A. S. & Pesci, E. C. (2013). The Transcriptional Regulator Np20 Is the Zinc Uptake Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(9): 1–11.

Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), p.783.

Gaballa, A., Wang, T., Ye, R. W., John, D. & Helmann, J. D. (2002). Functional Analysis of the *Bacillus subtilis* Zur Regulon Functional Analysis of the *Bacillus subtilis* Zur Regulon. *Society*, 184(23).

Gaballa, A. & Helmann, J. D. (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180(22): 5815–5821.

8. Literaturverzeichnis

- Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L. & Battistoni, A (2011).** Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC microbiology*, 11(1): 36.
- Gabriel, S. E., Miyagi, F., Gaballa, A. & Helmann, J. D. (2008).** Regulation of the *Bacillus subtilis* *yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *Journal of Bacteriology*, 190(10): 3482–3488.
- Gabriel, S. E. & Helmann, J. D. (2009).** Contributions of Zur-Controlled Ribosomal Proteins to Growth under Zinc Starvation Conditions. *Journal of Bacteriology*, 191(19): 6116–6122.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005).** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press: 571–607.
- Gilis, A., Khan, M. A., Cornelis, P., Meyer, J. M., Mergeay, M. & van der Lelie, D. (1996).** Siderophore-mediated iron uptake in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and identification of *aleB* encoding the ferric iron-alcaligin E receptor. *Journal of Bacteriology*, 178(18): 5499–5507.
- Gilston, B. A., Wang, S., Marcus, M. D., Canalizo-Hernández, M. A. Swindell, E. P., Xue, Y., Mondragón, A. & O'Halloran, T. V. (2014).** Structural and Mechanistic Basis of Zinc Regulation Across the *E. coli* Zur Regulon. *PLoS Biology*, 12(11): e1001987.
- Graham, A. I., Hunt, S., Stokes, S. L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A. G., McLeod, C. W., Poole, R. K. (2009).** Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *The Journal of biological chemistry*, 284(27): 18377–89.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12): 4645–4649.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., Munkelt, D. (2005).** FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, 183(1): 9–18.
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D. H., Kucharski, L. M., Maguire, M. E. & Rensing, C. (2005).** The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of bacteriology*, 187(5): 1604–11.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H. & Rensing, C. (2001).** ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(15): 4664–4667.
- Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G. & Genco, C. A. (2003).** Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16): 9542–9547.
- Grigg, J.C., Cheung, J., Heinrichs, D. E. & Murphy, M. E. P. (2010).** Specificity of Staphyloferrin B recognition by the SirA receptor from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry*, 285(45): 34579–88.

8. Literaturverzeichnis

- Große, C., Herzberg, M., Schüttau, M., Wiesemann, N., Hause, G., Nies, D. H. (2016).** Characterization of the $\Delta 7$ Mutant of *Cupriavidus metallidurans* with Deletions of Seven Secondary Metal Uptake Systems. *mSystems*, 1(1).
- Große, C., Friedrich, S. & Nies, D. H., 2007.** Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 12(3-4): 227–40.
- Haas, C. E., Rodionov, D. A., Kropat, J., Malasarn, D., Merchant, S. S. & de Crécy-Lagard, V. (2009).** A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC genomics*, 10: 470.
- Hantke, K. (2001).** Bacterial zinc transporters and regulators. *BioMetals*, 14(3-4): 239–249.
- Hantke, K. (2005).** Bacterial zinc uptake and regulators. *Current opinion in microbiology*, 8(2): 196–202.
- Harley, C. B. & Reynolds, R. P. (1987).** Analysis of E.Coli Promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 15(5): 2343–2361.
- Herzberg, M., Bauer, L., Kirsten, A. & Nies, D. H. (2016).** Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics*. DOI: 10.1039/c5mt00295h
- Herzberg, M., Schüttau, M., Reimers, M., Große, C., Schlegel, H.-G. & Nies, D. H. (2015).** Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands. *Metallomics : integrated biometal science*, 7(4): 632–49.
- Herzberg, M., Dobritzsch, D., Helm, S., Nies, D. H. (2014).** The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics*, 6(SEPT.): 2157–2165.
- Herzberg, M., Bauer, L. & Nies, D. H. (2014).** Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(3): 421–36.
- Hitomi, Y., Outten, C. E. & O’Halloran, T. V. (2001).** Extreme zinc-binding thermodynamics of the metal sensor/regulator protein, ZntR [11]. *Journal of the American Chemical Society*, 123(35): 8614–8615.
- Hobman, J. L., Julian, D. J. & Brown, N. L. (2012).** Cysteine coordination of Pb(II) is involved in the PbrR-dependent activation of the lead-resistance promoter, PpbrA, from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *BMC Microbiology*, 12(1): 109.
- Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P. & Chatonnet, A. (2004).** ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic acids research*, 32(Database issue): D145–7.
- Huang, D.L., Tang, Dong J., Liao, Q., Li, H. C., Chen, Q., He, Y. Q., Feng, J. X., Jiang, B. L., Lu, G. T., Chen, B. & Tang, J. L. (2008).** The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic Acids Research*, 36(13): 4295–4309.
- Huang, K.-F., Liu, Y.-L. & Wang, A. H.-J. (2005).** Cloning, expression, characterization, and crystallization of a glutaminyl cyclase from human bone marrow: a single zinc metalloenzyme.

8. Literaturverzeichnis

Protein expression and purification, 43(1): 65–72.

Ibáñez, M. M., Checa, S. K. & Soncini, F. C. (2015). A Single Serine Residue Determines Selectivity to Monovalent Metal Ions in Metalloregulators of the MerR Family. *Journal of Bacteriology*, 197(9): 1606–1613.

J. M. Scholtz & C. N. Pace (1997). Measuring the Conformational Stability of a Protein by Hydrogen Exchange. In *Protein structure: a practical approach*. IRL press, Oxford, UK: 299–322.

Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N., Vallaey, T., Lapidus, A., Monchy, S., Médigue, C., Taghavi, S., McCorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D. & Mergeay, M. (2010). The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PloS one*, 5(5): e10433.

Jeanthon, C. & Prieur, D. (1990). Susceptibility to Heavy Metals and Characterization of Heterotrophic Bacteria Isolated from Two Hydrothermal Vent Polychaete Annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 56(11): 3308–3314.

Julian, D.J., Kershaw, C. J., Brown, N. L. & Hobman, J. L. (2009). Transcriptional activation of MerR family promoters in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(2): 149–59.

Kehrer, J.P., (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1): 43–50.

Kehres, D. G., Lawyer, C.H. & Maguire, M. E. (1998). The CorA magnesium transporter gene family. *Microbial & comparative genomics*, 3(3): 151–69.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6): 845–858.

Kidd, S. P. & Brown, N. L. (2003). ZccR—a MerR-like regulator from *Bordetella pertussis* which responds to zinc, cadmium, and cobalt. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(4): 697–702.

Kim, E.-J., Kim, H.-P., Hah, Y. C., & Roe, J.-H. (1996). Differential Expression of Superoxide Dismutases Containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry*, 241(1): 178–185.

Kim, J.-W. & Rajagopal, S. N. (2000). Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica*, 45(1): 29–34

Kirsten, A., Herzberg, M., Voigt, A., Seravalli, J., Grass, G., Scherer, J. & Nies, D. H., 2011. Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Journal of bacteriology*, 193(18): 4652–63.

Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1666 (1995): 175–176.

Kreutzer, M. F., Kage, H., Gebhardt, P., Wackler, B., Saluz, H. P., Hoffmeister, D. & Nett, M. (2011). Biosynthesis of a complex yersiniabactin-like natural product via the mic locus in phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Applied and environmental microbiology*, 77(17): 6117–24.

8. Literaturverzeichnis

- Kuroda, M., Hayashi, H. & Ohta, T. (1999).** Chromosome-Determined Zinc-Responsible Operon *czr* in *Staphylococcus aureus* Strain 912. *Microbiology and Immunology*, 43(2): 115–125.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–685. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> [Accessed July 10, 2014].
- Laity, J. H., Lee, B. M. & Wright, P. E. (2001).** Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1): 39–46.
- Lau, C. M., Ure, A. M. & West, T. S. (1988).** Atom trapping atomic absorption spectrometric determination of some trace elements in soils, natural waters, seawater, and bovine liver. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 61(1): 79–85.
- Lee, S. W., Glickmann, E. & Cooksey, D. A. (2001).** Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator. *Applied and environmental microbiology*, 67(4): 1437–44.
- Legatzki, A. (2003).** Charakterisierung zweier CPx-Typ ATPasen und deren Zusammenwirken mit anderen Metall-Effluxsystemen in *Ralstonia metallidurans*. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Legatzki, A. Grass, G., Anton, A., Rensing, C. & Nies, D. H. (2003).** Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, 185(15): 4354–4361.
- van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M. & Nies, D. H. (1997).** Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular Microbiology*, 23(3): 493–503.
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J. & Chen, R. (2013).** Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC plant biology*, 13(1): 114.
- Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. (1997).** Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *Journal of bacteriology*, 179(19): 6127–32.
- Lindsay, J. A. & Foster, S. J. (2001).** Zur: A Zn²⁺-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 147(5): 1259–1266.
- Liu, T., Golden, J. W. & Giedroc, D. P. (2005).** A Zinc(II)/Lead(II)/Cadmium(II)-Inducible Operon from the Cyanobacterium *Anabaena* Is Regulated by AztR, an α 3N ArsR/SmtB Metalloregulator. *Biochemistry*, 44(24): 8673–8683.
- Liu, X. & Ferenci, T. (1998).** Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(15): 3917–22.
- Lloyd, D. R. & Phillips, D. H. (1999).** Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1): 23–36.
- de Lorenzo, V. & Neilands, J. B. (1986).** Characterization of *iucA* and *iucC* genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 167(1): 350–5.
- Louden, B. C., Haarmann, D. & Lynne, A. M. (2011).** Use of Blue Agar CAS Assay for

8. Literaturverzeichnis

Siderophore Detection. *Journal of microbiology & biology education*, 12(1): 51–3.

Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W. & Pohl, Ehmke (2007). Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13): 9914–9922.

Lunin, V. V., Dobrovetsky, E., Khutoreskaya, G., Zhang, R., Joachimiak, A., Doyle, D. A., Bochkarev, A., Maguire, M. E., Edwards, A. M. & Koth, C. M. (2006). Crystal structure of the CorA Mg²⁺ transporter. *Nature*, 440(7085): 833–837

M. Nei & S. Kumar (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.

Ma, Z., Faulkner, M. J. & Helmann, J. D. (2012). Origins of specificity and cross-talk in metal ion sensing by *Bacillus subtilis* Fur. *Molecular Microbiology*, 86(5): 1144–1155.

Ma, Z., Jacobsen, F. E. & Giedroc, D. P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chemical reviews*, 109(10): 4644–81.

Magnani, D. & Solioz, M. (2005). Copper Chaperone Cycling and Degradation in the Regulation of the Cop Operon of *Enterococcus Hirae*. *BioMetals*, 18(4): 407–412.

Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., Cellier, M. F. M. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology*, 35(5): 1065–1078.

Marx, C. J. & Lidstrom, M. E. (2002). Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in Gram-negative bacteria. *BioTechniques*, 33(5): 1062–1067.

McCall, K. A., Huang, C. & Fierke, C. A (2000). Zinc and Health: Current Status and Future Directions Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes 1. *the Journal of Nutrition*, 130(5): 1437S–1446S.

Mecasas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J. & Gross, C. A. (1993). The activity of sigma^E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & development*, 7(12B): 2618–28.

Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162(1): 328–334.

Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D. & Wattiez, R., (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3): 385–410.

Michaud-Soret, I., Adrait, A., Jaquinod, M., Forest, E., Touati, D., Latour, J. M. (1997). Electrospray ionization mass spectrometry analysis of the apo- and metal-substituted forms of the Fur protein. *FEBS Letters*, 413(3): 473–476.

Moore, C. M. & Helmann, J. D. (2005). Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 8(2): 188–95.

Munkelt, D., Grass, G. & Nies, D. H. (2004). The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *Journal of Bacteriology*, 186(23): 8036–8043.

8. Literaturverzeichnis

- Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R. & Ceccherini, Isabella (2006). Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 8(5): 544–50.
- Naville, M., Ghullot-Gaudeffroy, A., Marchais, A. & Gautheret, D. (2011). ARNold: A web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biology*, 8(1): 11–13.
- Nesterenko, M. V, Tilley, M. & Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 28(3): 239–42
- Nevo, Y. & Nelson, N. (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(7): 609–20.
- Nies, D. H., 1992. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 174(24): 8102–8110.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3): 313–339.
- Nies, D. H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbial Biotechnol*, 51: 730–750.
- Nies, D. H. & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2): 186–199.
- Nies, D.H. & Silver, S. (1989). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, 171(2): 896–900.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4): 593–656.
- Nikaido, H. & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews*, 49(1): 1–32.
- Oberto, J. (2010). FITBAR: a web tool for the robust prediction of prokaryotic regulons. *BMC bioinformatics*, 11(11): 554.
- Olsson-Francis, K., Van Houdt, R., Mergeay, M., Leys, N. & Cockell, C. S. (2010). Microarray analysis of a microbe-mineral interaction. *Geobiology*, 8(5): 446–456.
- Outten, C. E. & O'Halloran, T. V (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5526): 2488–92.
- Outten, C. E., Outten, F.W. & O'Halloran, T. V. (1999). DNA Distortion Mechanism for Transcriptional Activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR Homologue in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53): 37517–37524.
- Owen, G. A., Pascoe, B., Kallifidas, D. & Paget, M. S. B. (2007). Zinc-responsive regulation of alternative ribosomal protein genes in *Streptomyces coelicolor* involves *zur* and σ^R . *Journal of Bacteriology*, 189(11): 4078–4086.
- Panina, E. M., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17): 9912–7.
- Patzer, S. I. & Hantke, K. (2000). The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene

8. Literaturverzeichnis

cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32): 24321–24332.

Patzer, S. I. & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 28(6): 1199–1210.

Paulsen, I. T. & Saier, M. H. (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *The Journal of membrane biology*, 156(2): 99–103.

Pawlik, M.-C., Hubert, K., Joseph, B., Claus, H., Schoen, C. & Vogel, U. (2012). The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *Journal of bacteriology*, 194(23): 6594–603.

Pellicic, V., Reytrat, J. M. & Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *Journal of bacteriology*, 178(4): 1197–9

Pennella, M.A. & Giedroc, D. P. (2005). Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 18(4): 413–28.

Perry, R. D. & Fetherston, J. D. (2011). Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes and Infection*, 13(10): 808–817.

Petit-Härtlein, I., Rome, K., de Rosny, E., Molton, F., Duboc, C., Gueguen, E., Rodrigue, A. & Covès, J. (2015). Biophysical and physiological characterization of ZraP from *Escherichia coli*, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system.

Pfennig, N. (1974). *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Archives of Microbiology*, 100(1): 197–206.

Pirovano, W. & Heringa, J., 2010. Protein secondary structure prediction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 609: 327–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20221928> [Accessed February 2, 2016].

Pomposiello, P. J. & Demple, B. (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology*, 19(3): 109–114.

Pruteanu, M., Neher, S. B. & Baker, T. A. (2007). Ligand-controlled proteolysis of the *Escherichia coli* transcriptional regulator ZntR. *Journal of bacteriology*, 189(8): 3017–25.

Rabilloud, T., Carpentier, G. & Tarroux, P. (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*, 9(6): 288–91.

Reith, F., Etschmann, B., Große, C., Moors, H., Benotmane, M. A., Monsieurs, P., Grass, G., Doonan, C., Vogt, S., Lai, B., Martinez-Criado, G., George, G. N., Nies, D. H., Mergeay, M., Pring, A., Southam, G. & Brugger, J. (2009). Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42): 17757–62.

von Rozycki, T. & Nies, D.H.(2009). *Cupriavidus metallidurans*: Evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(2 SPEC. ISS.): 115–139.

Ruiz-Carrillo, D., Koch, B., Parthier, C., Wermann, M., Dambe, T., Buchholz, M., Ludwig, H.-H., Heiser, U., Rahfeld, J.-U., Stubbs, M. T., Schilling, S. & Demuth, H.-U. (2011). Structures of Glycosylated Mammalian Glutamyl Cyclases Reveal Conformational Variability near the Active Center. *Biochemistry*, 50(28): 6280–6288.

8. Literaturverzeichnis

Saier, M.H., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular microbiology*, 11(5): 841–7.

Scherer, J. & Nies, D. H. (2009). CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Molecular Microbiology*, 73(4): 601–621.

Schmidt, C., Schwarzenberger, C., Große, C. & Nies, D. H. (2014). FurC Regulates Expression of *zupT* for the Central Zinc Importer ZupT of *Cupriavidus metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, 196(19): 3461–3471.

Schröder, J., Tauch, A. (2010). The Zur regulon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC genomics*, 11: 12.

Schüttau, M. (2013). Diplomarbeit: Screening von Disruptionsmutanten nach unbekanntem Zinktransportern in *Cupriavidus metallidurans*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Schwuchow, T. (1995). Diplomarbeit: Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Shin, J.-H., Oh, S. Y., Kim, S. J. & Roe, J. H. (2007). The zinc-responsive regulator *zur* controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 189(11): 4070–4077.

Shin, J.-H., Jung, H. J., An, Y. J., Cho, Y.-B., Cha, S.-S. & Roe, J.-H. (2011). Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in *Zur*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12): 5045–5050.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology*, 1(9): 784–791.

Simossis, V.A. & Heringa, J. (2003). The PRALINE online server: optimising progressive multiple alignment on the web. *Computational Biology and Chemistry*, 27(4-5): 511–519.

Singh, V.K., Xiong, A., Usgaard, T. R., Chakrabarti, S., Deora, R., Misra, Tapan K. & Jayaswal, R. K. (1999). ZntR is an autoregulatory protein and negatively regulates the chromosomal zinc resistance operon *znt* of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 33(1): 200–207.

Smith, K.F., Bibb, L. A., Schmitt, M. P. & Oram, D. M. (2009). Regulation and activity of a zinc uptake regulator, *zur*, in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology*, 191(5): 1595–1603.

Smith, R. L., Banks, J. L., Snavely, M. D. & Maguire, M. E. (1993). Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein. *The Journal of biological chemistry*, 268(19): 14071–80.

Snavely, M.D., Florer, J. B., Miller, C. G. & Maguire, M. E. (1989). Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: 28Mg^{2+} transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *Journal of bacteriology*, 171(9): 4761–6.

Soboh, B., Stripp, S. T., Bielak, C., Lindenstraub, U., Brausemann, M., Javid, M., Hallensleben, M., Granich, C., Herzberg, M., Heberle, J. & Sawers, R. G., (2013). The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Letters* 587 (2013): 2512-2516.

8. Literaturverzeichnis

- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3): 503–517.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. & Brown, N. L. (2001).** CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular microbiology*, 39(2): 502–11.
- Studier, F.W., Daegelen, P., Lenski, R. E., Maslov, S. & Kim, J. F. (2009).** Understanding the Differences between Genome Sequences of *Escherichia coli* B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the *E. coli* B and K-12 Genomes. *Journal of Molecular Biology*, 394(4): 653–680.
- Taghavi, S., Lesaulnier, C., Monchy, S., Wattiez, R., Mergeay, M., & van der Lelie, D. (2009).** Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(2): 171–82.
- Tainer, J.A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (1983).** Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 306(5940): 284–287.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Tang, D.-J., Li, X.-J., He, Y.-Q., Feng, J.-X., Chen, B. & Tang, J.-L. (2005).** The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 18(7): 652–8.
- Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2012).** *Corynebacterium glutamicum* Zur acts as a zinc-sensing transcriptional repressor of both zinc-inducible and zinc-repressible genes involved in zinc homeostasis. *FEBS Journal*, 279(23): 4385–4397.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. & Saier, M. H. (1999).** The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1): 107–25.
- Vandamme, P. & Coenye, T. (2004).** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6): 2285–2289.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J., Konings, W. N., Zehnder, A. J. (1994).** Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 33(7): 1766–70.
- Waldron, K. J. & Robinson, N. J. (2009).** How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature reviews. Microbiology*, 7(1): 25–35.
- Walker, J.M. ed. (2005).** The Proteomics Protocols Handbook, Totowa, NJ: Humana Press.
- Wang, D., Hosteen, O. & Fierke, C. A. (2012).** ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111: 173–181.
- Wang, S.-Z., Chen, Y., Sun, Z.-H., Zhou, Q. & Sui, S.-F. (2006).** *Escherichia coli* CorA periplasmic domain functions as a homotetramer to bind substrate. *The Journal of biological chemistry*, 281(37): 26813–20.

8. Literaturverzeichnis

- Watanabe, S., Kawashima, T., Nishitani, Y., Kanai, T., Wada, T., Inaba, K., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. (2015).** Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe] hydrogenase by Ni-metallochaperone HypA and its enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25): 7701–7706.
- Weber, K. & Osborn, M. (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry*, 244(16): 4406–12.
- Weinberg, E.D. (1997).** The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspectives in biology and medicine*, 40(4): 578–83.
- Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F. & Appel, R. D. (1997).** Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis*, 18(3-4): 403–8.
- Williams, R.J.P. (1987).** The biochemistry of zinc. *Polyhedron*, 6(1): 61–69.
- Wolfe, S. A., Nekludova, L. & Pabo, C. O. (2000).** DNA Recognition by Cys₂ His₂ Zinc Finger Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29(1): 183–212.
- Worlock, A. J. & Smith, R. L. (2002).** ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 184(16): 4369–73.
- Xiong, J., Li, D., Li, H., He, M., Miller, S. J., Yu, L., Rensing, C. & Wang, Gejiao (2011).** Genome analysis and characterization of zinc efflux systems of a highly zinc-resistant bacterium, *Comamonas testosteroni* S44. *Research in Microbiology*, 162(7): 671–679.
- Yang, L., Arora, K., Beard, W. A., Wilson, S. H. & Schlick, T. (2004).** Critical role of magnesium ions in DNA polymerase beta's closing and active site assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 126(27): 8441–53.
- Zhang, Y. B., Monchy, S., Greenberg, B., Mergeay, M., Gang, O., Taghavi, S. & van der Lelie, D. (2009).** ArsR arsenic-resistance regulatory protein from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(2 SPEC. ISS.): 161–170.
- Zhao, H. & Eide, D. (1996).** The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6): 2454–2458.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle Personen richten, die mich bei der Erarbeitung meiner Dissertation unterstützt und gefördert haben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. D. H. Nies für die Bereitschaft, mir dieses Thema zu überlassen und es in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Des Weiteren danke ich für die vielfältige Unterstützung und für das große Interesse am Vorankommen meiner Arbeit.

Prof. Dr. K. Hantke danke ich für die Erstellung des 2. Gutachtens und die inspirierenden Eindrücke seiner Veröffentlichungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. R. G. Sawers für das Einbringen neuer Ansatzpunkte, die Diskussionsbereitschaft für die experimentellen Daten und die Übernahme des 3. Gutachtens.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Schierhorn für die massenspektrometrische Analyse der untersuchten Proteine sowie Martin Herzberg für die Analyse der Metallzusammensetzung via ICP-MS und für seinen manchmal kritischen Blick auf meine Daten. Außerdem danke ich Andreas für die Einarbeitung in die 2D- und die Aufnahmeexperimente sowie seinem Erfahrungsschatz, an dem ich teilhaben konnte.

Den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Nies & Sawers möchte ich meinen Dank aussprechen für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und vor allem die Unterstützung im Laboralltag (so z. B.: Anja, Lucy, Steffi, Lydia und Doreen). Außerdem habe ich das jahreszeitenunabhängige gute Klima und den reibungslosen Ablauf im Labor geschätzt, an dem Grit, Frau Otto und Diana einen großen Anteil hatten. Außerdem danke ich Falk und Conny für ihre offene Art und die guten Ratschläge für die Planung meiner Experimente.

Ein großer Dank geht auch an Marco und Dörte, die mich im Labor mehr als 5 Jahre begleitet haben und die ich auch als sehr gute Freunde schätze. Ich danke euch beiden Doktoren für die Unterstützung während der gesamten Laborzeit und der Schreibphase.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, Julia und Klein Theo für ihre Unterstützung, den seelischen Beistand, das aufgebrachte Verständnis und das private Glück in Gänze danken. Danke euch.

10. Eidesstattliche Erklärung

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den aufgeführten Quellen und den genannten Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit keiner Prüfungskommission zur Begutachtung vorlag und ich mich an keiner anderen Stelle für den Doktorgrad beworben habe.

Halle/ Saale, August 2016

.....

Christopher Schmidt

11. Lebenslauf

Christopher Schmidt

Geboren am 13.12.1986 in Bad Muskau

Lebensgemeinschaft, 1 Kind (*2015)

Bisherige Tätigkeit

- Seit 03.2016 Medizinisch-technischer Laboratoriumsassistent
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Universitätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie,
Psychotherapie und Psychosomatik
- 04.2015 – 02.2016 Elternzeit, Weiterbildungen und Promotionsniederschrift
- 01.2012 - 03.2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Molekulare Mikrobiologie
Thema: „Zur und ZntR vermittelte Regulation des
Zinktransportes in *Cupriavidus metallidurans*.“

Ausbildung

- 10.2006 - 11.2011 Studium der Biologie (Diplom)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie,
pharmazeutische Biologie
- Diplomarbeit:
Institut für allgemeine Mikrobiologie (AG Prof. Sawers)
Thema: „Charakterisierung der Klasse 1D Mutanten und das
Sco6102 - Genprodukt im Kontext des Stickstoff- Metabolismus
in *Streptomyces coelicolor* A3 (2).“
- 07.2009- 08.2009 Praktikum : Probiodrug AG, Halle (Saale)
- 06.2005 Erwerb der Hochschulreife
Landau-Gymnasium, Weißwasser
Leistungskurse: Biologie und Mathematik

Halle/ Saale, den 29.08.2016

.....
Christopher Schmidt

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht.

Schmidt, C., Schwarzenberger, C., Große, C. & Nies, D. H. (2014). FurC Regulates Expression of *zupT* for the Central Zinc Importer ZupT of *Cupriavidus metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, 196(19): 3461–3471.