

**Metall-Chaperone in *Cupriavidus metallidurans*:
Charakterisierung der putativen P-loop GTPasen CobW_{1/2/3}**

Dissertation

zur

Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Lucy Bütöf (geb. Bauer)

geb. am 24.05.1989 in Wolmirstedt

Gutachter: Prof. Dr. D.H. Nies
Prof. Dr. G. Sawers
Prof. Dr. W. Maret

öffentlich verteidigt am 18.06.2018, Halle (Saale)

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton

I Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| I Inhaltsverzeichnis | I |
| II Abbildungsverzeichnis | VI |
| III Tabellenverzeichnis | VIII |
| IV Abkürzungsverzeichnis | X |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Biologische Relevanz und Verfügbarkeit von Zink..... | 1 |
| 1.2 Metallome und Metallomics | 3 |
| 1.3 Zinkhomöostase in <i>C. metallidurans</i> | 5 |
| 1.3.1 Rolle des globalen Zinkregulators Zur in der Zinkhomöostase..... | 7 |
| 1.3.2 Metall-Chaperone | 11 |
| 2. Material und Methoden | 20 |
| 2.1 Kultivierungsbedingungen..... | 20 |
| 2.1.1 Nährmedien und Zusätze für Bakterien | 20 |
| 2.1.2 Anzucht und Zellernte..... | 22 |
| 2.1.3 Stammhaltung..... | 23 |
| 2.2 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA | 24 |
| 2.2.1 Isolierung von DNA | 24 |
| 2.2.1.1 Isolation von Gesamt-DNA..... | 24 |
| 2.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA | 24 |
| 2.2.2 DNA-Techniken | 24 |
| 2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese | 24 |
| 2.2.2.2 DNA-Größenstandard | 25 |
| 2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung..... | 25 |
| 2.2.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen | 25 |
| 2.2.2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA | 25 |
| 2.2.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen..... | 26 |
| 2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten | 26 |
| 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 26 |
| 2.2.3.1 Auswahl der Primer..... | 26 |
| 2.2.3.2 Standard Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 26 |
| 2.2.4 DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone | 28 |
| 2.2.4.1 Transformation nach der CaCl ₂ -Methode | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4.2 Plasmidtransfer durch Konjugation..... | 29 |
| 2.2.4.3 Selektion von <i>single cross</i> -Rekombinaten | 29 |
| 2.2.4.4 Konstruktion von <i>C. metallidurans</i> Deletionsmutanten mittels <i>cre-lox</i> System...30 | |
| 2.2.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung | 31 |
| 2.3 Proteinbiochemische Methoden..... | 31 |
| 2.3.1 Genexpression und Proteinreinigung | 31 |
| 2.3.1.1 Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte | 32 |
| 2.3.1.2 Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes..... | 32 |
| 2.3.1.3 Proteinreinigung mittels <i>Strep</i> -Tactin-Chromatographie..... | 32 |
| 2.3.1.4 Proteinreinigung mit Hilfe der Ni-NTA Affinitätschromatographie | 33 |
| 2.3.1.5 Größenausschlusschromatographie | 33 |
| 2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen..... | 34 |
| 2.3.2.1 Lowry-Proteinbestimmung (Lowry <i>et al.</i> , 1951) | 34 |
| 2.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)..... | 34 |
| 2.3.2.3 Proteinbestimmung am NanoDrop®ND-1000 Spektrophotometer..... | 34 |
| 2.3.3 Konzentrieren von Proteinlösungen | 34 |
| 2.3.4 Elektrophoretische Methoden | 35 |
| 2.3.4.1 Probenvorbereitung | 35 |
| 2.3.4.2 Proteinmarker | 35 |
| 2.3.4.3 Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970) | 35 |
| 2.3.4.4 Native-PAGE | 36 |
| 2.3.4.5 Proteintransfer auf eine Membran (Western-Blot)..... | 36 |
| 2.3.4.6 <i>Strep</i> -tag®II Detektionssystem (IBA lifescience, Göttingen) | 37 |
| 2.3.4.7 <i>His</i> -tag Antikörpernachweis..... | 37 |
| 2.3.4.8 Multiplex-Detektion mittels Fluoreszenzantikörpern | 37 |
| 2.3.5 Färbemethoden für Polyacrylamidgele | 38 |
| 2.3.5.1 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau nach Weber and Osborn, 1969 | 38 |
| 2.3.5.2 Proteinfärbung mittels Quick Coomassie™ stain | 38 |
| 2.3.5.3 Silberfärbung..... | 39 |
| 2.3.5.4 Visualisierung von DNA-Fragmenten mittel Ethidiumbromid..... | 39 |
| 2.3.6 Abspaltung des <i>His</i> -tags mit Hilfe der Tev-Protease | 39 |
| 2.3.7 CD-Spektroskopie | 40 |
| 2.3.8 Herstellung von Apo-Proteinen..... | 40 |
| 2.3.9 Metallinkubationsassay nach Sydor <i>et al.</i> , 2013 | 40 |
| 2.3.10 Zincon-Assay | 41 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3.11 | <i>Electrophoretic Mobility Shift-Assay</i> (EMSA) | 41 |
| 2.3.12 | Identifizierung von Interaktionspartnern mittels <i>Pulldown</i> | 41 |
| 2.3.12.1 | <i>Pulldown</i> mittels Ni-NTA <i>magnetic Beads</i> | 41 |
| 2.3.12.2 | <i>Pulldown</i> mit <i>Strep-Tactin magnetic Beads</i> | 42 |
| 2.3.13 | Tryptischer In-Lösungsverdau | 42 |
| 2.4 | Zellwachstumsversuche | 43 |
| 2.4.1 | Waschtumsversuche in Flüssigmedium | 43 |
| 2.4.1.1 | Messung der Zelltrübung | 43 |
| 2.4.1.2 | Zeitabhängige Wachstumskurven | 43 |
| 2.4.1.3 | Wachstumsendpunktbestimmung von <i>C. metallidurans</i> -Stämmen | 43 |
| 2.4.2 | Bestimmung der MIC (<i>minimal inhibitory concentration</i>) von <i>C. metallidurans</i> ... | 44 |
| 2.5 | Enzymologische Methoden..... | 44 |
| 2.5.1 | Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität | 44 |
| 2.5.1.1 | Zellanzucht der <i>C. metallidurans</i> -Stämme..... | 44 |
| 2.5.1.2 | β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung | 45 |
| 2.5.2 | Aktivitätsfärbung der Superoxiddismutase (SOD) | 46 |
| 2.5.3 | Hydrogenasen-Aktivitätsfärbung | 46 |
| 2.6 | ICP-MS (<i>inductively-coupled-plasma mass-spectrometry</i>)..... | 46 |
| 2.6.1 | Probenanzucht | 46 |
| 2.6.2 | Probenaufbereitung | 47 |
| 2.6.3 | Ermittlung des Metallgehalts ganzer Zellen..... | 47 |
| 2.6.4 | Probenaufbereitung und Datenauswertung von Proteinproben..... | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | <i>cobW</i> _{1/3} und <i>zur</i> sind Teile des Zur-Regulons | 49 |
| 3.1.1 | Die Deletion von <i>zur</i> führt zu einer gesteigerten Expression von <i>cobW</i> _{1/2/3} | 52 |
| 3.2 | Physiologische Charakterisierung der <i>C. metallidurans</i> Deletionsmutanten | 54 |
| 3.2.1 | Die Deletion der <i>cobW</i> 's führt im CH34 zu multiplen Effekten..... | 54 |
| 3.2.1.1 | Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration der CH34-Derivate | 57 |
| 3.2.1.2 | EDTA führt zu einem verminderten Zinkgehalt in den Zellen | 58 |
| 3.2.1.3 | Die CH34-Mutanten zeigen unterschiedliche Resistenzen gegen oxidativen Stress | 60 |
| 3.2.2 | Physiologische Charakterisierung der AE104-Derivate | 62 |
| 3.2.2.1 | Die IC50-Werte der AE104-Varianten weisen auf eine gestörte Metallhomöostase hin..... | 63 |
| 3.2.2.2 | Wie äußert sich der Resistenzverlust im Metallgehalt der Zellen?..... | 64 |
| 3.2.2.3 | Die AE104 Δ <i>cobW</i> ₃ -Derivate sind resistenter gegen oxidativen Stress..... | 65 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.3 Die Deletion der Chaperone führt im Stamm $\Delta zupT$ zu einem Wachstumsdefizit.. | 66 |
| 3.2.3.1 Welchen Einfluss haben die Chaperone auf die Metallresistenz der Zinkaufnahmemutante $\Delta zupT$? | 68 |
| 3.2.3.2 Die $\Delta zupT\Delta cobW_3$ -Derivate akkumulieren mehr Zinkatome pro Zelle..... | 69 |
| 3.2.3.3 Paraquat und H_2O_2 führen in den $\Delta zupT$ -Stämmen zu unterschiedlichen Effekten | 70 |
| 3.2.4 Physiologische Charakterisierung der Δzur -Derivate | 71 |
| 3.2.4.1 Die Δzur -Derivate weisen multiple Resistenzunterschiede auf | 72 |
| 3.2.4.2 Der Zinkgehalt im Δzur ist erhöht..... | 72 |
| 3.2.5 $CobW_{1/2/3}$ sind im $\Delta e4$ essentiell für die Zinkspeicherung..... | 74 |
| 3.2.5.1 Die Effluxdeletionsmutanten sind Nickel und Cadmium sensitiv | 75 |
| 3.2.5.3 Der Magnesiumgehalt in den erzeugten Effluxstämmen ist vermindert..... | 76 |
| 3.2.5.2 Oxidativer Stress führt zu multiplen Effekten in den Effluxmutanten..... | 78 |
| 3.3 Welchen Einfluss haben die Deletionen von $cobW_3$ und dem $cobW_1$ -Cluster auf die Effluxsysteme ZntA, CadA, DmeF und FieF? | 79 |
| 3.3.1 <i>CadA</i> wird in den CH34-Derivaten durch Zink induziert..... | 79 |
| 3.3.2 <i>CadA</i> wird in der Deletionsmutante $\Delta zupT\Delta cobW_3$ mit zunehmenden Zinkkonzentrationen induziert..... | 81 |
| 3.4 Proteinbiochemische Charakterisierung von $CobW_{1/2/3}$ | 83 |
| 3.4.1 Reinigung der rekombinanten Proteine und Abspaltung des <i>Tags</i> | 83 |
| 3.4.2 Bestimmung der Bindekapazität der $CobW$'s..... | 85 |
| 3.4.2.1 Zincon-Assay zur Bestimmung der Zinksbindeaffinität | 85 |
| 3.4.2.2 Bestimmung des gebundenen Metalls mittels ICP-MS | 87 |
| 3.4.3 Beeinflusst die Apo-Proteinherstellung und die Metallierung die Sekundär- und Tertiärstruktur von $CobW_{1/2/3}$?..... | 89 |
| 3.4.4 $CobW_1$ liegt nach der Reinigung als Mono- und Dimer vor | 92 |
| 3.4.5 $CobW_1$ -Monomere dimerisieren nicht durch Zugabe von Zink | 93 |
| 3.4.6 Identifizierung von Interaktionspartnern..... | 94 |
| 3.4.6.1 Protein- <i>Fishing</i> mit dem Rohextrakt von Δzur | 94 |
| 3.4.6.2 Interagiert $CobW_1$ mit dem Protein FolE _{IB2} aus der Folatbiosynthese?..... | 97 |
| 3.4.6.2.1 Die Interaktion der Chaperone mit FolE _{IB2} ist Zink-abhängig..... | 97 |
| 3.4.6.3 $CobW_{1/2}$ interagieren minimal mit Zur | 100 |
| 4 Diskussion..... | 101 |
| 4.1 Das Zur-Regulon umfasst in <i>C. metallidurans</i> Gene der Zink-Aufnahme, der Regulation und Chaperone | 101 |
| 4.2 Die Deletion von <i>zur</i> führt zur Akkumulation von Zink in der Zelle..... | 108 |

| | |
|--|------------|
| 4.3 CobW ₂ könnte in <i>C. metallidurans</i> die Funktion des Zinkspeicherproteins übernehmen | 110 |
| 4.4 CobW ₁ und CobW ₂ bedienen vermutlich den gleichen <i>pathway</i> in <i>C. metallidurans</i> | 111 |
| 4.5 Basiert die Entgiftung von Zink auf CobW ₃ ? | 113 |
| 4.6 Die Chaperone CobW _{1/2/3} zeigen unterschiedliche Zink-Bindekapazitäten | 118 |
| 4.7 FolE _{IB2} ist ein mögliches Targetprotein von CobW _{1/2/3} in <i>C. metallidurans</i> | 124 |
| 5 Zusammenfassung | 128 |
| 6 Ausblick | 130 |
| 7 Literaturverzeichnis | 132 |
| 8 Lebenslauf und Publikationsliste | 148 |
| 9 Danksagung | 151 |
| 10 Eidesstattliche Erklärung | 152 |
| 11 Anhang | 153 |
| 11.1 Bakterienstämme und Plasmide | 153 |
| 11.2 Übersicht der für die Klonierungen verwendeten Primer und Kontrollprimer | 157 |
| 11.3 Zur bindet Zink mit hoher Affinität | 161 |
| 11.4 Zur bindet nicht als Apo-Protein an den Promotorbereich von <i>cobW₁</i> | 162 |
| 11.5 EMSA mit Kontrollbereichen von <i>dksA</i> , <i>zurT</i> und <i>cobW₂</i> | 163 |
| 11.6 Konstruktion von <i>C. metallidurans</i> Deletions- und Disruptionsmutanten | 164 |
| 11.7 Aufreinigung der rekombinanten Tev-Protease | 167 |
| 11.8 Ermittlung einer Kalibriergeraden für die Größenausschlusschromatographie | 168 |
| 11.9 CobW ₁ konnte per MALDI-TOF-MS in Multimerbanden nachgewiesen werden | 169 |
| 11.10 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von CobW _{1/2/3} nach <i>Pulldown</i> mit der löslichen Fraktion des Δ_{zur} | 172 |
| 11.11 Reinigung von FolE _{IB2} als <i>Strep</i> -tag Fusionsprotein | 175 |
| 11.12 Die Deletion der Chaperone führt zu multiplen MIC-Effekten | 176 |
| 11.13 Die in Gel-Aktivität der Fe-Superoxiddismutase ist nicht beeinflusst | 178 |
| 11.14 Die Aktivität der löslichen Hydrogenase der <i>C. metallidurans</i> -Mutanten ist nicht eindeutig | 179 |
| 11.15 Aminosäurealignment der CobW's aus <i>E. coli</i> und <i>C. metallidurans</i> | 180 |

II Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Übersicht der in <i>C. metallidurans</i> CH34 an der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase beteiligten Transporter..... | 7 |
| Abbildung 2: Alignment von Zur aus <i>E. coli</i> und <i>C. metallidurans</i> zur Darstellung der konservierten Bereiche die an der Dimerisierung, DNA-Bindung oder Zinkbindung beteiligt sind (Gilston <i>et al.</i> , 2014)..... | 9 |
| Abbildung 3: Übersicht der Gen-Cluster in denen <i>zupT</i> und die Gene der putativen Metall-Chaperone <i>cobW₁</i> , <i>cobW₂</i> und <i>cobW₃</i> annotiert sind, sowie die vorhergesagten Zur-Bindeboxen (Haas <i>et al.</i> , 2009)..... | 10 |
| Abbildung 4: Einordnung der P-loop NTPasen in die Klassen und Familien nach Leipe <i>et al.</i> , 2002..... | 15 |
| Abbildung 5: Putative Struktur zur COG0523-Unterfamilie der G3E P-loop GTPasen erstellt aus einem Plot konservierter Aminosäuren (Haas <i>et al.</i> , 2009)..... | 15 |
| Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung von CobW _{1/2/3} aus <i>C. metallidurans</i> in bakterielle und eukaryotische Phyla, sowie die Abgrenzung von anderen G3E Unterfamilien. | 18 |
| Abbildung 7: Ethidiumbromidfärbung (A) und Silberfärbung (B) eines nativen 10%igen Polyacrylamidgels nach EMSA von 0.68 pmol <i>zupTp</i> mit steigenden Konzentrationen Holo- <i>Strep-Zur</i> (Bütöf <i>et al.</i> , 2017)..... | 50 |
| Abbildung 8: 10%ige Native-PAGE gefärbt mit Ethidiumbromid (A) zur DNA-Visualisierung und Silber (B) für die Anfärbung von DNA und Proteinen nach der Inkubation von 0.68 pmol <i>cobW_{1p}</i> DNA mit Holo- <i>Strep-Zur</i> (Bütöf <i>et al.</i> , 2017)..... | 50 |
| Abbildung 9: EMSA von 0.68 pmol <i>cobW_{3p}</i> mit steigenden Konzentrationen Holo- <i>Strep-Zur</i> visualisiert mit Ethidiumbromid (A) und Silber (B) (Bütöf <i>et al.</i> , 2017)..... | 51 |
| Abbildung 10: Ethidiumbromidfärbung (A) und Silberfärbung (B) eines nativen 10 %igen Polyacrylamidgels nach EMSA von 0.68 pmol <i>zurp</i> mit Holo- <i>Strep-Zur</i> (Bütöf <i>et al.</i> , 2017). . | 51 |
| Abbildung 11: Wachstumskurven des Parentalstammes CH34 und der Einzeldelentionsmutanten. | 55 |
| Abbildung 12: Wachstumskurven der Doppeldeletionen im Vergleich zum CH34 Wildtyp. | 56 |
| Abbildung 13: Vergleich des Wachstums des Parentalstammes CH34 im Vergleich zur Dreifachdeletionsmutante CH34Δ <i>cobW₁</i> -ClusterΔ <i>cobW₃</i> ϕ(<i>cobW₂</i> ': <i>lacZ</i>)299. | 57 |
| Abbildung 14: Dose Response Kurven mit steigenden Konzentrationen an H ₂ O ₂ und Paraquat zur Herbeiführung von oxidativem Stress in den CH34-Derivaten. | 61 |
| Abbildung 15: Untersuchung des Wachstumsverhaltens vom AE104 und den Derivaten. | 62 |
| Abbildung 16: Wachstumsendpunktbestimmung der AE104-Varianten bei steigendem oxidativen Stress hervorgerufen durch Paraquat und H ₂ O ₂ | 66 |
| Abbildung 17: Wachstumskurven der Δ <i>zupT</i> -Derivate in Tris-MiM (A), mit Zugabe von 100 μM EDTA (B) und 10 μM ZnCl ₂ (C)..... | 67 |
| Abbildung 18: Resistenz der Δ <i>zupT</i> -Derivate gegenüber oxidativem Stress..... | 70 |
| Abbildung 19: Wachstumskurven der <i>C. metallidurans zur</i> -Derivate..... | 71 |
| Abbildung 20: Wachstumsverhalten der Effluxdeletionsmutanten in Tris-MM(A/D), unter Metallmangel (B/E) und bei Zinkzugabe (C/F). | 74 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 21: <i>Dose Response</i> -Kurven der Effluxdeletionsmutanten unter oxidativem Stress erzeugt durch Wasserstoffperoxid (A/B) und Paraquat (C/D). | 78 |
| Abbildung 22: Nachweis von <i>His-CobW</i> _{1/2/3} in Zellen mit Coomassie-Blau-Färbung und Western-Blot. | 83 |
| Abbildung 23: Coomassie-Blau-Färbung und Autoradiogramm zum Nachweis der Abspaltung des Affinitätstags am Beispiel von <i>CobW</i> ₁ . | 84 |
| Abbildung 24: SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung zum Nachweis der Proteine <i>CobW</i> _{1/2/3} mit und ohne Affinitätstag | 84 |
| Abbildung 25: Aminosäurealignment eines Ausschnittes der Sequenzen von <i>CobW</i> _{1/2/3} , zur Darstellung des putativen Metallbindemotives (in rot). | 85 |
| Abbildung 26: Konkurrenzexperiment zwischen dem Farbstoff Zincon und <i>CobW</i> _{1/2/3} um frei verfügbares Zink. | 86 |
| Abbildung 27: Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur von <i>CobW</i> ₁ bei definierten Co-Faktorbindungen. | 90 |
| Abbildung 28: Analyse der Nah- und Fern-UV Spektren von <i>CobW</i> ₂ bei definierter Co-Faktorbindung. | 91 |
| Abbildung 29: Sekundär- und Tertiärstruktur von <i>CobW</i> ₃ bei definierter Zinkbindung. | 92 |
| Abbildung 30: Nachweis von <i>CobW</i> ₁ -Multimeren mit Größenausschlusschromatographie und Native-PAGE. | 93 |
| Abbildung 31: Coomassie-Blau-Färbung zum Nachweis von <i>CobW</i> ₁ -Monomeren nach Inkubation mit Zink und GTP. | 94 |
| Abbildung 32: SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blau gefärbt nach dem <i>Pulldown</i> von <i>His-CobW</i> _{1/2/3} mit der löslichen Fraktion des Δ <i>Zur</i> . | 95 |
| Abbildung 33: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE (A) und Multiplex-Western-Blots (B) zum Nachweis der Interaktion zwischen <i>FolE</i> _{IB2} - <i>Strep</i> und <i>His-CobW</i> ₁ bei Zugabe von Zink, Magnesium und GTP. | 98 |
| Abbildung 34: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE zum Nachweis der Interaktion von <i>FolE</i> _{IB2} - <i>Strep</i> und <i>CobW</i> ₁ ohne (A) und mit (B) Zink. | 98 |
| Abbildung 35: Nachweis der Interaktion von <i>FolE</i> _{IB2} - <i>Strep</i> und <i>CobW</i> ₃ ohne (A) und mit Zink (B) durch Coomassie-Blau-Färbung. | 99 |
| Abbildung 36: Überprüfung der Interaktion von <i>CobW</i> ₂ mit <i>FolE</i> _{IB2} - <i>Strep</i> bei Zinkzugabe durch Coomassie-Blau-Färbung einer SDS-PAGE. | 99 |
| Abbildung 37: SDS-PAGE nach Färbung mit Quick Coomassie Stain zur Interaktionsstudie von <i>Strep-Zur</i> mit <i>CobW</i> _{1/2/3} bei Zinkzugabe. | 100 |
| Abbildung 38: Alignment der <i>Zur</i> -Bindeboxen der Gene des identifizierten <i>Zur</i> -Regulons erstellt mit WebLogo (Crooks <i>et al.</i> , 2004). | 104 |
| Abbildung 39: Darstellung der hypothetischen Funktionen der Chaperone <i>CobW</i> _{1/2/3} in der Zelle. | 127 |
| Abbildung 40: Coomassie-Blau-Färbung und Autoradiogramm nach Western-Blot der Reinigung des rekombinanten <i>Strep-Zur</i> . | 161 |
| Abbildung 41: Ethidiumbromid- (A-C) und Silberfärbung (D-F) einer nativen 10 %igen PAGE nach EMSA von 0.68 pmol <i>cobW</i> _{1p} mit Apo- <i>Strep-Zur</i> (A,D), Apo- <i>Strep-Zur</i> + 100 μ M ZnCl ₂ (B,E) und Holo- <i>Strep-Zur</i> + 100 μ M EDTA (C,F) (Bütöf <i>et al.</i> , 2017). | 163 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 42: Ethidiumbromidfärbung (A-C) und Silberfärbung (D-F) eines nativen 10 %igen Polyacrylamidgels nach EMSA von 0.68 pmol <i>cobW</i> ₂ p (A,D), <i>dk</i> sAp (B,E) und <i>zupT</i> ₂ (C,F) mit Holo- <i>Strep</i> -Zur (Bütöf <i>et al.</i> , 2017). | 164 |
| Abbildung 43: Konstruktion einer Gendeletion in <i>C. metallidurans</i> mittels <i>cre-lox</i> -System am Beispiel von <i>cobW</i> ₃ (nach Marx and Lidstrom, 2002). | 165 |
| Abbildung 44: Konstruktion einer Disruption in <i>C. metallidurans</i> mit Hilfe des pLO2-Vektorsystems am Beispiel von <i>cobW</i> ₂ | 167 |
| Abbildung 45: Nachweis der rekombinanten Tev-Protease in den Zellen und nach der Reinigung. | 168 |
| Abbildung 46: Chromatogramm und Auswertung des LMW Gelfiltrationsmarkers. | 169 |
| Abbildung 47: Coomassie-Blau-Färbung der Native-PAGE zum Nachweis von CobW ₁ -Multimeren MALDI-TOF. | 170 |
| Abbildung 48: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE und Autoradiogramm nach dem Antikörpernachweis, zur Identifizierung von FoIE _{1B2} in den Fraktionen. | 176 |
| Abbildung 49: Native-PAGE zum Nachweis der Aktivität der Fe-SOD in den <i>C. metallidurans</i> Stämmen. | 178 |
| Abbildung 50: In Gel-Aktivität der löslichen Hydrogenase durch Benzylviologen und NADH+H ⁺ | 180 |
| Abbildung 51: Aminosäurealignment der CobW's aus <i>E. coli</i> und <i>C. metallidurans</i> mit Annotation der G-Motive | 181 |

III Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Medienzusätze | 22 |
| Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele | 35 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung der Native-PAGE | 36 |
| Tabelle 4: <i>In vivo</i> Aktivität der Gene des Zur-Regulons. | 53 |
| Tabelle 5: Mittlere inhibitorische Konzentrationen von EDTA und divalenter Kationen auf CH34. | 58 |
| Tabelle 6: Metallgehalt der CH34-Derivate. | 59 |
| Tabelle 7: IC50-Werte der AE104-Varianten im Vergleich zum Parentalstamm. | 64 |
| Tabelle 8: Metallgehalt des Parentalstammes AE104 und der Mutanten. | 64 |
| Tabelle 9: Mittlere inhibitorische Konzentrationen von EDTA und divalenter Kationen auf die Δ <i>zupT</i> -Derivate. | 68 |
| Tabelle 10: Metallgehalt der Aufnahmedeletionsmutante Δ <i>zupT</i> und den Derivaten. | 69 |
| Tabelle 11: IC50-Werte der Δ <i>zur</i> -Derivate für EDTA und divalente Metallkationen. | 72 |
| Tabelle 12: Analyse des Metallgehaltes vom Parentalstamm Δ <i>zur</i> und den Mutanten | 73 |
| Tabelle 13: IC50-Werte der Effluxdeletionsmutanten für Metallmangel und -überschuss. | 76 |
| Tabelle 14: Metallgehalt der Effluxdeletionsmutanten bestimmt per ICP-MS. | 77 |
| Tabelle 15: Einfluss der Deletion von <i>cobW</i> ₃ und des <i>cobW</i> ₁ -Clusters im CH34 auf die Expression der Gene <i>zntA</i> , <i>cadA</i> , <i>dmeF</i> und <i>fieF</i> | 80 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 16: Einfluss der Deletion von <i>cobW</i> ₃ im Stamm AE104 und dessen Mutante Δ_{zupT} auf die Expression der Gene <i>zntA</i> , <i>cadA</i> , <i>dmeF</i> und <i>fieF</i> | 82 |
| Tabelle 17: Co-Faktorbestimmung der gereinigten rekombinanten Proteine CobW _{1/2/3} | 88 |
| Tabelle 18: Abundante Proteine des <i>Fishing</i> -Experiments mit <i>His</i> -CobW _{1/2/3} | 96 |
| Tabelle 19: Bakterienstämme und Plasmide | 153 |
| Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Primer..... | 157 |
| Tabelle 21: Metallgehalt Apo- <i>Strep</i> -Zur und Holo- <i>Strep</i> -Zur. | 161 |
| Tabelle 22: Übersicht der gefundenen Trypsinfragmente für CobW ₁ in den Banden der Native-PAGE. | 171 |
| Tabelle 23: Übersicht der abundantesten Proteine im <i>His</i> -CobW _{1/2/3} <i>Fishing-Pulldown</i> | 173 |
| Tabelle 24: Übersicht der abundantesten Proteine die an die <i>magnetic</i> Beads gebunden haben. | 174 |
| Tabelle 25: Co-Faktorbestimmung des gereinigten FolE _{IB2} - <i>Strep</i> | 176 |
| Tabelle 26: Minimale inhibitorische Konzentration von EDTA und Metallen auf <i>C. metallidurans</i> | 177 |

IV Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| AHT | Anhydrotetracyclin |
| amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bidest | doppelt destilliertes Wasser (Reinstwasser) |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cfu | <i>colony forming units</i> |
| cm | Chloramphenicol |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| ICP-MS | <i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KE | Klett-Einheiten |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| M | Molarität |
| MCS | <i>multi cloning site</i> |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MIC | <i>minimal inhibitory concentration</i> |
| MM | Minimalmedium |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MW | Molekulargewicht |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| OD | Optische Dichte |
| ONPG | ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salinelösung |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| Pi | ortho-Phosphat |
| ppb | <i>parts per billion</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | <i>rotations per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SOD | Superoxiddismutase |
| TAE | Tris-Acetat/EDTA |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| tet | Tetracyclin |
| TG | Trockengewicht |
| TMH | Transmembrane Helix |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit (Einheit der Enzymaktivität) |
| UV | Ultraviolett |
| Vol. | Volumen |
| v/v | Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>) |
| w/v | Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>) |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid |

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

1 Einleitung

Die Erdkruste weist einen mittleren Zinkgehalt von 70 ppm auf, wohingegen der Gehalt in Böden zwischen 1 und 300 ppm schwankt, was dazu führt, dass es von allen Elementen an Position 25 der Häufigkeit in der Erdkruste vorliegt (Nriagu, 1980; Malle, 1992; Nies, 2016). Als Element der 4. Periode der 12. Gruppe des Periodensystems gehört Zink zu den Übergangsmetallen und wird aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften vielfältig verwendet. Es dient unter anderem als Korrosionsschutz für Eisen, da es an der Luft eine witterungsbeständige Schicht aus Zinkoxid und Zinkcarbonat bildet. Das Redoxpotential liegt bei -0.763 V , wodurch Zink zu den unedlen Metallen gezählt wird. Zinkionen (Zn^{2+}) sind im Gegensatz zu Eisen- ($\text{Fe}^{2+/3+}$) und Kupferionen ($\text{Cu}^{1+/2+}$) redox-inaktiv, da die *d*-Schale gefüllt ist. Dennoch erlauben sie Katalysen als Lewis-Säure, d.h. Zink dient als elektrophiler Elektronenpaarakzeptor.

1.1 Biologische Relevanz und Verfügbarkeit von Zink

„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis machts, daß ein Ding kein Gift sei.“ Bereits im 16. Jahrhundert tätigte Paracelsus, diese Aussage, welche auf verschiedenste Stoffe aus der Natur angewendet werden kann, so auch auf die Metalle. Für den Menschen sind 11 Metalle essentiell: Natrium, Magnesium, Kalium, Calcium, Mangan, Eisen, Nickel, Kobalt, Kupfer, Molybdän und Zink, wobei die zuletzt genannten in Milligrammmengen gesundheitsschädliche oder toxische Wirkungen auf den Menschen haben können, was auf der Bildung freier Radikale und der Auslösung von Fenton-Reaktionen, hervorgerufen durch oxidativen Stress, beruht (Vahrenkamp, 1973; Nies, 1999). Des Weiteren wirken die Metalle toxisch durch unspezifische Wechselwirkungen mit Aminosäureresten von Proteinen. Eine Wechselwirkung findet in diesem Fall mit Imidazol-Gruppen von Histidin-Resten oder den Thiol-Gruppen von Cystein-Resten statt (Westenberg and Guerinot 1997; Nies, 2004, part II.1). So können Mangel und Überschuss dieser zu den Schwermetallen zählenden Biometalle zu schwerwiegenden Krankheiten führen. Dies führte dazu, dass die WHO diese Metalle auf die Liste der Stoffe aufnahm, die toxische Wirkungen hervorrufen und nicht medizinisch verwendet werden (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision [Stand 17.07.2015], <https://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-who/kodesuche/onlinefassungen/htmlamtl2016/block-t51-t65.htm>). Vergiftungserscheinungen beim Menschen treten beispielsweise durch einen oralen Konsum von

Zinksalzen ab einer Menge von 1 bis 2 g auf und gehen einher mit Übelkeit, Schwindel, Erbrechen und Koliken. Des Weiteren kann eine Erhöhung des internen Zinkspiegels zur Verdrängung von Kupferionen führen und die sogenannte Hypocuprämie (Anämien) hervorrufen, da ein erhöhter Zinkgehalt im Darm assoziiert ist mit einer erhöhten Synthese von Metallthionein. Die Affinität dieser Proteine, mit niedrigem Molekulargewicht, ist für Kupfer höher als für Zink, was zur Kupferbindung und anschließenden Exkretion der beladenen Metallthioneine durch die Enterozyten führt (Ogiso *et al.*, 1979; Igit *et al.*, 2002; Plum *et al.*, 2010).

Für tierisches Leben ist Zink als Biometall essentiell und so weist der menschliche Körper einen Zinkgehalt von etwa 1.4-2.3 g auf. Die Verteilung in den Kompartimenten ist sehr divers. Hauptsächlich an Erythrozyten gebunden befindet sich ca. 1 % des Zinks im Blut (85 % an Erythrozyten, 11 % im Plasma, 3 % an Leukozyten und 1 % an Thrombozyten) (Ternes, 2013). Im Gegensatz dazu reichert sich Zink mit einer Konzentration von 1 g/kg in der Prostata und der Retina des Auges an. Aber auch in anderen Körperbestandteilen sind Konzentrationen von 20 bis 180 mg/kg an Zink zu finden. Im menschlichen Körper gibt es einen labilen Zink-Pool, wobei Zinkionen zu 66 % an Albumin, 30 % α_2 -Makroglobulin und 2 % Aminosäuren gebunden sind. Dabei sind die Aminosäuren Cystein und Histidin in der Lage Zinkionen aus dem Albuminkomplex zu lösen (Ternes, 2013). Zink wird im Zytoplasma auch an Cysteinreiche Metallthioneine mit unterschiedlicher Affinität im nano- bis pikomolaren Bereich gebunden, die als Zinkpuffer dienen (Krezel and Maret, 2007; Peroza *et al.*, 2009). Die Anzahl der Bindungsstellen wird durch reversible Oxidation von Thiol-Resten der Metallthioneine reguliert, was den Redox-Metabolismus mit der Zinkverfügbarkeit verbindet (Wellenreuther *et al.*, 2009). Die reversible Speicherung von überschüssigem Zink in sogenannten Zincosomen erfolgt im millimolaren Bereich (Wellenreuther *et al.*, 2009). Der Vorteil dieser Speicherung ist die schnellere, reversible Sequestrierung von überschüssigem Zink im Vergleich zu Metallthioneinen und einem entgegenwirken toxischer Effekte bei erhöhter Konsumierung von Zink. Der entgegengesetzte Fall tritt durch die Ernährung mit Zink-armen Produkten auf, da der menschliche Körper nur 20 bis 40 % des oral aufgenommenen Zinks im Duodenum durch energieabhängige Prozesse resorbieren kann, treten vermehrt Mangelerscheinungen auf (Malle, 1992; Ternes, 2013). So erhöhen niedrige Zink-, Kupfer- und Eisenwerte im Blutserum das Risiko für Osteoporose (Zheng *et al.*, 2014). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Eisen-Anämie, mit einem abgesenkten Hämoglobinspiegel, einhergeht mit einer verminderten Verfügbarkeit von Zink (Houghton *et al.*, 2016). Außerdem wird Zink eine antidiabetische

Funktion zugeschrieben, da es die Insulinsekretion der β -Zellen stimuliert und die Empfindlichkeit gegenüber Insulin erhöht (Cruz *et al.*, 2017; Maret, 2017). Neben 2 Calciumionen sind allerdings auch 4 Zinkionen im Insulin durch 3 Histidinreste koordiniert, um nur einige Beispiele für die physiologische Notwendigkeit von Zink im menschlichen Körper zu nennen (Ternes, 2013). Zusammenfassend für die biologische und medizinische Bedeutung ist zu sagen, dass Zink in folgenden Bereichen von Bedeutung ist: Protein-, Nukleinsäure-, Lipid-, Carboanhydrasemetabolismus, Immunsystem, Neurotransmitter, Hormonsekretion und Signaltransduktion (Andreini *et al.*, 2006b).

Zink ist nach Eisen das abundanteste Übergangsmetall im Blut von Organismen und zellulär ist der Gehalt höher als der anderer Biometalle. 10 % der humanen Proteine, was ca. 2 800 Proteinen entspricht, sind bekannt, die Zink als Co-Faktor benutzen, wobei dieser eine katalytische, strukturelle oder regulatorische Funktion einnimmt (Andreini *et al.*, 2006b; Cvetkovic *et al.*, 2010; Maret, 2013a). Die katalytische Funktion nutzen im Menschen etwa 1 000 Proteine der bekannten 6 Enzymklassen, wobei hauptsächlich hydrolisiert wird. Eine strukturelle Funktion hat Zink, indem die globale Proteinstruktur stabilisiert wird oder durch die Bindung des Co-Faktors findet eine Konformationsänderung statt, die die Präsentation von Interaktionsflächen für Lipide, Nukleinsäuren und andere Proteine zur Folge hat. Eine regulatorische Rolle nimmt Zink bei der Signaltransduktion und der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase ein (Finney and O'Halloran, 2003; Maret, 2013b; Maret, 2017). In absteigender Häufigkeit werden zusätzlich zum Zink auch die Ionen der folgenden Elemente als Co-Faktoren genutzt: Magnesium, Eisen, Zink, Mangan, Kobalt sowie Kalium, Natrium, Nickel und Molybdän, wobei letztere selten vorkommen. Zink, Kupfer und Nicht-Häm-Eisen sind in Bakterien in 10 % des Proteoms auffindbar und in Archaea machen sie 13 % aus (Andreini *et al.*, 2006a; Andreini *et al.*, 2007; Andreini *et al.*, 2008). Kupfer und Eisen werden als Elektronenakzeptoren bzw. Elektronendonatoren benutzt und im Hämoglobin ist Eisen für den Sauerstofftransport verantwortlich (Kurtz, 1999; Johnson *et al.*, 2005).

1.2 Metallome und Metallomics

In den letzten Jahrzehnten wurden essentielle Bausteine für das Leben mit dem Begriff 'ome' zusammengefasst (Maret, 2016). Dies umfasst die Genome, Proteome, Lipidome und Glycome. Der Begriff Metallom wurde von J.P. Williams und H. Haraguchi geprägt und umfasst die Gesamtheit der Metalle innerhalb eines Gewebes oder einer Zelle (Williams, 2001; Haraguchi, 2004). Techniken die mit den 'omen' verknüpft sind, werden als 'omiks' bezeichnet. So

untersucht die Metallomik, die Interaktionen und funktionelle Zusammenhänge von Metallionen oder Metalloiden mit Genen, Proteinen und anderen Biomolekülen (Maret, 2016). Wird der Schwerpunkt auf die Erforschung der Protein-assoziierten Metalle gelegt, so handelt es sich um die Metalloproteomik (Szpunar, 2005; Bertini and Cavallaro, 2008; Shi and Chance, 2008). Proteine werden dabei unterschieden in Metall-assoziierte Proteine, die während der Reinigung ihren Co-Faktor verlieren und Metalloproteine die eine stabile Protein-Metall-Bindung aufweisen (Vallee and Wacker, 1970). Außerdem kann unterschieden werden in funktionelle, strukturelle und quantitative Metalloproteomik (Maret, 2016). Bei der strukturellen Metalloproteomik handelt es sich um die Erforschung der koordinierten Metalle an Metallbindestellen, hauptsächlich in Proteinen, wohingegen die quantitative Analyse die Konzentration der verschiedenen Metalle im System analysiert. Die funktionelle Metalloproteomik hat das Verstehen der Funktion der Metalle in Proteinen zum Ziel. Die Funktionen können in 3 Klassen unterteilt werden katalytisch, strukturell und regulatorisch (Andreini *et al.*, 2006b; Maret, 2013b). Metallionen mit katalytischer Funktion können zur Aktivierung von gebundenem Wasser, Metallliganden oder Substraten führen (Maret, 2016). Strukturelle Metallionen organisieren die Proteindomänen und bestimmen somit die Tertiärstruktur, was einhergehen kann mit der Präsentation von Domänen für Protein-Protein-Interaktionen. In ihrer regulatorischen Funktion binden Metallionen transient und dienen somit als Effektor des Proteins. Einem Metallion kann allerdings nicht in jedem Fall nur eine dieser drei Funktionen zugeordnet werden, sondern es kann auch zu Kombinationen kommen. Die Metall-Protein-Interaktion erfolgt in jedem Fall direkt als Co-Faktor oder das Protein bindet eine Metall-assoziierte prosthetische Gruppe. Für diese Bindungen müssen sowohl geometrische als auch chemische Voraussetzungen erfüllt sein. Als Donor im Fall von Zink-Protein-Komplexen dienen der Sauerstoff von Glutaminsäure und Asparaginsäure, Stickstoff von Histidin oder Schwefel von Cystein als mögliche Bindepartner, die Zink verzerrt tetraedrisch koordinieren, wobei das Zinkzentrum asymmetrisch vorliegt (Waldron *et al.*, 2009; Ternes, 2013). Das Zink-Finger-Motiv ist die abundanteste Form eines Zink-Bindemotives und besteht im Idealfall aus 4 Cysteinresten mit zwei CxxC-Motiven, die durch eine Schleife von 12 bis 13 Aminosäuren getrennt sind (Andreini *et al.*, 2006b; Ternes, 2013). Ein Zink-Finger-Motiv kann allerdings auch aus 2 Cysteinresten und 2 Histidinresten bestehen (Miller *et al.*, 1985). Erfolgt eine Koordination des Zinkions durch Histidin, Cystein, Glu/Asp und einen H₂O/OH-Liganden führt dies zu einem Zn²⁺-OH-Komplex, der sowohl nucleophile als auch elektrophile Reaktionspartner aktivieren kann, was eine wichtige Voraussetzung für die

Hydrolyse ist (Ternes, 2013). In Alkoholdehydrogenasen ist ein weiteres Zink-Bindemotiv zu finden $Cx_2Cx_2Cx_7C$ (Maret, 2016). Zink-Metalloenzyme sind in allen 6 Enzymklassen zu finden und Beispiele sind Malat-, und Glutamatdehydrogenasen, Superoxiddismutasen, Phospholipasen C, α -Amylasen, Elastasen, Kollagenasen, RNA-Ligasen, DNA-Polymerase, Carboxypeptidasen, Carboanhydrasen, Oxidoreduktasen und Glutathion-Peroxidasen (Ternes, 2013; Maret, 2016). Beeinflusst wird das Metallom durch die Verfügbarkeit der essentiellen Metalle. Aus diesem Grund ist der Aufbau und Erhalt einer Metallhomöostase essentiell. Die Aufrechterhaltung der bakteriellen Zinkhomöostase ist weitestgehend bekannt.

1.3 Zinkhomöostase in *C. metallidurans*

Als Modellorganismus zur Untersuchungen der Metallhomöostase wird das Gram-negative β -Proteobakterium *Cupriavidus metallidurans* CH34, früher *Wautersia metallidurans*, *Ralstonia metallidurans* und *Alcaligenes eutrophus* genutzt, welches angepasst ist an eine Nische mit hohen Schwermetallkonzentrationen (Goris *et al.*, 2001; Vandamme and Coenye, 2004; Vaneechoutte *et al.*, 2004). Gram-negative Organismen zeichnen sich durch den Besitz von 2 Reaktionsräumen (Zytoplasma und Periplasma) aus, welche durch eine hydrophobe, selektive und permeable Biomembran voneinander getrennt sind (Nikaido, 1992).

1976 konnte dieser Modellorganismus aus den Sedimenten eines Dekantationstanks einer belgischen Zinkmine isoliert werden. Weitere Eigenschaften des fakultativ aeroben chemolithotrophen Bakteriums sind eine stäbchenförmige und begeißelte Morphologie, sowie das Vorkommen in Wasser und Boden (Mergey *et al.*, 1978; Mergey *et al.*, 1985).

Für das Überleben an extremen Standorten sind genetisch verankerte Eigenschaften notwendig. Im Fall von *C. metallidurans* CH34 sind im Genom eine Vielzahl von Resistenzdeterminanten auf 2 Chromosomen, sowie den Megaplasmiden pMOL28 (171 kb) und pMOL30 (233 kb) lokalisiert (Mergey *et al.*, 1978; Mergey *et al.*, 1985; Legatzki *et al.*, 2003; Munkelt *et al.*, 2004; Monchy *et al.*, 2007; von Rozycki and Nies, 2009; Janssen *et al.*, 2010). Auf pMOL30 sind Resistenzen gegenüber Co^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} und auf pMOL28 Resistenzen gegenüber Co^{2+} , Ni^{2+} und Cr^{3+} kodiert (Collard *et al.*, 1994; Taghavi *et al.*, 1997; Mergey *et al.*, 2003; Monchy *et al.*, 2007). Eine Resistenz gegenüber Hg^{2+} wird durch die Quecksilber-Transposons Tn4378 (pMOL28) und Tn4380 (pMOL30) vermittelt (Diels *et al.*, 1985). In der ersten Ebene gelangen Metallionen bei Gram-negativen Bakterien über die äußere Membran durch wassergefüllte Kanäle ins Periplasma, die als Porine bezeichnet werden (Nikaido, 1992). Die Aufnahme von Metallen in den zytoplasmatischen Raum wird durch Transporter gewährleistet (Nikaido and

Saier, 1992). Diese Transportmechanismen können einzelne oder mehrere Transmembranhelices aufweisen, die die Biomembran durchspannen (Dalbey *et al.*, 2000). Es werden passive und aktive Transporte unterschieden, wobei der aktive Transport unter Energieaufwendung gegen einen Konzentrationsgradienten stattfindet (Nikaido and Saier, 1992). Des Weiteren wird zwischen Efflux und Import unterschieden.

Der Efflux gehört zu den aktiven Transportvorgängen gegen ein Konzentrationsgefälle und ist für die Eliminierung überschüssiger Substanzen in erster Ebene aus dem Zytoplasma ins Periplasma und in zweiter Ebene aus dem Periplasma in den extrazellulären Raum verantwortlich. Die Entgiftung von Zink erfolgt in *C. metallidurans* im Stamm CH34 ebenfalls auf zwei Ebenen. In der ersten Ebene wird Zink durch die P_{IB4}-Typ ATPase CzcP, welche auf dem Megaplasmid pMOL30 kodiert ist, aus dem Zytoplasma ins Periplasma transportiert (Scherer and Nies, 2009). Der Export von Zink erfolgt allerdings auch durch die P_{IB2}-Typ ATPasen ZntA und CadA, welche durch MerR-Typ-Regulatoren kontrolliert werden (Abb. 1), wobei *zntA* und *cadA* auf den Chromosomen kodiert sind (Legatzki *et al.*, 2003; Scherer and Nies, 2009).

Eine weitere Determinante für die Detoxifizierung sind Proteine der RND-Familie (*resistance nodulation cell division*). Der Export von Schwermetallen wird realisiert durch die HME-Unterfamilie (*heavy metal efflux family*). Ein strukturelles charakteristisches Merkmal dieser Unterfamilien sind 12 putative transmembrane Helices (TMH) mit einem periplasmatischen *loop* zwischen TMHI und TMHII, sowie zwischen TMHVII und TMHVIII (Goldberg *et al.*, 1999). In *C. metallidurans* gehört die CzcCBA-Effluxpumpe, welche auf pMOL30 kodiert ist zu dieser Familie (Abb. 1), die im Gegensatz zu P-Typ ATPasen und CDF-Proteinen Schwermetallionen aus dem Periplasma über die äußere Membran in den extrazellulären Raum transportieren (Rensing *et al.*, 1997).

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die Detoxifizierung auf 2 Ebenen erfolgt. In der ersten Stufe transportieren P-Typ ATPasen und CDF-Proteine Metalle aus dem Zytoplasma ins Periplasma. Diese Transportmechanismen sind in *C. metallidurans* zum größten Teil auf dem Chromosom kodiert. RND-Proteine stellen die zweite Stufe der Entgiftung dar und transportieren die Metalle aus dem Periplasma in den extrazellulären Raum.

Importer sind die Gegenspieler der Exporter bei der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase. In *C. metallidurans* sind 9 Transporter für divalente Kationen mit hohen und niedrigen Spezifitäten bekannt, von denen lediglich einer einen Einfluss auf die Zinkhomöostase hat

(Grosse *et al.*, 2016; Herzberg *et al.*, 2016). Diese können unterteilt werden in primäre und sekundäre Aufnahmesysteme, die in *C. metallidurans* auf den Chromosomen kodiert sind. Sekundäre Aufnahmesysteme zeichnen sich durch einen passiven Transport aus, wobei ein elektrochemischer Gradient über eine Membran als Antrieb dient. Im Unterschied dazu nutzen die primären Aufnahmesysteme energiereiche Verbindungen wie ATP, PEP (Phosphoenolpyruvat), Redoxenergie oder Licht (Saier *et al.*, 2006; Nies, 2016).

Für den spezifischen Zinkimport konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Zinkionen in *E. coli* einem aktiven Transport unterliegt und somit energieabhängig ist (Bucheder and Broda, 1974). Der bakterielle ZIP-Transporter (ZRT, IRT-like Protein) ZupT wurde in *E. coli* als erstes Aufnahmesystem identifiziert (Grass *et al.*, 2002). ZupT besitzt in *E. coli* ein breites Substratspektrum und transportiert neben Zink und Eisen vermutlich auch Kobalt, Mangan, Cadmium und Nickel aus dem Periplasma ins Zytoplasma (Grass *et al.*, 2005; Taudte and Grass, 2010). Ein Transporter dieser Familie konnte ebenfalls in *C. metallidurans* identifiziert werden. Im Gegensatz zum ZupT_{*E. coli*} ist ZupT_{*C. metallidurans*} nicht konstitutiv exprimiert sondern wird durch Zinkmangel induziert und bei Überschuss reprimiert (Kirsten *et al.*, 2011; Herzberg *et al.*, 2014a). Da es in *C. metallidurans* kein ZnuABC-System gibt, übernimmt ZupT die Aufgabe des Hauptaufnahmesystems für Zink (Herzberg *et al.*, 2014a). Die Repression der Expression erfolgt durch die Bindung des globalen Regulators Zur an eine Zur-Bindebox im Promotorbereich von *zupT* (Schmidt *et al.*, 2014).

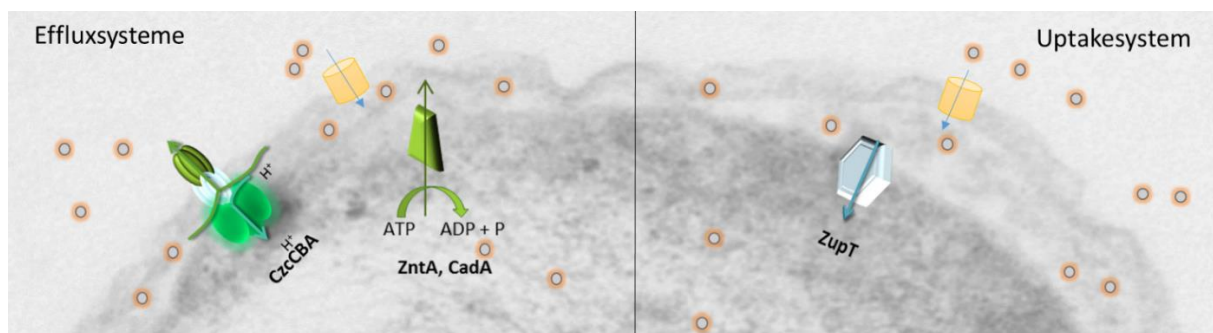


Abbildung 1: Übersicht der in *C. metallidurans* CH34 an der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase beteiligten Transporter. Das Periplasma wird mit Hilfe des RND-Systems CzcCBA entgiftet und das Zytoplasma durch die P-Typ ATPasen ZntA und CadA (Nies, 2016). Das Hauptzinkaufnahmesystem ist der ZIP-Transporter ZupT.

1.3.1 Rolle des globalen Zinkregulators Zur in der Zinkhomöostase

Die Verfügbarkeit von Zink in der Zellumgebung unterliegt einem stetigen Wechsel, der eine schnelle Adaptation der Organismen an diese Fluktuation für das Überleben voraussetzt. Für diese Prozesse sind Metall-Regulatoren zuständig, die zum einen den Efflux (z.B. ZntR) oder

die Aufnahme (z.B. Zur) regulieren (Brocklehurst *et al.*, 1999; Hitomi *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2014; Schmidt, 2016). Bei diesen Regulatoren wird unterschieden in Metall-de-Repressoren (z.B. CopY), Metall-Repressoren (z.B. Fur-Familie) und Metall-Aktivatoren (MerR-Familie) (Giedroc and Arunkumar, 2007; Waldron *et al.*, 2009). Der globale *zinc uptake regulator* Zur gehört zur Fur-Familie (*ferric uptake regulator*) und ist für die Regulation der Zinkaufnahmesysteme in verschiedenen Organismen, wie *E. coli*, *B. subtilis*, *L. monocystogenes* oder *S. aureus* verantwortlich (Gaballa and Helmann, 1998; Patzer and Hantke, 1998; Dalet *et al.*, 1999; Lindsay and Foster, 2001). Der Repressor bildet durch Bindung eines Zinkions pro Monomer ein Homodimer, welches in der Zelle für die Sensierung der Zinkkonzentration zuständig ist und bei erhöhter freier Verfügbarkeit an die entsprechenden, im Promotorbereich lokalisierten Zur-Bindeboxen bindet, wobei die Transkription reprimiert wird (Lee and Helmann, 2007; Ma *et al.*, 2011). In *N. meningitides* ist Zur für die Regulation des ATP-abhängigen Transporters ZnuABC verantwortlich, welcher eine Rolle bei der Pathogenität und Virulenz des Organismus spielt (Pawlik *et al.*, 2012). ZnuABC gehört in *E. coli* ebenfalls zum Zur-Regulon, wobei in diesem Organismus auch die ribosomalen Proteine L31P, L36P, PilG und das periplasmatische Zinkbindeprotein ZinT durch Zur reguliert werden (Hantke, 2005; Gilston *et al.*, 2014). Zusätzlich zu diesen 3 zentralen zellulären Prozessen: Import, ribosomale Proteine und periplasmatische Bindeproteine, werden auch Zinkspeicherproteine durch Mitglieder der Fur-Familie reguliert (Lee and Helmann, 2007; Gilston *et al.*, 2014). Dabei konnte festgestellt werden, dass Zur_{*E. coli*} eine hohe DNA-Bindeaktivität mit einem K_d im subfemtomolaren Bereich besitzt und damit sehr sensibel gegenüber Veränderungen des internen Zinklevel ist. Aufgrund dessen wurde von Outten and O'Halloran, 2001 postuliert, dass Bakterien kein frei verfügbares Zink im Zytoplasma tolerieren.

Für eine derart affine Bindung zwischen Zur und der Promotor-DNA ist das Vorhandensein einer Bindebox notwendig. Für *E. coli* konnte eine Übereinstimmung in den Bindeboxen aller Gene des Zur-Regulons gefunden werden, die zu der Annahme führt, dass Zur_{*E. coli*} als Dimer an einen Bereich bestehend aus 2 repetitiven Sequenzen bindet und folgende Struktur besitzt: Purin-NNN-Pyrimidin-XXX-Purin-NNN-Pyrimidin (Gilston *et al.*, 2014). Erste Studien zum Zur-Regulon von *C. metallidurans* zeigten, dass Zur im Promotorbereich von *zupT* vermutlich an folgende palindromische Sequenz bindet: GCAACxxxGTTGC (Haas *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2014; Bütöf *et al.*, 2017).

Wie alle Mitglieder der Fur-Familie bindet Zur in reduzierter Form ein strukturelles Zn^{2+} (Hantke, 2001). Diese Zinkbindung erfolgt mit hoher Affinität in SiteA an zwei schwefelreiche CxxC-Motive (Zink-Finger-Motiv), welche sowohl in *E. coli* als auch in *C. metallidurans* gefunden werden konnten (Abb. 2) (Gilston *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu wird das funktionelle Zink in *E. coli* in der SiteB (stickstoff-/sauerstoffreich) durch 2 Histidine, 1 Cystein und 1 Glutaminsäure koordiniert (Abb. 2) (Outten *et al.*, 2001; Gilston *et al.*, 2014). Bei Sequenzvergleichen konnten in *C. metallidurans* keine konservierten Aminosäurereste für die Koordination des funktionellen Zinks im Vergleich zu *E. coli* gefunden werden. Analysen mit dem Programm MetalDetector v2.0 führen allerdings zu der Annahme, dass die Koordination über His7, Cys45, His55 und His61 erfolgen könnte (Abb. 2) (Passerini *et al.*, 2011). In jedem Fall ist eine Bindung von 2 mol Zink/Monomer bei voller Metallierung von Zur in *C. metallidurans* anzunehmen. Die SiteA befindet sich im C-terminalen Bereich von Zur, was nach der Bindung des strukturellen Zinkions zur Bildung eines Homodimers in diesem Bereich führt (Ma *et al.*, 2011). Das Zur-Homodimer bindet zunächst ein Zinkion in der SiteB eines der Monomere im N-terminalen Bereich, was zur Ausbildung eines asymmetrischen Dimers mit niedriger DNA-Bindeaktivität führt. Erst bei Bindung eines 4. mol Zn/Homodimer entsteht eine hohe DNA-Bindeaktivität (Lee and Helmann, 2007; Ma *et al.*, 2011). Die in Abbildung 2 in rot (DNA-Bindestellen), grün (Kooperative Aminosäurereste für die Ausbildung von Salzbrücken) und blau (Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen) dargestellten konservierten Aminosäurereste sind nach der Bindung von 2 mol Zn/Monomer für die Bindung des Homodimers an die DNA verantwortlich (Gilston *et al.*, 2014). Gilston *et al.*, 2014 konnten in

| | | |
|--|-----|--|
| Zur _{<i>E. coli</i>} (JW5714) | 1 | MEKTT-----TQELLAQA EKIC AQ RN VRL TPQRLEVLRLMSLQDGAISA |
| Zur _{<i>C. metallidurans</i>} (Rmet_0128) | 1 | MTRTTPHAAASDDAVMPGDPLATAQLRLRQLGARVTPQRLAILACLIEAPEPLTH |
| Zur _{<i>E. coli</i>} (JW5714) | 45 | YDLLDLLREAE PQAKPPTVYRALDFLLEQGFVHKVESTNSYVLC H LFDQPTH--- |
| Zur _{<i>C. metallidurans</i>} (Rmet_0128) | 56 | QAVIDHL-PAEGDVDRVTVYRVLDWLVDQGLAQKRAGNDRVFRFSLVEHEAARAE |
| Zur _{<i>E. coli</i>} (JW5714) | 97 | ---TSAMFICDRCGAVK E ECAEGVEDIMHTLA AKMGFALRHNVIEAHGLCAACVE |
| Zur _{<i>C. metallidurans</i>} (Rmet_0128) | 110 | VHRQHS HFHCTRC--DRTFCLESAGKSVAPRVPN-GFAVEHVELTVNGICAE CGR |
| Zur _{<i>E. coli</i>} (JW5714) | 149 | VEACRHPEQCQHDHSVQVKKKPR |
| Zur _{<i>C. metallidurans</i>} (Rmet_0128) | 162 | ----SHGDASAH----- |

Abbildung 2: Alignment von Zur aus *E. coli* und *C. metallidurans* zur Darstellung der konservierten Bereiche die an der Dimerisierung, DNA-Bindung oder Zinkbindung beteiligt sind (Gilston *et al.*, 2014). Rot: konservierte DNA-Bindestellen; Grün: konservierte Bereiche für die Ausbildung kooperativer Salzbrücken; Blau: Konservierte Aminosäurereste für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Orange: (SiteA) Schwefelreiche Zink-Bindestellen; Lila: (SiteB) Stickstoff/Sauerstoffreiche Zinkbindestelle.

kooperativen DNA-Protein Kristallisationsexperimenten zeigen, dass 2 Zur-Homodimere in unterschiedlicher Orientierung an die Zur-Box von *ZnuABC_{E. coli}* binden, was bedeutet, dass für die Repression 4-mal mehr Moleküle des Repressors benötigt werden als DNA.

Wie bereits erwähnt gehören Proteine unterschiedlicher Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase zum Zur-Regulon. Für diverse Organismen konnten Haas *et al.*, 2009 durch bioinformatische Methoden mögliche Zur-Bindeboxen postulieren. Dabei wurden drei strukturelle Anordnungen in den Genomen identifiziert. Die erste Möglichkeit ist, dass *zur* in einem Operon mit dem zu regulierenden Genen liegt. Variante Nummer zwei ist, dass die zu kontrollierenden Gene in Clustern mit Genen von Zinktransportern kodiert sind. Die letzte Möglichkeit ist, dass die Gene in Clustern mit Paralogen, die für Zink-abhängige Proteinen kodieren, sind. In *C. metallidurans* konnten Beispiele für alle 3 Vorkommen gefunden werden. So befindet sich eine Zur-Bindebox im Promotorbereich von *zupT*, dessen Zugehörigkeit zum Zur-Cluster schon gezeigt werden konnte (Abb. 3) (Schmidt *et al.*, 2014; Bütof *et al.*, 2017). Außerdem konnten 2 putative Zur-Bindeboxen im Promotorbereich des Genes *cobW₁*, einer putativen G3E P-loop GTPase ermittelt werden, welches sich in einem Gen-Cluster mit Genen befindet, die für Paraloge von Zink-abhängigen Proteinen kodieren. Im dritten Cluster befinden sich ebenfalls 2 putative Zur-Bindeboxen, eine im Promotorbereich von *zur* und eine im Promotorbereich von *cobW₃*, kodierend für eine weitere putative G3E P-loop GTPase. In diesem Zur-Cluster sind *zur* und *cobW₃* zusammen mit einem dritten Paralogen der G3E P-loop GTPasen *cobW₂* und dem globalen Transkriptionsregulator *dksA* kodiert, welcher in *Pseudomonas aeruginosa* eine Funktion in der Zinkhomöostase hat (Blaby-Haas *et al.*, 2011).

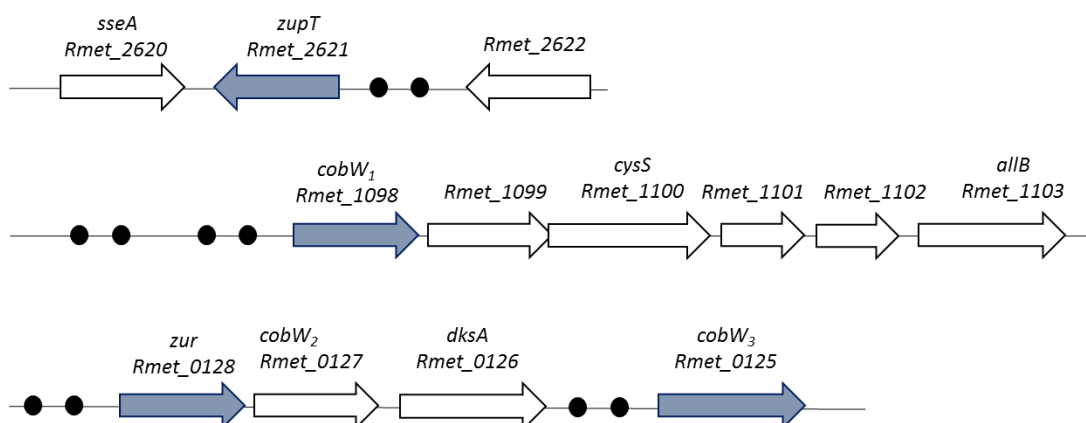


Abbildung 3: Übersicht der Gen-Cluster in denen *zupT* und die Gene der putativen Metall-Chaperone *cobW₁*, *cobW₂* und *cobW₃* annotiert sind, sowie die vorhergesagten Zur-Bindeboxen (Haas *et al.*, 2009). Die palindromischen Sequenzen innerhalb der Promotorregionen der putativen Gene des Zur-Regulons (blaue Pfeile) und die möglichen Bindeboxen (schwarze Kreise) sind dargestellt.

Basierend auf diesen Daten stellte sich bei der Bearbeitung der vorliegenden Arbeit zunächst die Frage, ob die postulierten Gene zum Zur-Regulon gehören und unter welchen Bedingungen die Gene reprimiert werden?

1.3.2 Metall-Chaperone

Neben der Metallaufnahme, -Export und -Regulation sind in der Zelle Speicherung und Mobilisierung, sowie die spezifische Insertion von Metallen ein essentieller Pfeiler der Metallhomöostase. Dies ist umso wichtiger, denn ohne selektive Inserierung, würden Proteine divalente Metallkationen nach ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften einbauen, beruhend auf der Irving-Williams-Serie: $Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$ (Irving and Williams, 1948). Dies hätte bei einer Gleichverteilung der Metalle in der Zelle zur Folge, dass alle Metall-Proteine bei Aufnahme von frei verfügbarem Metall, Kupfer-Proteine wären. In der Zelle liegen allerdings die Metalle in unterschiedlichen Konzentrationen vor, so ist in *C. metallidurans* die Konzentration an Zink 150-fach niedriger als die des Magnesiums und 10-fach geringer als die von Eisen, wohingegen die Konzentration von Kupfer nur halb so groß ist wie die des Zinks (Herzberg *et al.*, 2014a). Wird die Irving-Williams-Serie angewendet, würde dies zur Folge haben, dass die meisten Proteine Magnesium, gefolgt von Eisen und Zink als Co-Faktoren besitzen. Jedoch machen Magnesium- und Zink-Proteine mit ca. 16 und 9 % den Großteil der bekannten Metalloenzyme aus (Waldron and Robinson, 2009; Waldron *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2014). Eine Begründung dafür sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Metalle und Proteine die die Metallpräferenz beeinflussen. Zu diesen Eigenschaften gehören Valenz, Ionenradius, Koordinationsgeometrie, Anzahl der Liganden, Liganden der zweiten Schale, Effekte der Proteinmatrix, sowie die Eigenschaften des Liganden Nettoladung, Dipolmoment, Polarisierung, Ladungsabgabe- und Aufnahmevermögen (Dudev and Lim, 2014). Trotz dieser vielen unterschiedlichen Charakteristika, die zur Insertion bzw. Bindung eines Co-Faktors abgestimmt werden können, gibt es bekannte Beispiele wie die β -Galaktosidase und die Tryosinkinase, wo das Magnesiumion durch ein Zink ersetzt wird, was eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat (Sun and Budde, 1999; Fernandes *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2014).

Diese Falschmetallierung hat in der Zelle meist einen selektiven Abbau, ein Recycling oder eine partielle Entfaltung der Proteine zur Folge. Allerdings kann durch eine korrekte Geometrie des eingebauten Metalls die Tertiärstruktur des Proteins stabilisiert werden (Foster *et al.*, 2014). Im Kontrast dazu gibt es auch promiskuitive Proteine die mit unterschiedlichen Metall-Co-

Faktoren die Funktionen erfüllen können. Ein Beispiel sind die Superoxiddismutasen von *Streptococcus mutans* und *Thermus filiformis*, die ohne Verlust der Enzymaktivität die divalenten Kationen Mn^{2+} und Fe^{2+} verwenden können (Martin *et al.*, 1986; Mandelli *et al.*, 2013). Eine Insertion von Fe^{2+} in die Mangan-abhängige SOD von *E. coli* hat allerdings eine Inaktivierung des Proteins zur Folge (Culotta *et al.*, 2006).

Die selektive Insertion von Co-Faktoren wird von Metall-Chaperonen durchgeführt. In *B. subtilis* konnte für Kupfer-Chaperone gezeigt werden, dass sie am Efflux und an der Insertion von Kupfer in Cu-Zn-Superoxiddismutasen (Cu-Zn-SOD) beteiligt sind (Palumaa, 2013). Die Kupfer-Detoxifizierung des Zytoplasmas erfolgt in *B. subtilis* durch das Kupfer-Chaperon CopZ und die ATPase CopA (Banci *et al.*, 2001, Palumaa, 2013). CopZ bindet die Kupferionen und transportiert sie zu CopA, wo es zur Ausbildung eines Heterodimers kommt. Im Heterodimer werden die Kupferionen von CopZ auf das Metall-Bindemotiv (GMxCxxC) von CopA übertragen und das Kupfer aus dem Zytoplasma heraus transportiert (Wimmer *et al.*, 1999; Banci *et al.*, 2003, Palumaa, 2013). In *Archaeoglobus fulgidus* konnte die Detoxifizierung des Zytoplasmas über den CopZ-CopA-Weg ebenfalls gezeigt werden (Padilla-Benavides *et al.*, 2013). Die Insertion von Kupfer in das katalytische Zentrum der Cu-Zn-SOD erfolgt im Zytoplasma durch das Kupfer-Chaperon CCS, welches 2 spezifische Domänen und ein CxxC-Motiv besitzen (Culotta *et al.*, 1997). Das CxxC-Motiv ist nicht nur für die Co-Faktorbindung zuständig, sondern es trägt auch zur Stabilität der Cu-Zn-SOD bei, indem es an der Ausbildung der Disulfidbrückenbindung beteiligt ist (Furukawa *et al.*, 2004; Padilla-Benavides *et al.*, 2013). Die Domäne 1 besteht aus dem Metallbinde-Motiv, welches auch für CopZ beschrieben wurde. Die Domäne 2 ist für die Interaktion mit der SOD zuständig (Lamb *et al.*, 1999; Boal and Rosenzweig, 2009). In Eukaryoten werden Kupferionen für die Cytochrom c-Oxidase benötigt. Das Kupferion wird durch die Sco- und Cox-Chaperone in das Enzym inseriert (Robinson and Winge, 2010).

Neben Kupfer ist auch die Metallierung von Nickel-Protein am Beispiel von [NiFe]-Hydrogenasen und Ureasen untersucht. Für den Einbau des Co-Faktors in die Enzyme sind P-loop GTPasen verantwortlich (Kuchar and Hausinger, 2004; Kim *et al.*, 2005; Leach and Zamble, 2007). Die G3E P-loop GTPase HypB kann zwei Funktionen übernehmen, es kann zum einen als Insertase und zum anderen als Metall-Chaperon fungieren (Haas *et al.*, 2009). Als Insertion wird der energieabhängige Einbau von Co-Faktoren in Target-Proteine bezeichnet. Metall-Chaperone sind im Gegensatz dazu für Speicherung und Transport der Metalle verantwortlich. Voraussetzung für die Funktion als Chaperon ist ein Histidin-Einschub

im N-terminalen Bereich des Proteins (Haas *et al.*, 2009). Dies konnte 1995 für HypB in *Bradyrhizobium japonicum* gezeigt werden (Fu *et al.*, 1995). HypB_{*B. japonicum*} besitzt in diesem Organismus C-terminal 24 Histidine in einer Sequenz mit einer Länge von 34 Aminosäuren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass HypB_{*B. japonicum*} 18 Nickelionen pro Dimer binden kann. In *E. coli* verfügt HypB über keine Histidin-reichen Bereiche, bildet allerdings mit dem Nickel-Chaperon HypA bzw. dem Homolog HybF und SlyD einen Komplex, der für die Insertion des Nickel-Liganden in die [NiFe]-Hydrogenase verantwortlich ist (Maier *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 2009; Kaluarachchi *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2012). Lacasse *et al.*, 2016 postulierten den Zyklus des HypB_{*E. coli*} ausgehend von 2 Monomeren, die für die Dimerisierung GTP benötigen. Die Bindung des Co-Faktors Nickel führt anschließend zur Hydrolyse des GTP einhergehend mit einer Konformationsänderung, die die Interaktion mit dem Hydrogenasenreifungsprotein HypA_{*E. coli*} ermöglicht, indem das Homodimer zerfällt und das Monomer mit gebundenem Nickel und GDP die Interaktionsfläche präsentiert. Eine andere Alternative ist, dass SlyD die Funktion als Insertase und Chaperon übernimmt (Zhang *et al.*, 2005; Leach *et al.*, 2007; Kaluarachchi *et al.*, 2012).

An der Reifung der Nickel-abhängigen Ureasen, welche Harnstoff in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid spalten ist die G3E P-loop GTPase UreG beteiligt. UreG aus *E. coli* besitzt keinen Histidin-*stretch* und fungiert als Insertase, indem es Nickel auf den UreDEF-Komplex überträgt (Zambelli *et al.*, 2013). In diesem Fall übernimmt das Reifungsprotein UreE die Funktion des Chaperons und ist damit für die Speicherung von Nickel verantwortlich (Soriano *et al.*, 2000; Remaut *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu Nickel und Kupfer ist wenig über die Speicherung, Transport und Insertion von Zink bekannt. Haas *et al.*, 2009 konnten putative Zink-Chaperone identifizieren, die möglicherweise zum Zur-Regulon gehören. In Abbildung 3 sind CobW_{1/2/3} in den Gen-Clustern mit annotierten Zur-Bindeboxen zu sehen. Diese Proteine gehören wie UreG und HypB zu den P-loop GTPasen der G3E-Familie, allerdings zur COG0523-Unterfamilie. Diese Familie ist durch ein spezifisches G-Motiv (ein Glu befindet sich an Stelle eines Asp im Walker B-Motiv) und ein intaktes *base recognition*-Motiv, mit einer Spezifität für Guanin, deutlich abgegrenzt von den restlichen Familien der SIMIBI-Klasse (*Signal recognition GTPases*, *MinD superfamily*, and *BioD superfamily*), wobei die Einteilung durch gemeinsame strukturelle und sequenzielle Eigenschaften erfolgte (Leipe *et al.*, 2002).

Im allgemeinen katalysieren die GTPasen eine nukleophile Substitution am γ -Phosphat, die zur Spaltung des Nukleotids in GDP und Pi führt (Scheffzek and Ahmadian, 2005). Die Spezifität der Enzyme für das Nukleotid GTP beruht auf der Nukleotidbindestelle mit dem NKxD-Motiv, wobei die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Glycinrest im Walker B-Motiv und dem terminalen γ -Phosphat des Sauerstoffs gebildet wird (Bourne *et al.*, 1991). Zu dieser Klasse zählen metabolische Enzyme, wie Kinasen, *signal recognition particle* GTPasen aber auch MinD ähnliche Proteine die an der Lokalisation von Proteinen beteiligt sind (Leipe *et al.*, 2002). Allgemein handelt es sich bei 10 – 18 % aller Proteine der meisten zellulären Organismen um P-loop NTPasen, bei denen in der Aminosäuresequenz N-Terminal ein flexibler *loop* im Walker A-Motiv vorhanden ist, welches zwischen einem β -Faltblatt und einer α -Helix lokalisiert ist (Saraste *et al.*, 1990; Koonin *et al.*, 2000). Strukturell können die P-loop NTPasen in 2 Gruppen unterteilt werden (Abb. 4): Gruppe 1 beinhaltet die Kinasen und GTPasen, bei denen die Motive für die Ausbildung des P-loops und das Walker B-Motiv in direkter Nachbarschaft liegen. Zur 2. Gruppe gehören 5 Superklassen, wie die der RecA/F₁F₀-Proteine mit einer Insertion eines zusätzlichen β -Faltblattes zwischen diese beiden Motive (Leipe *et al.*, 2002). Innerhalb der P-loop NTPasen nehmen die GTPasen aufgrund des Walker B-Motivs, mit einem konservierten Glycin- und Glutaminsäurerest, sowie dem distalen Nukleotid-Bindemotiv eine Rolle als Superklasse ein (Bourne *et al.*, 1991). GTPasen unterlaufen *molecular switches*, d.h. die Bindung und Hydrolyse von GTP in der G-Domäne sorgt für Konformationsänderungen, was einhergeht mit der Effektivität einer Interaktion mit einem Makromolekül (Vetter and Wittinghofer, 2001). Die weitere Unterteilung erfolgt aufgrund struktureller und Sequenz spezifischer Eigenschaften zum einen in die TRAFAC-Klasse (*translation factor-related*), zu denen beispielsweise Proteine der Ras-Familie gehören und die bereits erwähnte SIMIBI-Klasse (Leipe *et al.*, 2002). Beide Klassen zusammen umfassen 20 Familien, welche in 57 Unterfamilien kategorisiert wurden. 2 Superfamilien der SIMIBI-Klasse, zu denen MinD und BioD gehören, grenzen sich von 4 weiteren Familien ab. Die G3E Familie ist eine dieser separierten Familie: durch ein abgewandeltes konserviertes Walker A-Motiv (GxxGxGK), eine Koordinierung des Magnesiumions durch einen Asparaginsäurerest im zweiten β -Faltblatt und das Auftreten weiterer Asparaginsäurereste im Walker B-*strand*, führen zur Einordnung der Proteine in die SIMIBI-Klasse (Leipe *et al.*, 2002). Abgegrenzt wird diese Familie von anderen Vertretern durch einen Glutaminsäurerest im Walker B-Motiv und ein intaktes NKxD Nukleotidbindemotiv. Die G3E P-loop GTPasen lassen sich wiederum in 4 Unterfamilien einordnen, zum einen HypB-, UreG-, MeaB-ähnliche Proteine und die COG0523-Unterfamilie

(Leipe *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2009). Die COG0523-Unterfamilie ist in allen Lebenswelten zu finden und ist untergliedert in 15 Untergruppen. Die Gruppenmitglieder zeichnen sich durch einen ähnlichen Aufbau aus. In Abbildung 5 ist ein Plot der konservierten Aminosäuren gezeigt, mit der N-terminalen GTPase-Domäne und dem variablen C-terminalen Bereich. In der GTPase-Domäne befinden sich das Walker A- und Walker B-Motiv. Außerdem konnten ein GCxCC-Motiv (Metallbinde-Motiv) und ein NKxD-Motiv (*base recognition*-Motiv) annotiert werden (Haas *et al.*, 2009).

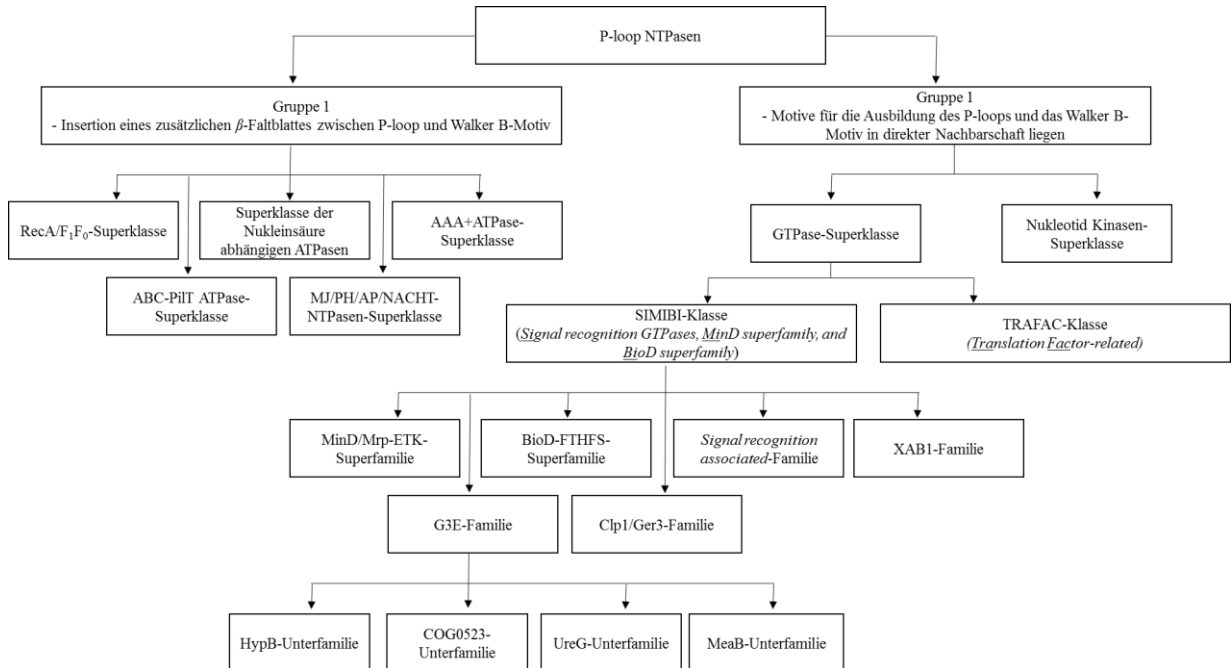


Abbildung 4: Einordnung der P-loop NTPasen in die Klassen und Familien nach Leipe *et al.*, 2002.

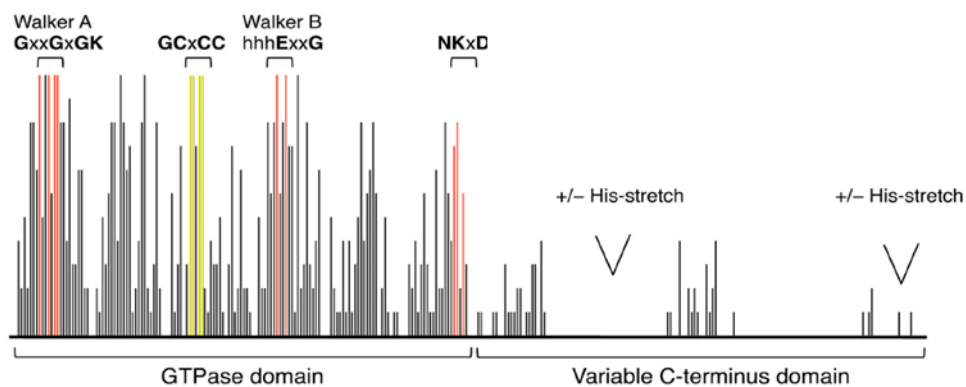


Abbildung 5: Putative Struktur zur COG0523-Unterfamilie der G3E P-loop GTPasen erstellt aus einem Plot konservierter Aminosäuren (Haas *et al.*, 2009). Die putativen Metall-Chaperone CobW₁, CobW₂ und CobW₃ der COG0523-Unterfamilie besitzen im N-Terminus die konservierte GTPase-Domäne. Der C-Terminus der Proteine unterscheidet sich, so weist CobW₁ im Gegensatz zu CobW₂ und CobW₃ keinen His-reichen Bereich auf. CobW₂ besitzt einen internen His-Einschub und CobW₃ einen endständigen C-terminalen His-Einschub.

Ein variabler C-Terminus konnte für 40 % der Proteine gezeigt werden. Der C- Terminus weist Histidin-Einschübe auf, die intern oder endständig sein können. Aufgrund der Variabilität der C-terminalen Domäne werden die Gene, die für diese Gruppe kodieren, als *segmentally variable genes* bezeichnet (Zheng *et al.*, 2004). Zheng *et al.* konnten zeigen, dass Proteine die derartig konservierte Regionen aufweisen und dennoch variabel innerhalb der Gruppe sind, eine Rolle bei der Adaptation an Stress spielen. So wird davon ausgegangen, dass die Proteine der COG0523-Unterfamilie an der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase beteiligt sind. Vertreter der Unterfamilie wurden zunächst als Teil der Cobalamin-Biosynthese in *Pseudomonas denitrificans* annotiert (Crouzet *et al.*, 1991). Die Funktion wurde bestätigt durch Heldt *et al.*, 2005 bei der aeroben Synthese von Vitamin B12 in *Rhodobacter capsulatus*. Eine Disruption der jeweiligen Gene führte zu einer fehlerhaften Synthese des Co-Faktors.

Insgesamt konnten 65 homologe Gene von CobW in verschiedenen Organismen annotiert werden, wobei 54 dieser Gene eine Rolle bei der Cobalaminbiosynthese spielen könnten, da sie unter Kontrolle eines B₁₂-Riboswitches stehen. Die restlichen 11 Gene stehen in keinem Zusammenhang mit der Cobalaminbiosynthese, da sie vermutlich durch Zur reguliert werden (Haas *et al.*, 2009). Haas *et al.*, 2009 postulierten Zur-Bindestellen, die auf eine Funktion im Zinkkreislauf schließen lassen. In *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass *yicC* unter der Kontrolle von Zur steht und das bei Zinkmangelbedingungen die Expression initiiert wird. YciC ist ebenfalls eine P-loop GTPase die zur COG0523-Unterfamilie gehört, aber fälschlicherweise ursprünglich als *low-affinity* Transporter annotiert wurde (Gaballa *et al.*, 2002; Gabriel *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009).

YeiR und YjiA konnten in *E. coli* ebenfalls als Mitglieder der COG0523-Unterfamilie annotiert werden (Blaby-Haas *et al.*, 2012; Sydor *et al.*, 2013). Eine Deletion von *yeiR* führt zu einem sensitiven EDTA- und Cadmium-Phänotyp, was ein Indiz für eine veränderte Zinkhomöostase ist. Biochemische *in vitro* Studien ergaben, dass YeiR Zinkionen mit nanomolarer Affinität bindet und dass diese Bindung sowohl zur Dimerisierung des Proteins führt als auch zu einer erhöhten GTPase-Aktivität (Blaby-Haas *et al.*, 2012). In biochemische Experimenten mit YjiA konnte festgestellt werden, dass es sich um ein cambialistisches bzw. promiskuitives Protein handelt, welches 1 mol Kobalt, 2 mol Nickel oder 4 mol Zink in Lösung binden kann (Sydor *et al.*, 2013). YjiA weist als Apo-Protein eine GTPase-Aktivität auf, allerdings führt die Metallbindung zu einer verminderten GTPase-Aktivität, was vermutlich an einer zusätzlichen Metallbindestelle bestehend aus einem Cysteinrest und 2 Glutamatresten liegt, die in

unmittelbarer Nachbarschaft zur Nukleotidbindestelle kodiert sind. Dies führt vermutlich zur Verdrängung des gebundenen Nukleotids (Khil *et al.*, 2004; Sydor *et al.*, 2013).

Im Stammbaum (Abb. 6), welcher mit dem Programm Genious8 (<https://www.geneious.com/>; Kearse *et al.*, 2012) per Neighbor-Joining erstellt wurde, liegen einem globalen Alignment 20 Aminosäuresequenzen von Vertretern der COG0523-Unterfamilie, sowie Sequenzen von UreG, HypB und MeaB zu Grunde. Dieser zeigt die Abgrenzung der Unterfamilien der G3E-Familie voneinander. So bildet MeaB aus *E. coli* einen einzelnen Zweig, der sich von den Proteinen der UreG-Unterfamilie (Grün) aus *E. coli* und *C. metallidurans* abzweigt. Die nächste Abzweigung stellen die HypB-Proteine (Lila) der beiden Organismen dar. Für eine weitere Einordnung der putativen Metall-Chaperone aus *C. metallidurans* in die COG0523-Unterfamilie wurden diese mit Vertretern der Organismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Acinetobacter baumannii*, *Synechocystis sp.*, *P. denitrificans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Cupriavidus necator* und *Cupriavidus taiwanensis* verglichen. Im Stammbaum ist ersichtlich, dass die eukaryotischen Vertreter der COG0523-Unterfamilie einen separaten Zweig bilden. Evolutionär scheinen YeiR aus *E. coli*, sowie ein Protein des Cyanobakteriums die höchste Homologie zu den eukaryotischen Vertretern zu haben.

Der 2. Vertreter aus *E. coli*, YjiA findet sich in einem Abzweig mit CobW₂ aus *C. metallidurans* (Blau) wieder, in dem sich auch andere Proteine der Burkholderiaceae befinden. Von dieser Entwicklungslinie getrennt sind Vertreter aus *B. subtilis*, *C. necator* und *C. taiwanensis* zu finden, von denen sich CobW₁ und CobW₃ aus *C. metallidurans*, sowie ein Vertreter aus *C. necator* abzweigen (Rot). Das 1991 als Teil der Cobalaminbiosynthese annotierte Gen *cobW* aus *P. denitrificans* befindet sich im Stammbaum in näherer Umgebung zu einem Paralogen des Cyanobakteriums und in weiterer Entfernung zu YeiR aus *E. coli* und CobW₂ aus *C. metallidurans*, was eine hohe Diversität innerhalb der Unterfamilie zeigt (Crouzet *et al.*, 1991).

Bei genauerem Hinsehen lässt sich erkennen, dass die 3 Proteine CobW_{1/2/3} variable Strukturen aufweisen. Im Allgemeinen weisen alle die Merkmale der COG0523-Unterfamilie auf. Die Unterschiede sind im C-Terminus zu finden, denn CobW₁ besitzt keine Histidin-reiche Region. In der Aminosäuresequenz von CobW₂ lässt sich ein interner Histidin-Einschub im C-Terminus finden und CobW₃ besitzt den Histidin-Einschub endständig (Abb. 5/51). Zur Sequenz von CobW₃ ist allerdings zu sagen, dass es keine Metallbindestelle mit dem Motiv GCxCC aufweist. Auch die Regulation und somit Expression der putativen Chaperone CobW_{1/2/3} ist divers. In Proteomic-Analysen wurden beim Wachstum in Tris-Minimalmedium in der Mitte der

exponentiellen Phase ausschließlich CobW₂ und CobW₃ identifiziert und nicht CobW₁ (Herzberg *et al.*, 2014b; Herzberg *et al.*, 2015). In Microarray-Daten wurde dies bestätigt und gezeigt, dass *cobW*_{2/3} konstitutiv exprimiert werden, wohingegen *cobW*₁ ausschließlich unter Zinkmangel exprimiert wurde, was auch in Induktionsexperimenten verifiziert werden konnte (Herzberg *et al.*, 2016; Bütof *et al.*, 2017). Da *cobW*₁ ähnlich wie *zupT* reguliert wird, schließt

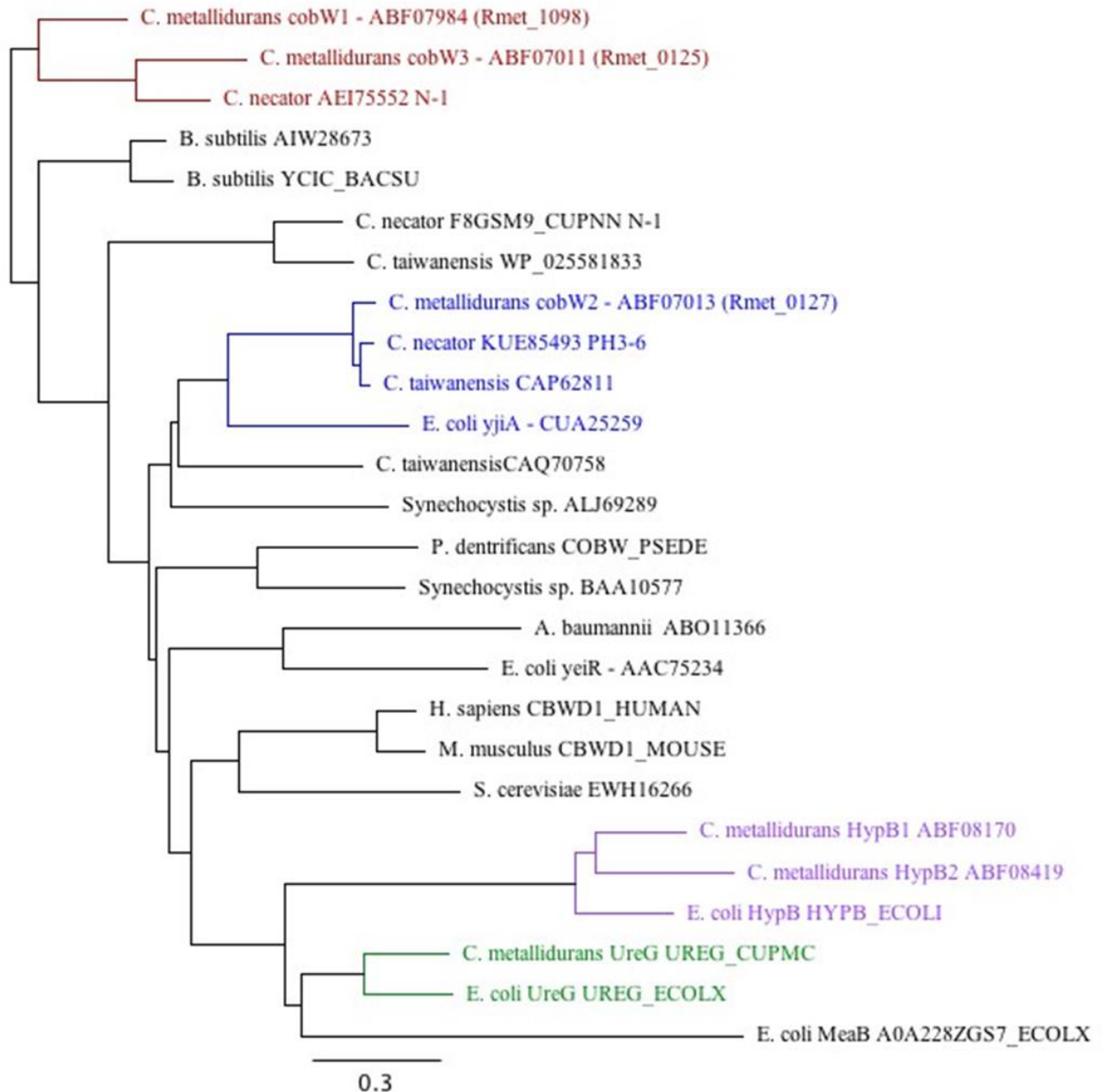


Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung von CobW_{1/2/3} aus *C. metallidurans* in bakterielle und eukaryotische Phyla, sowie die Abgrenzung von anderen G3E Unterfamilien. 26 Sequenzen von annotierten Vertretern der G3E Familie der P-loop GTPasen von Prokaryoten und Eukaryoten wurden ausgewählt und global aligniert, sowie der Stammbaum mit 51 Knotenpunkten per Neighbor-Joining mit dem Programm Genious8 (<https://www.geneious.com/>; Kearse *et al.*, 2012) erstellt. Die untersuchten Vertreter der G3E Familie aus *C. metallidurans* sind farblich in den jeweiligen Abzweigungen markiert, wobei CobW₁ und CobW₃ in Rot, CobW₂ in Blau, UreG in Grün und die HypB-Proteine in Lila dargestellt sind. *C. metallidurans* besitzt kein MeaB-ähnliches Protein, weswegen die *E. coli*-Variante als einziger Vertreter auftritt.

sich hier der Kreis zur Zinkhomöostase. Denn zusätzlich zu *zupT* könnten auch *cobW*_{1/2/3} und *zur* zum Zur-Regulon gehören und somit im gleichen *pathway* agieren. Die CobW-Proteine könnten allerdings aufgrund der Variabilität in *C. metallidurans* unterschiedliche Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase haben und verschiedene *pathways* bedienen. Funktionen im Co-Faktorschutz, als Insertase oder in der Kobalt-Präsentation gegenüber der Kobalt-Chelatase, aber auch der Speicherung von Metallen im Zytoplasma sind putative Aufgaben von CobW_{1/2/3} (Haas *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund war nicht nur die Frage welche Gene in *C. metallidurans* zum Zur-Regulon gehören, sondern auch welchen physiologischen Einfluss die putativen Chaperonen haben. Des Weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit eine biochemische Charakterisierung erfolgen und in diesem Zusammenhang mögliche Interaktionspartner identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Kultivierungsbedingungen

In dieser Arbeit wurden die unter Anhang 11.1 Tabelle 19 aufgelisteten Bakterienstämme und Plasmide verwendet.

2.1.1 Nährmedien und Zusätze für Bakterien

A) BD Difco™ LB Broth, Lennox-Medium zur Anzucht der verwendeten *E. coli*-Stämme (Becton Dickinson, Heidelberg)

20 g LB-Medium

ad 1 l H₂O_{bidest}

B) BD Difco™ LB Agar, Lennox-Agarplatten zur Stammhaltung von *E. coli* (Becton Dickinson, Heidelberg)

35 g LB-Agar

ad 1 l H₂O_{bidest}

C Terrific Broth (TB)-Medium für Expressionsexperimente

12 g Pepton aus Casein

24 g Hefeextrakt

4 ml Glycerin [98 % (w/v)]

2.13 g Kaliumdihydrogenphosphat

12.54 g Dikaliumhydrogenphosphat

ad 1 l H₂O_{dest.}

D) Nähragar für Konjugationsexperimente auf Festmedium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

23 g Nähragar

ad 1 l H₂O_{bidest}

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

Komponente A (20-fach):

800 ml H₂O_{bidest}
121.1 g Tris-HCl (pH 7,0)
danach Zugabe von:
93.6 g NaCl
29.8 g KCl
21.4 g NH₄Cl
4.0 g MgCl₂ x 6 H₂O
0.60 g CaCl₂ x 2 H₂O
0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat
2 ml Spurenelementlösung SL6 (10fach) nach Pfennig (1974)
ad 1 l H₂O_{bidest}

Komponente B (20-fach):

900 ml H₂O_{bidest}
19.5 g Na₂SO₄ x 10 H₂O
4.6 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
ad 1 l H₂O_{bidest}

F) 10fach Spurenelementlösung SL6 (Pfennig, 1974)

900 ml H₂O_{bidest}
0.10 g ZnSO₄ x 7 H₂O
0.03 g MnCl₂ x 4 H₂O
0.30 g H₃BO₃
0.20 g CoCl₂ x 6 H₂O
0.01 g CuCl₂ x 2 H₂O
0.188 g NiCl₂ x 6 H₂O
0.03 g Na₂Mo₄ x 2 H₂O
ad 1 l H₂O_{bidest}

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für die Anzucht von *C. metallidurans* auf einfache Konzentration verdünnt. Als Kohlenstoffquelle wurden 0.2 % Natriumgluconat (w/v) zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurden zusätzlich vor dem Autoklavieren 2 % *Bacto*TM-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg) (w/v) zugefügt.

G) Medienzusätze

Schwermetallsalze

Für den Versuch wurden wässrige 1 M Stammlösungen der Metallsalze CoCl₂, CdCl₂, NiCl₂ und ZnCl₂ verwendet. Die Lösungen wurden im Medium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

Chelatoren

Als Chelator diente Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und wurde in leicht basischem H₂O_{bide}st gelöst. Die Stammlösungen (0.5 M EDTA) wurden in sterilem Medium oder H₂O_{bide}st auf die gewünschten Endkonzentrationen eingestellt.

Antibiotika

Die Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte nach Ausubel (1993). Die Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt und den sterilen Medien in den in Tabelle 2 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

Tabelle 1: Medienzusätze

| Antibiotika | Stammlösung | Endkonzentration im Medium |
|-----------------|---|---|
| Ampicillin | 100 g/l H ₂ O _{bide} st | 100 mg/l |
| Kanamycin | 50 g/l H ₂ O _{bide} st | 50 mg/l (<i>E. coli</i>) 1.5 g/l (<i>C. metallidurans</i>) |
| Chloramphenicol | 10 g/l Ethanol (99 %) | 10 mg/l |
| Tetracyclin | 12.5 g/l Ethanol (50 %) | 12.5 mg/l |
| AHT | 2 mg/ml DMF | 200 µg/l |
| IPTG | 1 M in H ₂ O _{bide} st | 1 mM |
| X-Gal | 40 g/l | 40 mg/l |

Weitere Medienzusätze

Als Zusatz für Festmedien wurde der chromogene Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) verwendet. Zur Herstellung der bei -20 °C gelagerten Stammlösung wurden 80 g/l X-Gal in Dimethylformamid (DMF) gelöst und im Medium auf eine Endkonzentration von 80 mg/l verdünnt.

2.1.2 Anzucht und Zellernte

A) *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Primärselektion (Tabelle 1). Das Wachstum erfolgte in sterilen Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben, bei denen das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß max. 1:5 betrug.

Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C in schräg angebrachten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (HS500, IKA Labortechnik, Staufen) oder auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. Zur Ermittlung des Zellwachstums diente die optische Dichte (OD₆₀₀), die mit einem Spektrometer Smartspec™ 3000 plus (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gemessen wurde. Die Zellernte erfolgte bei 4° C in einer Eppendorf-Zentrifuge 5804R (30 min, 5 000 rpm [Eppendorf AG, Hamburg]), einer Eppendorf-Zentrifuge 5417R (15 min, 14 000 rpm [Eppendorf AG, Hamburg]) oder einer Sigma-Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz). Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 37 °C über Nacht inkubiert.

B) *C. metallidurans*

Die *C. metallidurans*-Stämme wurden in Tris-gepuffertem Minimalmedium mit 2 g/l Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle kultiviert. Zur Selektion erfolgte die Zugabe der Antibiotika (Tabelle 1). Die Anzucht erfolgte in sterilen Reagenzgläsern, Erlenmeyer- und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß max. 1:5 betrug. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) oder in einem Wasserschüttlerbad (HAT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 250 rpm angezogen. Mit einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., USA) konnte durch Messung der Zelltrübung in Klett-Einheiten (KE), das Wachstum der Flüssigkulturen verfolgt werden. Zur Kalibrierung wurde Medium als Nullwert verwendet. Die Zellernte erfolgte in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) für 15 min, bei 4 °C und 14 000 rpm. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert.

2.1.3 Stammhaltung

Die Kultivierung von *C. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-MM-Agarplatten und die von *E. coli*-Stämmen auf LB-Agarplatten. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen, die sich auf Plasmiden befanden oder in das bakterielle Genom integriert wurden, erfolgte die Zugabe dieser (Tabelle 1). Die Stämme wurden spätestens nach vier Wochen auf frische Agarplatten überführt. Nach der Inkubation bei 30 °C für die *C. metallidurans*-Stämme bzw. 37 °C für die *E. coli*-Stämme wurden die Platten bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurden Glycerinkulturen von neu konstruierten Stämmen angelegt, indem Kulturen der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden. Nach Zugabe von sterilem Glycerin mit einer Endkonzentration von 20 % [v/v] erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

2.2 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.2.1 Isolierung von DNA

Für die Arbeit mit DNA war es erforderlich, vorhandene DNasen zu inaktivieren, indem alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen vor Beginn der Experimente 20 min bei 121 °C autoklaviert wurden. Hitzeinstabile Geräte wurden mit 70 %igem Ethanol gereinigt oder hitzelabile Lösungen steril filtriert.

2.2.1.1 Isolation von Gesamt-DNA

Es wurden 750 µl einer Vorkultur der *C. metallidurans*-Stämme AE104 und CH34 durch Zentrifugation für 5 min bei 12 000 rpm pelletiert. Die Isolation der Gesamt-DNA erfolgte nach dem Protokoll des GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Die Elution der Gesamt-DNA erfolgte in 200 µl H₂O_{bidest} und wurde bei -20 °C gelagert. Die Gesamt-DNA diente als Template für DNA-Amplifikationen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

2.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA

Diese Methode diente der Isolation von Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung, für Restriktionsreaktionen und Transformation eingesetzt werden konnte. Dazu wurden 4 ml einer Übernachtskultur vom jeweiligen *E. coli*-Stamm bei 12 000 rpm pelletiert (Sigma 1-14, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde das Herstellerprotokoll des GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) abgearbeitet und die Elution erfolgte mit H₂O_{bidest} anstelle des Elutionspuffers.

2.2.2 DNA-Techniken

2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (*Easy Cast™ Electrophoresis System*). Für die Agarosegele wurden 0.5-1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA [pH 8.0]) durch Erwärmung in einer Mikrowelle (Bosch Hausgeräte) gelöst. Nach Abkühlung wurde der noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid (0.5 g/l) zugesetzt und das Gel gegossen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Vol. Stopp-Lösung (40 % [v/v] Glycerin, 0.1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, ± 2.5 g/l Bromphenolblau) versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und DNA-Konzentration und betrug 5-10 µl (analytische Gele) bzw. 20-100 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese

erfolgte bei 80-100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen), bis die gesuchten Fragmente ausreichend aufgetrennt waren. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (UV-Transilluminator, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) und die Dokumentation mittels Image-Master (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.2.2.2 DNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des DNA-Markers *Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific, USA): 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 und 250 bp

2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Fragmenten für Sequenzierungsreaktionen wurde mit einem NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific, USA) oder dem NanoQuantPlate™ im TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung für Restriktions- und Ligationsreaktionen erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität Ethidiumbromid-markierter DNA-Proben mit DNA Fragmenten bekannter Konzentrationen (Standard).

2.2.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Als Reaktionspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten 10fach Puffer, welche auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Für eine vollständige Restriktion wurden pro µg DNA 2 U Restriktionsendonuklease zugegeben und über Nacht, bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, bei der 1 µg DNA in 1 h bei 37 °C verdaut wird. Nach Überprüfung der vollständigen Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese wurden die Enzyme mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) entfernt.

2.2.2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Reinigung von DNA erfolgte mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA). Dabei sorgte eine chaotrophe Verbindung für die Denaturierung von Proteinen und förderte die Bindung der DNA an die Silikat-Membran der Säule. Verunreinigungen (z.B.

Enzyme) wurden durch einen Waschschrift entfernt und die Elution erfolgte abweichend vom Protokoll des Herstellers mit H₂O_{bidest.}.

2.3.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde die Bande mit der entsprechenden Größe aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) wurde die DNA aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt, wobei das Verhältnis von Vektor-DNA zu Fragment-DNA 1:3 betrug. Die einzusetzenden Mengen wurden mit Hilfe der Fluoreszenzintensität abgeschätzt. Zunächst wurden die Vektor- und Fragment-DNA mit sterilem H₂O_{bidest.} gemischt und zur Freilegung der kohäsiven Enden für 5 min bei 42 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 3 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-Ligase zugegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Auswahl der Primer

Die Konstruktion der Primer erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Clone Manager (Version 9, Scientific & Educational Software, USA) aus bekannten Sequenzen. Die Oligonukleotide (Tabelle 20) wurden von einem kommerziellen Anbieter (Metabion, Martinsried) in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden in sterilem H₂O_{bidest.} gelöst und auf eine Stammkonzentration von 10 pmol/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentration der Primer im PCR-Ansatz betrug 0.2 pmol/µl.

2.2.3.2 Standard Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten und kann für präparative und analytische Zwecke genutzt werden. Für den präparativen Zweck wurde die *Q5 high-fidelity* DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Schwallbach i. Taunus) mit 5'-3'-*proof-reading*-Aktivität verwendet, die für Sequenzen mit hohem GC-Gehalt geeignet ist. Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 50 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|--|---------|
| Template-DNA | 1 µl |
| 5 x Q5 Reaction Buffer | 10 µl |
| 5 x Q5 High-GC Enhancer | 10 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1 µl |
| Primer 1 (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Primer 2 (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Q5 high-fidelity DNA-Polymerase (1 U/µl) | 0.5 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | 25.5 µl |

Die Amplifikationen wurden als *Hot-Start*-Reaktionen im PCR-Block (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen) nach folgendem Protokoll gefahren und das Temperaturprotokoll dem jeweiligen Primerpaar (*Annealing*-Temperatur) und dem DNA-Template (*Extension*-Zeit) angepasst:

| | | | |
|----------------------------|--------------|-------|------------------|
| 1. | 30 sec | 98 °C | <i>Hot Start</i> |
| 2. | 5-10 sec | 98 °C | Denaturierung |
| 3. | 10-30 sec | x °C | <i>Annealing</i> |
| 4. | 20-30 sec/kb | 72 °C | <i>Extension</i> |
| Schritt 2.-4. 25-35 Zyklen | | | |
| 5. | 2 min | 72 °C | Nachsynthese |
| 6. | | 8 °C | Pause |

Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt mit frischem Koloniematerial als Template. Dazu wurden die Zellen mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in steriles H₂O_{bidest.} überführt, in einem Hitzeschritt für 10 min bei 95 °C gekocht und zentrifugiert. Für den PCR-Ansatz wurden 2 µl des Überstandes als Template eingesetzt, wobei der Reaktionsansatz ein Volumen von 50 µl umfasste und sich folgendermaßen zusammensetzte:

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Template-DNA | 2 µl |
| 10 x PCR-Puffer | 5 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1 µl |
| Primer 1 (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Primer 2 (10 pmol/µl) | 1 µl |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase (1 U/µl) | 1 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | 39 µl |

In einer *Hot-Start*-Reaktion mit auf Primerpaar (*Annealing*-Temperatur) und DNA-Template (*Extension*-Zeit) angepasstem Protokoll im PCR-Block (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen) erfolgte die Amplifikation nach folgendem Protokoll:

| | | | |
|----|--------------------------|-------|------------------|
| 1. | 5 min | 95 °C | <i>Hot-Start</i> |
| 2. | 30 sec | 95 °C | Denaturierung |
| 3. | 30 sec | x °C | <i>Annealing</i> |
| 4. | 1 min/kb | 72 °C | <i>Extension</i> |
| 5. | Schritt 2-4 26-30 Zyklen | | |
| 6. | 5 min | 72 °C | Nachsynthese |
| 7. | | 8 °C | Pause |

2.2.4 DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone

2.2.4.1 Transformation nach der CaCl₂-Methode

A) Herstellung chemokompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Dagert and Ehrlich, 1979). Es wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Stammes angezogen und mit dieser 100 ml LB-Medium 1 %ig inokuliert und bei 37 °C kultiviert, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0.5 erreicht wird. Die Zellen wurden in ein steriles 50 ml Falcon (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt und 10-15 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 10 min bei 5 000 rpm und 4 °C sedimentiert (Eppendorf-Zentrifuge 5804R; Eppendorf, Hamburg), das Pellet in 20 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und wiederholt 10-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5 000 rpm und 4 °C pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 2 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem 50 %igen Glycerin (Endkonzentration 25 % [v/v]) gemischt und anschließend 100 µl Aliquotes bei -80 °C gelagert.

B) Transformation und Selektion

Die Transformation chemokompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989. Die CaCl₂-kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein 90 s Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C. Danach wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0.5 ml LB-Medium wurde der Ansatz 60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert und nachfolgend auf einer LB-Agarplatte mit dem jeweiligen Resistenzmarker ausplattiert, was eine primäre Selektion der rekombinanten *E. coli*-Klone ermöglichte. Bei rekombinanten Klonen mit Integration des Gens in das α -Peptid (*lacZ'*) erfolgte zusätzlich eine Sekundärselektion mit Hilfe des Farbstoffs X-Gal. Dem Selektionsprinzip liegt die α -Komplementation der β -Galaktosidase zugrunde, wobei das chromosomal kodierte Ω -Fragment nicht durch das auf dem Plasmid kodierte α -Peptid, in welches die Fremd-DNA inseriert wurde, komplementiert wird. Der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal führt zu weißen Kolonien. Das Zellwachstum auf den LB-Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.4.2 Plasmidtransfer durch Konjugation

Die Konjugation erfolgte mit Zellen der Übernachtskulturen des *E. coli*-Stammes S17/1 und einer Tris-MM-Kultur von *C. metallidurans*. Je 300 µl der zu konjugierenden Stämme wurden auf einer Nähragarplatte ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Zellmaterial wurde mit einer Impföse abgenommen, in 300 µl Tris-MM resuspendiert und auf Tris-MM-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Ein Wachstum von *E. coli*-Zellen auf diesen Agarplatten wurde aufgrund von Auxotrophien und einer für *E. coli* zu hohen Antibiotikakonzentration in den Agarplatten verhindert.

2.2.4.3 Selektion von *single cross*-Rekombinaten

Zur Konstruktion von Mutanten wurde eine Methode von Lenz *et al.*, 1994 in leicht veränderter Form eingesetzt. Der zu rekombinierende DNA-Bereich wurde in den Vektor pECD794-1 kloniert, der in *C. metallidurans* nicht repliziert. Entscheidend dabei ist, dass eine homologe Kopie des Fragments im Genom von *C. metallidurans* vorhanden ist. Der Vektor trägt zum einen eine Kanamycin-Resistenzkassette und zum anderen ein Genfragment der β -Galaktosidase (*lacZ'*). Das Plasmid ist mobilisierbar und *C. metallidurans* mit einem

geeigneten *E. coli*-Stamm (S17/1) konjugiert werden. Bei der Konjugation kommt es zur Rekombination zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, welche durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden können. Zur Überprüfung wurde eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment in Verbindung mit *lacZ'* durchgeführt.

2.2.4.4 Konstruktion von *C. metallidurans* Deletionsmutanten mittels *cre-lox* System

Die Konstruktion von Mutanten erfolgte mit dem *cre-lox* System nach Marx and Lidstrom, 2002 in abgewandelter Form. Diese Methode ermöglicht die Herstellung markerloser Mutationen in einer Vielzahl von Gram-negativen Bakterien. Die Derivate des Vektors pECD1003 besitzen eine Tetracyclin-Resistenzkassette sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette, flankiert von *loxP*-Erkennungssequenzen, welche von der ortsspezifischen Cre-Rekombinase des Phagen P1 erkannt werden und somit die *in vivo* Exzision der Kanamycin-Resistenzkassette katalysieren. Für eine verbesserte Selektion tragen die Derivate des Vektors pECD1003 zusätzlich das Gen *sacB*. Wird dem Medium Saccharose zugegeben, sorgt das Genprodukt von *sacB* dafür, dass die Zellen sterben, da das Periplasma mit dem aus dem Zucker synthetisierten Levan-Polymer verstopft wird. Es wurden Fragmente amplifiziert, die direkt stromaufwärts und stromabwärts des Zielgenes lokalisiert sind. Diese Fragmente wurden so in den Vektor pECD1003 kloniert, dass sie die *loxP*-Erkennungsstellen beiderseits flankieren. Nach dem Transfer des Plasmids mittels Konjugation von *E. coli* S17/1 auf *C. metallidurans* kommt es zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, die durch Selektion auf Kanamycin und Tetracyclin identifiziert werden können. Die Zellen wurden in mehreren flüssigen Passagen mit Tris-MM mit 15 % Saccharose (Suizid-Medium) und Kanamycin angezogen, wobei die Cointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten und es dabei zur Plasmid-Exzision kam. Damit wurde auf die Kanamycin-Resistenzkassette zwischen den *loxP*-Erkennungsstellen selektiert, zum anderen kommt es durch die Zugabe von Saccharose zum Abtöten der Kulturen mit Cointegrat. Durch negative Selektion auf Tetracyclin-haltigem Medium konnten die Doppelrekombinaten identifiziert werden. Um eine markerfreie Deletionsmutante zu erhalten, wurde durch einen weiteren konjugativen Transfer das Plasmid pCM157 in die Kanamycin-Insertionsmutante von *C. metallidurans* gebracht. Dieses Plasmid trägt das Gen für die Cre-Rekombinase des Phagen P1. Durch Zugabe von Tetracyclin konnte auf dieses Plasmid selektiert werden. Die Zellen wurden zwei Tage in Tris-MM angezogen, wobei es zur Exzision der Kanamycin-Resistenzkassette an den *loxP*-Erkennungsstellen durch die Cre-Rekombinase kam. Die

gewünschten Deletionsmutanten konnten durch negative Selektion auf Kanamycin identifiziert werden. Außerdem wurde durch negative Selektion auf Tetracyclin der Verlust des Plasmids pCM157 nachgewiesen. Zur zusätzlichen Überprüfung der Deletionsmutanten wurde eine analytische PCR auf Verlust des Zielgenes durchgeführt.

2.2.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung

Die Sequenzierung erfolgte in einem 15 µL Ansatz mit 1.5 µg Plasmid-DNA und 30 pmol Primer und wurde von einem kommerziellen Anbieter (Microsynth AG, Lindau) durchgeführt. Der Versand des Ansatzes erfolgte in einem Mikro-Schraubdeckelröhrchen von Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Germany). Für die Auswertung wurden DNA-Sequenzen der NCBI-Datenbanken (Nation Center for Biotechnology Information) verwendet und Alignements mit dem Programm Clone Manager angefertigt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Genexpression und Proteinreinigung

A) *Strep-tag*[®]II Protein Purification System (IBA lifescience, Göttingen)

Das *Strep-tag*[®]II *purification system* basiert auf der spezifischen Bindung von *Strep-Tactin*[®] an *Strep-tag*[®]II Fusionsproteine. Der *Strep-tag*[®]II, setzt sich aus den Aminosäuren WSHPQFEK zusammen und ist je nach Vektorsystem am N- oder C-Terminus kodiert. Diese Methode ermöglicht die Affinitätschromatographie unter physiologischen Bedingungen, sodass die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt. Aufgrund der geringen Größe beeinflusst der *Strep-tag* weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch den Induktor AHT (Anhydrotetracyclin). Das AHT bindet dabei an den *tet*-Promotor und injiziert die Genexpression.

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

Mittels Einschrittaffinitätschromatographie können Proteine, welche einen 6 x *His-tag*[®] aufweisen, über die Bindung an Ni-NTA Agarose gereinigt werden. Durch Verwendung des Vektors pRHB152 (pET28A TEV Derivat) wurden Proteine mit N-terminalem *His-tag* synthetisiert, welcher durch eine Tev-Protease abgespalten werden kann. Die Induktion der Expression erfolgte mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), da das Gen hinter einen T7 Promotor kloniert wurde.

2.3.1.1 Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Der *E. coli*-Stamm Rosetta wurde mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Für die Expression wurden Übernachtskulturen hergestellt, mit denen LB-oder TB-Medium im Kolben oder im Fermenter (Minifors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) 2 %ig inokuliert und bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dem Erreichen einer $OD_{600} = 1$ im Kolben oder $OD_{600} = 3$ im Fermenter erfolgte die Zugabe des Induktors AHT (50-200 µg/l) bzw. IPTG (1 mM). Die Kolbenanzuchten wurden für weitere 3 h schüttelnd bei 30 °C inkubiert, wo hingegen die Fermenteranzuchten 1 h bei 30 °C wuchsen. Durch Zentrifugation (30 min, 14 500 rpm und 4 °C, Eppendorf-Zentrifuge 5804R; Eppendorf AG, Hamburg] oder 17 000 rpm und 4°C Sorvall-Zentrifuge [Thermo Scientific, USA]) wurden die Zellen geerntet und die Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.3.1.2 Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes

Das Zellpellet wurde in 3 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl) pro Gramm Feuchtgewicht mit 1 mM Proteaseinhibitor (PMSF) und 10 µg/ml DNaseI resuspendiert. Der Zellaufschluss von kleinen Volumina erfolgte auf Eis mit 6 Ultraschallzyklen (Uniequip Laborgerätebau UW60) à 30 s bei der Intervalleinstellung 70 % und 80 W Leistung. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Zellen 30 s auf Eis abgekühlt. Bei größerem Volumen wurden die Zellen mit Hilfe der *French Press* Gaulin (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2 000 psi (140 kg/cm²) in 5 Durchgängen aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die aufgeschlossenen Zellen 30 min bei 14 000 rpm und 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5417R [Eppendorf AG, Hamburg]) oder bei 17 000 rpm und 4 °C (Sorvall-Zentrifuge [Thermo Scientific, USA]) zentrifugiert.

2.3.1.3 Proteinreinigung mittels *Strep-Tactin*-Chromatographie

Eine Einwegsäule (*Polypropylene Column* 1 ml-10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1 ml Säulenmaterial (*Strep-Tactin*) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W äquilibriert. Das Zellextrakt wurde auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band. Unspezifisch bindende Proteine konnten durch Waschen mit 10 Vol. Puffer W entfernt werden. Das rekombinante Protein wurde mittels 5-10 Vol. Puffer S (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2.5 mM Desthiobiotin) eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch Spülen mit 10 Vol. Puffer R (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM HABA) regeneriert. Für die Analyse der Fraktionen,

wurden die Proben auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.1.4 Proteinreinigung mit Hilfe der Ni-NTA Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung wurde wiederum eine Einwegsäule verwendet und mit 1-2 ml Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden) beladen. Für größere Volumen wurde eine Äkta (ÄKTApurifier, GE Healthcare, Freiburg) für die Aufreinigung benutzt. Die Säule wurde äquilibriert mit 5 Vol. Puffer A (50 mM Tris- HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl). Im Anschluss wurde das Zellextrakt aufgetragen, wobei das rekombinante Protein spezifisch an die Matrix gebunden hat. Ungebundene Proteine wurden mit 5-10 Vol. Puffer A und Puffer A mit steigenden Imidazolkonzentrationen (5-25 mM Imidazol) von der Säule gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch Puffer A mit 500 mM Imidazol. Das Säulenmaterial wurde mit 5 Vol. MES-Puffer (20 mM MES [pH 5], 100 mM NaCl) regeneriert und bis zur erneuten Verwendung auf 20 % Ethanol gelagert. Für die Entsalzung der Elutionsfraktionen wurden die Proben auf eine mit Puffer E (50 mM Tris- HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl, 5 % Glycerin) äquilibrierte PD10-Säule (GE Healthcare, Freiburg) gegeben. Die rekombinanten Proteine wandern bei dieser Methode schneller durch die Säulenmatrix als die Salze. Zur Analyse wurden die Proben auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.1.5 Größenausschlusschromatographie

Durch Gelfiltration wurden Proteine der Größe nach auf einer Hiprep 26/60 Sephacryl S-100HR (GE Healthcare, Freiburg) aufgetrennt, wobei größere Proteine schneller durch die Matrix laufen als kleinere Proteine. Die Säule mit einem Bettvolumen von 320 ml wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min betrieben und mindestens 2 Säulenvolumen Puffer A (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl) äquilibriert. Es wurden min. 500 µg Protein in einem maximalen Volumen von 5 ml durch die Probenschleife aufgetragen und mit weiteren 5 ml Puffer A die Probenschleife gespült. Als Elutionspuffer diente der Äquilibrierungspuffer. Als Größenstandard diente das Gel Filtration Kit LMW (GE Healthcare, Freiburg) mit Proteinen der Größe 6.5 kDa bis 75 kDa, wobei Blue Dextran 2000 für die Bestimmung des Leervolumens der Säule diente. Mit Hilfe der Evaluierungssoftware UNICORN (GE Healthcare, Freiburg) wurden die Retentionszeiten bestimmt und eine Kalibriergerade erstellt. Anhand dieser wurden die Größen der untersuchten Proteine errechnet.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.3.2.1 Lowry-Proteinbestimmung (Lowry *et al.*, 1951)

Zur Proteinbestimmung wurde ein abgewandelter Test verwendet, bei dem 10 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. Verdünnung in einer *96well*-Microplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 100 µl frisch hergestellter Lösung C, die zu 90 % (v/v) aus Lösung A (22 % [w/v] Na₂CO₃, 0.5 % [w/v] Natriumtartrat und 0.1 N NaOH) und 10 % (v/v) Lösung B (0.1 % [w/v] CuSO₄·5H₂O) bestand, versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 15 µl Lösung D [50 % (v/v) Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz] zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Bei 750 nm wurde die Absorption im Tecan Infinite 200 (Tecan Group, Schweiz) gemessen und mit Hilfe einer BSA-Kalibriergeraden die Konzentration berechnet.

2.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Bei diesem Test wird die Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliantblau 250 ausgenutzt. Durch die Proteinbindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes auf 595 nm und ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Für die Messung wurden Verdünnungen hergestellt und die Proteinbestimmung, wie im Roti[®]-Quant Kit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für *96well*-Microplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) beschrieben, durchgeführt. Eine Kalibrierungsgerade wurde mit BSA als Standard erstellt.

2.3.2.3 Proteinbestimmung am NanoDrop[®]ND-1000 Spektrophotometer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine direkte spektroskopische Methode verwendet, bei der das spezifische Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins berücksichtigt wurden und die Absorption bei 280 nm NanoDrop[®]ND-1000 Spektrometer (Thermo Scientific, USA) gemessen. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten der rekombinanten Proteine wurde mit Hilfe des Programms ProtParam des ExPASy-Servers bestimmt (Pace *et al.*, 1995)

2.3.3 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von VivaSpin-Säulen mit Porengrößen von 10-30 kDa (VivaSpin, Sartorius AG, Göttingen) ankonzentriert. Die VivaSpin-Säulen wurden mit 2 Vol. H₂O_{dest.} bzw. Puffer E gespült und die Proteinlösung bei 2 500 rpm und 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5804R; Eppendorf AG, Hamburg) bis zur gewünschten Proteinkonzentration eingengt.

2.3.4 Elektrophoretische Methoden

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einem *Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System* (Bio-Rad Laboratories, USA) durchgeführt.

2.3.4.1 Probenvorbereitung

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris-HCL [pH 6.8], 20 g/l SDS, 50 % [v/v] Glycerin, 0.5% [v/v] β -Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau) gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.3.4.2 Proteinmarker

Folgende Proteingrößenstandards wurden aufgetragen:

- *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (#26619) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA): 10, 15, 25, 35,55 70, 100, 130, 250 kDa
- *SERVA VisiBlot Standard I* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg): 25, 40, 45, 60, 75, 85, 90, 120, 150 kDa

2.3.4.3 Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) verwendet (Tabelle 2). In das Sammelgel wurde ein Kamm zur Formung von Geltaschen eingesetzt. Der Elektrodenpuffer (2.5 mM Tris, 0.2 M Glyzin, 3.5 mM SDS) wurde in den Anoden- und Kathodenraum gegeben und die Proteine Auftrennung 1 h bei 180 V aufgetrennt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

| Detergens | Trenngel | | Sammelgel |
|-------------------------------------|------------|------------|------------|
| | 12.5 % | 10 % | |
| 30 % Acrylamid, 0.8 % Bis-Acrylamid | 2.5 ml | 2 ml | 0.33 ml |
| 1.88 M Tris-HCl (pH 8.5) | 1.2 ml | 1.2 ml | --- |
| 0.625 M Tris-HCl (pH 6.8) | --- | --- | 0.4 ml |
| 0.5% SDS (w/v) | 1.2 ml | 1.2 ml | 0.4 ml |
| Aqua _{bidest} | 1.1 ml | 1.6 ml | 0.87 ml |
| TEMED | 5 μ l | 5 μ l | 2 μ l |
| 10 % APS | 30 μ l | 30 μ l | 10 μ l |

2.3.4.4 Native-PAGE

In der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese wurden lösliche Proteinfractionen verschiedener Kulturen aufgetrennt und auf die Aktivität der Fe-SOD bzw. der [NiFe]-Hydrogenasen untersucht. Außerdem wurden EMSA-Experimente mit den nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen durchgeführt (Tabelle 3), sowie die native Laufform als Mono-/Di- bzw. Multimer untersucht. 0.2 Vol. 5 x Native-Probenpuffer (20 % Saccharose [w/v], 0.1 % Bromphenolblau [w/v], 10 % Glycerin [v/v]) dienten der Beschwerung der Proben. Die Elektrophorese wurde mit eiskaltem Elektrodenpuffer (0.1 M Tris, 0.1 M Glycin) für ca. 4 h bei 80 V durchgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Native-PAGE

| Detergens | Trenngel | Sammelgel |
|--|----------|-----------|
| | 10 % | 8 % |
| 40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 | 1.5 ml | 0.4 ml |
| 1,88 M Tris-HCl (pH 8,5) | 0.6 ml | 0.2 ml |
| Aqua _{bidest} | 3.82 ml | 1.4 ml |
| TEMED | 5 µl | 2 µl |
| 10 % APS | 40 µl | 15 µl |

2.3.4.5 Proteintransfer auf eine Membran (Western-Blot)

Proteine können mittels einer Semi-dry Fastblot B34-Apparatur (Analytik Jena, Jena) auf eine Nitrocellulose-Membran (porablot NCP, Machery-Nagel, Duren, Porengrose 0.45 µm) transferiert werden. Nach der Elektrophorese wurden das Gel, die Membran und das Whatman Papier (Schleicher & Schull, Dassel) 10 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, ad 1 l H₂O_{bidest.}) inkubiert und der *semi-dry-fastblot* von der Anode ausgehend, luftblasenfrei zusammengebaut:

- 3 Lagen Whatman Papier
- Nitrocellulose-Membran
- SDS-Polyacrylamidgel
- 3 Lagen Whatman

Der Transfer erfolgte bei 20 V und 150 mA für 30 min

2.3.4.6 *Strep-tag*®II Detektionssystem (IBA lifescience, Göttingen)

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran mit 3 % (w/v) BSA (in 1 x PBS-Puffer [4 mM KH_2PO_4 , 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 115 mM NaCl]) + 0.5 % Tween20 für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen vor der Detektion zu blockieren. Die Membran wurde 3-mal mit 1 x PBS-Puffer + 0.1 % Tween20 für 5 min gewaschen. Für den Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte eine 1 stündige Inkubation mit 1:100 000 *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat (Bio-Rad, München) verdünnt in 1 x PBS + 0.5 % (w/v) BSA + 0.1 % Tween20 und 2 weitere Waschschrirte mit 1 x PBS-Puffer + 0.1 % Tween20 für 5 min, sowie 5 min in 1 x PBS-Puffer. Das Konjugat wurde mit einer Meerrettich-Peroxidase markiert, welche mittels ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*) nachgewiesen werden konnte. Bei diesem Nachweis wird Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 unter Lichtaussendung oxidiert. Die Lösungen A (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 90 mM Coumarsäure [in DMSO gelöst], 250 mM Luminol [in DMSO gelöst]) und B (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, H_2O_2 (v/v) 0.03 %) wurden zu diesem Zweck im Dunkeln gemischt und 1 min auf die Membran gegeben. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei in eine Folie gelegt und in einer Fotokassette durch Auflegen eines Röntgenfilms (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) exponiert. Der Röntgenfilm wurde 5 min bis 1 h aufgelegt und in Entwicklerlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) geschwenkt. Anschließend wurde der Film in Wasser gewaschen und fixiert (Calbe Fotochemie, Calbe).

2.3.4.7 *His-tag* Antikörpernachweis

Die Membran wurde nach dem Blotvorgang in 5 % Milchpulver (in 1 x PBS-Puffer) 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal für 5 min in 1 x PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran 1 h im primären Antikörper (Anti *His*-Antikörper [Acris Antibodies GmbH, Herford] 1:2 500 in 1 x PBS-Puffer) geschwenkt, wiederum 3-mal 5 min mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und anschließend 1 h mit dem sekundären Antikörper (1:5 000 Anti *Mouse* Antikörper [Acris Antibodies GmbH, Herford] in 1 x PBS-Puffer) inkubiert. Abschließend wurde die Membran wieder 3-mal 5 min in 1 x PBS-Puffer gewaschen und danach erfolgte die ECL-Reaktion.

2.3.4.8 Multiplex-Detektion mittels Fluoreszenzantikörpern

Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen auf der Nitrocellulosemembran wurde diese über Nacht mit 3 % (w/v) BSA (in 1 x PBS-Puffer) bei 4 °C inkubiert. Nach 2 Waschrirten für 5 min

in 1 x PBS-Puffer + 0.1 % Tween und einem mit 1 x PBS-Puffer wurde die Membran zunächst mit dem primären Antikörper (Anti *His*-Antikörper [Acris Antibodies GmbH, Herford] 1:2 500 in 1 x PBS-Puffer) für eine Stunde inkubiert. Nach 3 weiteren Waschstritten mit 1 x PBS-Puffer für 5 min wurde die Membran parallel mit dem sekundären Antikörper (Cy3 goat anti-mouse IgG (H+L) [Thermo Fisher life technologies, Carlsbad, CA, USA] 1:1 000 verdünnt in 1 x PS-Puffer) und Streptavidin Alexa Fluor 647 Konjugat ([Thermo Fisher life technologies, Carlsbad, CA, USA] 1:1 000 verdünnt in 1 x PS-Puffer) für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Es schlossen sich 3 weitere Waschrritte für 5 min in 1 x PBS-Puffer im Dunkel an. Anschließend wurde die Membran im Dunkeln getrocknet, was eine dauerhafte Lagerung und Wiederverwendung ermöglicht. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit dem INTAS Advanced Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen). Der Cy3 goat anti-mouse IgG (H+L) Antikörper wurde bei einer Wellenlänge von 552 nm angeregt und fluoreszierte grün mit einer Emission bei 570 nm. Im Gegensatz dazu wurde das Streptavidin Alexa Fluor 647 Konjugat bei 650 nm angeregt und fluoreszierte im roten Bereich bei 668 nm. Durch gleichzeitige Messung beider Fluoreszenzkanäle wurde ein Multiplex-Image aufgenommen, wobei Überlagerungen beider Farbstoffe gelb dargestellt wurden.

2.3.5 Färbemethoden für Polyacrylamidgele

2.3.5.1 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau nach Weber and Osborn, 1969

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine konnten mittels Coomassie-Blau angefärbt werden, dabei lagert sich der Triphenylfarbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Zu diesem Zweck wurden die Gele mindestens 1 h oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Blau-Färbelösung (2 g Coomassie Brillantblau R-250, 0.5 g Coomassie Brillantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O_{bidest.}) inkubiert und nicht proteingebundener Farbstoff mittels Entfärberlösung (10 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 80 % H₂O_{bidest.}) entfernt.

2.3.5.2 Proteinfärbung mittels Quick Coomassie™ stain

Diese Methode diente der schnellen Proteinfärbung von Polyacrylamidgelen, welche in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 20-30 min in der Färbelösung der Firma SERVA Electrophoreses (GmbH, Heidelberg) inkubiert wurden. Die Entfernung von überschüssigem Farbstoff erfolgte durch waschen mit destilliertem Wasser.

2.3.5.3 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 Lösung aus 50 % Aceton (v/v), 1.25 % Trichloressigsäure (TCA) (v/v) und 0.02 % Formaldehyd (v/v) für 5 min fixiert. Das Gel wurde mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 50 % Aceton (v/v) vorbehandelt. Es schloss sich eine zweite Vorbehandlung mit 0.02 % Na₂S₂O₃ (w/v) in H₂O_{bidest.} für 1 min an. Nach mehrmaligem waschen mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit 0.26 % AgNO₃ (w/v), 0.37 % Formaldehyd (v/v) in H₂O_{dest.} für 8 min, wobei sich die Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten der Aminosäuren anlagern. Das Entwickeln erfolgte durch Reduktion der Ionen zu elementarem Silber und wurde nach weiteren Waschschritten mit destilliertem Wasser durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel in einer Lösung aus 1 % Na₂CO₃ (w/v), 0.02 % Formaldehyd (v/v), 0.0005 % Na₂S₂O₃ (w/v) in H₂O_{dest.} bis zum Erscheinen der Banden inkubiert. Die Reaktion wurde 30 s mit 1 % Essigsäure (v/v) gestoppt und das Polyacrylamidgel in destilliertem Wasser gelagert.

2.3.5.4 Visualisierung von DNA-Fragmenten mittel Ethidiumbromid

Für die Anfärbung von DNA-Fragmenten in der Native-PAGE wurde ein *post staining* in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) für 10 min durchgeführt. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte durch UV-Licht an einem UV-Transilluminator (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.3.6 Abspaltung des *His*-tags mit Hilfe der Tev-Protease

Die Expression der Gene mit dem Vektor pRHB152 führte dazu, dass ein rekombinantes Protein mit einem N-terminaler *His*-tag entsteht. Dieser *Tag* kann aufgrund einer *tev-cleavage site* an der Erkennungssequenz ENLYFQGH durch die Tev_{His} abgespalten werden. Für das Assay wurden 1 mol Tev-Protease mit 1 mol rekombinantes Protein in 1 x Tev-Puffer (2 x Tev-Puffer 100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 2 mM DTT) mit 0,5 % Mercaptoethanol für 24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie, wobei sich das rekombinante Protein im Durchfluss befand und die Tev_{His}-Protease in den Elutionsfraktionen.

2.3.7 CD-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie (Circulardichroismus) wird die Differenz der Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht gemessen. Wichtig für diese Messung waren Proben die chirale Moleküle enthielten, da die Enantiomere das Licht unterschiedlich stark absorbieren. Die Aufnahme von fern UV-CD-Spektren ($\lambda = 250-195$ nm) und nah UV-CD-Spektren ($\lambda = 350-250$ nm) erfolgte am Institut für Biochemie/Biotechnologie in Kooperation mit PD Dr. H. Lilie. Die Messungen wurden in einer 0.1 mm Quarzglasküvette für Fern-UV-Aufnahmen und einer 10 mm Quartzküvette für Nah-UV-Spektren an einem Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter (JASCO EUROPE S.R.L., Cremella, Italien) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 20 °C mit einer Stickstoffflussgeschwindigkeit von ca. 2.7 l/min und einer Auflösung von 0.5 nm. Es wurden jeweils 60 Spektren erstellt, gemittelt und anschließend durch Abzug des Pufferspektrums korrigiert. Für die Messung wurden 0.8 mg/ml der rekombinanten Proteine eingesetzt. Die mittlere molare Elliptizität wurde mit Hilfe der Molekulargewichte der rekombinanten Proteine nach Formel 1 berechnet und mit dem Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) der prozentuale Anteil an α -Helices und β -Faltblättern kalkuliert.

$$\text{Formel 1: } \varepsilon_M = \varepsilon * M / (10 * d * c)$$

mit:

- ε – Eliptizität [mdeg]
- M – durchschnittliches Molekulargewicht der AS [g/mol]
- c – Proteinkonzentration [g/l]
- d – Schichtdicke Küvette [cm²]

2.3.8 Herstellung von Apo-Proteinen

Die Apo-Proteine wurden aus den gereinigten Proteinen hergestellt, indem 100 μ M Protein mit 1 mM EDTA inkubiert wurden. Dieser Vorgang erfolgte bei 4 °C für 2 h und sollte zu einer Komplexierung der proteingebundenen Metalle führen. Anschließend wurden die Proteinlösungen über eine PD10-Säule entsalzt. Zuvor wurden die Säulen mit 2 Vol. Puffer E äquilibriert. Die Elutionsfraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.9 Metallinkubationsassay nach Sydor *et al.*, 2013

Um Aussagen über die spezifische Metallbindung der rekombinanten Proteine treffen zu können wurden die hergestellten Apo-Proteine mit verschiedenen Metallen inkubiert. 100 μ M Apo-Protein wurden mit 1 mM ZnCl₂ für 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend überschüssige

Metallionen durch PD10-Säulen entfernt. Als Elutionspuffer und Äquilibrationpuffer diente Puffer E. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.10 Zincon-Assay

Dieses Assay beruht auf der Bindung von Zink an den Farbstoff Zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulphoformazylbenzene), welche einhergeht mit der Verschiebung des Absorptionsmaximum von 480 nm auf 620 nm (Hilario *et al.*, 1990; Sabel *et al.*, 2010). Zu diesem Zweck wurden 10 µM der hergestellten Apo-Proteine oder 10 µM der mit Metallen inkubierten Proteine in das Assay eingesetzt. Zu den Proteinen wurden steigende ZnCl₂-Konzentrationen von 0-140 µM und 10 µM Zincon gegeben. Als Kontrolle wurde anstelle der Apo-Proteine 10 µM EDTA eingesetzt. Die 20 µl Ansätze wurden mit Puffer W aufgefüllt. Die Messung der Spektren (230-1 000 nm) in den 384well-Mikroplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) erfolgte im Tecan Infinite 200 (Tecan Group, Schweiz).

2.3.11 Electrophoretic Mobility Shift-Assay (EMSA)

Für die Protein-DNA-Interaktionsstudien wurde das Protokoll nach Shin *et al.*, 2007 in abgewandelter Form durchgeführt. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden gereinigtes rekombinantes Protein (*Strep-Zur*) in einem Konzentrationsbereich von 5.4 pmol bis 53.6 pmol mit 0.68 pmol oder 1.11 pmol DNA des jeweiligen zu untersuchenden Promotorbereichs für 30 min in Bindepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM KCl, 5 % Glycerin [v/v] und 1 mM Dithiothreitol [DTT]) bei 30 °C inkubiert. Die Konzentration an DNA-Molekülen wurde anhand der DNA-Konzentration und der Molekülmasse basierend auf der Sequenzlänge bestimmt. Weitere optionale Zusätze waren 0.1 mM ZnCl₂ bzw. EDTA. Nach der Inkubation wurden 0.2 Volumen des 5 x Native-Probenpuffers zu jeder Reaktion hinzugegeben und in einer 10 %ige Native-PAGE aufgetrennt. Als Größenstandard diente der *Gene Ruler*TM 1 kb *DNA Ladder* (Thermo Scientific, USA). Anschließend erfolgte die Visualisierung der DNA mittels Ethidiumbromid, Silberfärbung und Western-Blot.

2.3.12 Identifizierung von Interaktionspartnern mittels *Pulldown*

2.3.12.1 *Pulldown* mittels Ni-NTA *magnetic Beads*

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner wurden *Pulldown* Analysen mit gereinigten *His*-getaggtten Proteinen und der löslichen Fraktion des Stammes AE104 Δ *zur* durchgeführt, da in diesem Stamm Gene zinkabhängiger Proteine hochreguliert sein sollten. 250 µg der HisPurTM

Ni-NTA *magnetic Beads* (Thermo Scientific, USA) wurden durch einen Magneten im 96well-plate mit U-Boden sedimentiert und zunächst 3-mal mit Puffer E gewaschen. Anschließend wurden 10 µg des *bait*-Proteins für 30 min bei 4 °C an die Matrix gebunden. Die Bindung möglicher Interaktionspartner erfolgte durch Inkubation mit 100 µg Rohextrakt bei 4 °C. Nicht gebundenes Rohextrakt wurde zur weiteren Analyse abgenommen und die *magnetic Beads* 5-mal mit Puffer E gewaschen und anschließend die Proteine durch Zugabe von 2 x SDS-Probenpuffer oder Elutionspuffer (Puffer A + 500 mM Imidazol) eluiert. Alle Überstände, Waschfraktionen und die Elutionsfraktionen wurden in einer 12.5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Blau gefärbt. Für die Identifizierung der Interaktionspartner wurden die eluierten Proteine durch Zugabe von 4 Teilen eiskaltem Aceton über Nacht bei 4 °C gefällt und anschließend 1 h bei 5 000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das durch Imidazol bernsteinfarben gefärbte Proteinpellet bei -80 °C gelagert und zur Analyse tryptisch In-Lösung verdaut.

2.3.12.2 Pulldown mit Strep-Tactin magnetic Beads

Zum Nachweis der spezifischen Interaktion wurden 10 µg rekombinanter *Strep*-tag Fusionsproteine als *bait* Proteine in 96well-plates an 2 µg MagStrep “type3“ XT *magnetic Beads* (IBA lifescience, Göttingen), nach dreimaligem Waschen dieser mit Puffer W, für 30 min bei 4 °C gebunden. Die Inkubation mit dem *prey* Protein erfolgte für 3 h bei 4°C unter Zugabe von 500 µM MgCl₂ und optional 10 µM GTP, 10 µM GDP, 500 µM EDTA und ZnCl₂. Es schlossen sich 5 Waschschrte mit Puffer W und der anschließenden Elution durch 2 x SDS-Probenpuffer an. Die Überstände wurden zur Analyse durch Coomassie-Blau-Färbung und Western-Blot in 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

2.3.13 Tryptischer In-Lösungsverdau

Der tryptische Verdau dient der Fragmentierung von Proteinen, dabei wird durch Trypsin spezifisch die Peptidbindung am Carboxyterminus basischer Aminosäuren gespalten. Zu diesem Zweck wurde das Pellet pro 100 µg Protein in 221 µl 25 mM AmBic-Puffer (Ammonium-hydrogencarbonat in HPLC Grade Wasser) gelöst. Durch Zugabe von 12.5 µl 0.1%iger RapiGest Lösung und der Inkubation für 10 min bei 80 °C verbessert sich die Löslichkeit der Proteine. Anschließend wurde DTT gelöst in AmBic-Puffer in einer Endkonzentration von 0.25 mM hinzugegeben und zunächst 10 min bei 60 °C inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min im Dunkeln mit 0.8 mM Iodacetamid versetzt. Der tryptische Verdau erfolgte mit 1 µg Trypsin über Nacht

bei RT und die Reaktion wurde durch 37 %ige HCl abgestoppt, 30 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit den Peptiden abgenommen und für die Analyse mit der Synapt G2-S (Waters GmbH, Eschborn), in Kooperation mit Stefan Helm/Dr. Dirk Dobritzsch verwendet.

2.4 Zellwachstumsversuche

2.4.1 Waschtumsversuche in Flüssigmedium

2.4.1.1 Messung der Zelltrübung

Das Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., New York) diente der Zelltrübungsmessung wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Zur Kalibrierung der Skala wurde Medium als Nullwert verwendet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probenentnahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde. Neben der kontinuierlichen Messung des Zellwachstums wurde auch die Zelldichte nach einer definierten Wachstumszeit (20 h) bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen. Die Bestimmung des Zelltrockengewichtes und der Zellzahl erfolgte mittels Kalibrierkurven.

2.4.1.2 Zeitabhängige Wachstumskurven

Für die Aufnahme von zeitabhängigen Wachstumskurven wurden die *C. metallidurans*-Stämme in einer 1. Vorkultur in Tris-MM angezogen und nach dem Erreichen der frühen stationären Phase 5 %ig eine 2. Vorkultur inokuliert. Diese wuchs 24 h bei 30 °C bis zur späten stationären Phase, sodass eine Mangelkultur entstand. Für die Hauptkultur wurde die 2. Vorkultur in 2 ml Tris-MM 1:20 verdünnt und bei 30 °C in *24well* Zellkulturplatten (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) schüttelnd im Tecan Infinite 200 Pro reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) inkubiert, wobei alle 33 min die optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen wurde.

2.4.1.3 Wachstumsendpunktbestimmung von *C. metallidurans*-Stämmen

Die Endpunktbestimmung (*Dose Response*-Experimente) des Zellwachstums von *C. metallidurans* mit verschiedenen Konzentrationen an CdCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, NiCl₂ und des Komplexbildners EDTA wurde in Tris-MM durchgeführt. Aus einer Tris-MM Vorkultur, der

frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur 5 %ig inokuliert. Diese wurde für 24 h schüttelnd bei 30 °C bis zum Erreichen der späten stationären Phase, angezogen. Die Hauptkultur wurde 10 %ig in Medium verdünnt und in *96well* Mikroplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) kultiviert. Die Hauptkulturen wurden bei 30 °C in einem neoLab-Thermoshaker (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) bei 1 300 rpm angezogen. Nach 20 h erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) mit dem Tecan Infinite 200 Pro reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz). Aus den erhaltenen Werten wurden die IC50-Werte berechnet (Formel 2). Der IC50-Wert gab dabei den Wert an, bei dem die Zelltrübung um die Hälfte reduziert war. Die Berechnung basierte auf der abgewandelten Formel von Pace and Scholtz, 1997.

$$\text{Formel 2: } OD(c) = OD_0 / (1 + \exp[(c - IC50)/b])$$

2.4.2 Bestimmung der MIC (*minimal inhibitory concentration*) von *C. metallidurans*

Mit dieser Methode kann die toxische Konzentration von Metallen und Chelatoren in festem Medium bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Tris-MM-Agarplatten mit verschiedenen Konzentration an EDTA, $CoCl_2$, $CdCl_2$ und $ZnCl_2$ hergestellt. In diesem Experiment wurden 2. Vorkulturen 1:100 verdünnt und auf den Agarplatten ausgestrichen. Diese 2. Vorkulturen wurden zuvor 5 %ig mit einer Vorkultur inokuliert und 24 h bei 30 °C, bis zur Erreichung der späten stationären Phase, kultiviert. Die MIC-Agarplatten wurden für 4 Tage bei 30 °C gelagert und im Anschluss das Zellwachstum auf den Platten ausgewertet.

2.5 Enzymologische Methoden

2.5.1 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Mit Hilfe dieses Experimentes konnte die Induktion der Gene überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden *lacZ*-Genfusionen mit Hilfe des Vektors pECD794-1 hergestellt.

2.5.1.1 Zellanzucht der *C. metallidurans*-Stämme

Die für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *C. metallidurans* wurden in Tris-MM mit 1.5 mg/ml Kanamycin angezogen. Aus den Vorkulturen der frühen stationären Phase wurden zweite Vorkulturen in Klettkolben mit 12 ml Tris-MM auf 30 Klett-Einheiten inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm im Wasserbad inkubiert. Nach Verdopplung der Zelldichte erfolgte eine Aufteilung der Kulturen in sterile *96well*-Mikroplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen). Diesen Kulturen wurden unterschiedliche

Konzentrationen an EDTA, ZnCl₂, CoCl₂ und CdCl₂ zugesetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 30 °C und 1 300 rpm im neoLab Shaker DTS-2 (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) wurden 200 µl Kultur in 96well-Mikroplatten mit *round bottom* (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt, die OD₆₀₀ am TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen und durch Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 4 500 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung am nächsten Tag bei -20 °C gelagert.

2.5.1.2 β-Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

Für den Enzymtest (Miller, 1972; Miller, 1992; Griffith and Wolf, 2002) wurden die Zellpellets in 190 µl Z-Puffer (60 mM Na₂ HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.5 M β-Mercaptoethanol) mit 10 µl Permeabilisierungspuffer (6.9 mM CTAB; 12 mM Natriumdesoxycholat) aufgenommen. Der Ansatz wurde 10 min bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Substratlösung (13.3 mM ortho-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid [ONPG] in Z-Puffer [ohne β-Mercaptoethanol]) zugegeben und bis zur Gelbfärbung bei 30 °C im neoLab-Shaker (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) bei 300 rpm inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des Substrates ONPG zu o-Nitrophenol durch die β-Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Na₂CO₃ erhöht den pH-Wert im Reaktionsansatz auf 11, wodurch die β-Galaktosidase inaktiviert wurde. Die Zeit von Substratzugabe bis Reaktionsabstoppung wurde für die Berechnung der spezifischen Aktivität notiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 420 nm und 550 nm mit dem Tecan Infinite 200 Pro reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen. Der Korrekturfaktor von 315.8 µmol/l wurde berechnet aus dem Extinktionskoeffizienten von o-Nitrophenol, der Schichtdicke der Küvette und dem Koeffizienten aus Kulturvolumen und Volumen des Reaktionsansatzes (Formel 3). Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial. Für die Berechnung der Aktivität und der spezifischen Aktivität wurden folgende Formeln verwendet, wobei der Berechnung der Zelletrockenmasse in µg/ml die Formel 6 nach Schwuchow, 1995 zu Grunde lag:

$$\text{Formel 3: Korrekturfaktor} = 315.8 \mu\text{mol/l} = (1.35 \text{ mol} \cdot \text{cm} / 45001 \cdot 0.95 \text{ cm}) \cdot 10^6$$

$$\text{Formel 4: Aktivität} = 315.8 \mu\text{mol/l} \cdot (\text{OD}_{420} - [1.75 \cdot \text{OD}_{550}]) / \text{Reaktionszeit (min)}$$

$$\text{Formel 5: Spezifische Aktivität} = \text{Aktivität} / \text{Zelltrockenmasse}$$

$$\text{Formel 6: Pro } (\mu\text{g/ml}) = 4,84 + 2,38 \times \text{KE} - 1,57 \times 10^{-6} \times \text{KE}^2 + 6,46 \times 10^{-6} \times \text{KE}^3 + 8,79 \times 10^{-9} \times \text{KE}^4$$

2.5.2 Aktivitätsfärbung der Superoxiddismutase (SOD)

Die SOD-Aktivitätsfärbung (Beauchamp and Fridovich, 1971) in der Native-PAGE beruht auf der Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)-Methode. TEMED als Radikalstarter bewirkt am Licht die Oxidation von Riboflavin. Im Verlauf dieser Reaktion werden $O_2 \cdot$ Radikale freigesetzt, die einen Farbumschlag des NBT von gelb nach blau-schwarz bewirken. Die SOD konkurriert mit NBT um die Radikale und verhindert dadurch eine Schwarzfärbung des Gels. Nach der Gelelektrophorese wurde das native Polyacrylamidgel 20 min im Dunkeln mit Lösung A (0.3 mM NBT, 0.26 mM Riboflavin in $H_2O_{bidest.}$) inkubiert. Danach wurden 0.3 % TEMED zugegeben und das Gel bei Tageslicht oder unter Blaulicht für eine beschleunigte Reaktion inkubiert. Das blaugefärbte Gel mit ungefärbten Bereichen, die den SOD-Banden entsprechen, wurde bei Erreichen eines guten Kontrastes in Wasser gespült und somit die Reaktion gestoppt.

2.5.3 Hydrogenasen-Aktivitätsfärbung

Für den Nachweis der Hydrogenasenaktivität wurden die Proteinkomplexe eines zellfreien Extraktes in einer Native-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss für 10 min mit 50 mM MOPS pH 7.0 gewaschen und dann in Aktivitätspuffer (50 mM MOPS pH 7.0, 0.5 mM Benzylviologen, 1 mM 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, 0.3 mM NADH) unter 100 % H_2 -Atmosphäre in einer Serumflasche bei Raumtemperatur inkubiert (Ballantine and Boxer, 1985; Enoch and Lester, 1975).

2.6 ICP-MS (*inductively-coupled-plasma mass-spectrometry*)

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma dient der Spurenelementanalyse (X Serie II, Thermo Fisher). Das Verfahren beruht auf der Bildung eines Argon-Plasmas bei 5 000 bis 10 000 °C aus einem hochfrequenten ionisierten Argon-Strom. Die Proben werden eingeleitet und ionisiert. Durch den Skimmer und den Sampler werden die Ionen in das Vakuumsystem des Massenspektrometers überführt. Die Ionen wurden durch mehrere Linsen fokussiert, durch den Quadropol die Massen getrennt und anschließend quantitativ vom Detektor erfasst.

2.6.1 Probenanzucht

Zur quantitativen Elementbestimmung mittels ICP-MS wurden *C. metallidurans* Vorkulturen in Tris-MM angezogen und bei 30 °C kultiviert. Mit diesen Vorkulturen der frühen stationären Phase wurden 2. Vorkulturen in Tris-MM 5 %ig inokuliert, welche ebenfalls bei 30 °C inkubiert wurden. Ausgehend von den 24 h Kulturen wurden Hauptkulturen mit einem Volumen von 12

ml Tris-MM angezogen. Diese Kulturen wurden 1 %ig im Medium verdünnt und in einem Wasserbad bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Diesen Kulturen wurden bei 100 KE 100 µM EDTA, 10 µM ZnCl₂, 100 µM ZnCl₂, 100 µM CoCl₂ oder 100 µM NiCl₂ zugegeben. Nach dem Erreichen von 150 KE wurden die Proben durch Zentrifugation bei 5 000 rpm und 4 °C für 30 min (Eppendorf-Zentrifuge 5804R [Eppendorf AG, Hamburg]) geerntet. Die Zellpellets wurden 2-mal mit Puffer I (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) gewaschen, um überschüssige Metalle zu entfernen. Außerdem wurden Leerwerte mit und ohne Induktion durch Spurenelemente mitgeführt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Probenaufbereitung

Die Zellpellets wurden in 71 µl analytischer Salpetersäure (70 %) aufgenommen und mindestens 2 h bei 70 °C mineralisiert. Nach der Mineralisierung wurden die Proben auf ein Volumen von 2.5 ml mit Reinstwasser aufgefüllt, sodass eine Salpetersäure-Endkonzentration von 2 % entstand.

2.6.3 Ermittlung des Metallgehalts ganzer Zellen

Zur quantitativen Bestimmung des Metallgehalts in den Proben, wurden vor jeder Messreihe Kalibriergeraden erstellt. Zu diesem Zweck wurden Multielementstandards (Merck KGaA, Darmstadt) in Konzentrationen von 0 bis 100 ppb (*parts per billion*) erstellt, wobei das Verhältnis der gemessenen *counts* gegen den internen Indiumstandard bestimmt wurde. Die Konzentration der jeweiligen Elemente wurde in ppb bestimmt. Die gemessenen ppb-Werte der Leerwerte dienten als Korrekturfaktor für die Berechnung. Außerdem wurden Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen errechnet. Die Nachweisgrenze berechnet sich aus der Summe des Leerwertmittelwertes (MW) und der dreifachen absoluten Standardabweichung (SAW) des Leerwertes (Formel 7). Die Bestimmungsgrenze errechnet sich aus der Summe des Leerwertmittelwertes und der zehnfachen absoluten Standardabweichung des Leerwertes (Formel 8).

$$\text{Formel 7:} \quad \text{MW} + (3 \cdot \text{SAW})$$

$$\text{Formel 8:} \quad \text{MW} + (10 \cdot \text{SAW})$$

Für die Datenauswertung wurde mit Hilfe einer *cfu*-Kalibriergerade und den ppb-Werten die Atomanzahl pro Zelle berechnet (Formel 9).

Formel 9: $(ppb * 10^6 * N_A) / (2 * M * Z)$

mit

- ppb – *ppb*-Wert der ICP-MS
- N_A – Avogadrokonstante $6.022 * 10^{23}$
- M – Molare Masse [g/mol]
- Z – Zellzahl pro Liter [Zellen/l]
- 2 – Verdünnungsfaktor durch Aufkonzentration von 10 ml auf 5 ml
- 10^6 – Einheitskorrekturfaktor

2.6.4 Probenaufbereitung und Datenauswertung von Proteinproben

Mit Hilfe der ICP-MS können an Proteine gebundene Metalle bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Proteinlösungen auf eine Proteinendkonzentration von 0.1 mg/ml oder 0.025 mg/ml eingestellt und mit 43 μ l analytischer Salpetersäure (70 %) gemischt. Die Proteinproben wurden zur Mineralisierung 2 h bei 70 °C inkubiert und im Anschluss mit Reinstwasser auf 1.5 ml aufgefüllt. Unter Einbeziehung der molaren Masse des jeweiligen Proteins und der Metalle wurde das Molverhältnis berechnet.

3 Ergebnisse

Die putativen Chaperone CobW_{1/2/3}, gehören zur Unterfamilie COG0523 der P-loop GTPasen (Leipe *et al.*, 2002). Durch die Entdeckung der Zur-Bindeboxen von Haas *et al.*, 2009 wurde erstmals ein Zusammenhang mit der Zinkhomöostase hergestellt. Ob es sich bei den 3 annotierten Chaperonen CobW_{1/2/3} aus *Cupriavidus metallidurans* um Zink-bindende Proteine handelt, was die Rolle dieser Proteine bei der Aufrechterhaltung des Zinkgleichgewichts ist und wie die Regulation der Genexpression erfolgt, waren die zentralen Fragen dieser Arbeit. Um diese Fragen zu beantworten, wurden Einfach- und Mehrfachdeletionsmutanten in verschiedenen Stammhintergründen erstellt und der Einfluss der Mutationen in Wachstumskurven, *Dose Response*-Experimenten und im Metallgehalt ermittelt. Zusätzlich wurden proteinbiochemische Versuche durchgeführt, um die Metallbindekapazität zu bestimmen, und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Außerdem sollte die Zugehörigkeit der Chaperone zum Zur-Regulon geklärt werden.

3.1 *cobW*_{1/3} und *zur* sind Teile des Zur-Regulons

Von Schmidt *et al.*, 2014 konnte mit Hilfe von EMSA-Experimenten (*electrophoretic mobility shift assay*) die annotierte Zur-Bindebox in der Promotorregion von *zupT* (*zupT*_p) bestätigt werden. Durch Optimierung der Reinigungsbedingungen wurde Zur als Holo-Protein mit N-terminalem *Strep*-Tag über Säulenaffinitätschromatographie gereinigt (Abb. 40) und ein Metallgehalt von 2.9 ± 0.8 mol Zn/mol Protein (Tabelle 21) per ICP-MS bestimmt. Die Reproduktion des EMSA für *zupT*_p erfolgte nach dem Protokoll von Schmidt *et al.*, 2014 in abgewandelter Form, mit steigenden Holo-*Strep*-Zur Konzentrationen und konstanten DNA-Konzentrationen von 0.68 pmol. Durch PCR wurden die DNA-Sequenzen der Promotorbereiche amplifiziert und im Experiment auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt (siehe 2.3.10) (Abb. 7). Für alle EMSA wurden in Spur 1 als Kontrolle 0.68 pmol Promotor-DNA und in Spur 9 54 pmol Holo-*Strep*-Zur aufgetragen. Bei einem Verhältnis von 1:8 (Spur 2) ist der beginnende Shift, durch einen Schmier der DNA-Bande in der Ethidiumbromidfärbung (Abb. 7A) zu sehen, welcher bei einem Verhältnis von 1:39 (Spur 6) vollständig ist. Die Bande läuft verzögert in Höhe der 1 000 bp Markerbande und zeigt, dass durch Optimierung der Bedingungen Zur im Promotorbereich von *zupT* bindet.

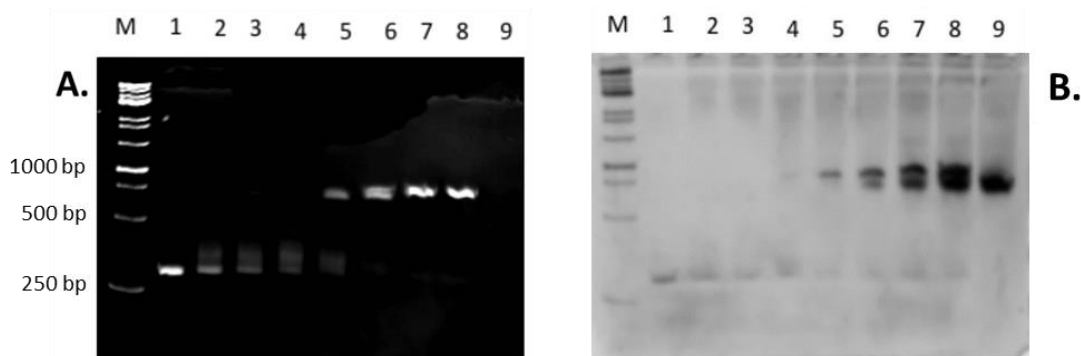


Abbildung 7: Ethidiumbromidfärbung (A) und Silberfärbung (B) eines nativen 10%igen Polyacrylamidgels nach EMSA von 0.68 pmol *zupTp* mit steigenden Konzentrationen Holo-*Strep-Zur* (Bütöf *et al.*, 2017). 0.68 pmol DNA des Promotorbereiches von *zupTp* wurden mit 0, 5.4, 10.7, 16.1, 21.4, 26.8, 40.2 oder 53.6 pmol (Spur 1-Spur 8) Holo-*Strep-Zur* für 30 min bei 30 °C inkubiert. In Spur 9 sind 53.6 pmol des Proteins ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Der 1 kb DNA-Ladder diente als Größenstandard (M).

Der Promotorbereich direkt *upstream* vom ATG des Gens *cobW₁* (*cobW_{1p}*) mit einer Größe von 399 bp wurde per PCR amplifiziert. Eine Bindung von *Zur* im Promotorbereich von *cobW_{1p}* ist in der Ethidiumbromidfärbung (Abb. 8A Spur 4) bei einem Verhältnis von 1:24 und nach der Silberfärbung (Abb. 8B Spur 3) bei 1:16 durch ein verzögertes laufen in der Native-PAGE erkennbar. Die Verzögerung ist stärker als bei *zupTp*, was zu einer Bande im Bereich von 2 000 bp führt.

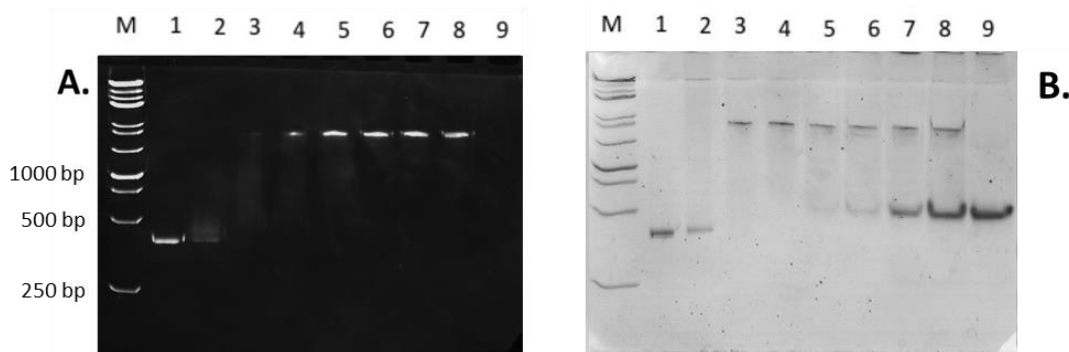


Abbildung 8: 10%ige Native-PAGE gefärbt mit Ethidiumbromid (A) zur DNA-Visualisierung und Silber (B) für die Anfärbung von DNA und Proteinen nach der Inkubation von 0.68 pmol *cobW_{1p}* DNA mit Holo-*Strep-Zur* (Bütöf *et al.*, 2017). Nach DNA Amplifikation wurden 0.68 pmol DNA des Promotorbereiches von *cobW_{1p}* mit 0, 5.4, 10.7, 16.1, 21.4, 26.8, 40.2 oder 53.6 pmol (Spur 1-Spur 8) Holo-*Strep-Zur* für 30 min bei 30 °C inkubiert. In Spur 9 sind 53.6 pmol des Proteins ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Der 1 kb DNA-Ladder diente als Größenstandard (M).

Die Untersuchung der *Zur*-Bindebox im Promotorbereich von *cobW₃* (*cobW_{3p}*) erfolgte mit einem 344 bp großem DNA-Fragment, welches per PCR *upstream* vom Start-Codon amplifiziert wurde. Der beginnende Shift und damit die Bindung von *Zur* an die DNA von *cobW_{3p}* ist bei einem Verhältnis 1:8 zu beobachten, wobei die gesamte DNA bei einem

Verhältnis von 1:16 gebunden ist (Abb. 9 Spur 3). Das verzögerte Laufverhalten der gebundenen DNA führt wie bei *zupT_p* zu einer Bande im Bereich von 1 000 bp.

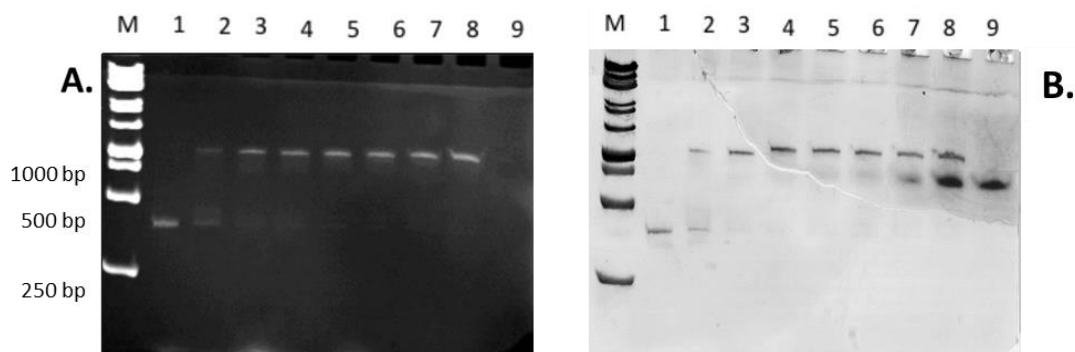


Abbildung 9: EMSA von 0.68 pmol *cobW_{3p}* mit steigenden Konzentrationen Holo-*Strep*-Zur visualisiert mit Ethidiumbromid (A) und Silber (B) (Bütöf *et al.*, 2017). Der Ansatz bestehend aus 0.68 pmol DNA des Promotorbereiches von *cobW₃* und steigenden Konzentrationen von 0, 5.4, 10.7, 16.1, 21.4, 26.8, 40.2 oder 53.6 pmol (Spur 1-Spur 8) Holo-*Strep*-Zur wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert. In Spur 9 sind 53.6 pmol des Proteins ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Der 1 kb DNA-Ladder diente als Größenstandard (M).

Haas *et al.*, 2009 publizierte einer weitere Zur-Bindebox im Promotorbereich von *zur* (*zur_p*). Für den EMSA wurde ein PCR-Fragment mit einer Größe von 412 bp *upstream* des ATG amplifiziert. Eine Bindung von Zur an *zur_p* ist bei einem Verhältnis von 1:32 (Abb. 10 Spur 5) zu sehen, wobei das verzögerte Laufverhalten wiederum zu einer Bande auf Höhe der 1 000 bp Markerbande führt.

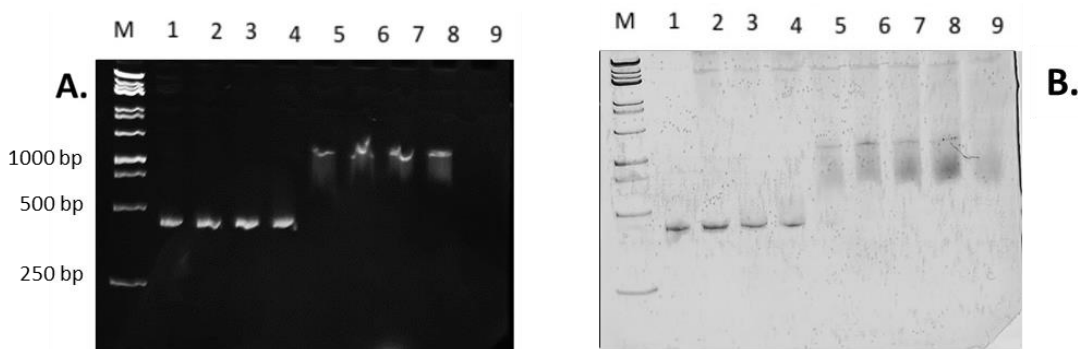


Abbildung 10: Ethidiumbromidfärbung (A) und Silberfärbung (B) eines nativen 10 %igen Polyacrylamidgels nach EMSA von 0.68 pmol *zurp* mit Holo-*Strep*-Zur (Bütöf *et al.*, 2017). 0.68 pmol DNA des Promotorbereiches von *zur* wurden mit 0, 5.4, 10.7, 16.1, 21.4, 26.8, 40.2 oder 53.6 pmol (Spur 1-Spur 8) Holo-*Strep*-Zur für 30 min bei 30 °C inkubiert. In Spur 9 sind 53.6 pmol des Proteins ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Der 1 kb DNA-Ladder diente als Größenstandard (M).

Für den Nachweis einer Zink-abhängigen Interaktion zwischen Zur und den Zur-Bindebox, wurden EMSA mit *cobW_{1p}* und Apo-*Strep*-Zur mit und ohne Zugabe von Zink, sowie dem Holo-Protein mit EDTA-Zugabe durchgeführt, welche diese Hypothese bestätigten (Abb. 41)

Als zusätzliche Kontrollen dienten DNA-Abschnitte im *zur*-Cluster und *upstream* vom alternativen Start-Codon von *zupT*, für die keine Zur-Bindeboxen vorhergesagt wurden und für die auch keine Bindung von Zur beobachtet werden konnte (Abb. 42).

3.1.1 Die Deletion von *zur* führt zu einer gesteigerten Expression von *cobW*_{1/2/3}

Im Gegensatz zu *cobW*_{1/3} befindet sich *upstream* von *cobW*₂ keine Zur-Bindebox und es konnte auch kein Shift von *cobW*_{2p} im EMSA beobachtet werden. *CobW*₂ ist allerdings *downstream* von *zur* kodiert. Aufgrund einer möglichen Co-Transkription könnte dieses Gen ebenfalls unter der Kontrolle von Zur stehen und zum Regulon gehören. In Induktionsexperimenten sollte somit ein Zinkmangel oder eine Deletion von *zur* zu einer gesteigerten Expression der Gene führen. Um dies zu überprüfen, wurden *cobW*₃- und *cobW*₂-*lacZ*-Fusionen im Genom von *C. metallidurans* generiert, sowie die Induktion von *cobW*₁ in den Disruptionsmutanten durch Insertion des *lacZ*-Gens in den Leserahmen von *cobW*₁ an Position 354 ($\phi[cobW_1::lacZ]354$) gemessen. Die Basalaktivität von *cobW*₁ liegt im Wildtyp CH34 bei 2.1 ± 1.4 U/mg TG und im AE104 bei 1.2 ± 0.2 U/mg TG (Tabelle 4). Die Deletion der Effluxsysteme *zntA*, *cadA*, *fieF* und *dmef* ($\Delta e4$) führt zu einer verminderten Basisaktivität von *cobW*₁ (0.4 ± 0.3 U/mg TG). In allen Stammhintergründen führt die Deletion von *zupT* zu einer höheren Aktivität, was auf den erzeugten Zinkmangel zurück zu führen ist, aber auch auf einen Zusammenhang zwischen den Genen hinweist. Durch die Deletion von *zur* wird die Regulation der Gene des Zur-Regulons entkoppelt. Die Deletion dieses Gens im AE104 führt zu einer Erhöhung der Induktion um Faktor 468 und bestätigt somit die Zugehörigkeit von *cobW*₁ zum Zur-Regulon. In den Stämmen CH34, AE104, $\Delta zupT$ und den Effluxdeletionsmutanten $\Delta e4$ und $\Delta e4zupT$ führt EDTA im Wachstumsmedium zu einer gesteigerten Expression von *cobW*₁ um Faktor 7 bis 40, was die Rolle von *CobW*₁ bei Zinkmangelbedingungen bestätigt. Ausschließlich im Stamm $\Delta zupT$ führen 10 μ M Kobalt zu einer signifikanten Induktion von *cobW*₁ um Faktor 3.8. Die Zugabe von 10 μ M bzw. 100 μ M Cadmium zum Medium führte zu einer Geninduktion um Faktor 1.8-10.4 in den Stämmen AE104 und $\Delta zupT$.

Um die Expression von *cobW*₂ zu bestimmen wurde eine *lacZ*-Fusion konstruiert ($\phi[cobW_2-lacZ]$), bei der das Reportergen direkt hinter das Stopp-Codon von *cobW*₂ kloniert wurde. Im Gegensatz zu *cobW*₁ weist *cobW*₂ unter den getesteten Bedingungen eine höhere Grundlevelaktivität im CH34, AE104 und $\Delta zupT$ von 64 bis 93 U/mg TG auf. Durch die Zugabe des Chelators EDTA konnte in diesen Stammhintergründen die Expression um Faktor 2 gesteigert werden. Zink reprimiert die Expression des Gens *cobW*₂ im CH34 und im $\Delta zupT$, hat aber

Ergebnisse

keinen Einfluss im AE104. Die Deletion des globalen Regulators *zur* führt zu einer erhöhten Expression von *cobW₂* auf 442 ± 83 U/mg Trockengewicht. Diese Aktivität kann durch die Erzeugung eines Metallmangels nicht gesteigert werden und wird auch durch Metallzugabe nicht verändert und weist auf eine Zugehörigkeit des Gens zum Zur-Regulon hin.

Die Expression von *cobW₃* wurde ebenfalls durch Fusion des Reportergens *lacZ* direkt hinter das Stopp-Codon bestimmt ($\phi[cobW_3-lacZ]$). Die Grundlevelaktivität von *cobW₃* liegt in den Stämmen AE104, CH34, $\Delta e4$ und $\Delta zurT$ bei 95 bzw. 125 U/mg TG. Die Erzeugung eines

Tabelle 4: In vivo Aktivität der Gene des Zur-Regulons.

| Stamm | Basisaktivität [U/mg TG] | Faktor der Hochregulation | | | | | | | |
|---|-----------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------|----------------------|
| | | EDTA ^a | | ZnCl ₂ ^{ab} | | CoCl ₂ ^{ab} | | CdCl ₂ ^b | |
| | | 50 μ M | 1 mM | 10 μ M | 100 μ M | 10 μ M | 100 μ M | 10 μ M | 100 μ M |
| <i>$\phi(cobW_1-lacZ)$</i> 354 | | | | | | | | | |
| CH34 | 2.1 \pm 1.4 | 37.4 \pm 6.3 | 15.0 \pm 4.8 | 0.2 \pm 0.0 | n.d. | 1.0 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.3 |
| AE104 | 1.2 \pm 0.2 | 20.3 \pm 2.6 | 65.9 \pm 12.9 | n.d. | 0.7 \pm 0.2 | 1.2 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.1 | 1.8 \pm 0.2 | 3.6 \pm 0.7 |
| $\Delta zurT$ | 3.4 \pm 0.56 | 27.8 \pm 2.8 | 23.1 \pm 2.5 | n.d. | 1.2 \pm 0.7 | 3.8 \pm 0.5 | 1.5 \pm 0.5 | 10 \pm 1.1 | 8.8 \pm 2.9 |
| Δzur | 562 \pm 81 | 1.1 \pm 0.1 | 1.4 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.4 | 1.2 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 |
| $\Delta e4$ | 0.4 \pm 0.3 | 7.5 \pm 2.8 | 93.6 \pm 18.3 | 0.2 \pm 0.0 | n.d. | 0.2 \pm 0.1 | n.d. | n.d. | 0.1 \pm 0.0 |
| $\Delta e4 zurT$ | 3.6 \pm 1.6 | 18.7 \pm 4.2 | 16.7 \pm 3.6 | 0.9 \pm 0.3 | 1.0 \pm 0.4 | 1.3 \pm 0.4 | 1.2 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.7 | 0.7 \pm 0.6 |
| <i>$\phi(cobW_2-lacZ)$</i> | | | | | | | | | |
| CH34 | 64 \pm 20 | 2.6 \pm 0.6 | 2.4 \pm 0.5 | 0.4 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.1 |
| AE104 | 85 \pm 3.3 | 2.2 \pm 0.0 | 2.6 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 1.4 \pm 0.0 | 1.6 \pm 0.0 |
| $\Delta zurT$ | 93 \pm 7.3 | 2.8 \pm 0.0 | 2.6 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 |
| Δzur | 442 \pm 83 | 1.0 \pm 0.0 | 1.1 \pm 0.0 | 1.2 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 |
| <i>$\phi(cobW_3-lacZ)$</i> | | | | | | | | | |
| CH34 | 123 \pm 48 | 1.6 \pm 0.5 | 1.5 \pm 0.4 | 1.1 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.1 |
| AE104 | 95 \pm 32 | 2.8 \pm 0.4 | 2.2 \pm 0.5 | 1.4 \pm 0.3 | 1.3 \pm 0.2 | 0.6 \pm 0.5 | 0.3 \pm 0.3 | 1.2 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.2 |
| $\Delta zurT$ | 108 \pm 24 | 1.6 \pm 0.6 | 1.9 \pm 0.6 | 0.8 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 |
| Δzur | 615 \pm 88 | 0.9 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.3 | 0.9 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.3 |
| $\Delta e4$ | 125 \pm 45 | 1.4 \pm 0.5 | 1.5 \pm 0.3 | 0.6 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.3 | 0.3 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 |
| $\Delta e4 zurT$ | 218 \pm 63 | 1.0 \pm 0.3 | 1.2 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 |

Im Wildtypstamm CH34, dem Parentalstamm AE104 und den Mutanten wurden Disruptionen in *cobW₁* durch Insertion von *lacZ*-pECD794-1 ($\phi(cobW_1-lacZ)$) und *lacZ*-Fusionen ($\phi(cobW_2-lacZ)$, $\phi(cobW_3-lacZ)$) *downstream cobW₂* und *cobW₃* erzeugt. Zellen der frühen exponentiellen Phase wurden zu diesem Zweck für 3 h bei 30 °C mit steigenden EDTA- bzw. Metallkonzentrationen inkubiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde bestimmt und der Faktor der Expressionssteigerung im Verhältnis zur Basisaktivität ohne Zusatz berechnet. Ein Faktor größer 1 bedeutet eine gesteigerte Expression des Gens, wobei signifikante Ergebnis fett dargestellt sind. Signifikante Unterschiede sind fett markiert. n.d. - nicht definiert ($n \geq 3$). ^a CH34 1000 μ M/5000 μ M EDTA; 1000 μ M/3000 μ M ZnCl₂; 100 μ M/ 1000 μ M CoCl₂, ^b $\Delta e4$ $\Delta e4 zurT$ 1 μ M/10 μ M ZnCl₂/CoCl₂/CdCl₂.

Metallmangels führt außer im Stamm $\Delta e4$ zu einer Induktion von *cobW*₃. Eine erhöhte Basisaktivität konnte im Stamm $\Delta e4zupT$ bestimmt werden, wobei die Deletion von *zupT* einen Metallmangel erzeugt, der für die Induktion des Gens zuständig ist. Im Δzur ist die Grundlevelaktivität um Faktor 6 höher im Vergleich zum Parentalstamm AE104. Die Metalle Zink, Kobalt und Cadmium führen zur Repression von *cobW*₃ in den Effluxdeletionsmutanten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Gene *cobW*_{1/2/3} durch Metallmangel induziert werden und indirekt durch die Kodierung *downstream* von *zur* oder direkt durch Zur-Bindeboxen im Promotorbereich zum Zur-Regulon gehören. Diese Ergebnisse stellen eine Verknüpfung zur Zinkhomöostase her.

3.2 Physiologische Charakterisierung der *C. metallidurans* Deletionsmutanten

Metallchaperone können in der Zelle unterschiedliche Funktionen besitzen. Zum einen die Speicherung von Metallen und zum anderen der Transport zu Target-Proteinen und die damit verbundene Übergabe des oder der Co-Faktoren. Der Einfluss der Chaperone auf die Metallhomöostase sollte in Deletions- und Disruptionsmutanten in diversen Stammhintergründen durch physiologische Experimente überprüft werden (Anhang 11.6).

3.2.1 Die Deletion der *cobW*'s führt im CH34 zu multiplen Effekten

Der Wildtyp CH34 besitzt 2 Chromosomen und 2 Megaplasmide pMOL28 und pMOL30, auf denen eine Vielzahl von Resistenzdeterminanten kodiert sind. In diesem Stammhintergrund wurden markerfreie Deletionen des gesamten *cobW*₁-Clusters und von *cobW*₃ erzeugt und zusätzlich Disruptionen von *cobW*₂. So war es im CH34 möglich Einzel-, Doppel- und Dreifachdeletionen zu untersuchen. Im ersten Schritt wurde der Einfluss der Deletionen auf das Wachstum der Stämme untersucht (siehe 2.4.1.2). Der Wildtyp CH34 erreicht die stationäre Phase nach ca. 17 h und besitzt eine Verdopplungszeit von 3.5 ± 0.4 h (Abb. 11A). Lediglich in der Disruptionsmutante ist ein verändertes Wachstum erkennbar, denn dieser Stamm erreicht die stationäre Phase nach 20 h mit einer signifikant erhöhten Zelldichte. Dieser Effekt ist durch die Zugabe von EDTA nicht zu erkennen (Abb. 11B). Unter dieser Bedingung erhöht sich die Verdopplungszeit der Disruptionsmutante auf 4.9 ± 0.2 h, was ebenfalls zu einem späteren Eintritt in die stationäre Phase führt (22 h). Dies weist auf eine essentielle Rolle als Zinkspeicherprotein von CobW₂ unter Mangelbedingungen hin. Diese These wird unterstützt durch ein verschlechtertes Wachstum des Stammes mit Zink im Medium. Unter dieser Bedingung liegt die Verdopplungszeit bei 4.4 ± 0.0 h im Vergleich zum CH34 mit 2.7 ± 0.1 h (Abb. 11C). Die Deletion von *cobW*₃ hat im Vergleich dazu einen Effekt auf das

Wachstum mit Kobalt und könnte ein Indiz dafür sein, dass CobW₃, welches kein GCxCC-Motiv für die Metallbindung besitzt, als Speicherprotein unterschiedlichen Metallen dient. Der Phänotyp äußert sich in einer verlängerten lag-Phase bei gleicher Verdopplungszeit.

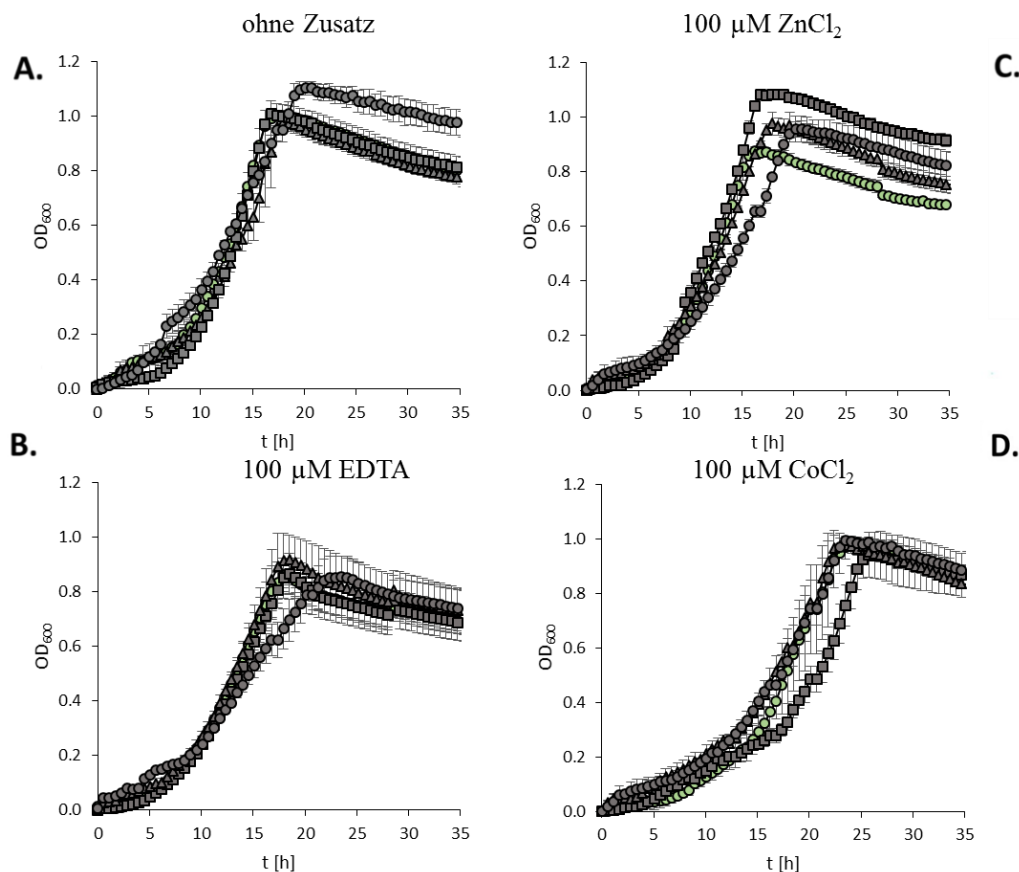


Abbildung 11: Wachstumskurven des Parentalstammes CH34 und der Einzeldelentionsmutanten. Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur angezogen und mit dieser nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert. Das Wachstumsverhalten in Tris-Minimalmedium ohne Zusätze (A), 100 µM EDTA (B), 100 µM ZnCl₂ (C) und 100 µM CoCl₂ (D) des Wildtyps CH34 (○), CH34ΔcobW₁-Cluster (△), CH34φ(cobW₂::lacZ)299 (◐) und CH34ΔcobW₃ (■) wurden untersucht (n≥3).

Auch in den Doppeldeletionsmutanten zeigt sich ein Einfluss der Disruption von *cobW*₂ auf das Wachstum in Tris-Minimalmedium ohne Zusätze, mit EDTA und Zink in den Stammhintergründen CH34ΔcobW₃ und CH34ΔcobW₁-Cluster. (Abb. 12). Unter Metallmangel erhöht sich in den genannten Doppeldeletionsmutanten die Verdopplungszeit im Vergleich zum Wildtyp CH34 von 2.5 ± 0.2 h auf 4.5 ± 0.2 h bzw. 4.1 ± 0.1 h und könnte für eine geringere Verfügbarkeit von Zink in den Zellen sprechen. Gestützt wird diese These durch die Wachstumskurven mit Zink, bei denen ein deutlich verschlechtertes Wachstum des Stammes CH34ΔcobW₁-Cluster φ(cobW₂::lacZ)299 zu beobachten ist, einhergehend mit einer Verdopplungszeit von 5.2 ± 0.3 h. Bei Zugabe von Kobalt zeigt lediglich der Stamm

CH34 $\Delta cobW_3 \phi(cobW_2::lacZ)299$ einen signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp, was sich in einer verlängerten lag-Phase bei gleicher Verdopplungszeit auswirkt und ein Indikator für die Rolle der Chaperone bei der Aufrechterhaltung der Homöostase verschiedener Metalle.

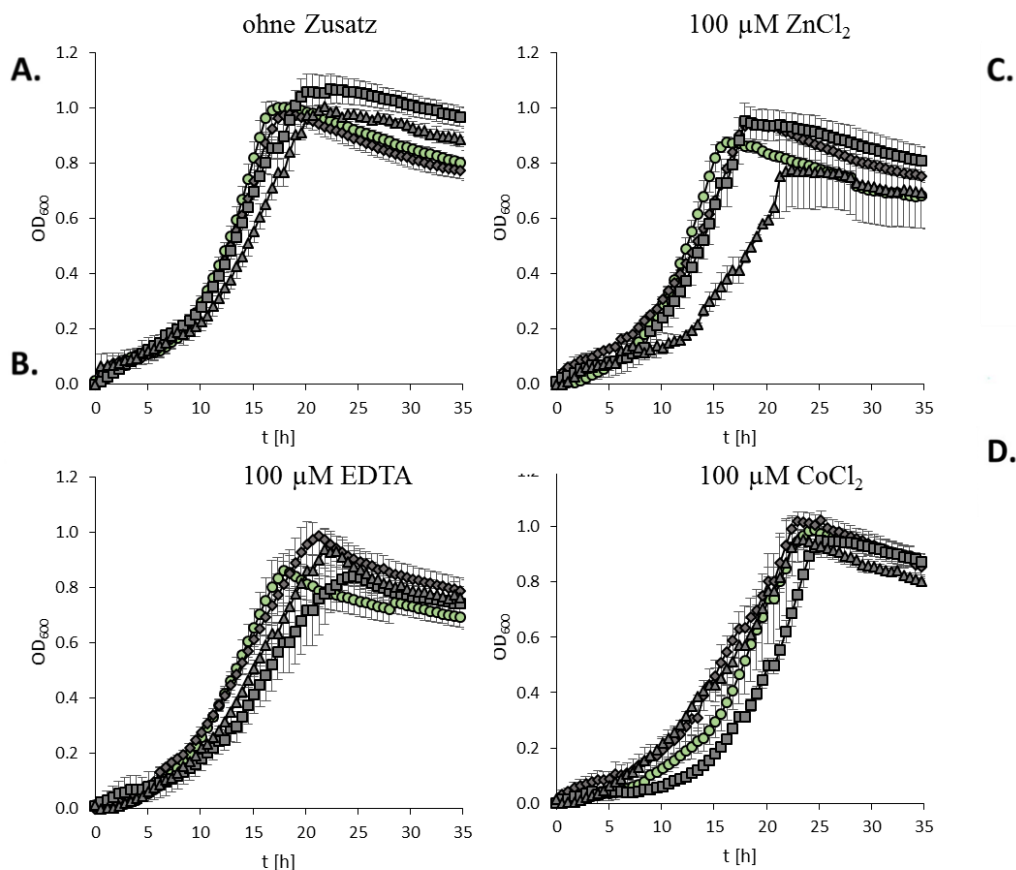


Abbildung 12: Wachstumskurven der Doppeldeletionen im Vergleich zum CH34 Wildtyp. Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur hergestellt und mit dieser nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert. Das Wachstumsverhalten in Tris-Minimalmedium ohne Zusätze (A), 100 μ M EDTA (B), 100 μ M $ZnCl_2$ (C) und 100 μ M $CoCl_2$ (D) des Wildtyps CH34 (\circ), CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (\triangle), CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$ (\diamond) und CH34 $\Delta cobW_3 \phi(cobW_2::lacZ)299$ (\square) wurden untersucht ($n \geq 3$).

Die Dreifachdeletionsmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp CH34, sowohl in Tris-Minimalmedium als auch mit EDTA und Zink im Medium ein deutlich verschlechtertes Wachstum, mit Verdopplungszeiten zwischen 4.2 ± 0.2 h bis 5.7 ± 0.2 h. Kobalt im Medium führt zu keinem veränderten Wachstum der Mutante im Vergleich zum CH34 (Abb. 13).

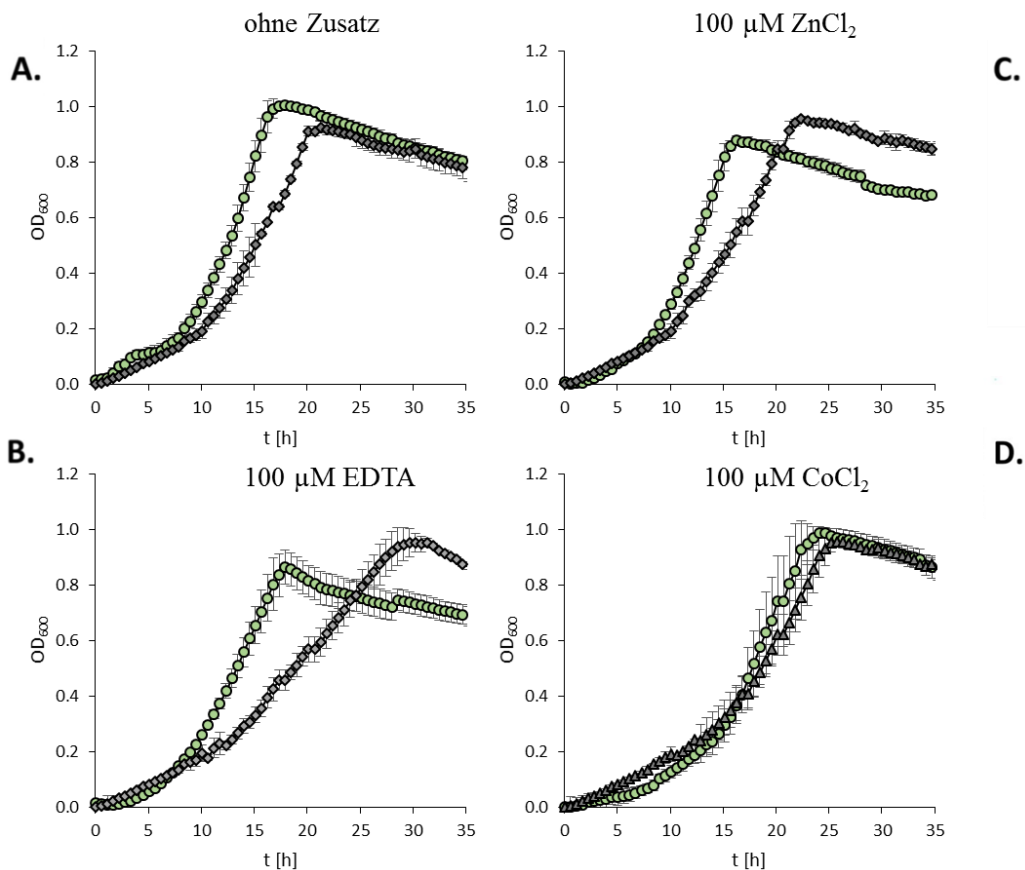


Abbildung 13: Vergleich des Wachstums des Parentalstammes CH34 im Vergleich zur Dreifachdeletionsmutante CH34 Δ cobW₁-Cluster Δ cobW₃ ϕ (cobW₂'::lacZ)299. Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur erzeugt und mit dieser nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert. Das Wachstumsverhalten in Tris-Minimalmedium ohne Zusätze (A), 100 μ M EDTA (B), 100 μ M ZnCl₂ (C) und 100 μ M CoCl₂ (D) des Wildtyps CH34 (\circ) und CH34 Δ cobW₁-Cluster Δ cobW₃ ϕ (cobW₂'::lacZ)299 (\blacklozenge) wurden untersucht ($n \geq 3$).

3.2.1.1 Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration der CH34-Derivate

Der Einfluss der Chaperone auf die Metallhomöostase zeigt sich auch in Wachstumsendpunktbestimmungen mit steigenden Konzentrationen des Chelators EDTA, sowie den Metallen Nickel, Zink, Kobalt und Cadmium (siehe 2.4.1.3). Aus den entstandenen dosis abhängigen Kurven wurden die IC₅₀-Werte berechnet. CobW₂ und CobW₃ haben einen Einfluss auf das Wachstum von *C. metallidurans* bei Metallmangel, was sich auch in den IC₅₀-Werten wieder spiegelt, denn diese sind in den Disruptionsmutanten CH34 ϕ (cobW₂'::lacZ)299 und CH34 Δ cobW₃ ϕ (cobW₂'::lacZ)299 niedriger als im Wildtyp CH34 (Tabelle 5). Dies könnte bedeuten, dass nicht genügend frei verfügbares Metall in der Zelle ist, welches an Targetproteine übergeben werden kann. Bestätigt wird dies durch einen Zink sensitiven Phänotyp der Doppel- und Dreifachdeletionsmutanten. Die IC₅₀-Werte weisen außerdem darauf hin, dass sich die Chaperone CobW₂ und CobW₃ gegenseitig komplementieren können, denn lediglich die Doppelmutante zeigt einen Cadmium sensitiven Phänotypen.

Wie auch in den Wachstumskurven zeigt sich eine Verbindung zwischen der Kobalthomöostase und der Deletion von *cobW₃*, was sich in einer verringerten Resistenz durch das Fehlen des Gens ausdrückt. Der Resistenzverlust könnte auf einen verminderten Kobaltgehalt in der Zelle hinweisen und würde für eine Speicherfunktion des Chaperons sprechen.

Eine gestörte Metallhomöostase durch Deletion bzw. Disruption eines der Gene, zeigt sich auch an den IC50-Werten der anderen Metalle, die im Fall von Nickel zu sensitiven Phänotypen führen.

Tabelle 5: Mittlere inhibitorische Konzentrationen von EDTA und divalenter Kationen auf CH34.

| Stamm | IC50-Werte | | | | |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [mM] | NiCl ₂ [mM] | CoCl ₂ [mM] | CdCl ₂ [μM] |
| CH34 | 6.0 ^{±1.13} | 2.0 ^{±0.13} | 2.6 ^{±0.20} | 1.5 ^{±0.24} | 103 ^{±9} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> -Cluster | 8.7^{±1.09} | 2.1 ^{±0.15} | 2.1^{±0.14} | 1.6 ^{±0.43} | 127^{±12} |
| CH34 φ(<i>cobW₂</i> :: <i>lacZ</i>)299 | 3.6^{±0.77} | 2.0 ^{±0.10} | 1.9^{±0.16} | 1.5 ^{±0.07} | 129^{±8} |
| CH34Δ <i>cobW₃</i> | 6.0 ^{±0.99} | 1.9 ^{±0.19} | 1.3^{±0.15} | 1.0^{±0.11} | 106 ^{±24} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> -Cluster φ(<i>cobW₂</i> :: <i>lacZ</i>)299 | 6.2 ^{±1.30} | 1.7 ^{±0.10} | 1.8^{±0.08} | 1.4 ^{±0.20} | 123^{±9} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> -ClusterΔ <i>cobW₃</i> | 8.5 ^{±1.32} | 2.1 ^{±0.28} | 1.7^{±0.19} | 2.2^{±0.31} | 145^{±20} |
| CH34Δ <i>cobW₃</i> φ(<i>cobW₂</i> :: <i>lacZ</i>)299 | 4.5^{±0.37} | 1.6^{±0.06} | 1.7^{±0.09} | 0.8^{±0.12} | 45^{±2} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> -ClusterΔ <i>cobW₃</i> φ(<i>cobW₂</i> :: <i>lacZ</i>)299 | 6.4 ^{±1.71} | 1.3^{±0.07} | 1.5^{±0.12} | 1.5 ^{±0.25} | 150^{±9} |

Die Bestimmung der IC50-Werte für die Stämme beruht auf den *Dose Response*-Kurven mit steigenden Konzentrationen an Zusätzen und wurde berechnet durch das Einfügen einer linearen Regression. Dafür wurden die Stämme in einer Vorkultur angezogen, welche nach dem Erreichen der frühen stationären Phase zur Inokulation der 2. Vorkultur genutzt wurde. Die 20 stündige Hauptkultur wurde 10 %ig mit der 2. Vorkultur der späten stationären Phase inokuliert. Das Zellwachstum wurde bei 600 nm bestimmt (n≥4) und die signifikanten Ergebnisse fett markiert.

3.2.1.2 EDTA führt zu einem verminderten Zinkgehalt in den Zellen

In den *Dose Response*-Kurven sind multiple Effekte für die CH34-Derivate zu sehen, um zu testen ob sich dies auch in den Metallgehalten der Zellen wieder spiegelt, wurden ICP-MS-Messungen durchgeführt (siehe 2.6). Im Gegensatz zu den Wachstums- und den *Dose Response*-Kurven zeigt sich in diesem Experiment der Einfluss von *CobW₁* auf die Zinkhomöostase, denn die Deletion führt in jedem Stammhintergrund bei Metallmangel zu einem vermindert Zinkgehalt in der Zelle. Dies weist darauf hin, dass das Chaperon unter dieser Bedingung essentiell ist, um das wenige frei verfügbare Zink in der Zelle zu binden und aus dem Medium zu akquirieren. Einhergehend mit dem verminderten Zinkgehalt ist ein geringerer Kobaltgehalt pro Zelle und ein erhöhter Nickelgehalt pro Zelle, was auf eine gestörte

Metallhomöostase hinweist. Ein erhöhter Nickelgehalt zeigt sich auch in allen Doppeldeletionsmutanten und in der Dreifachdeletionsmutante, welcher bei Zugabe von EDTA und Zink in den Stämmen einhergeht mit der Verringerung des Kobaltgehalts in den Zellen, wenn *cobW₁* deletiert ist. Auch dies bestätigt eine gestörte Metallhomöostase, kann allerdings auch ein Indiz für eine Funktion des Proteins bei der Aufrechterhaltung des Kobaltgleichgewichts sein. Bestätigt wird dies durch einen verminderten Kobaltgehalt in den Zellen nach Zugabe des Metalls. Ein konträres Ergebnis zeigt sich für die Deletion von *cobW₃*, denn die Einzeldelentionsmutante akkumuliert doppelt so viel Kobalt in der Zelle wie der Wildtyp bei einem verringerten Nickelgehalt in der Zelle. Dies Ergebnis weist darauf hin, dass CobW₃ an der Entgiftung von Kobalt im Zytoplasma beteiligt sein könnte.

Die ICP-MS Daten zeigen allerdings auch einen Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Kobalt und Nickel in den Zellen, denn ein erhöhter Nickelgehalt in der Zelle führt zu einem verminderten Kobaltgehalt und umgekehrt.

Tabelle 6: Metallgehalt der CH34-Derivate.

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|---|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | Mg (10 ⁶) | Fe (10 ³) | Zn (10 ³) | Co (10 ³) | Ni (10 ³) |
| CH34 | ohne | 11.9 ^{±1.0} | 636 ^{±65} | 64 ^{±9.4} | 1.2 ^{±0.5} | 4.0 ^{±2.2} |
| | 100 µM EDTA | 11.4 ^{±0.9} | 681 ^{±96} | 63 ^{±6.2} | 1.5 ^{±0.2} | 5.4 ^{±2.5} |
| | 100 µM ZnCl ₂ | 11.8 ^{±0.8} | 629 ^{±212} | 119 ^{±8.6} | 1.2 ^{±0.2} | 7.2 ^{±3.5} |
| | 25 µM CoCl ₂ | 13.4 ^{±1.9} | 640 ^{±71} | 62 ^{±6.2} | 42 ^{±2.5} | 4.3 ^{±1.9} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> -Cluster | ohne | 10.5 ^{±0.9} | 720 ^{±61} | 73 ^{±6.3} | 1.2 ^{±0.1} | 9.0 ^{±2.9} |
| | 100 µM EDTA | 9.6 ^{±0.4} | 573 ^{±41} | 43^{±2.8} | 0.8^{±0.2} | 12.1^{±1.7} |
| | 100 µM ZnCl ₂ | 9.3 ^{±1.0} | 621 ^{±107} | 99 ^{±8.9} | 0.6^{±0.1} | 8.3 ^{±5.2} |
| | 25 µM CoCl ₂ | 10.0^{±0.1} | 618 ^{±10} | 59 ^{±2.5} | 28^{±5.2} | 2.7 ^{±0.5} |
| CH34 φ(<i>cobW₂</i> :: <i>lacZ</i>)299 | ohne | 11.7 ^{±0.7} | 687 ^{±73} | 67 ^{±5.3} | 0.8 ^{±0.1} | 11.4^{±0.8} |
| | 100 µM EDTA | 10.7 ^{±1.2} | 571 ^{±59} | 51 ^{±6.8} | 0.6^{±0.1} | 13.4^{±3.4} |
| | 100 µM ZnCl ₂ | 12.0 ^{±1.2} | 704 ^{±74} | 130 ^{±12} | 0.6^{±0.1} | 11.9 ^{±2.0} |
| CH34Δ <i>cobW₃</i> | ohne | 11.2 ^{±1.4} | 704 ^{±83} | 78 ^{±8.3} | 2.0 ^{±0.4} | 5.3 ^{±2.9} |
| | 100 µM EDTA | 10.7 ^{±0.9} | 604 ^{±96} | 47^{±5.2} | 1.4 ^{±0.2} | 3.7 ^{±2.8} |
| | 100 µM ZnCl ₂ | 12.1 ^{±1.1} | 609 ^{±251} | 140^{±4.1} | 2.6^{±0.4} | 6.3 ^{±4.0} |
| | 25 µM CoCl ₂ | 10.5 ^{±1.3} | 462^{±63} | 51 ^{±2.4} | 83^{±1.3} | 0.7^{±0.2} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> -Cluster φ(<i>cobW₂</i> :: <i>lacZ</i>)299 | ohne | 11.0 ^{±1.1} | 890^{±96} | 68 ^{±5.7} | 1.0 ^{±0.1} | 17.3^{±2.0} |
| | 100 µM EDTA | 10.3 ^{±1.1} | 668 ^{±126} | 49^{±5.6} | 0.6^{±0.1} | 14.0^{±2.2} |
| | 100 µM ZnCl ₂ | 10.7 ^{±0.6} | 766 ^{±92} | 119 ^{±10} | 0.6^{±0.1} | 15.0^{±3.0} |

Fortsetzung Tabelle 6: Metallgehalt der CH34-Derivate.

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|---|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | Mg (10 ⁶) | Fe (10 ³) | Zn (10 ³) | Co (10 ³) | Ni (10 ³) |
| CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$ | ohne | 11.0 ^{±0.9} | 794^{±61} | 79 ^{±6.3} | 0.9 ^{±0.2} | 12.8^{±2.2} |
| | 100 μ M EDTA | 11.7 ^{±0.9} | 664 ^{±86} | 47^{±2.8} | 0.5^{±0.1} | 10.4^{±2.1} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.8 ^{±1.0} | 738 ^{±75} | 108 ^{±9.2} | 0.5^{±0.1} | 10.1 ^{±1.8} |
| CH34 $\Delta cobW_3$ $\varphi(cobW_2'::lacZ)$ 299 | ohne | 10.1 ^{±0.8} | 675 ^{±53} | 75 ^{±4.8} | 1.7 ^{±0.2} | 12.0^{±0.9} |
| | 100 μ M EDTA | 11.1 ^{±0.9} | 729 ^{±102} | 59 ^{±5.9} | 1.1 ^{±0.3} | 12.8^{±1.9} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.9 ^{±1.0} | 739 ^{±92} | 123 ^{±20} | 1.0 ^{±0.3} | 15.3^{±3.0} |
| CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3 \varphi(cobW_2'::lacZ)$ 299 | ohne | 11.0 ^{±1.3} | 835 ^{±170} | 67 ^{±5.7} | 1.0 ^{±0.1} | 16.2^{±4.9} |
| | 100 μ M EDTA | 11.1 ^{±1.4} | 809 ^{±242} | 45^{±7.5} | 0.6^{±0.1} | 12.3^{±2.7} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.6 ^{±1.1} | 742 ^{±77} | 108 ^{±12} | 0.5^{±0.1} | 17.8^{±6.4} |

Für Metallgehaltbestimmung in den Zellen wurde eine 1. Vorkultur angezogen, welche zur Anzucht der 2. Vorkultur diente. Mit dieser Kultur wurde eine Hauptkultur inokuliert die gegebenenfalls von 100 bis 150 Kletteinheiten mit den Zusätzen 100 μ M EDTA, 25 μ M CoCl₂ oder 100 μ M ZnCl₂ inkubiert wurden. Es schlossen sich 2 Waschschrte mit Puffer I an. Daraufhin sorgte 70 %ige HNO₃ für die Mineralisierung der Zellen. Nach der Messung mittels ICP-MS erfolgte die Berechnung der Metallgehalte mit Hilfe der optischen Dichten und den gemessenen ppb-Werten. Die signifikanten Effekte sind fett markiert (n \geq 5).

3.2.1.3 Die CH34-Mutanten zeigen unterschiedliche Resistenzen gegen oxidativen Stress

Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und Paraquat sollte oxidativer Stress in den CH34-Mutanten ausgelöst werden. Das Ziel dabei war die Erzeugung von Stress auf den unterschiedlichen Ebenen der ROS-Entgiftung (*reactive oxygen species*). Organismen schützen sich gegen die toxische Wirkung von H₂O₂ mittels Enzymen (z.B. Katalasen, Peroxidasen), die es zu ungiftigem molekularem O₂ und H₂O spalten (McCord *et al.*, 1971). Auch die Zugabe von Paraquat (Methylviologen) führt in Organismen zu oxidativem Stress (Tsaneva and Weiss, 1990). Dabei regeneriert Paraquat durch univalente Elektronenübertragung auf molekularem O₂ Superoxid-Anionen (Hyperoxide) im Zytoplasma und steigert somit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Imlay, 2008). Diese Hyperoxide können in Gegenwart von Wasser unter Bildung von Sauerstoff und Hydroxiden, sowie von Wasserstoffperoxid (Superoxiddismutasen) zerfallen. Durch die Wirkung von H₂O₂ kann es wiederum zur Bildung von Hydroxylradikalen kommen (Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion) (Hassan and Fridovich, 1977; Fridovich, 1986). Es ist daher anzunehmen, dass unter Paraquat vergleichbare Effekte wie unter H₂O₂-Stress auftreten. Auffällig ist, dass die Mutation von *cobW₁* in allen Stammhintergründen zu einem resistenten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp CH34 führt (Abb. 14) und das dieser Effekt einhergeht mit einer erhöhten Resistenz gegen Cadmium und EDTA. Das Gen ist somit nicht essentiell für den Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies. Die Disruption von *cobW₂* führt im CH34 zum gleichen Effekt.

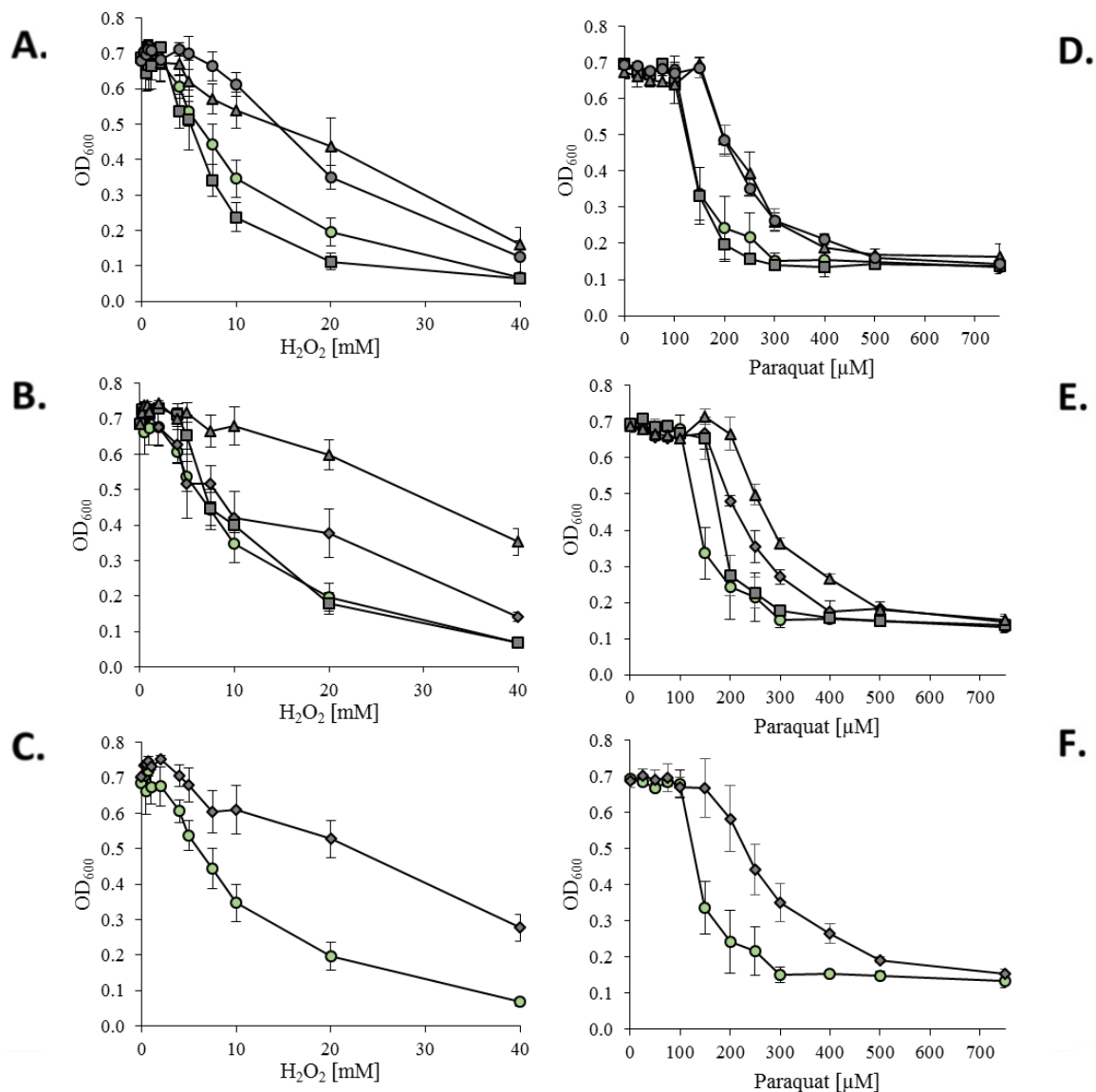


Abbildung 14: Dose Response Kurven mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ und Paraquat zur Herbeiführung von oxidativem Stress in den CH34-Derivaten. Zellen des Wildtypstammes CH34 (○) oder der Mutanten wurden in der Hauptkultur 5%ig mit der zweiten Vorkultur der späten stationären Phase in frischem Tris Minimalmedium verdünnt und mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ (A-C) und Paraquat (D-F) bei 30°C für 20 h kultiviert. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde bestimmt. Panel A und D zeigen die Einfachmutanten CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster (▲) CH34 $\Delta cobW_3$ (■) und CH34 $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (○). Die Darstellung der Doppelmutanten erfolgte in B und E CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (▲) CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$ (◆) CH34 $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (■). C und F: CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (◆) (n \geq 3).

Zusammenfassend für die CH34-Derivate kann gesagt werden, dass die Disruption von *cobW₂* in allen Stammhintergründen zu einem verschlechterten Wachstum in Tris-Minimalmedium und mit EDTA geführt hat, was eine Funktion als Speicherprotein vermuten lässt. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse der *Dose Response*-Kurven. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *cobW₃* zu einem veränderten Wachstum bei Kobalt im Medium, welches sich in einer verlängerten lag-Phase bei gleicher Verdopplungszeit ausdrückt und somit auf eine Funktion von CobW₃ bei der Speicherung von Kobalt in der Zelle hinweist. Ein Kobalt

sensitiver Phänotyp und eine erhöhte Akkumulation von Kobalt in der Zelle nach Inkubation mit dem Metall bestätigen dieses Ergebnis.

3.2.2 Physiologische Charakterisierung der AE104-Derivate

Der Stamm AE104 unterscheidet sich vom Wildtyp CH34 durch den Verlust der Megaplasמידe pMOL28 und pMOL30. Da auf den Megaplasmiden eine Vielzahl von Resistenzgenen kodiert sind, ist der AE104 im Vergleich zum CH34 sensitiver bei Metallstress. In diesem Stammhintergrund sollte der physiologische Einfluss der Chaperone ebenfalls untersucht

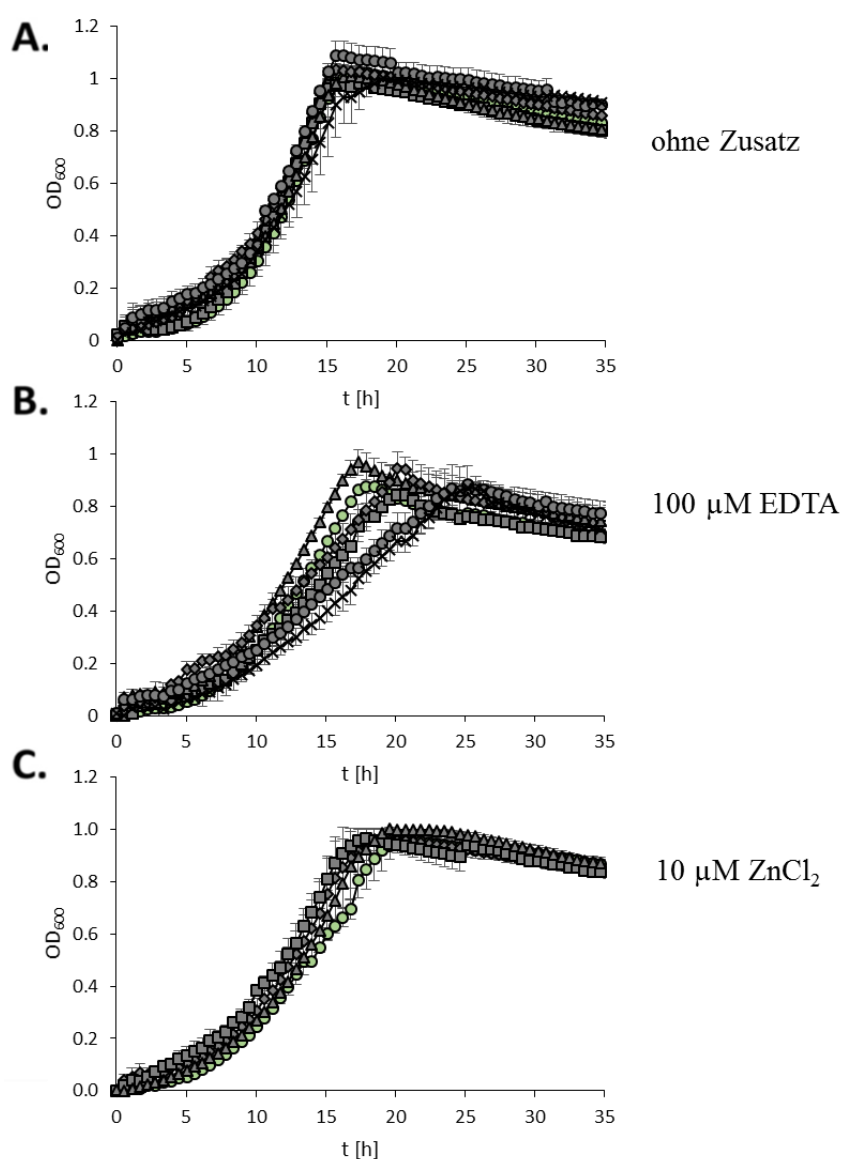


Abbildung 15: Untersuchung des Wachstumsverhaltens vom AE104 und den Derivaten. Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur hergestellt und mit dieser nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert. Das Wachstumsverhalten in Tris-Minimalmedium ohne Zusätze (A), 100 µM EDTA (B), 100 µM ZnCl₂ (C) des Parentalstammes AE104 (○) Δ zurT (■), Δ zur (▲), AE104 Δ cobW₃ (◆), AE104 Δ cobW₃ ϕ (cobW₁::lacZ)354 (○) und AE104 Δ cobW₃ ϕ (cobW₂::lacZ)299 (×) wurden untersucht (n \geq 3).

werden, da die Annahme bestand, dass die Präsenz des CzcCBA-Systems Effekte verschleiern könnte. Mit dem *cre-lox*-System wurde eine markerfreie Deletion des Genes *cobW₃* erstellt. Die funktionelle Störung der Gene der Chaperone CobW₁ und CobW₂ entstanden durch die Insertion des Vektors pECD794-1 mittig in den kodierenden Bereich. So entstanden die Stämme AE104Δ*cobW₃*, AE104Δ*cobW₃* φ(*cobW₁*::*lacZ*)354 und AE104Δ*cobW₃* φ(*cobW₂*::*lacZ*)299, welche zunächst in ihrem Wachstumsverhalten im Vergleich zum Parentalstamm untersucht werden sollten (siehe 2.4.1.2). Lediglich die Zugabe von EDTA führt zu signifikanten Wachstumsunterschieden im Vergleich zum Elternstamm AE104 (Abb. 15). Unter dieser Bedingung kommt es zu einer erhöhten Verdopplungszeit der Doppeldeletionsmutanten AE104Δ*cobW₃* φ(*cobW₁*::*lacZ*)354 und AE104Δ*cobW₃* φ(*cobW₂*::*lacZ*)299 von 5.3 ± 0.1 h bzw. 5.0 ± 0.1 h, wohingegen der AE104 sich in 2.4 h ± 0.0 verdoppelt. Dies weist wie in den CH34-Derivaten auf eine Rolle der Chaperone bei Metallmangel hin, um das interne Metalllevel konstant zu halten.

3.2.2.1 Die IC50-Werte der AE104-Varianten weisen auf eine gestörte Metallhomöostase hin

Dose Response-Kurven dienen der Überprüfung der Wachstumseffekte bei Metallmangelbedingungen und den Einfluss der Mutationen auf die Metallresistenzen zu testen (siehe 2.4.1.3). Das Ergebnis der zeitabhängigen Wachstumskurve des Stammes AE104Δ*cobW₃* φ(*cobW₁*::*lacZ*)354 mit 100 μM EDTA im Medium (Abb. 15B) spiegelt sich auch in einem um 80 % verminderten IC50-Wert wieder (Tabelle 7). Überraschenderweise zeigt der Stamm AE104Δ*cobW₃* φ(*cobW₂*::*lacZ*)299 die gleiche Resistenz wie der AE104, was dafür spricht, dass CobW₁ die anderen Chaperone unter dieser Bedingung komplementiert. Gestützt wird diese These durch die Einzeldelation von *cobW₁*, die 50 % der Resistenz des Parentalstammes besitzt. Eine Störung der Metallhomöostase in diesem Stammhintergrund zeigt sich auch an Kobalt und Cadmium sensitiven Phänotypen.

Die Rolle von ZupT bei der Zinkaufnahme zeigt sich ebenso, denn die EDTA-Resistenz ist um 50 % reduziert und bestätigt damit die Daten von Herzberg *et al.*, 2014a. Die Deletion von *zupT* führt zu pleiotropen Effekten, die sich ebenso in Resistenzverlusten gegen die weiteren Metalle zeigen und auf eine gestörte Metallhomöostase hinweisen.

Tabelle 7: IC50-Werte der AE104-Varianten im Vergleich zum Parentalstamm.

| Stamm | IC50 | | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [mM] | NiCl ₂ [μM] | CoCl ₂ [μM] | CdCl ₂ [μM] |
| AE104 | 3.2 ^{±0.5} | 0.5 ^{±0.1} | 227 ^{±11} | 135 ^{±18} | 119 ^{±16} |
| <i>ΔzurT</i> | 1.8^{±0.9} | 0.1^{±0.0} | 163^{±9} | 85^{±18} | 40^{±3} |
| <i>Δzur</i> | 2.0^{±0.4} | 0.5 ^{±0.1} | 195^{±6} | 136 ^{±14} | 161^{±18} |
| AE104 <i>φ(cobW₁::lacZ)</i> 354 | 1.5^{±0.1} | 0.5 ^{±0.1} | n.d. | 88^{±8} | 61^{±24} |
| AE104 <i>φ(cobW₂::lacZ)</i> 299 | 2.4 ^{±0.4} | 0.6 ^{±0.1} | n.d. | 124 ^{±16} | 119 ^{±7} |
| AE104 Δ <i>cobW₃</i> | 4.1 ^{±0.4} | 0.6 ^{±0.1} | 279^{±25} | 128 ^{±14} | 114 ^{±16} |
| AE104 Δ <i>cobW₃</i> <i>φ(cobW₁::lacZ)</i> 354 | 0.6^{±0.0} | 0.5 ^{±0.1} | 177^{±19} | 67^{±18} | 108 ^{±13} |
| AE104 Δ <i>cobW₃</i> <i>φ(cobW₂::lacZ)</i> 299 | 2.7 ^{±0.8} | 0.5 ^{±0.1} | 219 ^{±10} | 54^{±14} | 72^{±6} |

Die Bestimmung der IC50-Werte der AE104-Derivate beruht auf den *Dose Response*-Kurven mit steigenden Konzentrationen an Zusätzen und wurde berechnet durch das Einfügen einer linearen Regression. Dafür wurden die Stämme in einer Vorkultur kultiviert, welche nach dem Erreichen der frühen stationären Phase zur Inokulation der 2. Vorkultur genutzt wurde. Die 20 stündige Hauptkultur wurde 10 %ig mit der 2. Vorkultur der späten stationären Phase inokuliert. Das Zellwachstum wurde bei 600 nm bestimmt. Signifikante Unterschiede sind fett markiert (n≥4).

3.2.2.2 Wie äußert sich der Resistenzverlust im Metallgehalt der Zellen?

Mit der Bestimmung des Metallgehalts in den Zellen (siehe 2.6) sollten die Hypothesen untersucht werden, die anhand der Wachstums- und der *Dose Response*-Kurven aufgestellt wurden. Als Kontrollelemente wurden die Magnesium- und Eisengehalte bestimmt. In den Disruptionsmutanten AE104 *φ(cobW₁::lacZ)*354 und AE104 *φ(cobW₂::lacZ)*299 scheint lediglich der Eisengehalt beeinflusst zu sein. Die Verfügbarkeit von Zink im Medium und der interne Eisenspiegel scheinen ebenso in Verbindung zu stehen, denn eine Zugabe von Zink vermindert den Eisengehalt in den Zellen (Tabelle 8). Dieser Effekt ist nach Deletion von *cobW₃* nicht zu beobachten. Allerdings zeigt sich im Stamm AE104 Δ *cobW₃* ein Zusammenhang zur Kobalthomöostase, denn diese Mutante akkumuliert weniger Eisen bei Kobaltzugabe und parallel einen um 50 % reduzierten Kobaltgehalt in den Zellen, im Vergleich zu AE104. Bei Inkubation mit EDTA akkumuliert die Mutante lediglich 20 % des Kobaltgehaltes, der für den Parentalstamm AE104 bestimmt werden konnte.

Tabelle 8: Metallgehalt des Parentalstammes AE104 und der Mutanten.

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|-------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Mg (10 ⁶) | Fe (10 ³) | Zn (10 ³) | Co (10 ³) | Ni (10 ³) |
| AE104 | ohne | 11.5 ^{±1.0} | 768 ^{±96} | 76 ^{±4.4} | 3.3 ^{±0.7} | 5.1 ^{±2.3} |
| | 100 μM EDTA | 10.8 ^{±1.6} | 639 ^{±138} | 51 ^{±6.1} | 2.4 ^{±0.8} | 2.9 ^{±1.5} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 11.5 ^{±1.9} | 460 ^{±81} | 138 ^{±20} | 3.5 ^{±1.1} | 4.3 ^{±2.6} |
| | 25 μM CoCl ₂ | 11.7 ^{±1.4} | 569 ^{±75} | 54 ^{±7.6} | 121 ^{±27} | 1.3 ^{±0.4} |

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 8: Metallgehalt des Parentalstammes AE104 und der Mutanten.

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|--|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | Mg (10 ⁶) | Fe (10 ³) | Zn (10 ³) | Co (10 ³) | Ni (10 ³) |
| <i>ΔzurT</i> | ohne | 10.1 ^{±1.3} | 666 ^{±101} | 32^{±14} | 5.5 ^{±1.6} | 3.7 ^{±1.1} |
| | 100 μM EDTA | 10.3 ^{±1.4} | 598 ^{±83} | 28^{±10} | 4.8 ^{±0.8} | 4.6 ^{±1.1} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 10.4 ^{±1.0} | 439 ^{±40} | 122 ^{±20} | 5.9 ^{±1.3} | 6.2 ^{±2.7} |
| | 25 μM CoCl ₂ | 9.4^{±0.2} | 536 ^{±41} | 61 ^{±3.9} | 145^{±4} | 6.4^{±1.6} |
| <i>Δzur</i> | ohne | 10.7 ^{±0.9} | 763 ^{±89} | 97^{±9.7} | 2.8 ^{±0.7} | 5.0 ^{±2.0} |
| | 100 μM EDTA | 11.0 ^{±0.6} | 721 ^{±70} | 78^{±10} | 3.2 ^{±0.7} | 2.2 ^{±0.3} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 11.9 ^{±0.9} | 519 ^{±90} | 169 ^{±24} | 3.4 ^{±0.6} | 6.1 ^{±1.0} |
| | 25 μM CoCl ₂ | 9.3 ^{±1.7} | 542 ^{±137} | 69 ^{±11} | 101 ^{±16} | 1.2 ^{±0.1} |
| AE104 <i>φ(cobW₁::lacZ)</i> 354 | ohne | 14.1^{±0.9} | 639 ^{±97} | 76 ^{±8.1} | 6.2^{±1.3} | 3.4 ^{±1.6} |
| | 100 μM EDTA | 13.4^{±1.2} | 569 ^{±94} | 52 ^{±4.1} | 3.0 ^{±0.5} | 3.1 ^{±1.8} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 10.7 ^{±1.7} | 287^{±40} | 96 ^{±15} | 4.5 ^{±1.2} | 4.2 ^{±2.7} |
| AE104 <i>φ(cobW₂::lacZ)</i> 299 | ohne | 11.7 ^{±1.0} | 742 ^{±59} | 63 ^{±4.7} | 2.5 ^{±0.6} | 2.6 ^{±2.0} |
| | 100 μM EDTA | 12.4 ^{±1.1} | 630 ^{±148} | 49 ^{±3.1} | 1.6 ^{±0.3} | 5.6 ^{±3.1} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 11.3 ^{±1.1} | 351^{±38} | 123 ^{±9.6} | 3.1 ^{±1.2} | 3.6 ^{±2.1} |
| AE104 Δ <i>cobW₃</i> | ohne | 10.6 ^{±1.5} | 591 ^{±107} | 44^{±8.3} | 1.5 ^{±0.5} | 2.1 ^{±1.0} |
| | 100 μM EDTA | 11.7 ^{±0.9} | 664 ^{±86} | 47 ^{±2.8} | 0.5^{±0.1} | 2.9 ^{±2.0} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 12.1 ^{±1.0} | 495 ^{±116} | 139 ^{±21} | 2.9 ^{±0.8} | 5.0 ^{±3.7} |
| | 25 μM CoCl ₂ | 8.5^{±0.2} | 407^{±12} | 67 ^{±24} | 69^{±4.0} | 0.7 ^{±0.2} |
| AE104 Δ <i>cobW₃</i> <i>φ(cobW₁::lacZ)</i> 354 | ohne | 11.0 ^{±0.6} | 686 ^{±73} | 69 ^{±3.2} | 2.6 ^{±0.3} | 5.5 ^{±1.9} |
| | 100 μM EDTA | 10.9 ^{±0.6} | 591 ^{±87} | 47 ^{±6.6} | 1.7 ^{±0.3} | 5.7 ^{±2.0} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 11.6 ^{±0.7} | 447 ^{±78} | 138 ^{±21} | 2.8 ^{±0.3} | 5.0 ^{±1.9} |
| AE104 Δ <i>cobW₃</i> <i>φ(cobW₂::lacZ)</i> 299 | ohne | 11.2 ^{±0.9} | 716 ^{±81} | 77 ^{±12} | 3.1 ^{±0.4} | 7.0 ^{±3.9} |
| | 100 μM EDTA | 10.9 ^{±0.8} | 595 ^{±94} | 50 ^{±6.6} | 1.9 ^{±0.3} | 5.6 ^{±2.4} |
| | 100 μM ZnCl ₂ | 12.3 ^{±2.2} | 461 ^{±48} | 157 ^{±28} | 3.4 ^{±0.9} | 5.0 ^{±1.7} |

Für die Bestimmung der Metallgehalte wurde eine 1. Vorkultur angezogen, welche zur Anzucht der 2. Vorkultur diente. Mit dieser Kultur wurde eine Hauptkultur inokuliert die gegebenenfalls von 100-150 Kletteinheiten mit den Zusätzen 100 μM EDTA, 25 μM CoCl₂ oder 100 μM ZnCl₂ inkubiert wurden. Es schlossen sich 2 Waschstufen mit Puffer I an. Daraufhin sorgte 70 %ige HNO₃ für die Mineralisierung der Zellen. Nach der Messung mittels ICP-MS erfolgte die Berechnung der Metallgehalte mit Hilfe der optischen Dichten und den gemessenen ppb-Werten. Signifikante Unterschiede sind fett markiert (n≥4).

3.2.2.3 Die AE104 Δ *cobW₃*-Derivate sind resistenter gegen oxidativen Stress

Um den Einfluss des durch Wasserstoffperoxid und Paraquat erzeugten oxidativen Stress auf die Mutanten zu untersuchen, wurden *Dose Response*-Kurven erstellt. Die Deletion von *cobW₃* führt zu einem H₂O₂ resistenten Phänotypen, der sich durch die Disruption von *cobW₁* und *cobW₂* nicht änderte (Abb. 16). Ein abweichender Phänotyp zeigt sich mit Paraquat, denn der

Stamm AE104 Δ cobW₃ ϕ (cobW₂'::lacZ)299 besitzt das gleiche Wachstum wie der Parentalstamm AE104.

Die Stämme Δ zur und Δ zur sind resistenter gegen Paraquat, bei gleicher Resistenz mit Wasserstoffperoxid im Vergleich zum Parentalstamm. Das Ergebnis für den Stamm Δ zur steht im Widerspruch zu den publizierten Daten von Herzberg *et al.*, 2014a, die zeigen konnten, dass der Stamm unter den getesteten Bedingungen sensitiver gegen oxidativen Stress ist als der AE104.

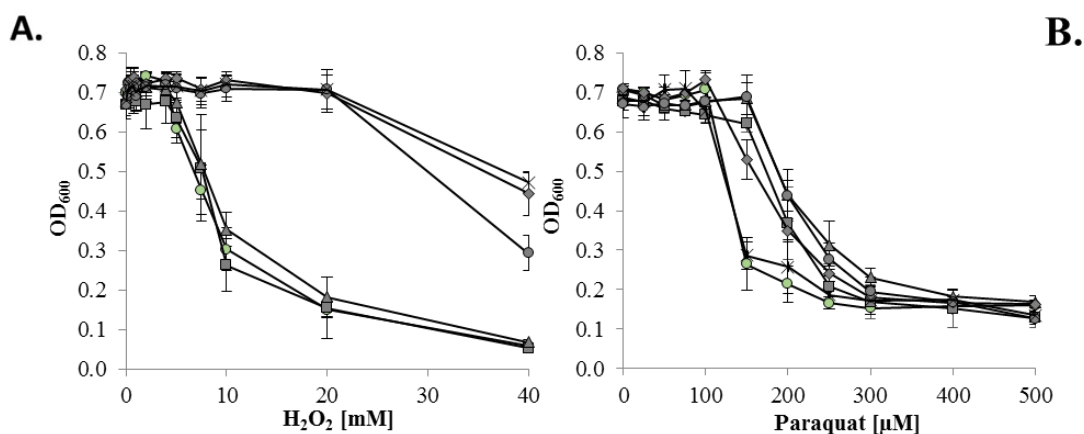


Abbildung 16: Wachstumsendpunktbestimmung der AE104-Varianten bei steigendem oxidativen Stress hervorgerufen durch Paraquat und H₂O₂. Zellen des Wildtypstammes AE104 (○) oder der Mutanten wurden in der Hauptkultur 5%ig mit der zweiten Vorkultur der späten stationären Phase in frischem Tris-Minimalmedium verdünnt und mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ (A) und Paraquat (B) bei 30°C für 20 h kultiviert. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde bestimmt. Δ zur (▲), AE104 Δ cobW₃ (◇), AE104 Δ cobW₃ ϕ (cobW₁'::lacZ)354 (●) und AE104 Δ cobW₃ ϕ (cobW₂'::lacZ)299 (✕) (n \geq 3).

Zusammenfassend konnte in den physiologischen Daten der AE104-Derivate gezeigt werden, dass CobW₁ im AE104 eine zentrale Rolle in der Zinkhomöostase einnimmt, denn durch die Disruption des Gens kam es zu Resistenzverlusten gegen Zink. Bestätigt wird dies durch ein schlechteres Wachstum der Mutante in den Wachstumskurven bei Metallmangel. Die Wachstumskurven zeigten allerdings auch einen Einfluss von CobW₂ auf die Zinkhomöostase. Eine Bestätigung der möglichen Rolle von CobW₃ in der Kobalthomöostase konnte durch die ICP-MS Messungen und die Wachstumsendpunktbestimmung ebenso bestätigt werden.

3.2.3 Die Deletion der Chaperone führt im Stamm Δ zur zu einem Wachstumsdefizit

Die Deletion von *zur* führt zu einem verminderten Zinkgehalt in den Zellen und zu einem EDTA- und Zink-sensitiven Phänotypen (Herzberg *et al.*, 2014a). Ob sich dieser Effekt durch eine zusätzliche Deletion oder Disruption der Gene der Chaperone verstärkt war eine zentrale Frage dieser Arbeit. In den Wachstumskurven in Tris-Minimalmedium (siehe 2.4.1.2) zeigt sich

ein deutliches Wachstumsdefizit der Einzeldelentionsmutante $\Delta zupT\Delta cobW_3$, welcher tendenziell durch eine Disruption $cobW_1$ verstärkt wird (Abb. 17). Dies spricht dafür, dass die Chaperone bei einem verminderten Zinkgehalt in der Zelle eine wichtige Funktion einnehmen und das $CobW_2$ diesen Effekt nicht komplementieren kann, wobei $CobW_1$ vermutlich die Funktion von $CobW_2$ übernehmen kann. Die Verdopplungszeit erhöht sich von 2.5 ± 0.1 h im Parentalstamm auf 3.5 ± 0.0 h in der Einzeldelentionsmutante und auf 3.8 ± 0.1 h im Stamm $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_1::lacZ)354$. Bei Zinkmangel hingegen führt eine zusätzliche

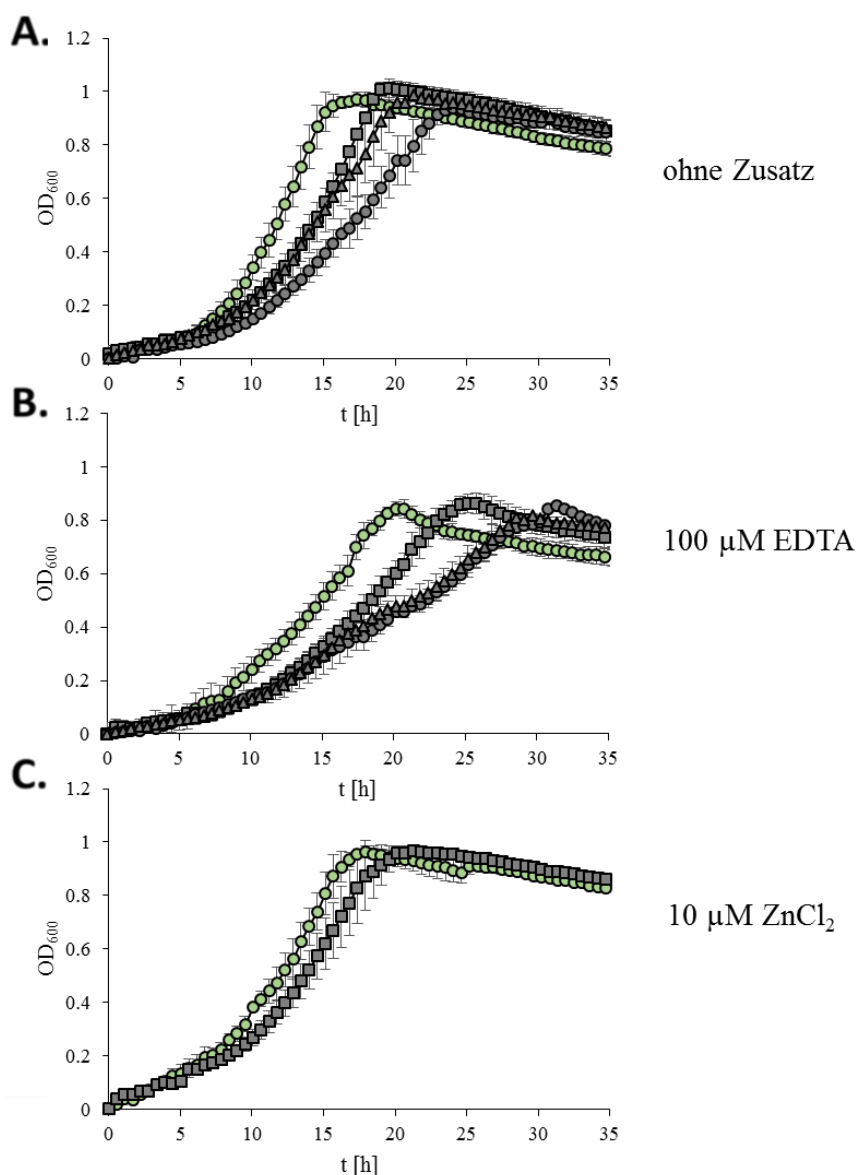


Abbildung 17: Wachstumskurven der $\Delta zupT$ -Derivate in Tris-MiM (A), mit Zugabe von 100 μM EDTA (B) und 10 μM ZnCl_2 (C). Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur hergestellt, mit der nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert wurde. Das Wachstum der Stämme $\Delta zupT$ (\circ), $\Delta zupT\Delta cobW_3$ (\blacksquare), $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_1::lacZ)354$ (\odot) und $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_2::lacZ)299$ (\blacktriangle) wurden bei 600 nm gemessen ($n \geq 3$).

Disruption von *cobW₁* oder *cobW₂* im $\Delta zupT\Delta cobW_3$ zu einem vergleichbaren Wachstumsdefizit was einhergeht mit einer Verdopplungszeit von 5.1 ± 0.0 h. Dies spricht dafür, dass bei Metallmangel CobW₂ essentiell ist für die Speicherung des verfügbaren Zinks in der Zelle. Zinkzugabe führt dazu, dass das Wachstumsdefizit der $\Delta zupT\Delta cobW_3$ Mutante aufgehoben wird, da vermutlich durch einen unbekanntem Transportweg mehr Zink in die Zelle gelangt und die essentiellen Proteine mit Co-Faktoren beladen werden können.

3.2.3.1 Welchen Einfluss haben die Chaperone auf die Metallresistenz der Zinkaufnahmemutante $\Delta zupT$?

Für die Verifizierung der beobachteten Effekte der Wachstumskurve wurden die Resistenzen der Stämme bestimmt (siehe 2.4.1.2) und es kann gezeigt werden, dass das Wachstumsdefizit der Doppeldeletionsmutanten bei Mangelbedingungen einhergeht mit einem Resistenzverlust von 50 % gegen EDTA im Vergleich zum $\Delta zupT$ (Tabelle 9). Die Einzeldelation von *cobW₁* und *cobW₂* zeigen dies allerdings nicht, was für eine gegenseitige Komplementation der Chaperone spricht.

Wie auch in den CH34-Derivaten führt die Deletion von *cobW₃* zu einem Nickel und Kobalt sensitiven Phänotyp, was für eine gestörte Metallhomöostase spricht.

Tabelle 9: Mittlere inhibitorische Konzentrationen von EDTA und divalenter Kationen auf die $\Delta zupT$ -Derivate.

| Stamm | IC50 | | | | |
|---|---------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [μM] | NiCl ₂ [μM] | CoCl ₂ [μM] | CdCl ₂ [μM] |
| $\Delta zupT$ | 1.8 ^{±0.9} | 137 ^{±46} | 163 ^{±9} | 85 ^{±13} | 40 ^{±3} |
| $\Delta zupT \phi(cobW_1'::lacZ)354$ | 4.8^{±1.5} | 157 ^{±9} | n.d. | 90 ^{±12} | 55 ^{±13} |
| $\Delta zupT \phi(cobW_2'::lacZ)299$ | 1.6 ^{±0.5} | 151 ^{±39} | n.d. | 36^{±10} | 40 ^{±3} |
| $\Delta zupT\Delta cobW_3$ | 1.5 ^{±0.6} | 151 ^{±37} | 80^{±16} | 17^{±10} | 47 ^{±5} |
| $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_1'::lacZ)354$ | 0.6^{±0.1} | 131 ^{±14} | 157 ^{±16} | 30^{±8} | 39 ^{±1} |
| $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_2'::lacZ)299$ | 0.9^{±0.2} | 137 ^{±3} | 73^{±8} | 26^{±11} | 32 ^{±3} |

Die Bestimmung der IC50-Werte der $\Delta zupT$ -Derivate beruht auf den *Dose Response*-Kurven mit steigenden Konzentrationen an Zusätzen und wurde berechnet durch das Einfügen einer linearen Regression. Dafür wurden die Stämme in einer Vorkultur angezogen, welche nach dem Erreichen der frühen stationären Phase zur Inokulation der 2. Vorkultur genutzt wurde. Die 20 stündige Hauptkultur wurde 10 %ig mit der 2. Vorkultur der späten stationären Phase inokuliert. Das Zellwachstum wurde bei 600 nm bestimmt. Fett markiert sind signifikante Werte (n≥3).

3.2.3.2 Die $\Delta zupT\Delta cobW_3$ -Derivate akkumulieren mehr Zinkatome pro Zelle

Mittels ICP-MS konnte der Metallgehalt in den $\Delta zupT$ -Derivaten gemessen werden (siehe 2.6), der im Vergleich zum AE104 um 50 % vermindert ist (Tabelle 8). Auffällig ist, dass die Deletion von $cobW_3$ in Tris-Minimalmedium zu einer Akkumulation von Zink in der Zelle führt

Tabelle 10: Metallgehalt der Aufnahmedeletionsmutante $\Delta zupT$ und den Derivaten.

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|---------------|
| | | Mg (10^6) | Fe (10^3) | Zn (10^3) | Co (10^3) | Ni (10^3) |
| $\Delta zupT$ | ohne | 10.1 \pm 1.3 | 666 \pm 101 | 32 \pm 14 | 5.5 \pm 1.6 | 3.7 \pm 1.1 |
| | 100 μ M EDTA | 10.3 \pm 1.4 | 598 \pm 83 | 28 \pm 10 | 4.8 \pm 0.8 | 4.6 \pm 1.1 |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.4 \pm 1.0 | 439 \pm 40 | 122 \pm 20 | 5.9 \pm 1.3 | 6.2 \pm 2.7 |
| $\Delta zupT \varphi(cobW_1'::lacZ)354$ | ohne | 12.1\pm0.5 | 585 \pm 60 | 46 \pm 7.5 | 5.1 \pm 0.9 | 4.7 \pm 3.7 |
| | 100 μ M EDTA | 10.8 \pm 2.3 | 579 \pm 251 | 28 \pm 5.8 | 3.7 \pm 0.6 | 4.6 \pm 1.4 |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.3 \pm 1.1 | 461 \pm 116 | 104 \pm 34 | 4.3 \pm 0.4 | 4.9 \pm 1.3 |
| $\Delta zupT \varphi(cobW_2'::lacZ)299$ | ohne | 10.3 \pm 0.3 | 626 \pm 67 | 38 \pm 5.5 | 5.0 \pm 1.1 | 3.5 \pm 1.2 |
| | 100 μ M EDTA | 10.4 \pm 2.4 | 598 \pm 174 | 23 \pm 9.0 | 2.8 \pm 0.9 | 2.9 \pm 1.3 |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.5 \pm 2.2 | 342 \pm 58 | 122 \pm 30 | 4.6 \pm 1.1 | 5.5 \pm 2.6 |
| $\Delta zupT\Delta cobW_3$ | ohne | 13.8\pm1.3 | 655 \pm 70 | 77\pm8.4 | 4.2 \pm 0.8 | 3.1 \pm 1.5 |
| | 100 μ M EDTA | 13.1\pm1.0 | 485 \pm 88 | 36 \pm 8.2 | 2.3 \pm 0.7 | 2.9 \pm 1.3 |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 15.0\pm1.4 | 410 \pm 72 | 168\pm15 | 4.1 \pm 0.8 | 5.7 \pm 4.1 |
| $\Delta zupT\Delta cobW_3 \varphi(cobW_1'::lacZ)354$ | ohne | 13.4\pm2.2 | 652 \pm 86 | 71\pm11 | 4.9 \pm 1.5 | 5.9 \pm 3.5 |
| | 100 μ M EDTA | 11.5 \pm 1.5 | 496 \pm 63 | 34 \pm 4.2 | 3.0 \pm 0.8 | 5.1 \pm 3.8 |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 11.5 \pm 1.3 | 447 \pm 91 | 182\pm21 | 4.3 \pm 1.0 | 4.6 \pm 2.7 |
| $\Delta zupT\Delta cobW_3 \varphi(cobW_2'::lacZ)299$ | ohne | 13.5\pm1.9 | 607 \pm 43 | 71\pm8.3 | 5.2 \pm 0.9 | 7.4 \pm 3.4 |
| | 100 μ M EDTA | 12.6 \pm 2.0 | 488 \pm 79 | 35 \pm 4.3 | 3.4 \pm 0.8 | 5.2 \pm 2.9 |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 11.7 \pm 1.3 | 408 \pm 91 | 212\pm36 | 4.3 \pm 0.7 | 4.6 \pm 2.9 |

Für die Bestimmung der Metallgehalte in den Zellen wurde eine 1. Vorkultur angezogen, welche zur Kultivierung der 2. Vorkultur diente. Mit dieser Kultur wurde eine Hauptkultur inokuliert die gegebenenfalls von 100 bis 150 Kletteinheiten mit den Zusätzen 100 μ M EDTA, 25 μ M CoCl₂ oder 100 μ M ZnCl₂ inkubiert wurden. Es schlossen sich 2 Waschschrte mit Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) an. Daraufhin sorgte 70 %ige HNO₃ für die Mineralisierung der Zellen. Nach der Messung mittels ICP-MS erfolgte die Berechnung der Metallgehalte mit Hilfe der optischen Dichten und den gemessenen ppb-Werten. Fett markiert sind signifikante Werte (n \geq 3).

(Tabelle 10). Bei Zugabe von Zink erhöht sich der Zinkgehalt ebenfalls, sodass mehr Zink als im AE104 und CH34 akkumuliert wird. Dies spricht dafür, dass der verringerte Zinkgehalt des $\Delta zupT$ in Tris-Minimalmedium abhängig ist von CobW₃ und, dass CobW₃ für die Belieferung der Effluxsysteme verantwortlich sein könnte.

3.2.3.3 Paraquat und H₂O₂ führen in den $\Delta zupT$ -Stämmen zu unterschiedlichen Effekten

Da es in *C. metallidurans* Eisen- und Kupfer/Zink-abhängige Superoxiddismutasen gibt, sollte der Einfluss der Chaperone auf oxidativen Stress hervorgerufen durch Paraquat bzw. Wasserstoffperoxid und indirekt auf die Funktionalität der SOD überprüft werden (siehe 2.4.1.3). Lediglich der Stamm $\Delta zupT\Delta cobW_3$ zeigt ein signifikant vom Parentalstamm abweichenden sensitiven Phänotypen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Abb. 18). Die Deletionen bzw. Disruptionen von $cobW_{1/2/3}$ im $\Delta zupT$ führen zu einem Paraquat sensitiven Phänotypen, wobei der Stamm $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_2::lacZ)299$ den stärksten Resistenzverlust zeigt. Vermutlich ist die Funktion der Cu/Zn-SOD durch die Deletionen beeinflusst.

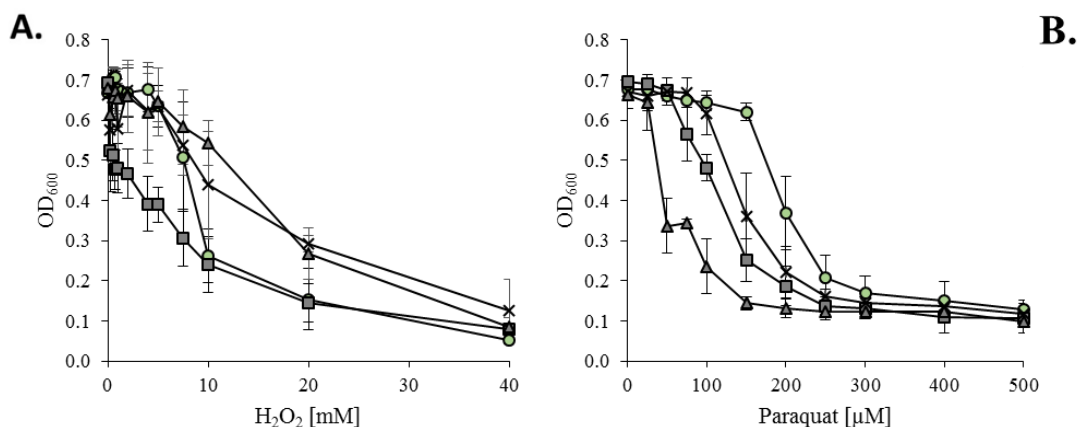


Abbildung 18: Resistenz der $\Delta zupT$ -Derivate gegenüber oxidativem Stress. Die Stämme wurden in der Hauptkultur 5%ig mit der zweiten Vorkultur der späten stationären Phase in frischem Tris-Minimalmedium verdünnt und mit steigenden Konzentrationen an H_2O_2 (A) und Paraquat (B) bei 30 °C für 20 h kultiviert. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde bestimmt. $\Delta zupT$ (○), $\Delta zupT\Delta cobW_3$ (□), $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_1::lacZ)354$ (△) und $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_2::lacZ)299$ (×) ($n \geq 3$).

Zusammenfassend weisen die Daten der $\Delta zupT$ -Derivate auf eine Rolle der drei Chaperone bei der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase hin, wobei CobW₁ vermutlich eine essentielle Rolle bei Metallmangel einnimmt und die Funktion unter diesen Bedingungen nicht durch CobW_{2/3} komplementiert werden kann. Gestützt wird diese These durch die zeitabhängigen Wachstumskurven. CobW₃ scheint am Efflux von Zink beteiligt zu sein, da ein Fehlen des Chaperons zur Akkumulation des Metalls in der Zelle führt.

3.2.4 Physiologische Charakterisierung der Δzur -Derivate

Um mögliche globale Effekte des Zink Aufnahme Regulators Zur im AE104 zu analysieren, wurde das Gene deletiert (Schmidt *et al.*, 2014) und der Einfluss der Chaperone in diesem Stammhintergrund untersucht, wobei eine Deletion des *cobW₁*-Clusters zu einem verbesserten Wachstum bei EDTA-Mangel führt, was sich auch in einer Verdopplungszeit von 2.4 ± 0.1 h im Vergleich zum Parentalstamm mit 3.3 ± 0.1 h zeigt (Abb. 19). Dieser Effekt wird aufgehoben durch die zusätzliche Disruption von *cobW₂* und ist auch in der Mutante $\Delta zur\Delta cobW_3 \phi(cobW_1::lacZ)354$ zu beobachten. Diese Stämme, sowie der Stamm $\Delta zur\Delta cobW_3$ besitzen ein Wachstumsdefizit, welches einher geht mit einer um 50 % erhöhten Verdopplungszeit und könnte darauf hinweisen, dass das Zink nicht in der Zelle gebunden werden kann.

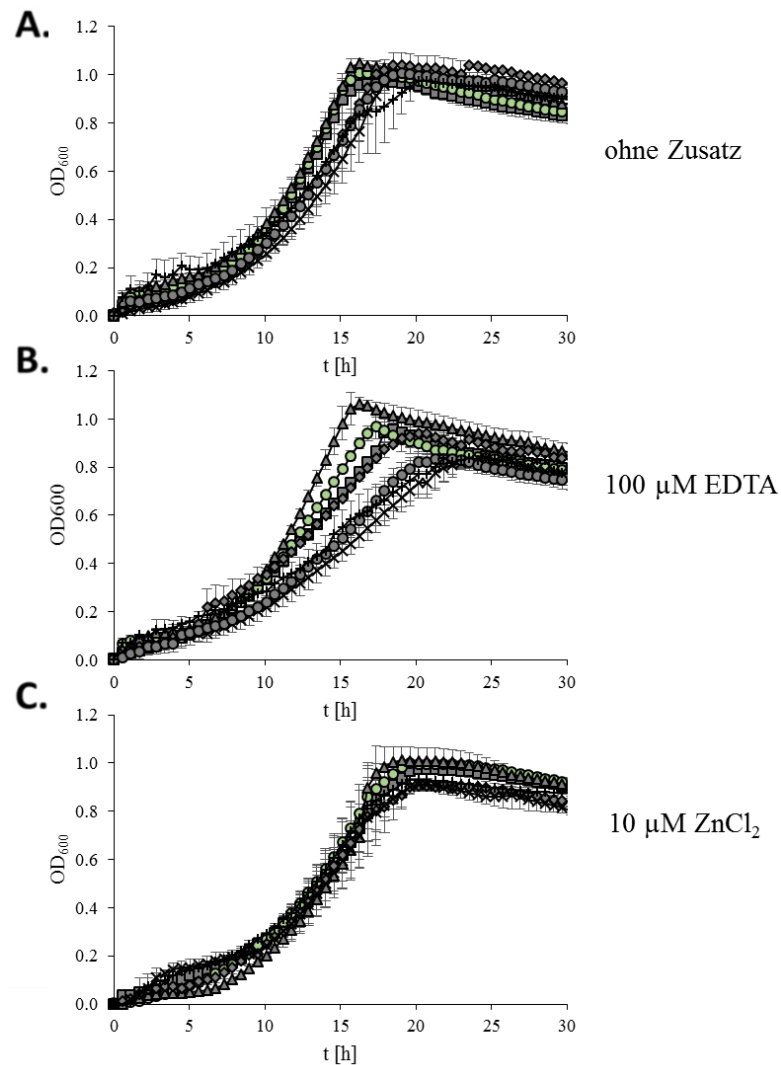


Abbildung 19: Wachstumskurven der *C. metallidurans zur*-Derivate. Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur inokuliert, mit der nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert wurde. Das Wachstum der Stämme Δzur (\circ), $\Delta zur\Delta cobW_1$ -Cluster (\blacktriangle), $\Delta zur \phi(cobW_2::lacZ)299$ (\blacklozenge), $\Delta zur\Delta cobW_3$ (\blacksquare), $\Delta zur\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (\bullet), $\Delta zur\Delta cobW_3 \phi(cobW_1::lacZ)354$ (\blackplus) und $\Delta zur\Delta cobW_3 \phi(cobW_2::lacZ)299$ (\blacktimes) erfolgte in Tris-MM (A), mit $100 \mu\text{M}$ EDTA (B) oder $10 \mu\text{M}$ ZnCl_2 (C); $OD_{600 \text{ nm}}$ ($n \geq 3$).

3.2.4.1 Die Δzur -Derivate weisen multiple Resistenzunterschiede auf

Die Resistenzbestimmung der Δzur -Derivate ergab einen von CobW₃ abhängigen EDTA sensitiven Phänotypen (siehe 2.4.1.3), der einher geht mit einer Sensitivität gegen Nickel und Kobalt (Tabelle 11). Dies bestätigt eine gestörte Metallhomöostase, die auch schon im Stammhintergrund des $\Delta zurT$ beobachtet werden konnte. Außerdem scheint CobW₃ für die Akquirierung der Metalle unter diesen Umständen notwendig zu sein.

Die Deletion von *cobW₁* und *cobW₂* zeigt einen Zink sensitiven Phänotypen, was für einen erhöhten Zinkgehalt in der Zelle spricht.

Eine zusätzliche Deletion oder Disruption im Δzur führt nicht zu veränderten Resistenzen gegenüber oxidativem Stress (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 11: IC50-Werte der Δzur -Derivate für EDTA und divalente Metallkationen.

| Stamm | IC50 | | | | |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [μM] | NiCl ₂ [μM] | CoCl ₂ [μM] | CdCl ₂ [μM] |
| Δzur | 2.0 ^{±0.4} | 485 ^{±45} | 195 ^{±6} | 136 ^{±14} | 161 ^{±18} |
| $\Delta zur cobW_1$ -Cluster | 1.9 ^{±0.2} | 516 ^{±49} | 183 ^{±12} | 134 ^{±15} | 166 ^{±7} |
| $\Delta zur \phi(cobW_2'::lacZ)299$ | 1.6 ^{±0.3} | 435 ^{±28} | 179 ^{±10} | 120 ^{±6} | 126^{±11} |
| $\Delta zur \Delta cobW_3$ | 1.3^{±0.1} | 513 ^{±73} | 125^{±17} | 101^{±21} | 164 ^{±15} |
| $\Delta zur \Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | 1.6 ^{±0.2} | 276^{±23} | 155^{±11} | 62^{±9} | 135 ^{±18} |
| $\Delta zur \Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ | 1.4^{±0.1} | 448 ^{±77} | 150^{±35} | 77^{±12} | 121^{±10} |
| $\Delta zur \Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | 1.8 ^{±0.3} | 447 ^{±53} | 188 ^{±12} | 62^{±9} | 126^{±8} |

Die Bestimmung der IC50-Werte der Δzur -Derivate beruht auf den *Dose Response* Kurven mit steigenden Konzentrationen an Zusätzen und wurde berechnet durch das Einfügen einer linearen Regression. Dafür wurden die Stämme in einer Vorkultur angezogen, welche nach dem Erreichen der frühen stationären Phase zur Inokulation der 2. Vorkultur genutzt wurde. Die 20 stündige Hauptkultur wurde 10 %ig mit der 2. Vorkultur der späten stationären Phase inokuliert. Das Zellwachstum wurde bei 600 nm bestimmt. Fett markiert sind signifikante Werte (n≥4).

3.2.4.2 Der Zinkgehalt im Δzur ist erhöht

Die Deletion von *zur* führt dazu, dass *zurT* konstitutiv exprimiert wird und mehr Zink in die Zelle gelangt, was sich in der Anzahl der Zinkatome pro Zelle im Vergleich zum Parentalstamm AE104 mit widerspiegelt (Tabelle 8). Die Deletion von *cobW₂* und des *cobW₁*-Clusters führen dazu, dass das Zinklevel sinkt, wobei der Wert in Doppeldeletionsmutanten sich nicht weiter verringert. Dieses Resultat lässt den Schluss zu, dass sich die Chaperone gegenseitig komplementieren können, was die Speicherung von Zink in der Zelle angeht. Die essentielle

Ergebnisse

Rolle von CobW₂ bei der Speicherung zeigt sich bei Metallmangel im $\Delta_{zur} \varphi(cobW_2'::lacZ)299$ und bei Zinküberschuss im $\Delta_{zur}\Delta_{cobW_3} \varphi(cobW_2'::lacZ)299$ an einem verminderten Zinkgehalt in der Zelle. Das Wachstum mit Zink führt bei Deletion von *cobW₂* und *cobW₁* allerdings auch zu einem verringerten Nickelgehalt in den Zellen, was für eine gestörte Homöostase spricht.

Tabelle 12: Analyse des Metallgehaltes vom Parentalstamm Δ_{zur} und den Mutanten

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|---|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | | Mg (10 ⁶) | Fe (10 ³) | Zn (10 ³) | Co (10 ³) | Ni (10 ³) |
| Δ_{zur} | ohne | 10.7 ^{±0.9} | 763 ^{±89} | 97 ^{±9.7} | 2.8 ^{±0.7} | 5.0 ^{±2.0} |
| | 100 μ M EDTA | 11.0 ^{±0.6} | 721 ^{±70} | 78 ^{±10} | 3.2 ^{±0.7} | 2.2 ^{±0.3} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 11.9 ^{±0.9} | 519 ^{±90} | 169 ^{±24} | 3.4 ^{±0.6} | 6.1 ^{±1.0} |
| $\Delta_{zur}\Delta_{cobW_1}$ -Cluster | ohne | 10.7 ^{±0.8} | 686 ^{±83} | 88 ^{±5.7} | 1.7 ^{±0.4} | 5.7 ^{±1.9} |
| | 100 μ M EDTA | 11.2 ^{±1.0} | 646 ^{±61} | 75 ^{±10} | 1.5 ^{±0.3} | 3.5 ^{±0.9} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 11.4 ^{±0.4} | 517 ^{±107} | 143 ^{±22} | 1.8 ^{±0.3} | 3.3 ^{±1.0} |
| $\Delta_{zur} \varphi(cobW_2'::lacZ)299$ | ohne | 9.6 ^{±0.6} | 591 ^{±43} | 64 ^{±8.2} | 1.9 ^{±0.5} | 3.5 ^{±1.1} |
| | 100 μ M EDTA | 9.39 ^{±0.8} | 476 ^{±87} | 53 ^{±9.4} | 1.5 ^{±0.2} | 2.2 ^{±0.5} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.7 ^{±0.3} | 379 ^{±24} | 145 ^{±13} | 2.3 ^{±0.2} | 2.4 ^{±0.6} |
| $\Delta_{zur}\Delta_{cobW_3}$ | ohne | 12.3 ^{±0.7} | 801 ^{±77} | 93 ^{±8.2} | 1.9 ^{±0.1} | 6.4 ^{±1.8} |
| | 100 μ M EDTA | 11.1 ^{±1.3} | 643 ^{±83} | 64 ^{±8.5} | 1.1 ^{±0.2} | 5.1 ^{±1.9} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 11.8 ^{±0.8} | 512 ^{±56} | 137 ^{±29} | 1.8 ^{±0.3} | 4.4 ^{±1.3} |
| $\Delta_{zur}\Delta_{cobW_1}$ -Cluster $\varphi(cobW_2'::lacZ)299$ | ohne | 9.1 ^{±0.5} | 545 ^{±48} | 66 ^{±5.9} | 1.8 ^{±0.2} | 2.6 ^{±0.6} |
| | 100 μ M EDTA | 10.2 ^{±1.1} | 500 ^{±84} | 62 ^{±6.9} | 1.7 ^{±0.3} | 3.1 ^{±0.7} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.9 ^{±0.8} | 387 ^{±49} | 155 ^{±16} | 1.8 ^{±0.5} | 1.8 ^{±0.5} |
| $\Delta_{zur}\Delta_{cobW_3} \varphi(cobW_1'::lacZ)354$ | ohne | 8.8 ^{±0.5} | 527 ^{±72} | 63 ^{±7.8} | 1.8 ^{±0.4} | 2.8 ^{±1.2} |
| | 100 μ M EDTA | 10.3 ^{±0.8} | 665 ^{±22} | 45 ^{±9.5} | 1.2 ^{±0.2} | 2.1 ^{±0.5} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 10.3 ^{±0.9} | 444 ^{±87} | 141 ^{±18} | 2.3 ^{±0.7} | 4.0 ^{±2.1} |
| $\Delta_{zur}\Delta_{cobW_3} \varphi(cobW_2'::lacZ)299$ | ohne | 10.2 ^{±0.7} | 714 ^{±85} | 91 ^{±11} | 1.9 ^{±0.5} | 3.3 ^{±1.1} |
| | 100 μ M EDTA | 10.6 ^{±0.3} | 507 ^{±34} | 45 ^{±3.5} | 1.2 ^{±0.2} | 2.4 ^{±1.0} |
| | 100 μ M ZnCl ₂ | 9.9 ^{±0.4} | 368 ^{±47} | 131 ^{±8.4} | 2.1 ^{±0.3} | 2.2 ^{±0.5} |

Für die Bestimmung der Metallgehalte in den Zellen wurde eine 1. Vorkultur angezogen, welche zur Anzucht der 2. Vorkultur diente. Mit dieser Kultur wurde eine Hauptkultur inokuliert die gegebenenfalls von 100 bis 150 Kletteinheiten mit den Zusätzen 100 μ M EDTA, 25 μ M CoCl₂ oder 100 μ M ZnCl₂ inkubiert wurden. Es schlossen sich 2 Waschstufen mit Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) an. Daraufhin sorgte 70 %ige HNO₃ für die Mineralisierung der Zellen. Nach der ICP-MS erfolgte die Berechnung der Metallgehalte mit Hilfe der optischen Dichten und den gemessenen ppb-Werten. Fett markiert sind signifikante Werte ($n \geq 3$).

Zusammenfassend zeigen die Daten der Δzup -Derivate, dass $CobW_2$ eine essentielle Rolle bei der Speicherung von Zink unter Metallmangelbedingungen einnimmt und das $CobW_{1/2}$ für die Zinkresistenz in diesem Stamm verantwortlich sind.

3.2.5 $CobW_{1/2/3}$ sind im $\Delta e4$ essentiell für die Zinkspeicherung

Bei erhöhten Metallgehalten in den Zellen sorgen Effluxsysteme für den Transport von Metallen aus dem Zytoplasma ins Periplasma und weiter über die äußere Membran in den extrazellulären Raum. Im Stamm $\Delta e4$ sind $ZntA$, $CadA$, $FieF$ und $DmeF$ im Stamm AE104

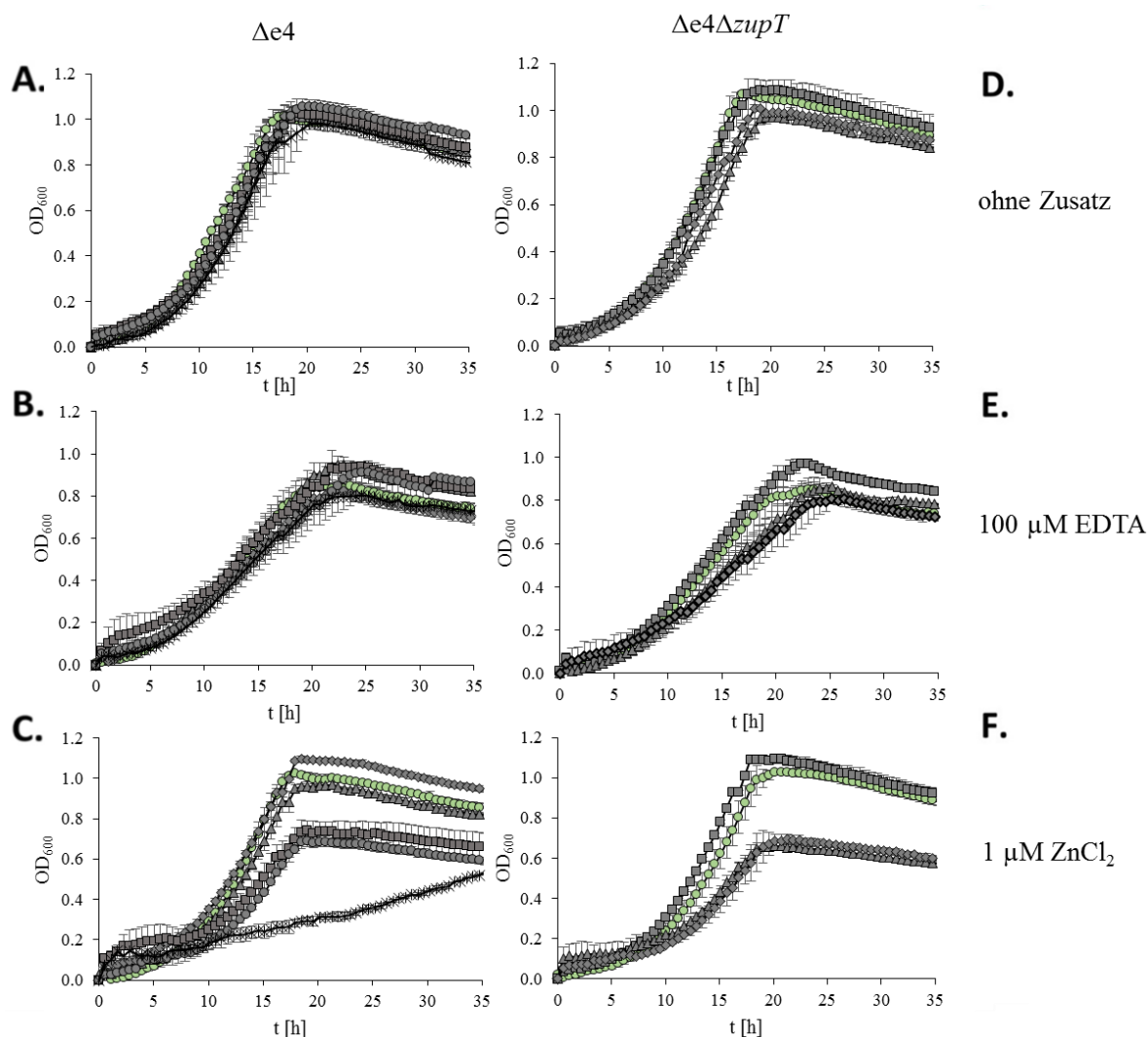


Abbildung 20: Wachstumsverhalten der Effluxdeletionsmutanten in Tris-MM(A/D), unter Metallmangel (B/E) und bei Zinkzugabe (C/F). Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur inokuliert, mit der nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert wurde. Das Wachstum der Varianten vom $\Delta e4$ (\circ) ist in Panel A-C gezeigt und beinhaltet die Stämme $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster (\blacklozenge), $\Delta e4\Delta cobW_3$ (\blacktriangle), $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ (\blackstar), $\Delta e4\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ (\blacksquare) und $\Delta e4\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ (\bullet). Im Panel D-F sind die Derivate der Mutante $\Delta e4\Delta zupT$ (\circ) zu sehen; $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3$ (\blacksquare), $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ (\blacktriangle) und $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ (\blacklozenge). Die optischen Dichten wurden bei 600 nm gemessen ($n \geq 3$).

deletiert, die an der Entgiftung des Zytoplasmas beteiligt sind (Scherer and Nies, 2009). Lediglich die Zugabe von 1 μM Zink führt zu Wachstumsunterschieden (siehe 2.4.1.2), die sich in einer erhöhten Verdopplungszeit von 2.8 ± 0.1 h im $\Delta e4$ auf 5.3 ± 0.1 h im $\Delta e4\Delta cobW_3 \varphi(cobW_1'::lacZ)354$ und 4.6 ± 0.1 h im $\Delta e4\Delta cobW_3 \varphi(cobW_2'::lacZ)299$, sowie einer verminderten optischen Dicht zu Beginn der stationären Phase äußert (Abb. 20). Den stärksten Wachstumsunterschied zeigt jedoch der Stamm $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster $\varphi(cobW_2'::lacZ)299$ mit einer Verdopplungszeit von 18.4 ± 0.6 h. Diese Ergebnisse weisen auf eine essentielle Rolle der Chaperone bei der Speicherung hin, da das Zink nicht eliminiert werden kann.

Wird im Stamm $\Delta e4$ der Transporter *zupT* deletiert, führt dies zu einer Mutante, die im Efflux und Import gestört ist (Herzberg *et al.*, 2014a). Auf diese Mutante hat die Deletion von *cobW₃* und *cobW₂* bzw. *cobW₃* und *cobW₁* auf das Wachstum einen negativen Einfluss, was wie im $\Delta e4$ zu einer erhöhten Verdopplungszeit und einer geringeren optischen Dicht beim Eintritt in die stationäre Phase führt und bestätigt die aufgestellte These.

3.2.5.1 Die Effluxdeletionsmutanten sind Nickel und Cadmium sensitiv

Durch die Deletion der Effluxsysteme zeigen die Stämme $\Delta e4$ und $\Delta e4\Delta zupT$ sensitive Phänotypen für alle getesteten Metalle mit IC50-Werten die um Faktor 10 bis 100 niedriger sind als des Parentalstamms AE104 (siehe 2.4.1.3) (Tabelle 13). Es konnte auch ein leicht sensitiver Effekt für Metallmangel durch EDTA beobachtet werden. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Scherer and Nies, 2009 für Zink und Kobalt. Ein sensitiver Phänotyp der Effluxdeletionsmutanten für Cadmium konnte ebenfalls beobachtet werden, allerdings ist der IC50-Wert mit 21 bzw. 22 μM um ein vielfaches höher als der publizierte mit 0.082 μM (Scherer and Nies, 2009). Eine Funktion der Chaperone bei der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase zeigt sich in der Mutante $\Delta e4\Delta cobW_3 \varphi(cobW_1'::lacZ)354$ in einem sensitiven Phänotypen. Außerdem konnten, wie auch schon in den anderen Stammhintergründen Nickel, Kobalt und Cadmium sensitive Phänotypen beobachtet werden, was wiederum auf eine gestörte Metallhomöostase oder eine Funktion der Chaperone bei der Speicherung mehrerer divalenter Kationen hindeutet.

Tabelle 13: IC50-Werte der Effluxdeletionsmutanten für Metallmangel und -überschuss.

| Stamm | IC50 | | | | |
|--|---------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [μM] | NiCl ₂ [μM] | CoCl ₂ [μM] | CdCl ₂ [μM] |
| Δe4 | 1.7 ^{±0.3} | 6.3 ^{±1.0} | 26 ^{±1.3} | 4.7 ^{±1.2} | 21 ^{±10} |
| Δe4ΔcobW ₁ -Cluster | 1.5 ^{±0.2} | 5.3 ^{±0.5} | 7^{±1.7} | 4.6 ^{±0.1} | 1.9^{±0.5} |
| Δe4ΔcobW ₃ | 1.5 ^{±0.2} | 5.6 ^{±0.1} | 6^{±6.4} | 4.7 ^{±0.2} | 1.5^{±0.4} |
| Δe4ΔcobW ₁ -Cluster φ(cobW ₂ ::lacZ)299 | 1.6 ^{±0.2} | 5.3 ^{±0.5} | 6^{±3.4} | 4.6 ^{±0.3} | n.d. |
| Δe4ΔcobW ₃ φ(cobW ₁ ::lacZ)354 | 1.7 ^{±0.1} | 1.6^{±0.1} | 6^{±1.1} | 4.4 ^{±0.2} | 14 ^{±3.7} |
| Δe4ΔcobW ₃ φ(cobW ₂ ::lacZ)299 | 1.5 ^{±0.3} | 5.4 ^{±0.5} | 5^{±0.4} | 3.0^{±0.2} | 2.9^{±0.9} |
| Δe4ΔzupT | 1.9 ^{±0.5} | 5.7 ^{±0.4} | 22 ^{±1.9} | 4.1 ^{±1.5} | 22 ^{±12} |
| Δe4ΔzupTΔcobW ₃ | 1.6 ^{±0.2} | 5.6 ^{±0.2} | 14^{±0.9} | 4.6 ^{±0.2} | 1.7^{±0.3} |
| Δe4ΔzupTΔcobW ₃ φ(cobW ₁ ::lacZ)354 | 1.7 ^{±0.3} | 6.3 ^{±1.9} | 21 ^{±1.1} | 4.6 ^{±0.2} | 2.4^{±0.5} |
| Δe4ΔzupTΔcobW ₃ φ(cobW ₂ ::lacZ)299 | 1.6 ^{±0.2} | 5.5 ^{±3.5} | 4^{±2.3} | 1.6^{±0.4} | 2.8^{±1.4} |

Die Bestimmung der IC50-Werte der Δe4-Derivate beruht auf den *Dose Response*-Kurven mit steigenden Konzentrationen an Zusätzen und wurde berechnet durch das Einfügen einer linearen Regression. Dafür wurden die Stämme in einer Vorkultur kultiviert, welche nach dem Erreichen der frühen stationären Phase zur Inokulation der 2. Vorkultur genutzt wurde. Die 20 stündige Hauptkultur wurde 10 %ig mit der 2. Vorkultur der späten stationären Phase inokuliert. Das Zellwachstum wurde bei 600 nm bestimmt. Signifikante Unterschiede sind fett markiert; n.d. – nicht definiert (n≥4).

3.2.5.3 Der Magnesiumgehalt in den erzeugten Effluxstämmen ist vermindert

Für die weitere physiologische Charakterisierung der Mutanten wurde der Metallgehalt mittels ICP-MS ermittelt. Die Deletion der Effluxsysteme *dmeF*, *fieF*, *zntA* und *cadA* führt unter allen Bedingungen zur Akkumulation von Magnesium in den Zellen. Dies ändert sich auch nicht mit zusätzlicher Deletion von *zupT*. Ca. 39.9 x 10⁶ und 35.3 x 10⁶ Atome/Zelle konnten bereits von Herzberg *et al.*, 2014a publiziert werden. Jede Deletion bzw. Disruption eines Gens des Zur-Regulons führt zur Verminderung des Magnesiumgehalts auf das Niveau des Stammes AE104 (Tabelle 14), was auf eine Umsortierung des Metallimports durch die jeweiligen Deletion bzw. Disruptionen schließen lässt.

In den Effluxdeletionsmutanten ist CobW₃ bei Metallmangel und bei Zinkzugabe für die Speicherung des Zinks verantwortlich, was sich im Zinkgehalt pro Zelle unter diesen Bedingungen zeigt. Eine zusätzliche Disruption von *cobW₁* bzw. *cobW₂* hat darauf im Δe4 keinen Einfluss. Allerdings zeigt der Stamm Δe4ΔcobW₁-Cluster φ(cobW₂::lacZ)299 bei Metallmangel und bei Zinkzugabe ebenfalls einen verringerten Zinkgehalt pro Zelle. Dies könnte zum einen abhängig von CobW₂ sein, da die Einzeldelentionsmutante diesen Effekt nicht

Ergebnisse

Tabelle 14: Metallgehalt der Effluxdeletionsmutanten bestimmt per ICP-MS.

| Stamm | Zusatz | Atome pro Zelle | | | | |
|--|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | Mg (10 ⁶) | Fe (10 ³) | Zn (10 ³) | Co (10 ³) | Ni (10 ³) |
| Δe4 | ohne | 39.9 ^{±6.1} | 761 ^{±127} | 58 ^{±4.9} | 3.9 ^{±1.3} | 1.7 ^{±0.8} |
| | 100 μM EDTA | 37.7 ^{±4.5} | 659 ^{±178} | 61 ^{±5.6} | 3.4 ^{±0.4} | 2.3 ^{±0.4} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 31.0 ^{±5.0} | 618 ^{±105} | 215 ^{±14} | 3.7 ^{±0.6} | 3.4 ^{±2.1} |
| Δe4ΔcobW ₁ -Cluster | ohne | 9.4^{±1.5} | 557 ^{±81} | 72 ^{±9.1} | 2.3 ^{±0.4} | 2.3 ^{±0.4} |
| | 100 μM EDTA | 9.6^{±1.6} | 483 ^{±102} | 52 ^{±6.5} | 3.6 ^{±1.0} | 2.1 ^{±0.6} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 11.4^{±0.4} | 517 ^{±107} | 219 ^{±18} | 1.8^{±0.3} | 2.2 ^{±0.6} |
| Δe4ΔcobW ₃ | ohne | 10.0^{±0.6} | 617 ^{±59} | 77^{±4.4} | 4.3 ^{±0.6} | 2.1 ^{±0.6} |
| | 100 μM EDTA | 8.9^{±0.8} | 469 ^{±76} | 46^{±5.7} | 2.5 ^{±1.4} | 2.5 ^{±1.4} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 8.3^{±0.8} | 475 ^{±70} | 172^{±12} | 2.0^{±0.6} | 2.0 ^{±0.6} |
| Δe4ΔcobW ₁ -Cluster φ(cobW ₂ ::lacZ)299 | ohne | 9.5^{±0.1} | 571 ^{±78} | 70 ^{±11} | 3.4 ^{±0.7} | 1.4 ^{±0.3} |
| | 100 μM EDTA | 9.7^{±1.4} | 361^{±77} | 45^{±4.8} | 2.8 ^{±0.9} | 1.7 ^{±0.8} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 9.0^{±1.5} | 427 ^{±45} | 164^{±22} | 2.9 ^{±0.5} | 2.0 ^{±0.8} |
| Δe4ΔcobW ₃ φ(cobW ₁ ::lacZ)354 | ohne | 9.5^{±1.4} | 609 ^{±109} | 62 ^{±7.8} | 3.8 ^{±1.3} | 2.1 ^{±0.6} |
| | 100 μM EDTA | 9.3^{±0.9} | 443 ^{±68} | 41^{±4.2} | 2.7 ^{±0.7} | 1.6 ^{±0.8} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 7.9^{±0.7} | 488 ^{±59} | 172^{±17} | 3.0 ^{±0.5} | 2.1 ^{±0.7} |
| Δe4ΔcobW ₃ φ(cobW ₂ ::lacZ)299 | ohne | 8.3^{±0.8} | 512 ^{±70} | 66 ^{±5.6} | 3.4 ^{±0.8} | 2.0 ^{±0.9} |
| | 100 μM EDTA | 9.1^{±1.3} | 361^{±36} | 42^{±6.8} | 2.6 ^{±0.6} | 1.4 ^{±0.5} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 8.6^{±1.0} | 496 ^{±56} | 159^{±30} | 2.8 ^{±0.7} | 1.4 ^{±0.5} |
| Δe4ΔzupT | ohne | 35.3 ^{±5.5} | 711 ^{±119} | 27 ^{±3.4} | 5.2 ^{±1.6} | 1.8 ^{±0.7} |
| | 100 μM EDTA | 36.4 ^{±4.9} | 562 ^{±188} | 43 ^{±8.0} | 3.8 ^{±0.4} | 1.5 ^{±0.5} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 28.5 ^{±3.2} | 530 ^{±55} | 264 ^{±28} | 2.6 ^{±0.4} | 3.4 ^{±2.0} |
| Δe4ΔzupTΔcobW ₃ | ohne | 10.0^{±0.1} | 531 ^{±70} | 52^{±1.6} | 4.0 ^{±1.2} | 1.7 ^{±0.5} |
| | 100 μM EDTA | 11.1^{±1.5} | 522 ^{±89} | 28^{±2.7} | 3.6 ^{±1.4} | 2.0 ^{±0.6} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 10.8^{±1.5} | 497 ^{±89} | 194^{±20} | 4.0 ^{±1.2} | 2.0 ^{±0.6} |
| Δe4ΔzupTΔcobW ₃ φ(cobW ₁ ::lacZ)354 | ohne | 9.2^{±2.1} | 474 ^{±208} | 64^{±8.9} | 3.2 ^{±1.2} | 1.4 ^{±0.5} |
| | 100 μM EDTA | 9.6^{±0.9} | 496 ^{±80} | 42 ^{±0.4} | 2.9 ^{±0.5} | 1.9 ^{±0.4} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 8.4^{±1.1} | 515 ^{±109} | 191^{±36} | 2.8 ^{±0.9} | 2.2 ^{±0.5} |
| Δe4ΔzupTΔcobW ₃ φ(cobW ₂ ::lacZ)299 | ohne | 9.4^{±0.6} | 488 ^{±91} | 88^{±11} | 3.5 ^{±0.5} | 1.2 ^{±0.4} |
| | 100 μM EDTA | 9.5^{±0.7} | 406 ^{±102} | 36 ^{±10} | 2.2 ^{±1.1} | 1.2 ^{±0.8} |
| | 10 μM ZnCl ₂ | 8.5^{±0.9} | 337 ^{±74} | 152^{±12} | 3.4 ^{±2.0} | 1.6 ^{±1.1} |

Für die Bestimmung der Metallgehalte in den Zellen wurde eine 1. Vorkultur angezogen, welche zur Kultivierung der 2. Vorkultur diente. Mit dieser Kultur wurde eine Hauptkultur inokuliert die gegebenenfalls von 100 bis 150 Kletteinheiten mit den Zusätzen 100 μM EDTA, 25 μM CoCl₂ oder 100 μM ZnCl₂ inkubiert wurden. Es schlossen sich 2 Waschschrte mit Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) an. Daraufhin sorgte 70 %ige HNO₃ für die Mineralisierung der Zellen. Nach der Messung mittels ICP-MS erfolgte die Berechnung der Metallgehalte mit Hilfe der optischen Dichten und den gemessenen ppb-Werten. Signifikante Unterschiede sind fett markiert (n≥3).

zeigt und zum anderen beweisen, dass sich CobW₁ und CobW₂ gegenseitig komplementieren und erst die Doppeldeletion einen Effekt hervorruft. Im $\Delta e4\Delta zupT$ führt Metallmangel in den Doppeldeletionsmutanten nicht zu einem verringerten Zinkgehalt im Vergleich zum Ausgangsstamm, was auf eine gegenseitige Komplementation der Chaperone hindeutet.

In Tris-Minimalmedium akkumulieren die Stämme $\Delta e4\Delta cobW_3$, $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3$, $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3\phi(cobW_1::lacZ)354$ und $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3\phi(cobW_2::lacZ)299$ mehr Zink, was sich durch die Hochregulation eines unbekanntes Zinktransporters erklären ließe, der bei Zinküberschuss reprimiert wird.

3.2.5.2 Oxidativer Stress führt zu multiplen Effekten in den Effluxmutanten

Die Chaperone beeinflussen die Resistenz gegen Wasserstoffperoxid und Paraquat auf unterschiedliche Weise, denn im Stammhintergrund des $\Delta e4$ führen die Deletionen von *cobW*₃ und des *cobW*₁-Clusters zu einem resistenteren Phänotypen, wohingegen die Doppeldeletionsmutanten sensitiv gegen Wasserstoffperoxid und Paraquat sind (Abb. 21).

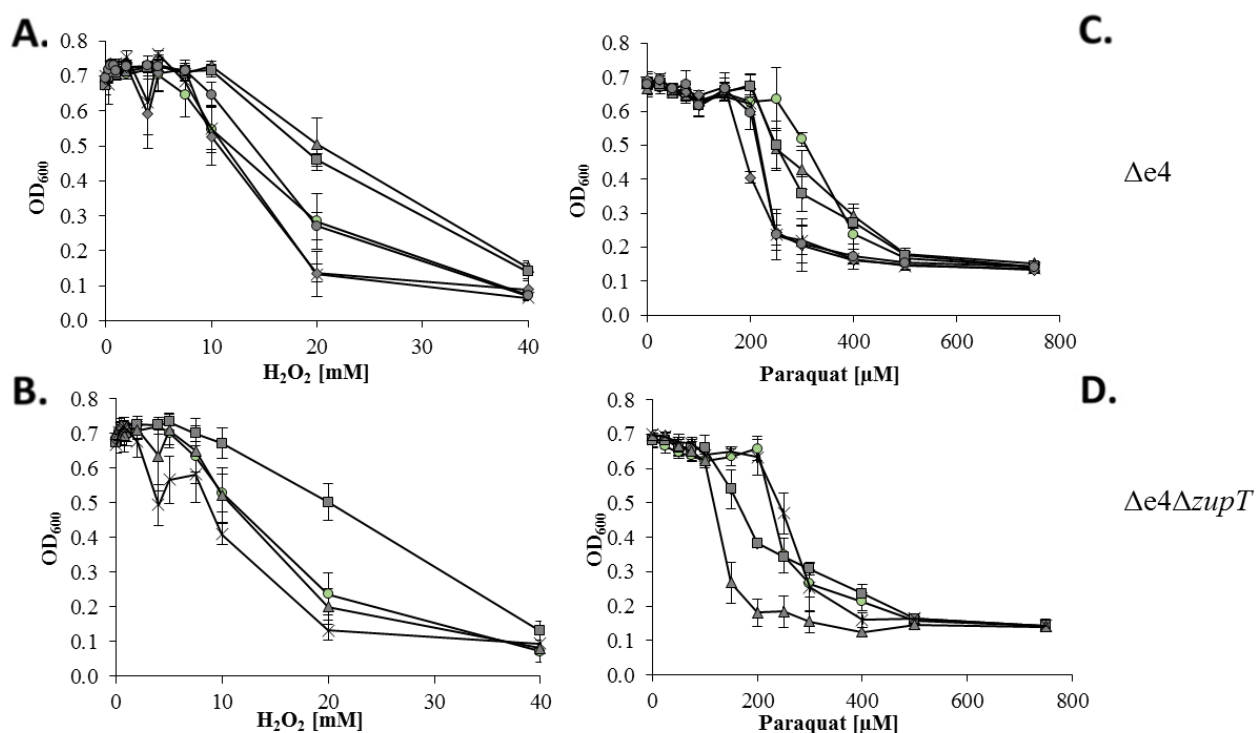


Abbildung 21: Dose Response-Kurven der Effluxdeletionsmutanten unter oxidativem Stress erzeugt durch Wasserstoffperoxid (A/B) und Paraquat (C/D). Mit Vorkulturen der frühen stationären Phase wurde eine 2. Vorkultur inokuliert, mit der nach 24 h Wachstum eine Hauptkultur 5 %ig inokuliert wurde. Das Verhalten der Varianten vom $\Delta e4$ (○) ist in Panel A und C gezeigt und beinhaltet die Stämme $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster (▲), $\Delta e4\Delta cobW_3$ (■), $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$ (●), $\Delta e4\Delta cobW_3\phi(cobW_1::lacZ)354$ (✕) und $\Delta e4\Delta cobW_3\phi(cobW_2::lacZ)299$ (◆). Im Panel B und D sind die Derivate der Mutante $\Delta e4\Delta zupT$ (○) zu sehen; $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3$ (■), $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3\phi(cobW_1::lacZ)354$ (▲) und $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3\phi(cobW_2::lacZ)299$ (✕). Die optischen Dichten wurden bei 600 nm gemessen ($n \geq 5$).

Für die Derivate des $\Delta e4\Delta zupT$, zeigt sich ein ähnliches Bild. So führt die Deletion von *cobW₃* zu einer Resistenzsteigerung gegen Wasserstoffperoxid, aber zu einem Resistenzverlust gegen Paraquat. Außerdem zeigt die Mutante $\Delta e4\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_1::lacZ)_{354}$ einen sensitiven Paraquat Phänotypen.

Die Kombination der Ergebnisse der Effluxdeletionsmutanten lässt vermuten, dass die Cu/Zn-SOD in der Aktivität beeinflusst ist und ein mögliches Target der CobW's ist.

Zusammenfassend führen die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen der Effluxdeletionsmutanten zu dem Schluss, dass CobW₃ verantwortlich ist für die Speicherung von Zink in der Zelle und in Tris-Minimalmedium nicht durch die CobW_{1/2} komplementiert werden kann. Bestätigt wird dies durch die Wachstumsdefizite. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass auch CobW₁ und CobW₂ eine Funktion bei der Zinkspeicherung haben und sich vermutlich gegenseitig komplementieren.

3.3 Welchen Einfluss haben die Deletionen von *cobW₃* und dem *cobW₁*-Cluster auf die Effluxsysteme ZntA, CadA, DmeF und FieF?

Für die Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase im AE104 ist ein Zusammenspiel zwischen dem Aufnahmesystem ZupT und den Haupteffluxsystemen ZntA und CadA notwendig (Scherer and Nies, 2009; Herzberg *et al.*, 2014a). Es ist allerdings nicht geklärt, ob die Effluxsysteme frei verfügbare Metalle entgiften oder ob im Zytoplasma eine Belieferung durch Chaperone erfolgt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Effluxsystemen und CobW_{1/2/3} zu untersuchen wurden Reporterfusionen von *zntA*, *cadA*, *dmeF* und *fieF* erstellt.

3.3.1 *CadA* wird in den CH34-Derivaten durch Zink induziert

Die Expression von *zntA* wird in allen CH34-Derivaten durch 750 μ M Zink induziert und bei höheren Konzentrationen reprimiert, was eine Funktion im Zinkefflux bestätigt und somit die Daten von Schwarzenberger, 2007 reproduziert (siehe 2.5.1) (Tabelle 15). Eine Induktion der Genexpression konnte auch mit Cadmium beobachtet werden und weist auf eine Rolle bei der Cadmiumentgiftung hin.

Die Basisaktivität von *cadA* ist durch die Deletion von *cobW₃* und/oder des *cobW₁*-Clusters um Faktor 2.5 bis 3 vermindert, wird jedoch durch 750 μ M Zink induziert. Dies bestätigt zum einen eine Funktion der P_{IB2}-Typ ATPase bei der Zinkentgiftung und zum anderen lässt sich eine Funktion der Chaperone beim Efflux postulieren. CadA spielt außerdem eine Rolle beim Efflux von Cadmium, was sich anhand der Geninduktion durch Cadmium ableiten lässt.

Ergebnisse

Eine mögliche Funktion der Chaperone beim Efflux von Metallen zeigt sich auch in der Grundaktivität von *dmeF*, welche in den Einzeldelentionsmutanten vermindert und in der Doppeldeletion erhöht ist im Vergleich zum CH34. Da in der Doppeldeletionsmutante weniger Metallspeicherkapazität durch das Fehlen von CobW_{1/3} vorhanden ist, lässt sich vermuten, dass DmeF unter dieser Bedingung eine essentielle Rolle besitzt.

Tabelle 15: Einfluss der Deletion von *cobW*₃ und des *cobW*₁-Clusters im CH34 auf die Expression der Gene *zntA*, *cadA*, *dmeF* und *fieF*.

| Stamm | Basis- aktivität [U/mg TG] | Faktor der Hochregulation | | | | | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | EDTA | | ZnCl ₂ | | CoCl ₂ | | CdCl ₂ | |
| | | 1 mM | 5 mM | 750 µM | 2 mM | 0.1 mM | 1 mM | 10 µM | 100 µM |
| <i>φ(zntA-lacZ)</i> | | | | | | | | | |
| CH34 | 21.0 ^{±7.7} | 1.0 ^{±0.2} | 1.0 ^{±0.2} | 2.1^{±0.5} | 0.2^{±0.2} | 1.1 ^{±0.3} | 1.1 ^{±0.1} | 3.6^{±0.4} | 4.7^{±0.3} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ - Cluster | 21.5 ^{±3.6} | 0.8 ^{±0.2} | 0.9 ^{±0.2} | 1.9^{±0.6} | 0.1^{±0.0} | 1.2 ^{±0.2} | 1.4 ^{±0.1} | 5.6^{±0.9} | 5.4^{±0.3} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₃ | 21.1 ^{±5.8} | 0.8 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.1} | 2.3^{±0.5} | 0.5^{±0.3} | 1.1 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.2} | 4.6^{±0.3} | 6.5^{±1.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ - ClusterΔ <i>cobW</i> ₃ | 19.2 ^{±4.9} | 1.0 ^{±0.2} | 0.9 ^{±0.1} | 2.7^{±0.5} | 0.2^{±0.1} | 1.3 ^{±0.1} | 1.5 ^{±0.2} | 5.5^{±0.8} | 8.0^{±1.5} |
| <i>φ(cadA-lacZ)</i> | | | | | | | | | |
| CH34 | 20.8 ^{±5.3} | 1.4 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.1} | 0.7 ^{±0.3} | 1.3 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.2} | 3.0^{±0.3} | 9.4^{±2.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ - Cluster | 7.4^{±2.2} | 1.1 ^{±0.3} | 1.1 ^{±0.2} | 2.0^{±0.4} | 0.4 ^{±0.1} | 1.3 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.2} | 4.4^{±0.2} | 13.4^{±0.8} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₃ | 7.2^{±1.7} | 1.1 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.1} | 2.5^{±0.4} | 0.8 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.5} | 1.0 ^{±0.4} | 7.1^{±0.2} | 17.6^{±0.6} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ - Cluster Δ <i>cobW</i> ₃ | 8.2^{±2.8} | 1.0 ^{±0.2} | 1.12 ^{±0.2} | 1.9^{±0.3} | 0.2 ^{±0.2} | 1.4 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.0} | 6.2^{±0.7} | 12.5^{±2.1} |
| <i>φ(fieF-lacZ)</i> | | | | | | | | | |
| CH34 | 18.3 ^{±1.8} | 1.2 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.0} | 0.6 ^{±0.1} | 0.3 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.0} | 0.9 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.0} | 1.0 ^{±0.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ - Cluster | 19.4 ^{±2.8} | 1.2 ^{±0.2} | 1.0 ^{±0.0} | 0.5 ^{±0.2} | 0.1 ^{±0.0} | 1.1 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.2} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₃ | 15.1 ^{±4.0} | 1.3 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.1} | 0.3 ^{±0.0} | 1.5 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.3} | 1.4 ^{±0.1} | 1.4 ^{±0.1} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ - Cluster Δ <i>cobW</i> ₃ | 21.4 ^{±4.9} | 1.4 ^{±0.1} | 1.4 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.1} | 0.1 ^{±0.0} | 1.4 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.3} | 1.3 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.1} |

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 15: Einfluss der Deletion von *cobW₃* und des *cobW₁*-Clusters im CH34 auf die Expression der Gene *zntA*, *cadA*, *dmeF* und *fieF*.

| Stamm | Basis- aktivität [U/mg TG] | Faktor der Hochregulation | | | | | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | EDTA | | ZnCl ₂ | | CoCl ₂ | | CdCl ₂ | |
| | | 1 mM | 5 mM | 750 μM | 2 mM | 0.1 mM | 1 mM | 10 μM | 100 μM |
| $\varphi(dmeF-lacZ)$ | | | | | | | | | |
| CH34 | 54.9 ^{±4.1} | 1.8^{±0.4} | 0.8 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.2} | 0.2 ^{±0.1} | 1.6 ^{±0.1} | 0.8 ^{±0.7} | 0.9 ^{±0.0} | 0.9 ^{±0.3} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> - Cluster | 33.3^{±3.2} | 1.3 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.2} | 0.5 ^{±0.1} | 0.1 ^{±0.0} | 1.7 ^{±0.3} | 1.3 ^{±0.0} | 1.0 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.2} |
| CH34Δ <i>cobW₃</i> | 35.6^{±4.0} | 2.1^{±0.2} | 0.9 ^{±0.2} | 0.4 ^{±0.2} | 0.1 ^{±0.1} | 2.1 ^{±0.5} | 1.4 ^{±0.4} | 1.0 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.2} |
| CH34Δ <i>cobW₁</i> - Cluster Δ <i>cobW₃</i> | 89.2^{±12.7} | 1.2 ^{±0.2} | 1.0 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.1} | 0.1 ^{±0.0} | 1.3 ^{±0.3} | 0.7 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.1} | 0.8 ^{±0.1} |

Im Wildtypstamm CH34 und den Mutanten wurden *lacZ*-Fusionen downstream *dmeF*, *fieF*, *zntA* und *cadA* erzeugt. Zellen der frühen exponentiellen Phase wurden zu diesem Zweck für 3 h bei 30 °C mit steigenden EDTA- bzw. Metallkonzentrationen inkubiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde bestimmt und der Faktor der Hochregulation im Verhältnis zur Basisaktivität ohne Zusatz berechnet. Ein Faktor größer 1 bedeutet eine gesteigerte Expression des Gens. Signifikante Unterschiede sind fett markiert ($n \geq 3$).

3.3.2 *CadA* wird in der Deletionsmutante $\Delta zupT\Delta cobW_3$ mit zunehmenden Zinkkonzentrationen induziert

Durch das Fehlen der Megaplasmide und somit einer Vielzahl von Resistenzdeterminanten, wird *zntA* durch Zink stärker induziert, was sich in einer bis zu 10fach höherer Expression wieder spiegelt. Allerdings führt die Deletion von *cobW₃* im AE104 und $\Delta zupT$ zu einer verringerten Induktion bei höheren Zinkkonzentration und deutet gemeinsam mit den Daten der Induktion mit Kobalt auf eine Beeinflussung der Effluxsysteme durch die Chaperone hin.

Wie auch im CH34 führt die Deletion von *cobW₃* im AE104 zu einer um Faktor 2 verminderten Basisaktivität von *cadA*. Die Zugabe von Cadmium und Zink führt zu einer Induktion des Gens, vergleichbar mit dem des AE104. Im $\Delta zupT\Delta cobW_3$ hingegen wird *cadA* durch Cadmium nicht so stark induziert und lässt vermuten, dass der Stamm weniger Cadmium in der Zelle hat.

Ergebnisse

Tabelle 16: Einfluss der Deletion von *cobW*₃ im Stamm AE104 und dessen Mutante Δ *zupT* auf die Expression der Gene *zntA*, *cadA*, *dmeF* und *fieF*.

| Stamm | Basis- aktivität [U/mg TG] | Faktor der Hochregulation | | | | | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
| | | EDTA | | ZnCl ₂ | | CoCl ₂ | | CdCl ₂ | |
| | | 100 μ M | 1 mM | 100 μ M | 500 μ M | 2.5 μ M | 10 μ M | 2.5 μ M | 150 μ M |
| <i>$\varphi(zntA-lacZ)$</i> | | | | | | | | | |
| AE104 | 50.4 ^{±5.8} | 0.6 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.2} | 7.3 ^{±1.8} | 6.0 ^{±0.7} | 3.1 ^{±0.3} | 1.0 ^{±0.0} | 6.8 ^{±1.2} | 5.8 ^{±0.2} |
| AE104 Δ <i>cobW</i> ₃ | 53.2 ^{±8.6} | 0.7 ^{±0.1} | 0.7 ^{±0.1} | 9.4 ^{±0.6} | 3.2 ^{±0.5} | 2.3 ^{±0.4} | 1.4 ^{±0.1} | 8.4 ^{±1.2} | 5.0 ^{±3.4} |
| Δ <i>zupT</i> | 37.4 ^{±7.5} | 0.5 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.1} | 10 ^{±1.7} | 5.5 ^{±1.3} | 1.4 ^{±1.0} | 0.9 ^{±0.3} | 6.3 ^{±1.2} | 16 ^{±3.2} |
| Δ <i>zupT</i> Δ <i>cobW</i> ₃ | 50.7 ^{±8.4} | 0.7 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.1} | 8.3 ^{±1.7} | 2.6 ^{±1.0} | 4.6 ^{±1.2} | 2.1 ^{±0.7} | 7.9 ^{±1.8} | 8.8 ^{±0.7} |
| <i>$\varphi(cadA-lacZ)$</i> | | | | | | | | | |
| AE104 | 28.5 ^{±4.7} | 0.9 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.1} | 1.7 ^{±0.2} | 0.8 ^{±0.2} | 1.1 ^{±0.2} | 1.0 ^{±0.1} | 8.3 ^{±1.9} | 21 ^{±2.5} |
| AE104 Δ <i>cobW</i> ₃ | 15.0 ^{±2.6} | 0.9 ^{±0.1} | 0.7 ^{±0.1} | 2.3 ^{±0.5} | 1.7 ^{±0.3} | 1.2 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.1} | 13 ^{±4.8} | 40 ^{±0.9} |
| Δ <i>zupT</i> | 25.7 ^{±5.0} | 0.7 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.0} | 1.4 ^{±0.2} | 0.4 ^{±0.2} | 1.1 ^{±0.3} | 0.9 ^{±0.1} | 6.7 ^{±2.0} | 21 ^{±3.5} |
| Δ <i>zupT</i> Δ <i>cobW</i> ₃ | 25.2 ^{±7.5} | 0.8 ^{±0.1} | 0.7 ^{±0.1} | 1.8 ^{±0.2} | 0.8 ^{±0.3} | 1.0 ^{±0.2} | 0.7 ^{±0.0} | 9.6 ^{±2.8} | 2.8 ^{±2.8} |
| <i>$\varphi(fieF-lacZ)$</i> | | | | | | | | | |
| AE104 | 20.2 ^{±4.4} | 1.2 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.2} | 0.5 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.2} | 0.8 ^{±0.4} |
| AE104 Δ <i>cobW</i> ₃ | 23.6 ^{±4.7} | 1.1 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.1} | 1.2 ^{±0.1} | 0.3 ^{±0.2} | 1.2 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.2} | 1.2 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.1} |
| Δ <i>zupT</i> | 25.3 ^{±3.3} | 1.1 ^{±0.0} | 1.0 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.1} | 0.3 ^{±0.2} | 1.1 ^{±0.2} | 1.0 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.2} | 0.8 ^{±0.2} |
| Δ <i>zupT</i> Δ <i>cobW</i> ₃ | 31.0 ^{±4.8} | 1.0 ^{±0.0} | 1.0 ^{±0.1} | 0.7 ^{±0.1} | 0.3 ^{±0.1} | 1.0 ^{±0.1} | 0.8 ^{±0.1} | 1.1 ^{±0.1} | 0.9 ^{±0.2} |
| <i>$\varphi(dmeF-lacZ)$</i> | | | | | | | | | |
| AE104 | 33.4 ^{±6.7} | 1.4 ^{±0.3} | 1.7 ^{±0.6} | 1.5 ^{±0.1} | 0.6 ^{±0.1} | 2.1 ^{±0.8} | 2.5 ^{±0.6} | 1.5 ^{±0.2} | 3.4 ^{±0.9} |
| AE104 Δ <i>cobW</i> ₃ | 31.7 ^{±7.9} | 1.5 ^{±0.5} | 2.8 ^{±0.4} | 1.5 ^{±0.4} | 0.6 ^{±0.2} | 2.5 ^{±0.9} | 3.9 ^{±0.9} | 1.5 ^{±0.2} | 3.9 ^{±0.3} |
| Δ <i>zupT</i> | 34.3 ^{±6.7} | 1.3 ^{±0.1} | 1.3 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.2} | 0.3 ^{±0.1} | 4.6 ^{±1.5} | 3.3 ^{±0.2} | 1.3 ^{±0.1} | 3.1 ^{±0.2} |
| Δ <i>zupT</i> Δ <i>cobW</i> ₃ | 25.5 ^{±4.6} | 1.1 ^{±0.2} | 1.9 ^{±0.2} | 1.8 ^{±0.4} | 0.6 ^{±0.3} | 3.8 ^{±0.8} | 3.1 ^{±1.1} | 1.1 ^{±0.2} | 2.6 ^{±0.4} |

Im AE104, Δ *zupT* und den Mutanten wurden *lacZ*-Fusionen *downstream dmeF*, *fieF*, *zntA* und *cadA* erzeugt. Zellen der frühen exponentiellen Phase wurden zu diesem Zweck für 3 h bei 30 °C mit steigenden EDTA- bzw. Metallkonzentrationen inkubiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde bestimmt und der Faktor der Hochregulation im Verhältnis zur Basisaktivität ohne Zusatz berechnet. Ein Faktor größer 1 bedeutet eine gesteigerte Induktion. Signifikante Unterschiede sind fett markiert (n \geq 3).

3.4 Proteinbiochemische Charakterisierung von CobW_{1/2/3}

Für eine biochemische Charakterisierung der Chaperone CobW_{1/2/3} wurden die Gene amplifiziert und mit dem pET28A-Derivat pRHB152 ligiert. Dies ermöglichte die Reinigung der rekombinanten Proteine über einen N-terminalen ab spaltbaren Histidin-*tag* mittels Tev-Protease.

3.4.1 Reinigung der rekombinanten Proteine und Abspaltung des *Tags*

Nach der Geninduktion mit IPTG und der Proteinsynthese konnten die rekombinanten Proteine von CobW_{1/2/3} in 50 µg Zellen in einer SDS-PAGE durch kolloidale Färbung und Western-Blot nachgewiesen werden (siehe 2.3) (Abb. 22). *His*-CobW₁ konnte nach der Induktion als 48 kDa großes Protein durch Coomassie-Blaufärbung nachgewiesen werden. CobW₂ und CobW₃ konnten als *His*-tag-Fusionsproteine mit einer Größe von 44 kDa bzw. 46 kDa sowohl kolloidal angefärbt werden, als auch im Immunoblot detektiert werden.

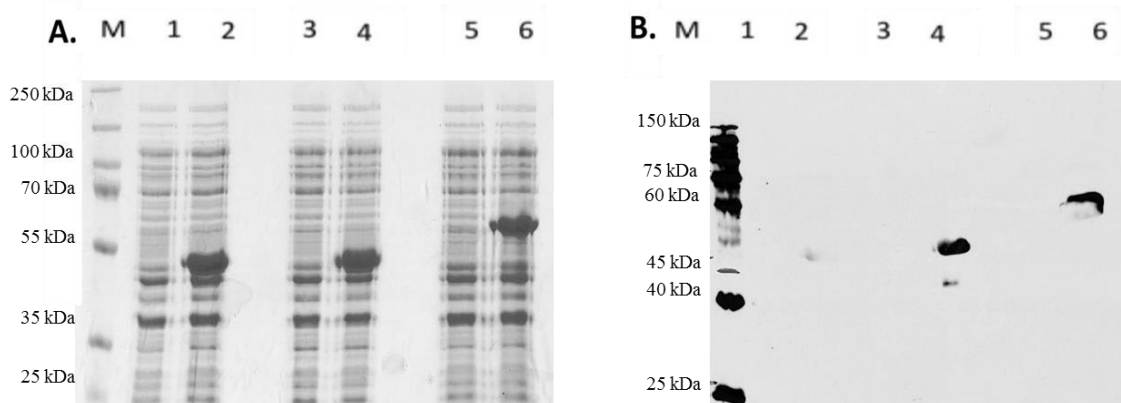


Abbildung 22: Nachweis von *His*-CobW_{1/2/3} in Zellen mit Coomassie-Blau-Färbung und Western-Blot. Die Expression erfolgte in TB-Medium bei 37 °C bis zum Erreichen der OD₆₀₀=1.5, dann erfolgte ein Temperaturshift auf 30 °C und die Induktion mit 1 mM IPTG für 1 h. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Färbung der SDS-PAGE mit Coomassie-Blau (A) und Western-Blot (B) mit 1:2 500 Anti *His*-Antikörper und 1:5 000 Anti *Mouse*-Antikörper (Acris). 50 µg Zellen 2 x SDS-Probenpuffer nach 5 min 95 °C: (1) vor Induktion *cobW*₁, (2) nach Induktion *cobW*₁, (3) vor Induktion *cobW*₂, (4) nach Induktion *cobW*₂, (5) vor Induktion *cobW*₃, (6) nach Induktion *cobW*₃. Als Größenstandard für die Coomassie-Blau-Färbung diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* und für den Western-Blot *VisiBlot*.

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.3.1.4), mit anschließender Abspaltung des *His*-tags mittels Tev-Protease (siehe 2.3.6). In Abbildung 23 ist dies am Beispiel von *His*-CobW₁ gezeigt und es ist deutlich nach 24 stündiger Inkubation mit der Protease ein Größenshift nach der Coomassie-Blau-Färbung, im Vergleich zu *Tev-His* und *His*-CobW₁ erkennbar, und ein Signalverlust im Western-Blot, was auf die Abspaltung des *Tags* schließen lässt. Ebenso konnte nach einer zweiten Affinitäts-

chromatographie zur Trennung der Tev-Protease und CobW₁ kein Signal auf dem Autoradiogramm für CobW₁ mit einer Größe von 44 kDa detektiert werden, jedoch eine Doppelbande nach der kolloidalen Färbung, was für ein Gemisch aus CobW₁ und His-CobW₁ spricht.

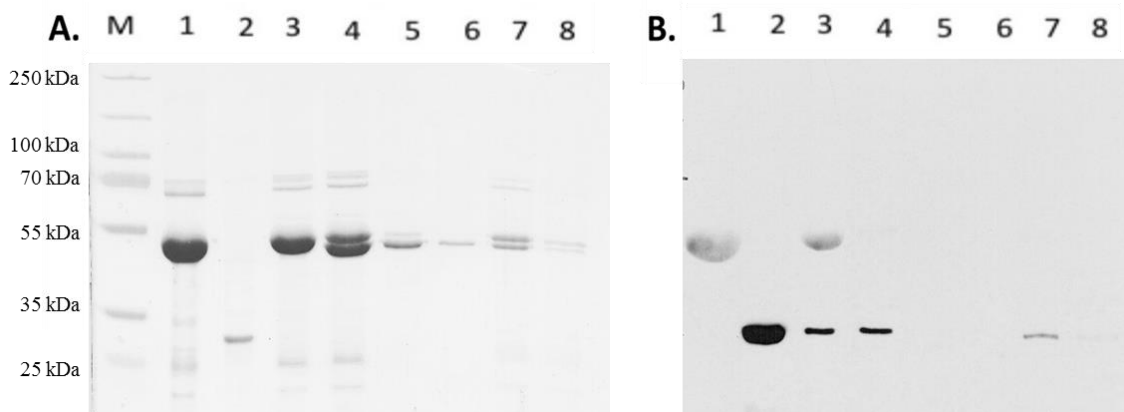


Abbildung 23: Coomassie-Blau-Färbung und Autoradiogramm zum Nachweis der Abspaltung des Affinitätstags am Beispiel von CobW₁. His-CobW₁ wurde in einem Molverhältnis von 50:1 mit Tev-His in Tev-Puffer + 0.07 % Mercaptoethanol für 24 h bei 4 °C inkubiert und anschließend über Affinitätschromatographie gereinigt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Färbung der SDS-PAGE mit Coomassie-Blau (A) und Western-Blot (B) mit 1:2 500 Anti His-Antikörper und 1:5 000 Anti Mouse-Antikörper. Gereinigtes Protein in 2 x SDS Probenpuffer nach 5 min 95 °C: (1) 8 µg His-CobW₁, (2) 8 µg Tev-His, (3) 4 µg His-CobW₁ und 0.1 µg Tev-His zum Zeitpunkt t=0, (4) 4 µg His-CobW₁ und 0.1 µg Tev-His zum Zeitpunkt t=24 h, (5/6) Durchfluss Affinitätschromatographie, (7/8) Elutionsfraktionen Affinitätschromatographie. Als Größenstandard dienten A: PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus und B: VisiBlot.

Vor der weiteren Verwendung wurden die Proteine als Fusionsproteine und ohne His-Tag auf eine SDS-PAGE aufgetragen und es zeigten sich nach Färbung mit Coomassie-Blau keine weiteren abundanten Banden in den Spuren nach der Abspaltung (Abb. 24).

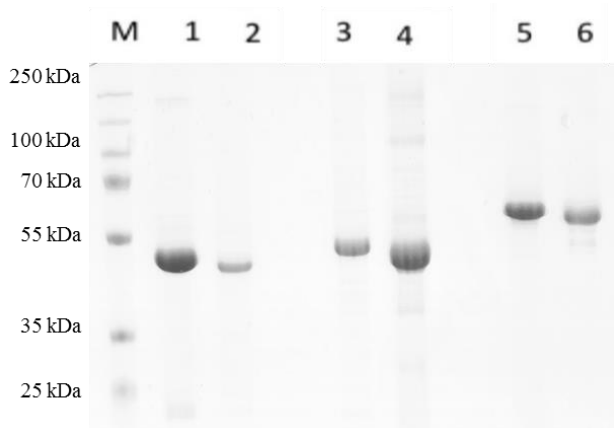


Abbildung 24: SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung zum Nachweis der Proteine CobW_{1/2/3} mit und ohne Affinitätstag. Nach der Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde der Affinitätstag im Tev-Assay entfernt. Zur Kontrolle wurden die Proteine in 2 x SDS-Probenpuffer nach 5 min 95 °C auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen: (1) 10 µg His-CobW₁, (2) 5 µg CobW₁, (3) 10 µg His-CobW₂, (4) 10 µg CobW₂, (5) 10 µg His-CobW₃, (6) 10 µg CobW₃. Als Größenstandard für die Coomassie-Blau-Färbung diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus.

3.4.2 Bestimmung der Bindekapazität der CobW's

Für die Bindung von Zink an Proteine sind unter anderem *zinc finger* Motive notwendig. In Eukaryoten bestehen diese typischerweise aus 4 Cysteinen oder 2 Cysteinen und 2 Histidinen (Andreini *et al.*, 2006a). Koordiniert wird das klassische Cys2His2-Motiv mit einem gebundenen Zn^{2+} durch eine α -Helix und ein antiparalleles β -sheet (Lee *et al.*, 1989). In der COG0523-Familie der P-loop GTPasen wurde eine abweichende putative Metallbindestellen mit einem GCxCC-Motiv identifiziert, dass auch in *C. metallidurans* konserviert ist (Haas *et al.*, 2009). CobW₁ und CobW₂ besitzen im Gegensatz zu CobW₃ ein GCICC-Motiv (Abb. 25). Allerdings besitzen CobW₃ (endständig) und CobW₂ (mittig) im variablen C-Terminus Histidin-Einschübe, die möglicherweise an der Metallbindung beteiligt sein könnten (Abb. 5). Um dies zu untersuchen wurden die gereinigten Chaperone auf ihre Metallbindekapazität mittels Zincon-Assay und Metallbinde-Assay mit anschließender Co-Faktorbestimmung per ICP-MS untersucht.

```

CobW1: EETLVEMSNGCICCTLREDLLEVERLAR---EGR--FDQLVIESTGISEPLPVA
CobW2: REQIVQMSNGCICCTIRGDLVQALSDLVTQRDEGKIAFDRVVIETGTVANPGPVA
CobW3: -----DSHG-----DLLAEVERLAQ---TGQ--YDHVVIEAGATDEPLGLA

```

Abbildung 25: Aminosäurealignment eines Ausschnittes der Sequenzen von CobW_{1/2/3}, zur Darstellung des putativen Metallbindemotives (in rot).

3.4.2.1 Zincon-Assay zur Bestimmung der Zinksbindeaffinität

Sollte es sich bei den Chaperonen um Zink bindende Proteine mit einer hohen Affinität halten, dann treten sie mit dem Farbstoff Zincon in Konkurrenz und lösen es aus diesem heraus bzw. verhindern die Bindung (siehe 2.3.10). In diesem Fall würde Zincon erst Zink binden, wenn CobW_{1/2/3} mit Zink gesättigt sind. Als Kontrolle wurden zunächst 10 μ M Zincon mit steigenden Konzentrationen an Zink inkubiert und die Konzentration der Sättigung bestimmt (Abb. 26). Die Sättigung wurde anhand des Verschwindens des Peaks bei 480 nm berechnet und in Prozent angegeben. Die Sättigung des Zincons setzt bei einem Verhältnis von 1:1 ein. Um das Herauslösen von Zink aus dem Zincon-Zink-Komplex zu simulieren, wurde dem Ansatz 10 μ M EDTA zu gefügt. Dies sorgt dafür, dass das Zincon erst bei einem Verhältnis von 1:3 gesättigt ist. Bei 10 μ M Zink liegt die Sättigung bei 0 %, was dafür spricht, dass das gesamte Zink durch EDTA gebunden ist. Erhöht sich die Konzentration auf 20 μ M $ZnCl_2$ liegt die Sättigung bei 30 % und beschreibt einen intermediären Bindungszustand.

Werden diese Kontrollen nun mit dem Ergebnis von CobW₁ (Abb. 26A) verglichen, so zeigt sich, dass 10 μM des mit EDTA hergestellten Apo-CobW₁ bei einem Verhältnis von 1:2 gesättigt sind (siehe 2.3.8). 10 μM Zinkchlorid sorgt für einen intermediären Bindungszustand und zeigt eine Sättigung von 20 %. Anhand dieser Daten würde das Apo-Protein von CobW₁ zwischen 1 und 2 mol Zn/mol Protein binden. Als Kontrolle wurde das Apo-Protein vor dem Assay mit Zink inkubiert und überschüssiges Zink durch Größenausschlusschromatographie entfernt (siehe 2.3.9). Beim metallierten CobW₁ setzt die Sättigung des Zincons bereits bei einer Konzentration von 10 μM Zinkchlorid ein.

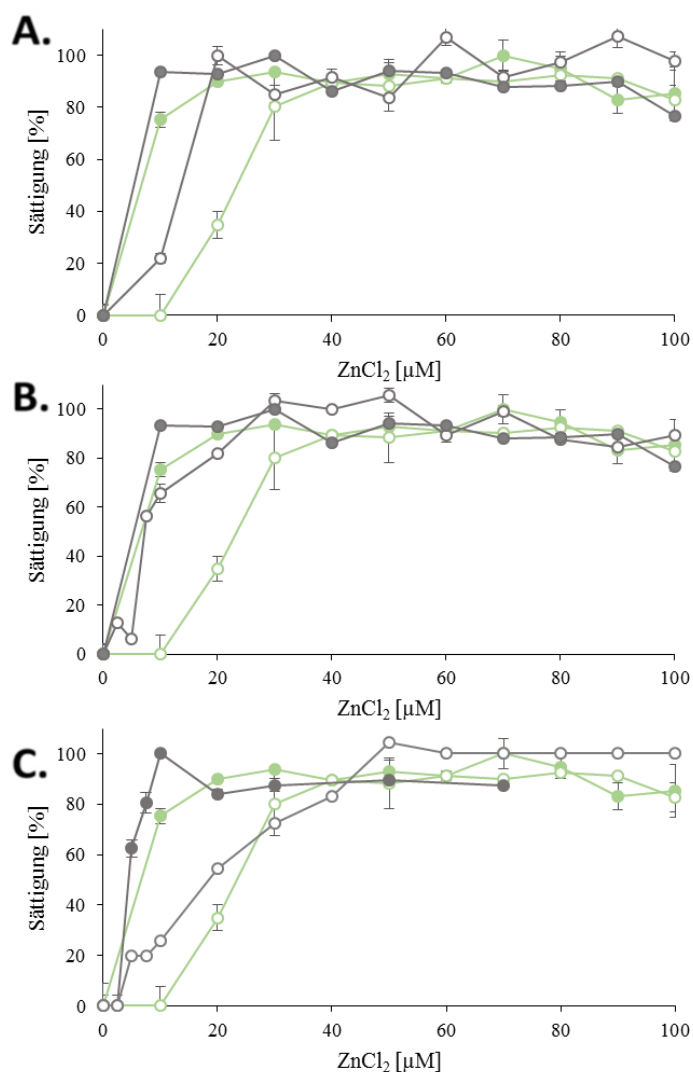


Abbildung 26: Konkurrenzexperiment zwischen dem Farbstoff Zincon und CobW_{1/2/3} um frei verfügbares Zink. 10 μM Zincon wurden mit 10 μM des jeweiligen Proteins und verschiedenen Zinkchloridkonzentrationen gemischt und die Bindung von Zink an Zincon gemessen. Das Absorptionsmaximum des Zincons verschiebt sich durch die Metallbindung von 480 nm auf 620 nm und die Sättigung [%] konnte berechnet werden. Als Kontrollen wurde nur 10 μM Zincon + ZnCl₂ (●) und 10 μM Zincon + 10 μM EDTA + ZnCl₂ (○) verwendet. In Panel A wurde CobW₁ als Apo-Protein (○) und mit Zink beladen (●) untersucht. Panel B zeigt das Apo-Protein von CobW₂ (○) und das mit Zink metallierte (●). Das Apo-Protein von CobW₃ (○) im Vergleich zum Zink inkubierten ist in Panel C dargestellt (●).

CobW₂ besitzt zusätzlich zum Metallbindemotiv eine C-terminale Histidin-reiche Region, die dazu führt, dass eine Sättigung des Apo-Proteins von 100 % bei 30 μM ZnCl₂ erreicht ist (Abb. 26B). Allerdings konnte ein intermediärer Bindungszustand bei Konzentrationen von 7.5, 10, und 20 μM mit Sättigungen von 50 – 80 % festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindekapazität des Apo-Proteins geringer als 3 mol Zn/mol Protein ist. Auch in diesem Fall wurde eine Zink-inkubierte Variante getestet, welche bei einem Verhältnis von 1:1 mit 100 % gesättigt ist.

Trotz des fehlenden GCxCC-Motivs in CobW₃ bindet die Apo-Form des Chaperons Zink mit hoher Affinität, was sich an einer Sättigung von 100 % bei einem Verhältnis von 1:5 zeigt (Abb. 26C). Dies lässt den Schluss zu, dass die Metallbindung durch die C-terminal kodierten Histidine erfolgt. Bei genauerer Betrachtung lässt sich eine Sättigung von 0 % bis zu einer Konzentration von 2.5 μM ZnCl₂ erkennen. Diese steigt stufenweise auf 20 % bei 5 μM ZnCl₂ über 80 % bei 40 μM auf 100 %. Aufgrund dieser Daten liegt die Bindungskapazität von Apo-CobW₃ bei zwischen 4 und 5 mol Zn/mol Protein. Die Nutzung des voll metallierten CobW₃ führt zu einer Sättigung des Proteins bei einem Verhältnis von 1:1.

Anhand des Zincon-Assays lässt sich zusammenfassen, dass CobW₃ die höchste Bindekapazität für Zink besitzt und CobW₁ die geringste.

3.4.2.2 Bestimmung des gebundenen Metalls mittels ICP-MS

Die analytische bzw. spektrometrische Bestimmung der Metall-Co-Faktoren erfolgte mittels ICP-MS. Anhand der ppb-Werte (*parts per billion*), dem Molekulargewicht der Proteine und der Proteinkonzentration wurde die gebundene mol-Menge pro mol Protein berechnet. Zunächst wurden die Apo-Proteine durch Inkubation mit EDTA hergestellt (siehe 2.3.8), die als Grundlage für die Metallinkubationen mit Zink oder Zink, GTP und Magnesium dienen (siehe 2.3.9). Für alle Ansätze konnte ein Kobalt-, Cadmium- und Magnesiumgehalt unterhalb der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt werden (Tabelle 17), was eine Bindung dieser Metalle an die Proteine ausschließt. Nickel konnte im Gegensatz dazu unter allen Bedingungen mit ca. 1 mol/mol Protein gebunden an CobW₂ nachgewiesen werden, jedoch nicht in CobW₁ und CobW₃.

Wird der Zinkgehalt der Proteine untereinander verglichen, so zeigt sich eine minimale Verunreinigung von Apo-CobW₁, wobei der gemessene ppb-Wert unterhalb der Nachweis- und Bestimmungsgrenze lag. Die Inkubation von Zink oder Zink, GTP und Magnesium führt zur Bindung des Metalls ohne signifikante Unterschiede. Anhand des Zincon-Assays konnte eine

Bindung von 1 bis 2 mol Zn/mol CobW₁ postuliert werden, was sich in diesem Experiment bestätigt.

Hohe Standardabweichungen für den Zinkgehalt des Apo-CobW₂ mit einem Mittelwert von 1 ± 0.1 mol Zn/mol Protein lassen vermuten, dass der Histidin-reiche C-Terminus je nach Struktur veränderte Zinkaffinitäten besitzt und eine Herstellung des Apo-Proteins erschwert. Die Inkubation mit Zink bzw. Zink, GTP und Magnesium führt zu einer Bindung von $ca. 7 \pm 0.7$ bzw. 8 ± 0.0 mol Zn/mol Protein und liegt damit deutlich über dem postulierten Wert aus dem Zincon-Assay.

Die Metallierung eines Zink-freien CobW₃ führt zur Bindung von 6 ± 2.7 mol Zn/mol Protein bei Inkubation des Proteins mit Zink. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit Zink, GTP und Magnesium zu einer Bindung von 3 ± 0.0 mol Zn/mol Protein. Der Mittelwert beider Ansätze ergibt eine Bindung von 4.6 mol Zn/mol CobW₃ und bestätigt damit das Zincon-Assay.

Zusammenfassend bestätigen die Co-Faktorbestimmungen von CobW₁ und CobW₃ das Zincon-Assay. Allerdings ergibt sich aus den ICP-MS-Messungen eine veränderte Hierarchie was die Bindekapazitäten der Chaperone angeht, denn CobW₂ bindet mit $ca. 7$ mol Zn/mol Protein das meiste Zink.

Tabelle 17: Co-Faktorbestimmung der gereinigten rekombinanten Proteine CobW_{1/2/3}.

| Bedingung | | Metall [mol/mol Protein] | | | | |
|-------------------|---|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | Zn | Mg | Ni | Co | Cd |
| CobW ₁ | Apo | 0.09\pm0.04 | 0.01 \pm 0.06 | 0.05 \pm 0.04 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | ZnCl ₂ | 1.84\pm0.63 | 0.08 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.02 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | ZnCl ₂ + GTP + MgCl ₂ | 1.41\pm0.13 | 0.08 \pm 0.00 | 0.10 \pm 0.03 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| CobW ₂ | Apo | 1.37\pm0.96 | 0.00 \pm 0.03 | 0.91 \pm 0.55 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | ZnCl ₂ | 7.07\pm0.73 | 0.06 \pm 0.05 | 1.41 \pm 0.53 | 0.00 \pm 0.01 | 0.00 \pm 0.00 |
| | ZnCl ₂ + GTP + MgCl ₂ | 7.64\pm0.00 | 0.23 \pm 0.00 | 1.19 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| CobW ₃ | Apo | 0.01\pm0.04 | 0.00 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.08 | 0.01 \pm 0.01 | 0.00 \pm 0.00 |
| | ZnCl ₂ | 5.76\pm2.65 | 0.00 \pm 0.08 | 0.08 \pm 0.04 | 0.01 \pm 0.01 | 0.00 \pm 0.00 |
| | ZnCl ₂ + GTP + MgCl ₂ | 3.34\pm0.00 | 0.04 \pm 0.00 | 0.14 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |

Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie und anschließender Entsalzung der durch PD10-Säulen. Um die Proteine mit Zink beladen zu können, wurde im ersten Schritt ein Apo-Protein durch Zugabe eines 10fachen Überschusses an EDTA hergestellt. Die Metallierung mit Zink erfolgte ebenfalls mit einem 10fachen Überschuss. Nach dem gleichen Prinzip erfolgte die Beladung mit Zink, GTP und Magnesium. Zur Co-Faktorbestimmung wurde die X-Serie benutzt. Die Messung von CobW₂ und CobW₃ mit GTP, Mg und Zn beruhen auf einem Einzelexperiment, alle anderen Daten sind Mittelwerte aus mindestens 3 Replikaten.

3.4.3 Beeinflusst die Apo-Proteinherstellung und die Metallierung die Sekundär- und Tertiärstruktur von CobW_{1/2/3}?

Circulardichroismus kann in 2 Wellenlängenbereichen durchgeführt werden. Zum einen zwischen 195 bis 250 nm (fern UV) für die Bestimmung der Sekundärstruktur und zum anderen zwischen 250 und 350 nm (nah UV) für die Tertiärstruktur. Dabei wird die Chiralität optisch aktiver Moleküle ausgenutzt, die polares Licht unterschiedlich stark absorbieren (Greenfield, 2006). Es kommt zur Bildung eines Spektrums, in dem positiver und negativer Circulardichroismus abgebildet ist, je nachdem ob rechts oder links zirkular polarisierte Komponenten stärkeren absorbiert werden. Daraus folgt das α -Helices 2 Minima aufweisen, bei 208 und 222 nm und ein Maximum bei 193 nm. Antiparallele β -Faltblätter haben im Vergleich dazu ein einzelnes Minima bei 218 nm und ein Maximum bei 195 nm. Eine negative Elliptizität bei 195 nm und eine leicht positive bei 210 nm weist auf eine *disorderd* Struktur hin, wobei die Berechnung auf der Differenz der Extinktionskoeffizienten multipliziert mit der Schichtdicke, der Proteinkonzentration und einem konstanten Faktor von 33 beruht. Für die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität wurde das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren des Proteins mit einbezogen. Die Ermittlung der fern UV-Spektren wurde genutzt, um eine native Faltung der Proteine zu zeigen. Bei der Messung im nah UV-Bereich wird die Absorption von Tryptophan, der spektroskopisch aktivsten aromatische Aminosäure, bei 290 nm ausgenutzt (Strickland, 1974). Tyrosin kann in den nah UV-Spektren bei ca. 266 und 299 nm gemessen werden, wohingegen Phenylalanin bei 270 nm absorbiert (Gasymov *et al.*, 2014). Die Spektren wurden in jeweils 3 Replikaten aufgenommen die die gleichen Schlussfolgerungen zuließen. Da es durch eine leichte Verschiebung der Maxima und Minima auf der x-Achse zu hohen Standardabweichungen kam sind hier Einzelspektren einer Messung gezeigt, für die parallel eine Co-Faktorbestimmung durchgeführt wurde.

Die fern UV Spektren von Apo-CobW₁, nach Zink und Zink, GTP und Magnesium Inkubation zeigten die gleiche α -helikale Struktur mit den charakteristischen Minima und dem Maximum (Abb. 27A). Die Berechnung mit dem Programm CDNN ergab für die 3 Varianten von CobW₁ ca. 15 % α -Helices, 21 % β -sheet und 48 % *random coil* (Böhm *et al.*, 1992). Mit Hilfe des Programms Phyre wurde die Tertiärstruktur vorhergesagt und bestätigte mit 30 % α -Helices und 21 % β -sheets, sowie 11 % *disorderd* Bereichen die Berechnung, was auf eine korrekte Faltung der CobW₁-Varianten schließen lässt (Kelley and Sternberg, 2009). Die Bestimmung der Tertiärstruktur ergab für alle Ansätze Maxima bei 286 nm und 292 nm, was Tryptophan und Tyrosin entspricht (Abb. 27B), darauf hatte die Bindung von ca. 1.5 mol Zn/mol Protein

einhergehend mit der Inkubation mit Zink bzw. Zink, GTP und Magnesium im Vergleich zum Apo-Protein keinen Einfluss. Somit handelt es sich bei dem gebundenen Zink vermutlich nicht um ein strukturelles Zink.

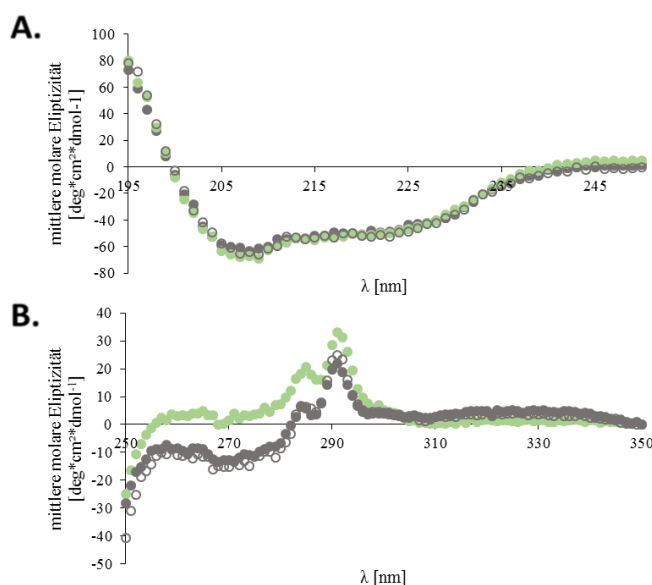


Abbildung 27: Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur von CobW₁ bei definierten Co-Faktorbindungen. Nach der Affinitätschromatographie wurde eine Apo-Form (●) von CobW₁ durch Inkubation mit EDTA hergestellt. Die Metallierung des Proteins erfolgte durch Zink (●) bzw. Zink, GTP und MgCl₂ (○) und ergab eine Bindung von ca. 1.5 mol Zn/mol CobW₁. Nach der Co-Faktorbestimmung wurde ein fern UV (Panel A) und ein nah UV-Spektrum (Panel B) mit dem CD-Spektroskop Jasco aufgenommen.

Leicht ausgeprägte Minima und ein Maximum im fern UV-Spektrum sprechen für eine α -helikale Struktur von CobW₂ (Abb. 28A). Die Berechnung mit CDNN ergab 17.5 % α -helikale und 20.5 % β -sheet Anteile, sowie 20.5 % *disorderd* Struktur, was abweichend von der Phyre Vorhersage mit 32.5 % α -Helix, 23 % β -Faltblatt und 10.2 % ungefalteten Bereichen ist (Böhm *et al.*, 1992; Kelley and Sternberg, 2009). Da die Messung und die Vorhersage auf eine helikale Struktur hinweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die CobW₂-Varianten korrekt gefaltet sind. Das nah UV-Spektrum des Apo-Proteins und des metallierten Proteins zeigen keine Unterschiede und lassen den Schluss zu, dass es sich bei den 3 mol Zn/mol CobW₂ nicht um strukturelles Zink handelt (Abb. 28B). Im Vergleich dazu zeigt sich nach der Inkubation mit Zink, GTP und Magnesium ein verändertes Spektrum was für eine Fehlfaltung spricht, die in der Bestimmung der Sekundärstruktur nicht sichtbar war.

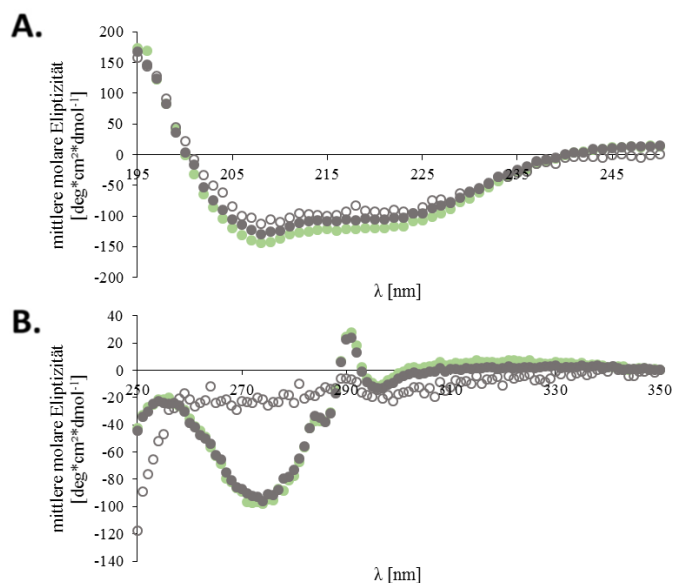


Abbildung 28: Analyse der Nah- und Fern-UV Spektren von CobW₂ bei definierter Co-Faktorbindung. Das rekombinante Protein wurde mit EDTA behandelt und somit ein Apo-CobW₂ (●) hergestellt. Die Metallierung des Proteins erfolgte durch ZnCl₂ (●) bzw. ZnCl₂, GTP und MgCl₂ (○) und führte zur Bindung von ca. 3 mol Zn/mol Protein. Nach der Co-Faktormessung wurde ein Spektrum der Sekundär- (Panel A) und der Tertiärstruktur (Panel B) mit dem CD-Spektroskop Jasco aufgenommen.

Die fern UV-Spektren der CobW₃-Derivate deuten auf eine α -helikale Struktur hin, die durch das Programm CDNN mit 15.2 % α -Helices und 21.2 % β -Faltblätter nicht eindeutig bestätigt werden konnte (Böhm *et al.*, 1992; Abb. 29A). Die Vorhersage mit Hilfe des Programms Phyre ergab einen abweichenden Anteil, mit 30.7 % α -Helices und 18.7 % β -Faltblätter, sowie 16.6 % *disorderd* (Kelley and Sternberg, 2009). 47.8 % *random coil* Struktur konnten anhand des Spektrums berechnet werden, was auf den Histidin-reichen C-Terminus zurück zu führen ist. Die Inkubationen mit Zink und Zink, GTP, Magnesium führte zu einer Verschiebung des Minimums auf der x-Achse um 2 nm, was auf eine Veränderung der Tertiärstruktur durch die Bindung von 1.4 mol Zn/ mol CobW₃ hin deuten könnte. Dies kann jedoch durch das nah UV-Spektrum nicht bestätigt werden, was wiederum darauf hin deutet, dass es sich bei dem gebundenen Zink nicht um strukturelles Zink handelt (Abb. 29B).

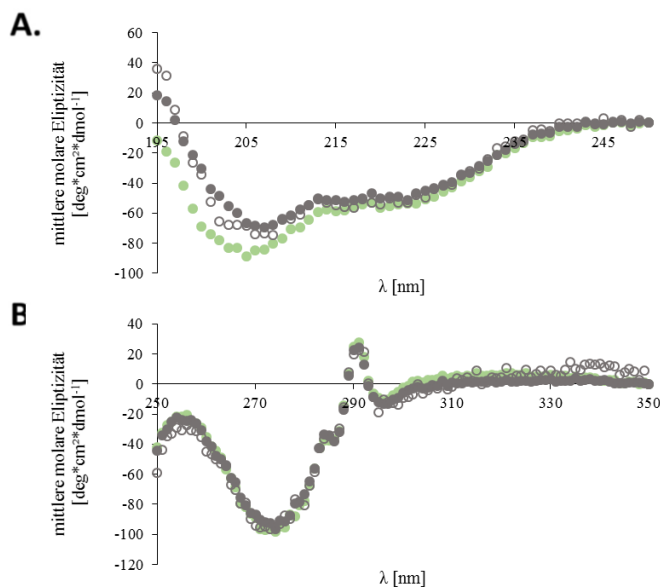


Abbildung 29: Sekundär- und Tertiärstruktur von CobW₃ bei definierter Zinkbindung. Nach der Affinitätschromatographie wurde CobW₃ also Apo-Protein (●) durch Inkubation mit EDTA hergestellt. Die Metallierung des Proteins erfolgte durch Zink (●) bzw. Zink, GTP und MgCl₂ (○), was zur Bindung von ca. 1.5 mol Zn/mol Protein führte. Nach der Co-Faktorbestimmung wurde ein fern UV (Panel A) und ein nah UV-Spektrum (Panel B) mit dem CD-Spektroskop Jasco aufgenommen.

3.4.4 CobW₁ liegt nach der Reinigung als Mono- und Dimer vor

Die Größenausschlusschromatographie von CobW₁ ergab 2 Peaks, die mit Hilfe einer Kalibriergeraden 73.8 kDa und 54.8 kDa zugeordnet werden konnten (Abb. 30A; Anhang 11.8). Da CobW₁ eine vorhergesagte Größe von 44.4 kDa besitzt spricht dies für eine Reinigung von Mono- und Dimeren oder für Verunreinigungen (Pace *et al.*, 1995). Um diese Thesen zu prüfen wurden die Peaks in 5 Fraktionen eluiert und auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Panel C), die in Spur 3 eine Verunreinigung durch ein Protein mit einer Größe von 120 kDa zeigt. Die anderen Proben führten zu einer Bande bei ca. 50 kDa und entsprechen CobW₁, was eine Mono- und Dimerisierung bestätigt, die auch an dem Bandenmuster in der Native-PAGE erkennbar ist (Panel B). Für eine weitere Bestätigung wurden Banden aus dem nativen Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in Kooperation mit Frau Dr. Schierhorn und Dr. Dirk Dobritzsch die Peptide mittels MALDI-TOF-MS bestimmt (Anhang 11.9). In allen Gelausschnitten wurde CobW₁ identifiziert und in Elutionsfraktion 3 zusätzlich eine Pyruvatkinase Typ II aus *E. coli*, welche allerdings nicht Zink als Co-Faktor besitzt. Die massenspektrometrischen Daten bestätigen die Hypothese, dass CobW₁ als Mono- und Dimer vorliegt.

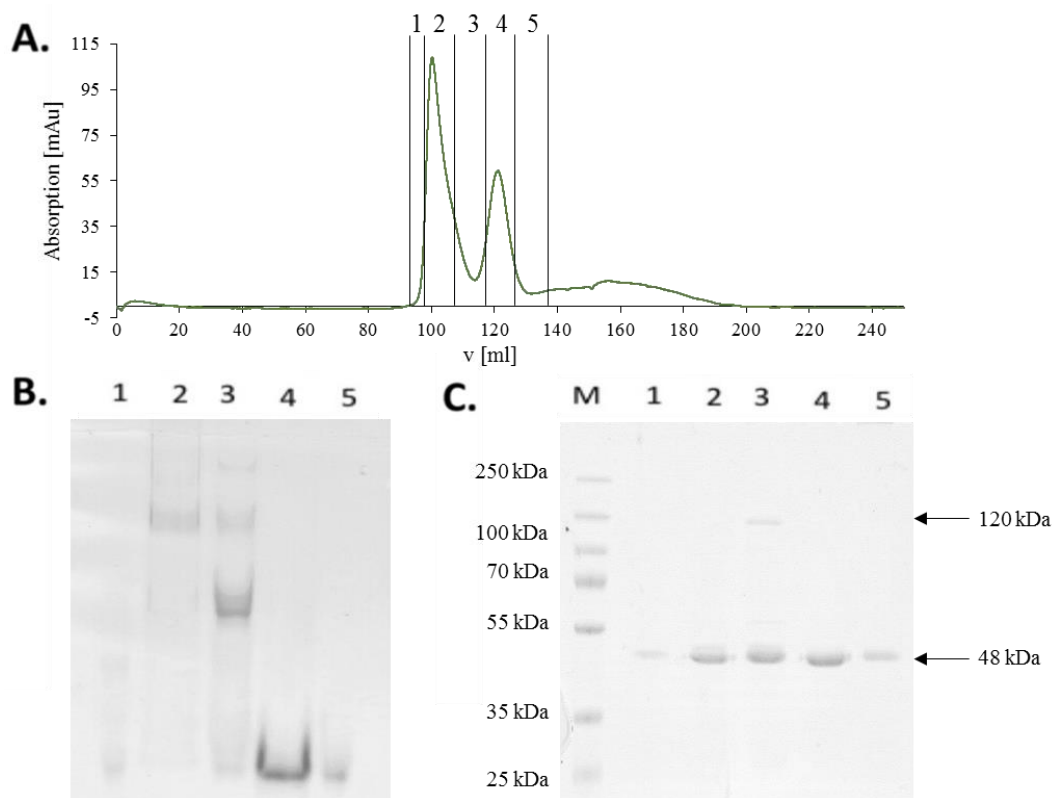


Abbildung 30: Nachweis von CobW₁-Multimeren mit Größenausschlusschromatographie und Native-PAGE. 5 mg des gereinigten Proteins wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 g/ml auf eine HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 High Resolution Säule aufgetragen und mit Puffer A eluiert. Im Chromatogramm (A) sind die 5 Elutionsfraktionen eingezeichnet, von denen 5 µg in B auf eine 10 %ige Native-PAGE und in C auf eine 12.5 %ige SDS-PAGE aufgetragen wurden. Die Polyacrylamidgelen wurden zur Visualisierung mit Coomassie-Blau gefärbt. Als Größenstandard in Panel C diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus*.

3.4.5 CobW₁-Monomere dimerisieren nicht durch Zugabe von Zink

Nachdem gezeigt wurde, dass CobW₁ nach der Reinigung als Monomer und Dimer auftreten kann, sollte die Dimerisierung der Monomere durch Zugabe von Zink, GTP und/oder Magnesium gezeigt werden. Bei diesem Inkubationsexperiment wurde CobW₁ in 4 verschiedenen Ansätzen 2 h inkubiert und das native Laufverhalten, sowie das des denaturierten Proteins in Polyacrylamidgelen untersucht. In der Coomassie-Blau gefärbten Native-PAGE ist zu erkennen, dass sich durch Zugabe von Zink, Magnesiumchlorid und GTP oder Zink, Magnesium und GTP im Vergleich zum Apo-Protein kein verändertes Laufverhalten zeigt und somit keine Dimerisierung vorliegt (Abb. 31A). Als Kontrolle wurden die Ansätze auf eine SDS-PAGE aufgetragen, was in allen Ansätzen zu einer ca. 50 kDa Bande führte (Panel B). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass CobW₁ ein Monomer ist und die Dimere Artefakte waren oder der Trigger für die Dimerisierung nicht Zink und GTP sind.

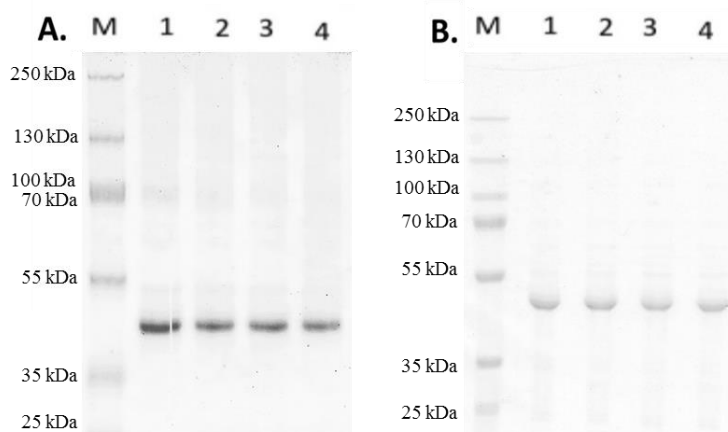


Abbildung 31: Coomassie-Blau-Färbung zum Nachweis von CobW₁-Monomeren nach Inkubation mit Zink und GTP. 100 µM der nach Größenausschlusschromatographie eluierten CobW₁-Monomere wurden für 2 h bei 4 °C inkubiert. 5 µg der Ansätze (1) Kontrolle ohne Zusatz, (2) 1 mM ZnCl₂, (3) 1 mM GTP und 1 mM MgCl₂, (4) 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂ und 1 mM GTP wurden auf ein nicht denaturierendes (A) und eine denaturierendes (B) Polyacrylamidgel aufgetragen. Der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* diente als Größenstandard.

3.4.6 Identifizierung von Interaktionspartnern

CobW_{1/2/3} können als Chaperone für die Speicherung und Übergabe von Zink zuständig sein. Die Übergabe von Zink an Targetproteine oder aber die Übernahme des aufgenommenen Zinks von Zinkaufnahmesystemen würde eine Interaktion voraussetzen. Da über die möglichen Interaktionspartner von CobW_{1/2/3} nichts bekannt ist, wurden unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen sollten über *Pulldown fishing* Experimente mit den *getagten* Proteinen und dem Rohextrakt vom Δ zur, mit anschließender Identifizierung per Massenspektrometrie, mögliche Bindepartner gefunden werden. Zum anderen wurde in spezifischen *Pulldown*-Experimenten die Interaktion mit *Strep*-Zur (Rmet_0128) und FolE_{IB2}-*Strep* (Rmet_1099) untersucht.

3.4.6.1 Protein-Fishing mit dem Rohextrakt von Δ zur

Target-Proteine von CobW_{1/2/3} sollten identifiziert werden, indem 10 µg als *bait* (Fängerprotein) an Ni-NTA *magnetic Beads* gebunden wurden und mit 1 mg des Rohextraktes vom Stamm Δ zur inkubiert (*prey*) (siehe 2.3.12.1). Für die Auswertung wurde der Überstand nach der *bait*- und *prey*-Inkubation, sowie die Waschfraktionen und die Elutionsfraktion auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 32), wobei darauf geachtet wurde, dass es keine Verunreinigungen in der letzten Waschfraktion gibt. In den Elutionsfraktionen konnten zusätzlich zu CobW_{1/2/3} weitere Proteine nach der Färbung mit Coomassie-Blau detektiert werden.

Zunächst wurden die abundanten Banden der Elutionsfraktion des CobW₁-Ansatzes ausgeschnitten, um in Kooperation mit Fr. Dr. Schierhorn putative Interaktionspartner von

CobW₁ zu identifiziert (Panel A). Dies führte zur Identifikation von RpoC, GroEL, CobW₂, LysA und SbnB, wobei es sich bei RpoC und CobW₂ um Zink-abhängige Proteine handelt. SbnB ist an der Synthese des Siderophores Staphloferrin B beteiligt (Beasley *et al.*, 2011). Möglicherweise gibt dieses Metalle an CobW₁ weiter. Zur Bestätigung der Daten und Identifizierung weiterer Proteine wurden die Elutionsfraktionen in einem In-Lösungsverdau mit Trypsin behandelt. In Kooperation mit Stefan Helm und Dr. Dirk Dobritzsch wurden die Peptide mittels Synapt G2-S identifiziert und dem Proteom von *C. metallidurans* zugeordnet. Dem *Pulldown* von CobW₁ konnten Peptide von 1170 Proteinen zugeordnet werden, wobei Proteine mit 5-fach höherer Abundanz als das Kontrollprotein Glykogenphosphorylase weiter betrachtet wurden (Tabelle 18/ Tabelle 23). Das abundanteste Protein war in diesem Fall CobW₂ und bestätigt damit die Hypothese einer Interaktion der beiden CobW's. RpoC und weitere Untereinheiten der RNA-Polymerase konnten ebenfalls identifiziert werden und deuten darauf hin, dass die Zink-abhängige RNA-Polymerase, im speziellen RpoB/C ($\beta\beta'$ -Untereinheiten) ein Targetprotein von CobW₁ ist.

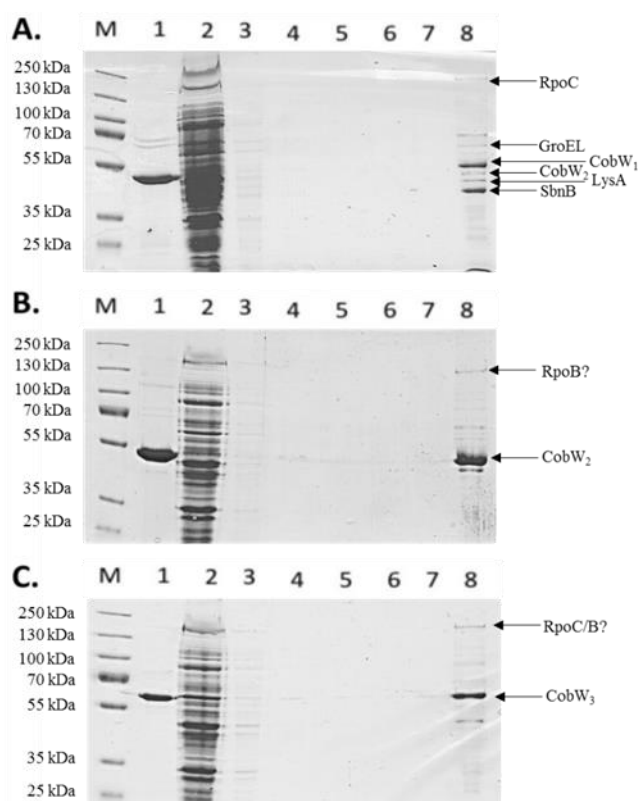


Abbildung 32: SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blau gefärbt nach dem *Pulldown* von *His-CobW*_{1/2/3} mit der löslichen Fraktion des Δ *zur*. 10 μ g der rekombinanten Proteine wurden als *bait* an HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads gebunden durch 30 min Inkubation. Der Überstand wurde abgenommen (1). Als *prey* wurde 1 mg der löslichen Fraktion des Stammes Δ *zur* genutzt, welcher 3 h inkubierte (2). Durch 5 Waschschritte (3-7) wurden nicht ans *bait* gebundene Proteine entfernt. Die Elution (8) der Proteine erfolgte mit 2 x SDS-Probenpuffer. Panel A zeigt den Pulldown von *His-CobW*₁, Panel B von *His-CobW*₂ und Panel C von *His-CobW*₃. Als Größenstandard fungierte *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus*.

Ergebnisse

Nach dem *Pulldown* von CobW₂ konnten 934 Polypeptide identifiziert werden, wobei ein Porin (Rmet_3234) sowie RpoB (β -Untereinheit) als Untereinheit der RNA-Polymerasen mit der höchsten Konzentrationen gefunden wurden (Panel B). RpoB könnte demzufolge ein Targetprotein von CobW₂ sein.

Tabelle 18: Abundante Proteine des *Fishing*-Experiments mit *His*-CobW_{1/2/3}.

| Rmet-Nummer | Annotation | Abundanz | Funktion | Co-Faktor |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------|--|-------------------------------------|
| <i>His</i> -CobW ₁ | | | | |
| Rmet_0127 | CobW ₂ | 6.5 | Chaperon | Zn ²⁺ , Mg ²⁺ |
| Rmet_3234 | putatives Porin | 6.4 | | |
| Rmet_0965 | putativer Transkriptionsregulator | 6.0 | | |
| Rmet_3334 | RpoB | 5.9 | β -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_3324 | Tuf ₁ | 4.8 | Elongationsfaktor | GTP |
| <i>His</i> -CobW ₂ | | | | |
| Rmet_3234 | putatives Porin | 3.3 | | |
| Rmet_3334 | RpoB | 3.2 | β -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_0965 | putativer Transkriptionsregulator | 3.1 | | |
| Rmet_3291 | RpoA | 2.9 | α -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_3497 | AtpH | 2.8 | δ -Untereinheit F ₁ F ₀ -ATPase | Mg ²⁺ |
| <i>His</i> -CobW ₃ | | | | |
| Rmet_1282 | HypD | 34.2 | Hydrogenasenreifungsprotein | Mg ²⁺ |
| Rmet_5065 | putativer ATPase-Aktivator | 30.8 | | Mg ²⁺ |
| Rmet_0875 | CbbF ₃ | 11.1 | Fructose 1,6-bisphosphatase | Zn ²⁺ |
| Rmet_4954 | Transkriptionsregulator | 10.3 | Aminotransferase; GntR family | |
| Rmet_4603 | Transkriptionsregulator | 5.9 | Aminotransferase; GntR family | |

Es wurde ein *Pulldown* mit *His*-CobW_{1/2/3} und dem Rohextrakt des Δ_{zur} durchgeführt, indem das rekombinante Protein an Ni-NTA *magnetic* Beads gebunden wurden. Die nicht gebundenen Proteine wurden in mehreren Waschschrinen entfernt und anschließend die Proteine mit Puffer A + 500 mM Imidazol eluiert. Für die Massenspektrometrie wurden die Proteine der Elutionsfraktion mit Aceton gefällt und ein tryptischer In-Lösungsverdau durchgeführt. Die Bestimmung der Peptide erfolgte in Kooperation mit Stefan Helm und Dr. Dobritzsch (AG Prof. Baginsky) mit anschließendem Abgleich gegen das Proteom von *C. metallidurans*. Als Kontrolle wurden 10 fmol einer humanen Glykogenphosphorylase hinzu gegeben. Die Abundanz gibt an um welchen Faktor das Protein häufiger gefunden wurde als das Kontrollprotein.

Der CobW₃-*Pulldown* führte zu 1133 Proteinen, wobei es sich bei den am meisten abundanten Proteinen ausschließlich bei CbbF₃ um ein Zink-abhängiges Protein handelt (Panel C). Das abundanteste Protein HypD ist an der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen beteiligt und könnte ein Indiz sein, dass CobW₃ auch bei der Aufrechterhaltung der Nickelhomöostase eine Rolle spielt (Forzi and Sawers, 2007). Mit geringeren Konzentrationen wurden CobW₂ und RpoB als

mögliche Interaktionspartner gefunden und zeigt wiederum eine Verknüpfung der Chaperone untereinander und auch zur RNA-Polymerase.

In allen 3 *Pulldown*-Experimenten konnten Proteine gefunden werden, welche im *cobW₁*-Cluster kodiert sind. Die Konzentration von FolE_{IB2} liegt bei 12 fmol (*CobW₃ Pulldown*) bis 24 fmol (*CobW₁ Pulldown*), was um Faktor 1.2 bzw. 2.4 höher ist als die des Kontrollproteins und somit auf eine Interaktion schließen lässt.

Zusammenfassend wird vermutet, dass CobW_{1/2/3} mit den Zink-abhängigen Untereinheiten der RNA-Polymerase, sowie den Proteinen die durch das *cobW₁*-Cluster kodiert sind, interagieren. Außerdem scheinen die Chaperone Bindungen untereinander einzugehen.

3.4.6.2 Interagiert CobW₁ mit dem Protein FolE_{IB2} aus der Folatbiosynthese?

FolE_{IB2} wird durch das Gen *Rmet_1099* kodiert, welches in einem Cluster mit *cobW₁* liegt. Da die Induktion beider Gene im Microarray bei Metallmangel und in der Deletionsmutante von *zur* sichtbar war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass unter Metallmangel CobW₁ FolE_{IB2} als Paralog eines essentiellen Proteins mit Zink beliefert (Herzberg *et al.*, 2014b; Herzberg *et al.*, 2015; Bütöf *et al.*, 2017). Bei FolE_{IB2} handelt es sich um eine GTP Cyclohydrolase IB, die die Reaktion von GTP in Anwesenheit von Wasser zu Formiat und 7,8-Dihydroneopterin-3'-triphosphat katalysiert (Nichol *et al.*, 1985). Auf Grundlage der *Fishing*-Experimente wurden spezifische Interaktionsstudien mit FolE_{IB2} (*bait*) und CobW_{1/2/3} (*prey*) durchgeführt (siehe 2.3.12.2). Zu diesem Zweck wurde FolE_{IB2}-*Strep* als rekombinantes Protein gereinigt (Abb.48) und anschließend eine Co-Faktorbestimmung durchgeführt (Apo- FolE_{IB2}-*Strep* 0.3 mol Zn/mol Protein).

3.4.6.2.1 Die Interaktion der Chaperone mit FolE_{IB2} ist Zink-abhängig

Im ersten Ansatz unter Zugabe von Zink, GTP und Magnesium konnten FolE_{IB2}-*Strep* und CobW_{1His} nach den jeweiligen Inkubationen im Überstand detektiert werden, jedoch nicht in den letzten Waschfraktionen (Abb. 33). In der Elutionsfraktion nach der Coomassie-Blaufärbung sind zwei Banden mit gleicher Intensität zu sehen, welche durch den Multiplex-Fluoreszenz-Western-Blot *His-CobW₁* und FolE_{IB2}-*Strep* zugewiesen werden konnten. Eine Interaktion der beiden Proteine mit gleichem stöchiometrischem Verhältnis ist daher anzunehmen.

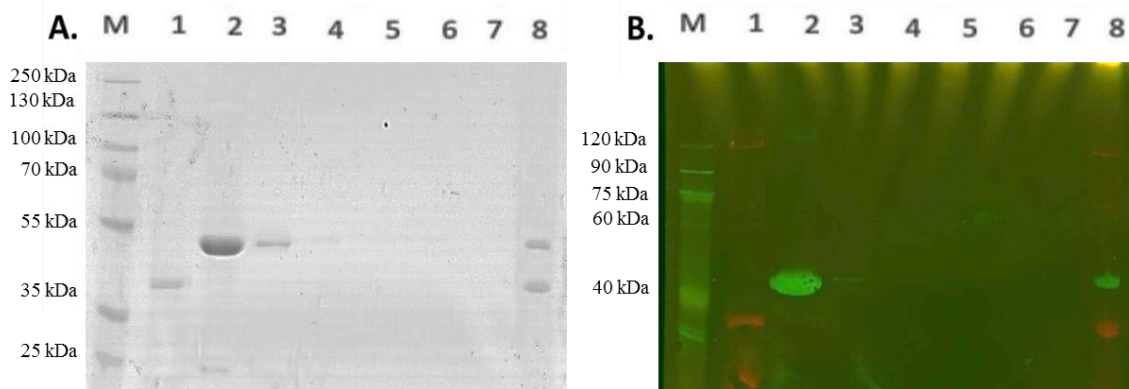


Abbildung 33: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE (A) und Multiplex-Western-Blots (B) zum Nachweis der Interaktion zwischen FolE_{IB2}-Strep und His-CobW₁ bei Zugabe von Zink, Magnesium und GTP. 10 µg FolE₂-Strep (*bait*) wurden 30 min an MagStrep “type3” XT Beads gebunden. Der Überstand wurde abgenommen (1). Als *prey* wurden 100 µg His-CobW₁ genutzt und 3 h inkubiert (2). Durch 5 Waschschrte (3-7) wurden nicht gebundene Proteine entfernt. Die Elution (8) der Proteine erfolgte mit 2 x SDS-Probenpuffer. Panel Für den Multiplex-Fluoreszenz-Western-Blot wurden Streptavidin Alexa Fluor 647 Konjugat (rot) und Cy3 *goat anti-mouse* (H+L) (grün) genutzt, welches an den primären Antikörper Anti His gebunden hat. Als Größenstandard fungierten A: PageRuler™Prestained Protein Ladder Plus und B: VisiBlot.

Die Validierung der Interaktion erfolgte mit *ungetaggetem* Apo-CobW₁ als Ligand und es zeigte sich nach kolloidaler Färbung, dass Apo-CobW₁ nach der Inkubation und in der ersten Waschfraktion sichtbar war, jedoch im Gegensatz zu FolE_{IB2}-Strep nicht in der Elutionsfraktion (Abb. 34A). Wird parallel zur Inkubation mit Apo-CobW₁ Zink zum Ansatz gegeben, dann erscheint eine zusätzliche Bande der Größe von CobW₁ in der Elutionsfraktion (Panel B). Diese Ergebnisse sprechen für eine Zink-abhängige Interaktion der beiden Proteine, unabhängig von GTP und Magnesium.

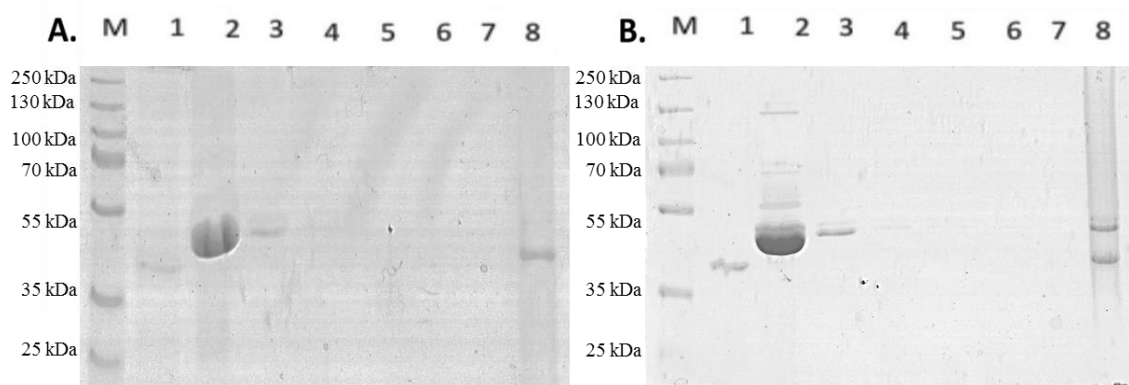


Abbildung 34: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE zum Nachweis der Interaktion von FolE_{IB2}-Strep und CobW₁ ohne (A) und mit (B) Zink. 10 µg des *bait* FolE_{IB2}-Strep wurden 30 min an MagStrep “type3” XT Beads gebunden. Der Überstand wurde abgenommen (1). Als *prey* wurden 100 µg Apo-CobW₁ 3 h inkubiert, der Überstand abgenommen (2) und 5-mal gewaschen (3-7). Die Elution (8) der Proteine erfolgte mit 2 x SDS-Probenpuffer. Als Größenstandard fungierte der PageRuler™Prestained Protein Ladder Plus.

Apo-CobW₃ interagiert nicht mit FolE_{IB2}-Strep in Abwesenheit von Zink, weil es unter dieser Bedingung nicht in der Elutionsfraktion detektiert werden konnte (Abb. 35A). Die Zugabe von Zink führt zu einer Bindung der Proteine im gleich stöchiometrischen Verhältnis (Panel B).

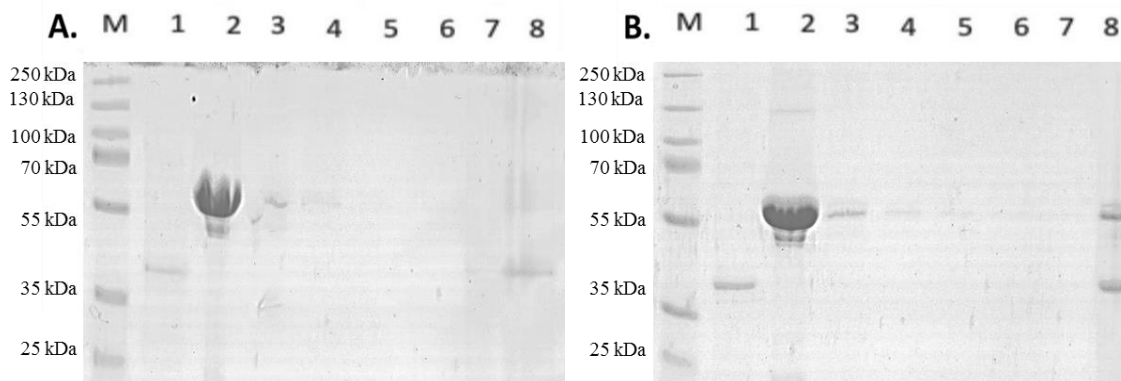


Abbildung 35: Nachweis der Interaktion von FolE_{IB2}-Strep und CobW₃ ohne (A) und mit Zink (B) durch Coomassie-Blau-Färbung. 10 µg FolE_{IB2}-Strep wurden 30 min an MagStrep “type3” XT Beads gebunden. Der Überstand wurde abgenommen (1). Als prey dienten 100 µg Apo-CobW₃, welches 3 h inkubierte. Anschließend wurde der Überstand abgenommen (2) und die Beads 5-mal gewaschen (3-7). Die Elution (8) der Proteine erfolgte mit SDS-Probenpuffer. Als Größenstandard fungierte der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus.

Um eine Zink-abhängige Interaktion von CobW₂ und FolE₂ zu testen wurde dem Ansatz während der Ligandenbindung Zink zugefügt, was dazu führte, dass CobW₂ in der Elutionsfraktion in einem ähnlichen stöchiometrischen Verhältnis wie FolE₂-Strep detektiert werden konnte (Abb. 36).

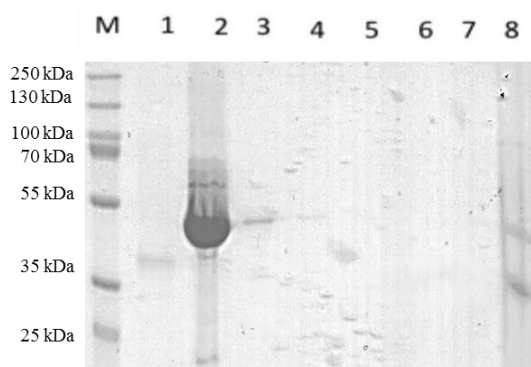


Abbildung 36: Überprüfung der Interaktion von CobW₂ mit FolE_{IB2}-Strep bei Zinkzugabe durch Coomassie-Blau-Färbung einer SDS-PAGE. 10 µg FolE_{IB2}-Strep 30 min an MagStrep “type3” XT Beads gebunden. Der Überstand wurde abgenommen (1). Als prey dienten 100 µg Apo-CobW₂ welches 3 h inkubierte. Anschließend wurde der Überstand abgenommen (2) und die Beads 5-mal gewaschen (3-7). Die Elution (8) erfolgte mit SDS-Probenpuffer. Als Größenstandard diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus.

Die spezifischen Interaktionsstudien von FolE_{IB2}-Strep und CobW_{1/2/3} ergab eine Zink-abhängige Interaktion der Proteine, was den Schluss zulässt, dass es sich bei FolE_{IB2} um ein Targetprotein der Chaperone handelt.

3.4.6.3 CobW_{1/2} interagieren minimal mit Zur

Da *cobW_{2/3}* in einem Cluster mit *zur* kodiert sind, stellte sich die Frage, ob die Chaperone an der Übergabe des funktionellen Zink beteiligt sind. Die Interaktionsstudien von CobW₁ und CobW₂ mit Apo-*Strep*-Zur bei Zinkzugabe führte zur Visualisierung der Chaperone in den entsprechenden Elutionsfraktionen, jedoch nicht in der letzten Waschfraktion (Abb. 37A/B) (siehe 2.3.12.2). Da das stöchiometrische Verhältnis nicht 1:1 beträgt lassen sich 3 Hypothesen aufstellen: 1. Die Banden von CobW_{1/2} sind Verunreinigungen, daraus resultiert 2., dass Zur kein Target der Chaperone ist; 3. CobW_{1/2} sind für die Übergabe des strukturellen Zinks verantwortlich.

CobW₃ konnte im Überstand nach der Inkubation und in der ersten Waschfraktion detektiert werden, jedoch nicht in der Elutionsfraktion (Panel C). Zur ist demnach kein Targetprotein von CobW₃.

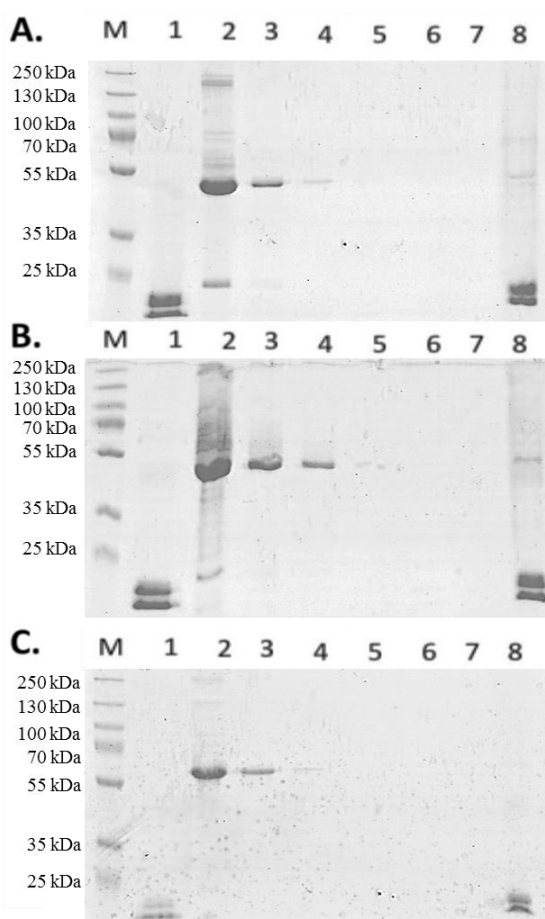


Abbildung 37: SDS-PAGE nach Färbung mit Quick Coomassie Stain zur Interaktionsstudie von *Strep*-Zur mit CobW_{1/2/3} bei Zinkzugabe. 10 µg *Strep*-Zur wurden 30 min an MagStrep “type3” XT Beads gebunden und der Überstand abgenommen (1). 100 µg Apo-CobW_{1/2/3} inkubierten 3 h, der Überstand wurde abgenommen (2) und die Beads 5-mal gewaschen (3-7). Die Elution (8) der Proteine erfolgte mit 2 x SDS-Probenpuffer. A :CobW₁, B CobW₂ und C CobW₃. Der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* wurde als Größenstandard genutzt.

4 Diskussion

4.1 Das Zur-Regulon umfasst in *C. metallidurans* Gene der Zink-Aufnahme, der Regulation und Chaperone

Die Konzentration an frei verfügbarem Zink im Zytoplasma der Zellen fluktuiert, so konnte für ruhende eukaryotische Zellen eine pikomolare Konzentration bestimmt werden und in Phasen des *signallings* nanomolare Konzentrationen (Li and Maret, 2009, Colvin *et al.*, 2010). Für prokaryotische Organismen konnte am Beispiel von *E. coli* eine freie Zytoplasmatische Zinkkonzentration im mikro- bis pikomolaren Bereich bestimmt werden (Outten and O'Halloran, 2001). Im Gegensatz dazu liegt die Gesamtzinkkonzentration in der Zelle im millimolaren Bereich, was auf eine hohe intrazelluläre Bindekapazität für Zink schließen lässt.

Frei verfügbares Zink im Zytoplasma ist der Trigger für die Regulation der Gene, kodierend für Aufnahme- und Effluxsysteme (Outten and O'Halloran, 2001). Diese Aufgabe übernehmen die hoch affinen Proteine der Zur-Familie, von den derzeit 18 Orthologe in verschiedenen Organismen identifiziert und charakterisiert sind (Choi and Bird, 2014). In den Organismen *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Streptomyces coelicolor* und *Agrobacterium tumefaciens* gehören die Gene der ATPase ZnuABC zum Zur-Regulon, wobei eine erhöhte zytoplasmatische Zinkkonzentration eine Repression der Gene des Aufnahmesystems zur Folge hat (Patzner and Hantke, 1998, Patzner and Hantke, 2000, Lindsay and Foster, 2001, Shin *et al.*, 2007, Ellison *et al.*, 2013, Bhubhanil *et al.*, 2014). Auch in *Xantomonas campestris* und *Corynebacterium glutamicum* reprimiert Zur die Expression des Gens für die ATPase, allerdings besitzt Zur in diesen Organismen auch eine Aktivatorfunktion für Effluxsysteme der CDF-Familie und der P_{1B2}-ATPasen (Tang *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008; Teramoto *et al.*, 2012).

C. metallidurans kodiert im Gegensatz zu den genannten Organismen nicht für ein orthologes Gen des *high affinity* ZnuABC-Transporters sondern für einen ZIP-Transporter ZupT (Rmet_2621), welcher ebenfalls unter der Kontrolle von Zur steht (Schmidt *et al.*, 2014). Dies äußerte sich in Reportergernefusionen durch die Hochregulation des Gens in einer Zur-Deletionsmutante und konnte auch durch Microarray-Daten verifiziert werden (Bütöf *et al.*, 2017). Basierend auf diesen Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass im Stamm Δ_{zur} der Gesamtzinkgehalt in der Zelle steigt, da die Expression des Importers nicht reprimiert wird. Die Messung des zellulären Gesamtzinkgehalts im Parentalstamm AE104 lag nach Wachstum in Minimalmedium bei ca. 76 000 Atomen/Zelle und stieg in der Mutante auf ca. 97 000

Atome/Zelle (Tabelle 8). Dieser Effekt konnte auch bei Inkubation der Stämme mit 100 μ M EDTA als Chelator beobachtet werden. In diesem Fall akkumulierte die Mutante ca. 78 000 Zinkatome/Zelle im Vergleich zum AE104 mit ca. 51 000 Zinkatome/Zelle. Lediglich die Inkubation mit 100 μ M Zinkchlorid führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen Wildtyp und Mutante.

Diese Ergebnisse weisen auf eine gestörte Zink-Homöostase durch einen erhöhten Zinkeinstrom in die Zelle der Deletionsmutante hin. Es lässt sich allerdings nicht aus den Daten schließen, ob *C. metallidurans* für ein Zur-kontrolliertes Effluxsystem wie *X. campestris* und *C. glutamicum* kodiert, da dieses in der Deletionsmutante reprimiert wäre (Huang *et al.*, 2008; Schröder *et al.*, 2010; Teramoto *et al.*, 2012). Bioinformatische Analysen zu potentiellen Mitgliedern des Zur-Regulons von Schmidt, 2016 gaben keine Indizien für ein Effluxsystem unter der globalen Kontrolle von Zur. Die Erhöhung des internen Zinkgehalts durch die gestörte Regulation könnte sich in der Resistenz des Stammes auswirken, denn frei im Zytoplasma verfügbares Zink kann zur Verdrängung von Co-Faktoren nach der Irving-Williams-Serie führen, wie es für die β -Galaktosidase und die Tryosinkinase bekannt ist, wo das Magnesiumion durch ein Zink ersetzt wird, was eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat (Sun and Budde, 1999; Fernandes *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2014).

Entgegen der Vermutungen zeigte sich für den Stamm Δ zur im Vergleich zum Parentalstamm AE104 kein Zink-sensitiver Phänotyp, was bedeuten könnte, dass es Pufferkapazitäten für Zink in der Zelle gibt (Tabelle 7). Erstaunlicherweise ist der Stamm sensitiv gegen Metallmangel erzeugt durch den Chelator EDTA. Metallmangel führt im AE104 zur Expressionssteigerung von Genen des Zur-Regulons wie *zupT*, da essentielle Konzentrationen an Zink in der Zelle benötigt werden (Kirsten *et al.*, 2011; Bütof *et al.*, 2017). EDTA und die Deletion von *zur* sollten in der Zelle zu ähnlichen Effekten führen. Der Vergleich der Zinkgehalte in der Zelle zeigt allerdings, dass selbst bei erzeugtem Mangel der interne Zinklevel höher ist als im Elternstamm beim Wachstum in Minimalmedium (Tabelle 12). Außerdem zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Stamm AE104 Δ zur zwischen Normalbedingungen und Metallmangel. Diese Ergebnisse weisen auf ein gestörtes Zinkgleichgewicht hin, wobei eine EDTA-Sensitivität bei nicht vermindertem Zinkgehalt in der Zelle ein mögliches Abfangen des Zinks in der Zelle zur Folge hat und dieses nicht an die Targetproteine weiter geleitet wird. Dieses Protein müsste eine höhere Zinkaffinität haben als die Targetproteine. Eine zweite Möglichkeit wäre eine Falschmetallierung, indem das Zink durch Chaperone fehlerhaft weiter

gegeben wurde oder Chaperon unabhängig gebunden wurde. In jedem Fall müssten Proteine die diese Funktionen übernehmen unter Metallmangel hoch reguliert werden.

In Microarray-Analysen konnte ein möglicher Kandidat identifiziert werden, bei dem es sich um *cobW₁* (*rmet_1098*) handelt (Herzberg *et al.*, 2015). CobW₁ ist eine P-loop GTPase der G3E-Familie und zugehörig zur Unterfamilie COG0523. Diese Unterfamilie besitzt strukturell alle Eigenschaften einer GTPase mit einer *metal binding site* (Leipe *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2009). Des Weiteren zeichnen sich die Vertreter dieser Unterfamilie durch eine putative Zur-Bindestelle in der Promotorregion des Gens aus oder einer Co-Transkription mit *zur*, was eine Verknüpfung zur Zink-Homöostase herstellt (Haas *et al.*, 2009). Die Zugehörigkeit von *cobW₁* zum Zur-Regulon wurde nach dem von Schmidt *et al.*, 2014 publizierten Protokoll in abgewandelter Form untersucht, indem das rekombinante *Strep-Zur* ohne EDTA im Waschpuffer per Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Nach der Chromatographie lag das Protein als Holo-Protein vor (siehe Anhang 11.3). Eine nachträgliche Herstellung eines Apo-Proteins durch Behandlung mit einem 10fachen Überschuss an EDTA führte zur Bindung von 1 mol Zn/mol Protein, was eine Reproduktion des Zinkgehalts der Daten publiziert durch Schmidt *et al.*, 2014 bedeutet. In dieser Publikation wurden EMSAs durchgeführt mit der Promotorregion des Gens *zupT*, dem gereinigten rekombinanten *Strep-Zur*, mit oder ohne Zinkzugabe. Schmidt *et al.*, 2014 konnten eine Bindung des Proteins an die Promotorbox durch einen Shift der DNA-Bande zeigen, allerdings nur unter Zugabe von Zink. Die Validierung der Methode unter zu Hilfenahme des Holo-*Strep-Zur* führte auch ohne Zugabe von Zink zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei die gesamte DNA von *zupTp* mit einem 59fachen Überschuss an Holo-*Strep-Zur* geshiftet wurde (siehe 3.1). Zum Vergleich wurde die Promotorregion von *cobW₁* in das Experiment eingesetzt, mit dem Ergebnis, dass eine höhere Affinität von Zur zu dieser DNA-Sequenz vorliegt: *CobW_{1p}* wurde bereits bei einer Holo-*Strep-Zur*-Konzentration von 10.7 pmol, was einem Verhältnis von 1:15 entspricht, vollständig gebunden. Dieses Ergebnis konnte mit der Apo-Form des rekombinant gereinigten Regulators nicht beobachtet werden, lediglich eine Inkubation in Anwesenheit von Zink führte zu einer Bindung und bestätigt eine Zinkabhängigkeit der Interaktion (Schmidt *et al.*, 2014; Schmidt, 2016; Bütöf *et al.*, 2017).

Nachdem geklärt wurde, dass es sich bei *cobW₁* um ein Mitglied des Zur-Regulons handelt, wurden Sequenzuntersuchungen angestellt, in denen die Promotorregionen möglicher anderer Vertreter untersucht wurden. Als Kandidaten kamen die von Haas *et al.*, 2009 publizierten putativen Chaperone *cobW₂* (*rmet_0127*), *cobW₃* (*rmet_0125*), sowie *zur* in Frage, wobei *cobW₂*

keine postulierte Zur-Bindebox besitzt sich aber vermutlich in einem Operon mit *zur* befindet, da der Leserahmen von *cobW₂* direkt stromaufwärts und in gleicher Orientierung mit einem aus nur 50 Basen bestehenden intergenischen Raum zu *zur* kodiert ist. Dies muss jedoch in Operonstrukturanalysen durch quantitative Real Time-PCR bestätigt werden. Erstellte Alignments der putativen Zur-Bindeboxen mit Hilfe der Software Mega7 zeigen palindromische Sequenzen: GCAACxxxA/GTTGC (Abb. 38A) (Kumar *et al.*, 2016). Die Promotorregion von *cobW₁* weist zwei aufeinander folgende palindromische Sequenzen, mit einem GCAACxxxGTTGC-Motiv auf, was auf eine strikte Regulation des Gens hindeuten könnte und somit die höhere Affinität von Zur im EMSA erklären kann. Das zwei Zur-Bindeboxen im Promotorbereich zu einer strikten Regulation von Genen führt, wurde von Gabriel *et al.*, 2008 für *yciC* aus *B. subtilis* ebenfalls postuliert. Untersuchungen von YciC-Orthologen in anderen Organismen zeigten, dass die Regulation nicht immer durch die Bindung von Zur an zwei aufeinander folgende palindromische Sequenzen erfolgt. So wurde im Promotorbereich von *yciC* aus *A. tumefaciens* eine putative Zur-Bindebox mit einem AATGTTxxTTCATT-Motiv identifiziert (Chaoprasid *et al.*, 2016). Alle untersuchten Zur-Bindeboxen weisen jedoch die allgemeine Struktur auf: Purin-NNN-Pyrimidin-XXX-Purin-NNN-Pyrimidin (Gilston *et al.*, 2014).

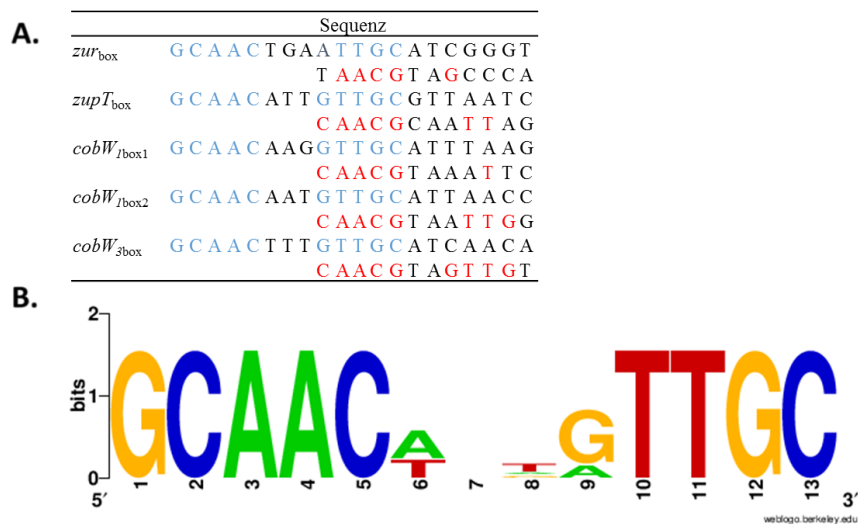


Abbildung 38: Alignment der Zur-Bindeboxen der Gene des identifizierten Zur-Regulons erstellt mit WebLogo (Crooks *et al.*, 2004). Die Basensequenzen der Promotorbereiche von *zurT*, *zur*, *cobW₁* und *cobW₃* wurden auf homologe palindromische Sequenzen untersucht. A: Sequenzvergleich der Zur-Bindeboxen mit Markierung der homologen Basen, wobei in Blau die die erste putative Zur-Bindestelle und in Rot die zweite stromaufwärts liegende Zur-Bindestelle dargestellt sind. B: WebLogo der konservierten Bereiche aus A.

Die postulierten Zur-Bindeboxen von *zupT* und *cobW₃* zeigen die gleiche palindromische Sequenz bestehend aus 13 Basen, lediglich das Motiv im Promotorbereich von *zur* weicht in einer Base ab. Im WebLogo an Position 9 ist zu sehen, dass ein Guanin durch ein Adenin ersetzt wurde (Abb. 38B) (Crooks *et al.*, 2004). Die Zugehörigkeit zum Zur-Regulon wurde im Anschluss an diese Untersuchungen ebenfalls durch *mobility shift* Assays untersucht, mit dem Ergebnis, dass Zur mit gleicher Affinität an die Bindebox im Promotorbereich von *zur* bindet wie in *zupTp* bzw. die gleich hohe Affinität für *cobW_{3p}* besitzt wie für *cobW_{1p}* (Abb. 7-10).

Induktionsexperimente mit dem Reporter gen *lacZ*, kodierend für die β -Galaktosidase, bestätigten eine Zugehörigkeit der Gene, einschließlich *cobW₂* zum Zur-Regulon, da alle Gene sowohl unter Metallmangel als auch in einer AE104 Δ *zur*-Mutante signifikant hoch reguliert wurden (Tabelle 4). Diese Ergebnisse bestätigen auch die erhobenen Microarray-Daten, die zeigen, dass diese Gene im Stamm Δ *zur* auf RNA-Ebene hochreguliert werden (Bütöf *et al.*, 2017). Bei Zinkzugabe ergaben die Induktionsraten aller Gene eine Herabregulation, was in anderen Organismen, wie *B. subtilis*, für Gene des Zur-Regulons ebenfalls beobachtet werden konnte. So ergaben β -Galaktosidase-Experimente, dass *yciC* bei Mangelbedingungen exprimiert und bei Zinküberschuss reprimiert wird (Gaballa and Helmann, 1998). Allerdings ist in den Reporter gen fusionen deutlich geworden, dass *cobW₂*, *cobW₃* und *zur* im Gegensatz zu *zupT* und *cobW₁* konstitutiv exprimiert werden. Dies spiegeln die publizierten Microarray-Daten auf RNA-Ebene wieder, bei denen *cobW₁* bei einem erzeugten Metallmangel um Faktor 18 hochreguliert wird (Herzberg *et al.*, 2015). Die Transkriptomanalyse vom Stamm AE104 zeigte für den Vergleich von EDTA- und Zinkzugabe keine Unterschiede in der RNA-Menge von *cobW₁* (Bütöf *et al.*, 2017). Auf Proteomebene konnten die Peptidfragmente von CobW₁ und ZupT, nach Wachstum in Minimalmedium, nicht identifiziert werden (Herzberg *et al.*, 2014b). Die anderen Gene des *zur*-Clusters wurden im AE104 beim Vergleich zwischen EDTA und Zinkzugabe nicht signifikant auf RNA-Ebene reguliert, die Peptide jedoch in der Proteomanalyse identifiziert (Herzberg *et al.*, 2014b; Bütöf *et al.*, 2017). Die meisten Kopienzahlen in der Zelle konnten mit $1\,755 \pm 195$ für CobW₂ berechnet werden, gefolgt von CobW₃ mit 263 ± 68 Kopien und 77 ± 17 für Zur.

Auch in *Yersinia pestis* konnten Unterschiede in der Regulation der Gene des Zur-Regulons beobachtet werden. So wird das hoch affine Zinkaufnahmesystem ZnuABC strikt reguliert, wie es in *C. metallidurans* bei ZupT erfolgt, wobei andere Zink-abhängige Gene zwar reguliert werden aber ein erhöhtes Grundlevel der Expression aufweisen (Li *et al.*, 2009). Die Unterschiedlichen Expressionsraten der Gene des Zur-Regulons trotz der hohen Homologien

könnte zum einen an den *upstream* und *downstream* Bereichen der Boxen liegen, denn es könnte zu Ausbildungen von Sekundärstrukturen wie *loops* kommen, die die Bindung der Polymerase inhibieren.

Für Fur ist bekannt, dass es eine indirekte positive Regulation ausüben kann. In diesem Fall wird Fur durch eine *antisense* regulatorische sRNA reprimiert, was zu einer Induktion der Gene führt (Lee and Helmann, 2007). Dies stellt eine zweite Möglichkeit der Zur-abhängigen Regulation dar.

Eine weitere Möglichkeit für die Klärung der unterschiedlichen Regulationen, ist ein Zusammenspiel zwischen Zur und einer weiteren regulatorischen Komponente. Dies könnte zum Beispiel der Transkriptionsregulator DksA sein. Ein Paralog ist ebenfalls im *zur*-Cluster von *C. metallidurans* kodiert. DksA destabilisiert in seiner Aufgabe *open promotor* Komplexe (Blaby-Haas *et al.*, 2011). Das Hauptmerkmal von DksA-Proteinen ist ein Zink-Finger-Motiv, welches aus 4 Cysteinresten gebildet wird. *C. metallidurans* kodiert für 4 DksA Paraloge. DksA₂ (Rmet_4453), DksA₃ (Rmet_4470) und DksA₄ (Rmet_4602) weisen ein Zink-Finger-Motiv auf. DksA₁ wird durch das Gen *rmet_0126* kodiert, welches in besagtem *zur*-Cluster liegt. Dieses Protein besitzt jedoch kein konserviertes Zink-Finger-Motiv. Eine Kontrolle dieses Gens durch Zur kann ausgeschlossen werden, da der Abstand zwischen dem Stopp-Codon von *cobW₂* und *dksA₁* 318 bp beträgt. Zudem konnte in β -Galaktosidase-Messungen keine Induktion des Gens bei Zinkmangel festgestellt werden (Schirrmeister, 2015). Für *P. aeruginosa* konnte gegensätzliches gezeigt werden. Das DksA Paralog ohne Zink-Finger-Motiv wird ebenfalls durch Zur kontrolliert (Blaby-Haas *et al.*, 2011). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass DksA ohne Zink-Finger als *back-up* System unter Zinkmangelbedingungen dient. Diese Hypothese konnte für *C. metallidurans* nicht bestätigt werden (Schirrmeister, 2015). Ebenso zeigte sich, dass DksA₁ konstitutiv exprimiert wurde und in der Zelle $3\,283 \pm 111$ Kopien vorlag, wobei ein Zinkmangel erzeugt durch die Deletion von *zupT* lediglich zu einer leicht erhöhten Kopienzahl von $3\,588 \pm 41$ führte (Herzberg *et al.*, 2014b). Jedoch konnte keines der 3 Zink-abhängigen Paraloge identifiziert werden. DksA₁ könnte demnach eine andere regulatorische Rolle in *C. metallidurans* übernehmen.

In *B. subtilis* konnten zwei unterschiedliche Bindeformen von Zur festgestellt werden, die die unterschiedlichen Regulationen hervorrufen könnten, Zur₂Zn₃ und Zur₂Zn₄, wobei das Homodimer bei sinkenden Zinkkonzentrationen in der Zelle ein Zinkion verliert und es zur Bildung des Zur₂Zn₃-Komplexes kommt (Shin and Helmann, 2016). Dieser Komplex löst sich

vom Promotor und es kommt zur Derepression einiger Gene, die essentielle Funktionen im Stoffwechsel besitzen. Gene, die an der Aufnahme des Zinks beteiligt sind, werden erst bei weiterem Abfall der internen Zinkkonzentration dereprimiert. Shin and Helmann, 2016 stellten daher die Hypothese auf, dass die Nutzung von Zink aus Speicherproteinen Priorität hat vor der energieabhängigen Aufnahme von Zink.

Reporterfusionen sollten eine Zink-Abhängigkeit der Genexpression von *cobW₁* zeigen (Tabelle 4). Eine Inkubation mit Zink führte zur Herabregulation des Gens, was auf eine Repression durch Zur zurückzuführen ist. Allerdings wurde dieser Effekt auch schon bei anderen Messungen mit nicht Zink-abhängigen Genen beobachtet und könnte auf eine Fehlfunktion der β -Galaktosidase hinweisen, durch Einbau von Zink ins aktive Zentrum und der einhergehenden Verdrängung des Magnesiums (Sun and Budde, 1999; Fernandes *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2014, Herzberg *et al.*, 2014a).

Worauf die unterschiedliche Regulation der Gene beruht muss in weiteren Experimenten untersucht werden, aber die Daten aus *B. subtilis* für *yciC* und *znuABC* weisen Parallelen zu den Induktionsdaten von *zupT* und *cobW₁* aus *C. metallidurans* auf. So könnten durch gezielte Veränderung der Promotorregion, essentielle Basen identifiziert werden, die für die Bindung von Zur notwendig sind und parallel die Bestimmung der DNA-Bindeaffinitäten des Zur-Homodimers mittels SRP (*surface plasmon resonance*) am Biacore erfolgen.

Für die Zink-abhängige Regulation durch Zur kann postuliert werden, dass bei subfemtomolaren Zinkkonzentrationen das Homodimer im Promotorbereich der Gene bindet und somit die Expression der Gene vermindert bzw. im Fall von *zupT* und *cobW₁* die Expression fast komplett reprimiert (Choi *et al.*, 2017). Bei der Bildung eines Zur-Homodimers in *B. subtilis*, wird zunächst im C-terminalen Bereich von Zur ein strukturelles Zinkion pro Monomer gebunden (Ma *et al.* 2011). Es kommt zur Bildung eines Dimers ohne Repressoreigenschaft. Im zweiten Schritt wird im N-terminalen Bereich ein Zinkion gebunden, was zur Bildung eines asymmetrischen Dimers führt. Dieses Dimer besitzt eine schlechte DNA-Bindeaktivität. Bei Zinküberschuss wird ein viertes Zinkion gebunden, wodurch ein Homodimer mit hoher DNA-Bindeaffinität entsteht und als Repressor agiert (Lee and Helmann, 2007; Ma *et al.*, 2011). Die Sensierung von in der Zelle frei verfügbarem Zink ist vermutlich der Trigger der regulatorischen Funktion von Zur, was durch die Zugabe von Zink zum EMSA mit dem Apo-Protein bestätigt wurde (Abb. 41). Außerdem zeigten die *Pulldown*-Experimente der gereinigten Chaperone und Zur keine Interaktion und somit keinen Zinktransfer.

4.2 Die Deletion von *zur* führt zur Akkumulation von Zink in der Zelle

In zeitabhängigen Wachstumskurven zeigte sich, dass der Δzur im Vergleich zum AE104 keine Wachstumsdefizit oder –benefit hat (Abb. 15). Dies bedeutet, dass *C. metallidurans* mit einer erhöhten Anzahl von Proteinen des Zur-Regulons umgehen kann und eine erhöhte Aufnahme von Zinkionen kompensieren könnte. Ein von ca. 76 000 Zn-Atomen/Zelle im AE104 auf ca. 97 000 Zn-Atomen/Zelle im Δzur , um 30 % gesteigerter Zinkgehalt konnte per ICP-MS gemessen werden (Tabelle 12). Die Bestimmung von Zink⁶⁵-Aufnahmeraten des AE104 führten zu 231 ± 133 Zn⁶⁵-Atomen/Zelle pro Sekunde (Kirsten *et al.*, 2011; Schmidt, 2016). Durch die Deletion von *zur* veränderte sich diese Aufnahmerate mit 227 ± 89 Zn⁶⁵-Atomen/Zelle pro Sekunde nicht signifikant (Bütöf *et al.*, 2017). Der erhöhte Zinkgehalt ist demnach kein Resultat eines veränderten *flow equilibrium* zwischen Aufnahme und Efflux.

Dies legt die Vermutung nah, dass die Zink-Homöostase zwar gestört ist, dass es aber zu einer Kompensation der erhöhten Zinkatome in der Zelle durch Speicherung im Zytoplasma kommt, da eine erhöhte Anzahl Zink-bindender Proteine vorliegen. Diese Kompensation von erhöhtem Zink in der Zelle konnte auch in *Dose Response*-Experimenten in flüssig und bei der Ermittlung der MIC beobachtet werden, denn es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Resistenzen (Tabelle 11/26). Allerdings kann die Deletion einen erzeugten Metallmangel durch EDTA zwar in der Wachstumskurve bei Zugabe von 100 μ M kompensieren, der IC50-Wert vermindert sich jedoch von 3.2 ± 0.5 mM auf 1.8 ± 0.9 mM, was auf festem Medium nicht bestätigt werden konnte, denn die MIC beider Stämme lag bei 2 mM.

Das es allerdings zu einer gestörten Metallhomöostase durch die Deletion von *zur* kommt, zeigt sich in der Toxizitätsbestimmung von Cadmium und Nickel (Tabelle 11). Bei steigenden Konzentration im Medium konnte für beide Metalle ein veränderter Phänotyp bestimmt werden. Die Ermittlung des IC50-Wertes für Nickel ergab 195 ± 6 μ M in der Mutante und zeigt damit ein signifikant sensitiveres Wachstum als der AE104 mit 227 ± 11 μ M. Ein Nickel-abhängige Enzyme, welche in *C. metallidurans* CH34 auch unter heterotrophen Bedingungen synthetisiert werden, sind [NiFe]-Hydrogenasen (Herzberg *et al.*, 2015). Die Mutante ist zwar Nickel-sensitiv besitzt jedoch den gleichen Nickelgehalt pro Zelle, was vermuten lässt, dass die Aktivität des Enzyms nicht beeinflusst ist. Zu diesem Zweck wurden In-Gel Färbungen nach Ballantine and Boxer, 1985 durchgeführt. Das Bandenmuster ist nicht verändert, was für eine unveränderte Aktivität der Hydrogenasen spricht, nach Wachstum der Stämme in Minimalmedium (Abb. 50). Leicht resistenter ist die Mutante jedoch gegenüber Cadmium, was

sowohl durch MIC auf festem Medium, als auch in flüssig durch *Dose Response* bestimmt werden konnte. Der IC50-Wert steigt durch die Deletion von $119 \pm 16 \mu\text{M}$ auf $161 \pm 18 \mu\text{M}$, wobei der Effekt auf festem Medium deutlicher ausfällt und sich die MIC von $255 \pm 27 \mu\text{M}$ auf $400 \mu\text{M}$ erhöht. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse für Nickel und Cadmium, dass eine gestörte Metallhomöostase vorhanden ist, die für veränderte Resistenzen sorgen, was bei Nickel an einer mis-Metallierung liegen könnte.

Um die Einflüsse von Zur weiter zu untersuchen, wurden Deletionen und Disruptionen von *cobW_{1/2/3}* in der Δ_{zur} -Mutante eingefügt. Dabei ist auffällig, dass jede Doppeldeletionsmutante ein vermindertes Wachstum unter EDTA-Zugabe aufweist, d.h. ein erzeugter Metallmangel außerhalb der Zelle nicht kompensiert werden kann (Abb. 19). Dies spricht dafür, dass unter diesen Bedingungen die Zinkatome nicht zu den Targetproteinen gelangen könnten. Gleichzeitig bedeutet dies, dass die Chaperone sich gegenseitig nicht ersetzen können. Nun ist die Frage ob der Metallmangel auch einen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt hat. In den Einzeldelentionsmutanten führt lediglich die Disruption von *cobW₂* zu einem verminderten Zinkgehalt/Zelle, der 62 % des Elternstammes entsprach (Tabelle 12). CobW₂ scheint demnach für die erhöhte Akkumulation von Zink in den Zellen des Δ_{zur} verantwortlich zu sein. Werden die Gene von zwei Chaperonen im Δ_{zur} deletiert, so zeigen sich multiple Effekte. Zum einen kann CobW₁ in Minimalmedium das Fehlen der anderen Chaperone kompensieren, jedoch nicht unter Metallmangel und bei Zinküberschuss im Medium. Was auf eine verminderte Bindungskapazität des Proteins schließen lässt. Der 2. Effekt ist, dass CobW₂ lediglich bei Zinkzugabe die Deletionen von *cobW₁* und *cobW₃* kompensieren kann. Dies legt die Vermutung nah, dass sich die Chaperone in unterschiedlichen Stoffwechselwegen befinden, die sich nur unter bestimmten Bedingungen kreuzen. Deutlich wird dies auch im 3. Effekt, denn CobW₃ kompensiert das Fehlen der anderen Chaperone bei Metallmangel und Zinküberschuss im Medium.

Vergleichend weisen die Daten der ICP-MS darauf hin, dass es durch die Deletion bzw. Disruption der Chaperone zu einer verminderten Akkumulation von Zink in der Zelle kommt und damit der Efflux von Zink erhöht ist. Um diese These zu bestätigen, müssten Untersuchungen der Haupteffluxsysteme für Zink ZntA und CadA durchgeführt werden, wobei ZntA die erste Ebene der Entgiftung ist und CadA diese Rolle beim Fehlen von ZntA teilweise übernimmt (Legatzki *et al.*, 2003; Scherer and Nies, 2009).

4.3 CobW₂ könnte in *C. metallidurans* die Funktion des Zinkspeicherproteins übernehmen

CobW₂ ist im *zur*-Cluster mit einem Abstand von 50 bp hinter *zur* kodiert, besitzt jedoch einen Abstand 318 bp zu *dksA*. Dies lässt darauf schließen, dass *cobW₂* und *zur* in einem Operon vorliegen und *dksA* einen eigenen Promotor besitzt. Eine markerfreie Deletion konnte für *cobW₂* nicht erzeugt werden, da beim *cre-lox* die homologe Rekombination im Promotorbereich des *downstream* kodierten *dksA* erfolgt. DksA ist zusammen mit dem Signalmolekül ppGpp für die generelle Stressantwort in der Zelle verantwortlich und ist daher essentiell für das Überleben (Paul *et al.*, 2004; Potrykus and Cashel, 2008). Da es möglich war *cobW₂* in verschiedenen Stammhintergründen zu disruptieren, beruht der toxische Effekt vermutlich nicht auf dem Verlust des Gens.

Das CobW₂ jedoch einen Einfluss auf die Metallhomöostase und das Wachstumsverhalten von *C. metallidurans* CH34 hat, zeigte sich in zeitabhängigen Wachstumskurven der Einzeldelentionsmutante bei Zugabe von EDTA und Zink, und wird verstärkt in der Doppel- und Dreifachdelentionsmutante (Abb. 11/12/13). Bei genauerer Betrachtung führt die Disruption von *cobW₂*, unter diesen Bedingungen, in allen Stammhintergründen zu einem verschlechterten Wachstum, was einhergeht mit einer erhöhten Verdopplungszeit (Abb. 15/17/19). Dieser Effekt könnte auf einer verringerten Speicherkapazität für Zink in der Zelle oder an der fehlenden Weitergabe von Zink als Co-Faktor an Targetproteine beruhen.

Der Zinkgehalt in den Stammhintergründen des CH34, AE104, $\Delta zupT$ und den Effluxdelentionsmutanten scheint allerdings nicht abhängig von CobW₂ zu sein (Tabelle 6/8/10). Lediglich im Δzur hat das Fehlen des Chaperons in Minimalmedium und bei Metallmangel im Medium einen negativen Effekt auf die Verfügbarkeit von Zink in der Zelle (Tabelle 12). In dieser Mutante sind *cobW₁* und *zupT* nicht reprimiert, d.h. dass die Zinkaufnahme über den Zip-Transporter erfolgt und CobW₁ vermutlich Co-Faktoren an essentielle Proteine des *cobW₁*-Clusters übergibt (Schmidt *et al.*, 2014; Bütof *et al.*, 2017). Ein verminderter Zinkgehalt könnte demnach bedeuten, dass CobW₂ das Zink direkt von ZupT übernimmt, speichert und verteilt. Andererseits könnte CobW₂ auch als interner Zinkspeicher fehlen, der bei Metallmangel Zink an CobW₁ übergibt. Dass es sich bei CobW₂ um ein internes Zinkspeicherprotein handeln könnte, das an der Zink-Übergabe beteiligt sein könnte, ist auch am EDTA-sensitiven Phänotypen des Stammes CH34 $\phi(cobW_2::lacZ)_{299}$ zu erkennen (Tabelle 5), der trotz unverändertem Zinkgehalt in den Zellen Metallmangel nicht tolerieren kann.

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass CobW₂ als Zinkspeicherprotein im Zytoplasma dienen kann, diese Funktion allerdings unter bestimmten Bedingungen auch von CobW₃ übernommen werden kann. Außerdem scheint eine Kaskade ausgehend von ZupT über CobW₂ zu CobW₁ zu existieren. Diese Theorien müssen aber noch Interaktionsstudien und Zink-Übergabeexperimenten stand halten.

4.4 CobW₁ und CobW₂ bedienen vermutlich den gleichen *pathway* in *C. metallidurans*

Um eine Interaktion zwischen den Chaperonen zu zeigen und mögliche Targetproteine zu identifizieren wurden *Fishing-Pulldown*-Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Nullprobe bestimmt, indem das Rohextrakt direkt mit den Ni-NTA *magnetic Beads* inkubiert wurde und in Kooperation mit Stefan Helm und Dr. D. Dobritzsch, mit Hilfe von *high definition* MS (HDMS), die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse durch Messung der Flugzeit der Peptide bestimmt (TOF). Dabei konnten verschiedene Metall-abhängige Proteine identifiziert werden, unter anderem RpoB, FolE_{IB2} aber auch CobW₂ (Tabelle 24). Alle diese Bindungen beruhen auf einer erhöhten Affinität für Nickel, was bei CobW₂ auf den Histidin-Einschub im C-Terminus des Proteins zurück zu führen ist.

Für das spezifische Suchen nach Interaktionspartnern wurde zunächst CobW₁ an die *magnetic Beads* gebunden und 1170 Proteine als putative Interaktionspartner identifiziert (Tabelle 23). Unter diesen befanden sich Proteine die als Interaktionspartner aufgrund der Lokalisation in der Zelle ausgeschlossen werden können, wie ein putatives Porin (Rmet_3234). Ein putativer Transkriptionsregulator (Rmet_0965) und RpoC (Rmet_3333) konnten als mögliche Interaktionspartner von CobW₁ identifiziert werden. Bei RpoC handelt es sich um die Zink-abhängige β' -Untereinheit der RNA Polymerase (Chanfreau, 2013). Das Holoenzym bindet 2 Zinkionen tetrahedral pro Heteropentamer an der β' -Untereinheit, wobei die Ionen durch Cysteine koordiniert sind (Wu *et al.*, 1992; Murakami, 2013). Die Bindung von Zink scheint dabei essentiell für die Funktion des Enzyms zu sein (Markov *et al.*, 1999).

Rmet_0965 hingegen ist ein hypothetischer Transkriptionsregulator der direkt stromaufwärts vom Urease-Reifungscluster kodiert ist, aber in entgegengesetzter Richtung. Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab eine mögliche Metalbindestelle koordiniert durch 2 Cysteine und 2 Histidine, die keine Bindemotiv bilden, allerdings in der Tertiärstruktur ein Zink binden könnten (Passerini *et al.*, 2011). RpoC und Rmet_0965 kommen als putative Interaktionspartner in Frage und müssen durch *Pulldown*-Experimente und weitere Interaktionsstudien z.B. per *size*

exclusion Chromatographie oder ITC überprüft werden. Außerdem besteht die Möglichkeit von *Bacterial Two Hybrid*-Experimenten (BACTH), bei dem die Interaktion zweier Proteine im Zytoplasma oder an der inneren Membran zur Rekonstruktion von cAMP (*cyclic* AMP) führt, was mit Hilfe der Umsetzung von ONPG und X-Gal durch β -Galaktosidaseaktivität sichtbar gemacht werden kann (Karimova *et al.*, 2017). Dieses Experiment ist auch möglich für den Ausschluss falsch positive Ergebnisse des *Fishing-Pulldowns*.

Zu den falsch positiven Ergebnissen könnte auch CobW₂ gehören, welches sowohl in der Negativkontrolle als auch im Experiment mit hoher Abundanz auftaucht. CobW₂ kann zum einen aufgrund des Histidin-reichen Bereichs an die Ni-NTA-*Beads* binden oder aber ein Interaktionspartner von CobW₁ sein. Für den putativen Interaktionspartner spricht der experimentelle Aufbau bei dem das *bait*-Protein im Überschuss zum Ansatz gegeben wird, um eine Sättigung aller präsentierten Bindeflächen zu realisieren. Allerdings könnte CobW₂ eine höhere Affinität für Nickel besitzen als CobW₁, was zu einer Verdrängung des *bait*-Proteins führt. Putative Zielproteine von CobW₂ wurden ebenfalls per *fishing* bestimmt, mit einem ähnlichen Ergebnis (Tabelle 23). Die Bestimmung ergab 934 Interaktionspartner, wobei das putative Porin (Rmet_3234) und den Transkriptionsregulator (Rmet_0965), sowie Bestandteile der RNA Polymerase (RpoB/RpoA) ebenfalls bestimmt werden konnten. Auch CobW₁ wurde identifiziert, allerdings mit einer geringen Abundanz. Für RpoA und RpoB, welche für die α - und β -Untereinheiten der RNA-Polymerase kodieren, ist ebenfalls eine schwache Bindung von Zink beschrieben die allerdings keinen strukturellen Einfluss hat (Nies and Grass, 2009). Weitere Zink-abhängige Proteine die identifiziert wurden sind das universelle Stressprotein UspA, die Methyltransferase RsmD und die Sulfatase EgtB, die mit den bereits genannten Methoden weiter untersucht werden müssen. AtpH, die δ -Untereinheit der F₁F₀-ATPase ist ein Magnesium-abhängiges Protein welches ebenfalls mit hoher Abundanz bestimmt werden konnte, vermutlich aber kein Targetprotein von CobW₂ ist. Aufgrund der ähnlichen putativen Interaktionspartner die für CobW₁ und CobW₂ bestimmt werden konnten, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass sich beide Proteine im gleichen *pathway* befinden. In diesem Fall würde CobW₂, welches konstitutiv exprimiert wird, unter normalen Bedingungen Zink zum Speichern und zum anderen die Co-Faktoren auf die genannten Proteine übertragen, und CobW₁ diese Rolle bei Metallmangel übernehmen. In diesen *pathway* könnte außerdem der Zink-Transporter ZupT eingreifen, welcher bei Metallmangel und somit unter den gleichen Bedingungen hoch reguliert wie *cobW₁* (Herzberg *et al.*, 2015). Die Proteine können somit eine Kaskade ausgehend vom Importer ZupT bilden, der die importierten Zinkionen auf CobW₂ oder

CobW₁ überträgt, welches dann das Zink an Zinkabhängige Proteine essentieller Stoffwechselwege und Enzyme weiter gibt. Außerdem könnte CobW₂ auch gespeichertes Zink bei Metallmangel an CobW₁ weiter geben, um die essentielle Stoffwechselwege zu bedienen. Auch hier werden für die Untersuchung der Hypothese proteinbiochemische Experimente benötigt, die Protein-Protein-Interaktionen und Transfer von Metallen zeigen. Für diese Experimente ist eine Reinigung des Transporters ZupT unausweichlich, was in bisherigen Arbeiten nur in Spuren für ZupT aus *E. coli* gelang (Grass *et al.*, 2005). Demzufolge müssen die Bedingungen hierfür zunächst validiert werden. Taudte, 2010 etablierte die Expression in *Spodoptera frugiperda* Sf9 Insektenzellen nach vorheriger Transfektion der Zellen mit generierten Baculoviren. Zusätzlich zu diesem System stellt auch die zellfreie Expression eine Möglichkeit dar, für die schon eine Expression von Membranproteinen aus *E. coli* gezeigt werden konnte (Schwarz *et al.*, 2007a; Schwarz *et al.*, 2007b). Der erste Schritt um eine Protein-Protein-Interaktion von CobW₁ und ZupT zu zeigen ist jedoch die Nutzung des BACTH-Systems oder FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) (Kenworthy, 2001; Karimova *et al.*, 2017).

4.5 Basiert die Entgiftung von Zink auf CobW₃?

Für die Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase sind Regulations-, Aufnahme und Effluxvorgänge essentiell. In *C. metallidurans* sind die Systeme, die diese Funktionen übernehmen, weitestgehend untersucht, allerdings fehlt das Wissen über das oder die zytoplasmatischen Bindeglieder. Regulatorische Prozesse werden im Stamm AE104 durch Zur, für die Aufnahme von Zink und ZntR, für den Efflux von Zink übernommen (Schmidt *et al.*, 2014; Schmidt, 2016). Bei steigenden Zinkkonzentrationen im Zytoplasma bindet ZntR Zink mit femtomolarer Sensitivität, was zu einer Zink-induzierten strukturellen Änderung führt, sodass ZntR an die DNA binden kann und die Expression der Effluxpumpe induziert (Brocklehurst *et al.*, 1999; Outten and O'Halloran, 2001; Hitomi *et al.*, 2001).

ZntR wird durch *Rmet_3456* kodiert und wurde bestätigt als Aktivator von ZntA (Schmidt, 2016). Im Gegensatz dazu reguliert Zur *zupT* und somit die Zinkaufnahme, um unter Zinkmangelbedingungen ein Minimum von 20 000 Zinkatomen in *C. metallidurans*-Zellen zu realisieren (Kirsten *et al.*, 2011; Herzberg *et al.*, 2014a). Eine Deletion von *zupT* führt zu multiplen Effekten, wie der Akkumulation der Zink-abhängigen β' -Untereinheit der RNA-Polymerase, einem EDTA-sensitiven Phänotypen und der Verringerung des Zinkgehalts auf besagte ca. 20 000 Zinkatome/Zelle (Kirsten *et al.*, 2011; Herzberg *et al.*, 2014a; Herzberg *et*

al., 2016). Wie der Stamm $\Delta zupT$ die Aufnahme der ca. 20 000 Zinkatome/Zelle realisiert, ist bisher nicht bekannt, es wurden aber 8 weitere putative primäre und sekundäre Zinkaufnahmesysteme untersucht (Grosse *et al.*, 2016; Herzberg *et al.*, 2016). Aus den Untersuchungen ist die Hypothese aufgestellt worden, dass *C. metallidurans*, zusätzlich zur unspezifischen Aufnahme und über Phosphatkomplexe, Zink an Natriumgluconat gebunden in die Zelle aufnimmt. Allerdings muss diese Vermutung überprüft werden, indem alternative Kohlenstoffquellen genutzt werden, die keine Metallkomplexe binden. Mergeay *et al.*, 1985 publizierten zwar alternative Kohlenstoffquellen, ein Wachstum mit diesen konnte allerdings nicht bestätigt werden (unpublizierte Daten Dr. M. Herzberg). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es im Stamm AE104 durch die Funktionalität von ZupT und ZntA zu einem Gleichgewicht kommt. Stellt sich nun die Frage, wie das Zink im Zytolplasma weiter transportiert wird und an die Zielproteine gelangt. Um diese Frage zu klären wurden, wie bereits erwähnt, im Vorfeld dieser Arbeit Microarrays mit dem Stamm $\Delta zupT$ durchgeführt und die Chaperone als Kandidaten identifiziert (Herzberg *et al.*, 2015).

In physiologischen Experimenten mit Einzel-, Doppel- und Dreifachdeletionsmutanten in verschiedenen Stammhintergründen wurden multiple Effekte beobachtet, die auf eine gestörte Metallhomöostase hinweisen. Wie bereits erwähnt führt die Deletion von *zupT* zu einem EDTA sensitiven Phänotypen, welcher in der Doppelmutante $\Delta zupT\Delta cobW_3 \phi(cobW_1'::lacZ)_{354}$ in Flüssigkultur verstärkt wird (Tabelle 9) (Herzberg *et al.*, 2014a). Auf festem Medium vermindert sich die MIC $\Delta zupT\Delta cobW_3$ im Vergleich zum Parentalstamm $\Delta zupT$ (Tabelle 26). Der gleiche Effekt konnte in *A. tumefaciens* beobachtet werden, wo durch die Deletion von *yciC* im Stamm $\Delta troCBA$ die Sensitivität gegenüber Metallmangel erhöht wird (Chaoprasid *et al.*, 2016). In diesem Organismus konnte allerdings auch durch die Deletion des *cobW* Paralogen *yciC* und eines weiteren Zink-Chaperons *zinT* ein Wachstumsdefekt bei Metallmangel beobachtet werden. In den *C. metallidurans*-Stämmen $AE104\Delta cobW_3 \phi(cobW_1'::lacZ)_{354}$ und $AE104\Delta cobW_3 \phi(cobW_2'::lacZ)_{299}$ konnte in Wachstumskurven ein vermindertes Wachstum mit 100 μ M EDTA im Medium gezeigt werden, was zu einer verlängerten exponentiellen Phase und einem verspäteten Eintritt in die stationäre Phase führt. Dies geht einher mit der Erhöhung der Verdopplungszeit von 2.4 ± 0.0 h auf 5.3 ± 0.0 h (Abb. 15). Wird der Stamm $\Delta zupT$ als Parentalstamm genutzt, dann führt jede Disruption bzw. Deletion von *cobW*_{1/2/3} zu einem verminderten Wachstum bei Metallmangel, wobei der Metallgehalt der *cobW*_{1/2}-Mutanten konstant bleibt (Abb. 17/ Tabelle 10). Auffällig war jedoch, dass jede Mutante mit Deletion von *zupT* und *cobW*₃ zu einem erhöhten Zinkgehalt in der Zelle

fürte. Mit ca. 71 000 bis 76 000 Zinkatomen/Zelle liegt der Gehalt bei 200 % im Vergleich zum Parentalstamm bei Wachstum in Minimalmedium. Auch die Zugabe von 100 μM Zink führt in den Mutanten zu einem gesteigerten Zinkgehalt in der Zelle von 140 bis 175 %. Wird eine Metallmangel durch Zugabe von 100 μM EDTA erzeugt, dann sind keine signifikanten Änderungen des Metallgehaltes zu erkennen.

Einhergehend mit der Erhöhung des Zinkgehalts in der Zelle zeigt sich eine verminderte Resistenz gegen oxidativen Stress, hervorgerufen durch Paraquat und Wasserstoffperoxid. Ob die Änderung der Resistenz gegen diese Stoffe einen Einfluss auf die Aktivität der Eisen-Superoxiddismutase hat, wurde ein SOD-Assay durchgeführt (Abb. 49), mit dem Ergebnis, dass die Aktivität durch keine der Deletionen beeinflusst ist. Somit könnten die Änderungen im Resistenzverhalten auf der Aktivität der Cu/Zn-SOD des Organismus beruhen, was eine Fehlfunktion durch mis-Metallierung vermuten lässt.

Allerdings lassen sich aus der Akkumulation von Zink in der Zelle und den anderen physiologischen Effekten zwei Hypothesen aufstellen: zum einen, dass das Effluxsystem ZntA nicht bedient wird und zum anderen, dass es durch die Deletion von *cobW₃* zu einer Expressionssteigerung von *cobW₂* kommt. Ist dies der Fall, dann müssten die Doppelmutanten einen verminderten Zinkgehalt aufweisen. Dies war allerdings nicht der Fall, denn auch in diesen Stämmen waren 71 000 Zinkatome/Zelle messbar (Tabelle 10). Für die Widerlegung dieser Hypothese müssten allerdings noch weitere Experimente, wie Reporterfusionen mit *gfp* und *lacZ*, durchgeführt werden. Für die Untersuchung der ersten Hypothese, dass es durch die Deletion von *cobW₃* zu einem verminderten Efflux kommt, könnten Induktionsstudien der Effluxsysteme Aufschluss geben oder aber die Untersuchung von Exportraten mit radioaktivem Zink.

Reporterfusionen mit *lacZ* wurden für die Gene der Effluxsysteme ZntA, CadA, DmeF und FieF durchgeführt. Bei Zugabe von Zinkkonzentrationen im Bereich von 0 bis 100 μM kommt es zu einer Induktion von *zntA* und *cadA*. Die Gene *dmeF* und *fieF* werden bei Zugabe von Zink nicht hochreguliert (Tabelle 15/16). Interessanterweise wird *zntA* in den Stämmen $\Delta zupT$ und $\Delta zupT\Delta cobW_3$ gleich reguliert, sodass die Expression um Faktor 10 von 37.4 ± 7.5 U/mg Trockengewicht auf 386.2 ± 64.3 U/mg Trockengewicht bei 100 μM Zinkchlorid gesteigert wird. Unterschiede sind jedoch in der Expression von *cadA* zu beobachten, wobei die Induktion im Grundlevel im $\Delta zupT$ bei 25.7 ± 5.0 U/mg Trockengewicht liegt und im $\Delta zupT\Delta cobW_3$ bei 25.2 ± 7.5 U/mg Trockengewicht. Diese Basisaktivität erhöht sich bei Zugabe von 100 μM

Zinkchlorid im $\Delta zupT$ um Faktor 1.4 auf 36.0 ± 5.6 U/mg Trockengewicht und im $\Delta zupT\Delta cobW_3$ um Faktor 1.8 auf 48.7 ± 4.3 U/mg Trockengewicht.

Auch in anderen Stammhintergründen konnte eine Induktion von *zntA* und *cadA* gemessen werden, allerdings zeigten sich keine Unterschiede in der Expression durch das Fehlen von *cobW_3*. Bei der Untersuchung weiterer Metalle war auffällig, dass *zntA* im Stamm $\Delta zupT\Delta cobW_3$ bei der Zugabe von Kobalt induziert wird und eine 4fach höhere Induktionsrate bei 2.5 μ M Kobalt besitzt als im Parentalstamm. Auch *dmeF* wurde unter diesen Bedingungen induziert, jedoch ohne Unterschiede zwischen den Stämmen. DmeF scheint demnach für die Entgiftung von Kobalt zuständig zu sein, was auch in Wachstumsexperimenten von Scherer and Nies, 2009 gezeigt werden konnte. Auch die Zugabe von bis zu 150 μ M Cadmium steigerte die Induktion von *dmeF*, aber auch von *zntA* und *cadA* in allen Stammhintergründen. Das ZntA, CadA und DmeF an der Entgiftung von Cadmium beteiligt sein könnten, zeigte sich in Wachstumsexperimenten nicht, denn lediglich eine Vierfachdeletionsmutante $\Delta e4$ zeigt einen sensitiven Phänotyp (Scherer and Nies, 2009). *FieF* hingegen wurde nur signifikant hoch reguliert bei Zugabe von Eisen (Daten nicht gezeigt). Die Induktionsdaten der Effluxsysteme bestätigen die Hypothese, dass CobW₃ Teil der Entgiftung von Zink sein könnte.

Für die Identifizierung möglicher Interaktionspartner, wie den Transportern die an der Entgiftung der Zytoplasmas beteiligt sind, wurden *Fishing-Pulldown*-Experimente mit der His-getaggen metallierten Variante von CobW₃ durchgeführt, die zur Identifizierung von 1133 Proteinen führten (Tabelle 23). Die Analyse führt zur Zink-abhängigen Fructose-1,6-bisphosphatase CbbF₃, welche in der Glucogenese den Umsatz von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat und Phosphat katalysiert (Hers, 1983; Zhang *et al.*, 1996). Neben diesem Enzym konnte, wie auch für CobW₁ und CobW₂, das Zink-abhängige universelle Stressprotein UspA identifiziert werden, sowie die RNA-Polymerase Untereinheiten RpoA bzw. RpoB. Auch das putative Porin Rmet_3234 konnte in diesem Ansatz gefunden werden, was auch in diesem Fall aufgrund der Lokalisation von Porinen in der äußeren Membran als Zielprotein ausgeschlossen werden kann. In vergleichenden Proteomikanalysen zwischen den Stämmen AE104 und $\Delta zupT$ konnte das Porin in der Mutante in geringerer Kopienzahl in der Zelle gefunden werden als im Wildtyp (Nies, 2016). Allerdings ist nicht klar warum eine Zelle die Metallmangel durch verminderte Zinkaufnahme und damit fehlerhafte Zinkallokation, Transportmechanismen wie dieses Porin der äußeren Membran herabreguliert. Vorstellbar ist eine spezifische Aufnahme von Zink durch dieses Porin und den Transport ins Periplasma, mit einer Weiterleitung zu Transportern der inneren Membran wie ZupT, dann könnte es ein

Netzwerk geben, dessen Bestandteil die Proteine des Zur-Regulons und Rmet_3234 sind. Im *Pulldown* ist nicht auszuschließen, dass es zu einer Bindung aller Proteine des Netzwerks kommt, die eine Kette bilden und gemeinsam eluiert werden. Das würde auch den Fakt erklären, dass CobW₂ im *Pulldown* von CobW₃ ebenso wie in CobW₁ identifiziert werden konnte.

Ein weiteres *Pulldown*-Ergebnis weist auf eine Funktion von CobW₃ außerhalb der Zink-Homöostase hin. Die höchste Abundanz konnte mit 34.2 für HypD bestimmt werden. Dieses Protein ist an der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen beteiligt und bildet gemeinsam mit HypC einen Komplex, der den Transfer des Fe-CN₂Co-Liganden auf die große Untereinheit katalysiert (Forzi and Sawers, 2007; Stripp *et al.*, 2013; Lacasse and Zamble, 2016). HypD weist lediglich ein Eisen-Schwefel-Cluster im aktiven Zentrum auf und keine weiteren Kationen wie Nickel und Zink, somit kann ausgeschlossen werden, dass HypD aufgrund einer hohen Nickelaffinität *His*-CobW₃ verdrängen kann (Forzi and Sawers, 2007). Allerdings ist ein Zink-bindendes Protein an der Reifung beteiligt HypF, welches mit HypE einen Komplex eingeht, den Cyanidliganden generiert und auf das Rückgrat des HypC-HypD-Heterodimers überträgt (Blokesh *et al.*, 2004). Ein zweites Zink-abhängiges Protein ist HypA, das sowohl Zink als auch Nickel bindet (Lacasse and Zamble, 2016). Bei dem Zinkion handelt es sich um ein strukturelles Zink und sorgt somit für die Präsentation der Interaktionsfläche von HypA (Watanabe *et al.*, 2015). Die Ausbildung dieses HypA-HypB-Komplexes und SlyD sorgt für die Insertion des Nickelions in das aktive Zentrum der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase (Lacasse and Zamble, 2016). Um zu überprüfen, ob die Deletion von *cobW*₃ einen Einfluss auf die Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase besitzt wurden In-Gel-Färbung (Abb. 50) (Ballantine and Boxer, 1985). Es konnte bei einigen Stämmen eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa identifiziert werden. Das Auftreten der Bande ist allerdings unbeeinflusst von der Deletion von *cobW*₃ oder eines anderen Gens des Zur-Regulons. Außerdem konnten die Daten von Herzberg *et al.*, 2015 nicht eindeutig reproduziert werden, was in einer Optimierung des Experiments und der Bestimmung der quantitativen Hydrogenaseaktivität für zukünftige Versuche resultiert.

Die Physiologischen Daten der *cobW*₃-Deletionsmutanten weisen außerdem auf eine Verknüpfung zur Kobalthomöostase hin. So zeigen die Wachstumskurven der CH34-Derivate eine verlängerte lag-Phase, wobei die Berechnung der Verdopplungszeit in der log-Phase nicht vom Elternstamm abwich (Abb. 11/12). Daraus lassen sich zwei Hypothesen ableiten: zum einen werden die Effluxsysteme nicht mit Kobalt beliefert, dann müsste mehr Kobalt in der Zelle akkumuliert sein. Oder es kann kein Kobalt gespeichert werden, dann ist weniger Kobalt

in der Zelle vorhanden. Die Metallgehalte der Einfachdeletionsmutante CH34 Δ *cobW*₃ bestätigt die erste Hypothese, denn bei Zugabe von Zink oder Kobalt akkumuliert der Stamm doppelt so viel Kobalt wie der Wildtyp CH34 (Tabelle 6), was einhergeht mit einem Kobalt sensitivem Phänotypen (Tabelle 5). Eine Kobaltakkumulation, nach Zugabe des Metalls, konnte ebenfalls im AE104 Δ *cobW*₃ beobachtet werden (Tabelle 8).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse von CobW₃ auf eine Rolle des Chaperons bei der Entgiftung von Zink und Kobalt hin. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein auch Nickel speichert und inseriert.

4.6 Die Chaperone CobW_{1/2/3} zeigen unterschiedliche Zink-Bindekapazitäten

Die postulierte Funktion der zur Unterfamilie COG0523 gehörenden P-loop GTPasen YjiR und YjiA aus *E. coli* und YciC aus *B. subtilis* in der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase konnte gezeigt werden und in der vorliegenden Arbeit an Hand der physiologischen Daten für CobW_{1/2/3} aus *C. metallidurans* bestätigt werden (Gaballa and Helmann, 1998, Blaby-Haas *et al.*, 2012). Nun stellt sich jedoch die Frage, ob es ein spezifischer Einfluss auf das Zinkgleichgewicht ist oder ob CobW_{1/2/3} in *C. metallidurans* unterschiedliche Metallpräferenzen besitzen. Kristallstrukturuntersuchungen und die Bestimmung von Bindungskonstanten ergaben für YjiA_{*E. coli*}, dass dieses Protein mit steigender mikromolaren Affinitäten Zink, Nickel Kobalt bindet, wobei die Affinität für Zink bei paralleler Bindung von GDP im Verhältnis zu Nickel und Kobalt steigt (Sydor *et al.*, 2013). Dies könnte bedeuten, dass durch die Bindung des Nukleotides eine Konformationsänderung stattfindet, die eine verbesserte Bindeaffinität für Zink zur Folge hat.

Stammbaumanalysen der Aminosäuresequenzen von YjiA_{*E. coli*} und CobW_{1/2/3}_{*C. metallidurans*} haben ergeben, dass CobW₂ evolutionär am engsten mit YjiA verwandt ist (Abb. 6), was ähnliche Funktionen und Affinitäten vermuten lässt. Allerdings weist YjiA im Vergleich zu CobW₂ keinen Histidin-Einschub auf. Dieser Einschub befindet sich im C-Terminus des Proteins, allerdings nicht endständig und setzt sich aus 22 Histidinen in einer Sequenz aus 43 Aminosäuren zusammen (Abb. 51). Ein C-terminaler Histidin-Einschub lässt sich auch in der Aminosäuresequenz von CobW₃ finden, welches eine höhere phylogenetische Distanz zu CobW₂ besitzt. Aufgrund der Histidin-reichen Regionen sollten beide Proteine ähnliche Bindekapazitäten aufweisen, welche vergleichbar mit dem Histidin-reichen HypB aus *B. japonicum* sind (Fu *et al.*, 1995). Trotz des höheren phylogenetischen Abstandes, aber aufgrund

des fehlenden Histidin-Einschubs sollte CobW₁ ähnliche Metallbindekapazitäten wie YjiA_{E. coli} oder YciC_{B. subtilis} aufweisen.

Die Vorhersage putativer Metallbindestellen in CobW₁, YciC_{B. subtilis} und YjiA_{E. coli} beruhen lediglich auf dem Metallbindemotiv GCxCC (Haas *et al.*, 2009). Programme zur Vorhersage von Metallbindestellen, wie MetalDetector v2.0 annotieren ausschließlich Metallbindemotive, dabei kann es in der Tertiärstruktur zur Ausbildung weiterer Metallbinde-Motive kommen oder auch zur Metallkoordinierung durch Anreicherung von Metall-bindenden Aminosäuren in der Sequenz. CobW₁ besitzt insgesamt 9 Histidine und 5 Cysteine, die an der Koordinierung von Zink beteiligt sein könnten. Im Vergleich dazu besitzt YciC_{B. subtilis} 8 Cysteine und 7 Histidine. Vergleiche zur Metallbindekapazität können nicht durchgeführt werden, da es für YciC_{B. subtilis} lediglich Experimente zur Zugehörigkeit zum Zur-Regulon gibt. Hier konnte aber gezeigt werden, dass *yciC_{B. subtilis}* wie *cobW₁* zwei Zur-Bindeboxen in der Promotorregion aufweist (Gaballa *et al.*, 2002; Gabriel *et al.*, 2008). Eine ähnliche Funktion der beiden Proteine mit α -helikaler Struktur ist daher anzunehmen (Kelley and Sternberg, 2009). Im Gegensatz dazu weist die Aminosäuresequenz von YjiA_{E. coli} 7 Histidine und 4 Cysteine auf. In Abwesenheit von GDP bindet YjiA_{E. coli} 3.8 mol Zn/ mol Protein und in Anwesenheit von GDP 3.2 mol Zn/mol Protein (Sydor *et al.*, 2013). CobW₁ bindet 1.4 ± 0.1 mol Zink/ mol nach der Inkubation mit Zink, sowie mit Zink, GTP und Magnesium (Tabelle 17). In Konkurrenzversuchen mit Zincon zeigte sich das gleiche Resultat. Bereits bei einem Verhältnis von 1:1 treten Zincon und CobW₁ in Konkurrenz, was auf eine ähnlich hohe Affinität schließen lässt (Abb. 26). Bei einer Konzentration von 20 μ M Zinkchlorid und somit einem 2fachen Überschuss ist das Zincon gesättigt. Die Bindekapazität von CobW₁ liegt demnach bei 50 % im Vergleich zu YjiA_{E. coli}.

Es stellt sich allerdings die Frage, wie CobW₁ als Monomer 1.5 mol Zink/ mol Protein binden kann. YeiR aus *E. coli* dimerisiert in Anwesenheit von Zink, was durch Größenausschlusschromatographie gezeigt werden konnte (Blaby-Haas *et al.*, 2012). Die Dimerisierung von CobW₁ konnte durch SEC (*Size Exclusion chromatographie*) gezeigt werden, allerdings war es nicht möglich mit Apo-CobW₁ *in vitro* ein metalliertes Dimer zu erzeugen. CobW₁ dimerisiert also nicht unter den getesteten Bedingungen, die auf dem Protokoll von Sydor *et al.*, 2013 beruhen. Sollte die Funktionalität des Proteins auf einer Multimerisierung beruhen, wie es auch für andere G3E P-loop GTPasen wie HypB, UreG und YeiR bekannt ist, findet dies nicht unter den gewählten Bedingungen statt oder es handelt sich um einen anderen Auslöser (Fu *et al.*, 1995, Fong *et al.*, 2013, Blaby-Haas *et al.*, 2012). Bei UreG_{H. pylori} beruht die Bildung des Homodimers auf der Bindung eines GTP-Nukleotids pro Monomer, welches der Trigger für die

Dimerisierung und die Bindung des Nickel-Co-Faktors ist und mit dem Targetprotein interagieren kann (Fong *et al.*, 2013). Dies führt zur Bildung eines Reifungskomplexes bestehend aus $\text{UreF}_2\text{H}_2\text{G}_2$, der die Apo-Urease durch die Übergabe des Nickelions aktiviert, was durch die GTP-Hydrolyse erfolgt. Allerdings ist nicht geklärt, ob für die Aktivierung von UreG und damit die Beladung eine Interaktion mit dem UreE-Homodimer notwendig ist (Farrugia *et al.*, 2013). Da die Funktion von CobW₁ vermutlich nicht auf der Bildung eines Komplexes mit anderen Proteinen beruht, die dann einen Co-Faktor an ein Targetprotein übertragen, müssen die Dimerisierungsbedingungen weiter untersucht werden und überprüft werden ob ein Homodimer für die Aktivität des Chaperons notwendig ist.

Wie bereits erwähnt ist die phylogenetische Distanz zwischen CobW₃ und CobW₁ geringer als beider Proteine zu CobW₂. Allerdings zeigen die Aminosäuresequenzen strukturelle Unterschiede auf zwischen CobW₃ und CobW₁, so besitzt CobW₃ kein GCxCC Metallbindemotiv. Allerdings können in der Sequenz 3 Cysteine gefunden werden und 23 Histidine, die für Co-Faktorbindungen eine Rolle spielen könnten. Acht der Histidine bilden im C-Terminus einen Einschub, die für eine Zinkkoordinierung sorgen könnte. Die Aminosäuresequenz von CobW₂ weist 7 Cysteine und 30 Histidine auf, von denen 22 Histidine einen Histidin-Einschub bilden. Für HypB aus *B. japonicum* konnte ebenfalls eine Histidinreiche Region bestehend aus 24 Histidinen in einer Sequenz aus 39 Aminosäuren annotiert werden, welcher abweichend von CobW_{2/3} im N-Terminus kodiert ist (Fu and Maier, 1994). HypB ist bei der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen an der Insertion des Nickel-Co-Faktoren beteiligt (Forzi and Sawers, 2007). Für HypB aus *B. japonicum* konnte gezeigt werden, dass es sich mit einer Bindung von 9 mol Nickel/mol Monomer, um ein Nickelspeicherprotein handelt, welches auch an der Aktivierung der Transkription der Hydrogenasenreifungsproteine beteiligt ist (Fu *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1997).

Die bestimmten Bindekapazitäten von CobW_{2/3} bestätigen, dass der Histidin-Einschub zu einer erhöhten Bindung von Metallen führt und die Proteine somit an der Speicherung im Zytoplasma beteiligt sein könnten, was wiederum die physiologischen Daten bestätigt. Die Co-Faktorbestimmung ergab, dass 7.1 ± 0.7 mol Zn/mol CobW₂ gebunden sind und das eine Zugabe von GTP die Kapazität auf 7.6 mol Zn/ mol CobW₂ erhöht (Tabelle 17). Allerdings war auch nach der Herstellung des Apo-Proteins noch 1 mol Zn/ mol CobW₂ messbar, was auf eine starke Bindeaffinität und ein strukturelles Zink hinweist. Aufgrund erhöhter Standardabweichungen spielte es bei der Co-Faktorbestimmung von CobW₃ keine Rolle, ob dem Metallinkubationsassay nur Zink oder Zink, GTP und Magnesium zugesetzt wurden, denn

es gab sich ein Zinkgehalt von 5.8 ± 2.7 bzw. 3.3 ± 0.0 mol Zn/mol CobW₃. Die erhöhten Standardabweichungen sind vermutlich auf die Anhäufung der Histidine im C-Terminus zurück zu führen. Diese Histidin-reichen Bereiche sind flexible Bereiche die in der CD-Spektroskopie oft als *disordered* Bereiche zu sehen sind und auch in Kristallisationsexperimenten nur schlecht aufgelöst werden können (persönliche Information Dr. H. Lilie) (Abb. 27/28/29).

Um zu testen, ob die Zinkionen mit unterschiedlichen Affinitäten gebunden werden, müssten vergleichende Experimente mit Chealoren bekannter Stabilitätskonstanten durchgeführt werden. Dafür kommen EDTA mit einer Stabilitätskonstanten von $\log K_1 = 13.4$ bei pH 7.0 und TPEN mit einer Stabilitätskonstanten von $\log K_1 = 15.6$ in Frage (Sillen and Martell, 1971, Andregg *et al.*, 1977). Bisher wurde für CobW₂ lediglich ein *competition* Experiment mit Zincon durchgeführt, bei dem es sich um einen Farbstoff handelt, der Zink mit einer Stabilitätskonstante von $\log K_1 = 5.89$ bindet, einhergehend mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 480 nm auf 620 nm (Hilario *et al.*, 1990, Sabel *et al.*, 2010, Kocyla *et al.*, 2017). Im Experiment würde dies bedeuten, dass die Sättigung des Zincons bei 0 % bleibt, wenn Zink stärker an CobW₂ bindet. Sättigungen zwischen 0 und 100 % zeigen einen intermediären Zustand, bei dem die Bindeaffinität für Zink bei Zincon und CobW₂ gleich ist. Aus dem Zincon-Assay ergibt sich, dass CobW₂ 1.5 mol Zink/mol Protein mit einer höheren Affinität bindet als Zincon und 1.5 mol Zink/mol Protein mit gleicher Affinität (Abb. 26). Im Gegensatz dazu konkurriert CobW₃ bereits ab einer Zinkkonzentration von 5 μ M mit dem Zincon um das Zink. Dieser intermediäre Bindezustand ist bis zu einer Konzentration von 40 μ M zu beobachten, wobei Zincon bei 50 μ M Zinkchlorid gesättigt ist und eine höhere Stabilitätskonstante als CobW₃ aufweist. CobW₃ bindet demzufolge 0.5 mol Zn/ mol Protein mit hoher Affinität und weitere 3.5 mol Zn/mol Protein mit der gleichen Affinität wie Zincon. Die unterschiedlichen Affinitäten für Zink der Proteine CobW₂ und CobW₃ beruhen zum einen auf der Affinität der Metallbindestelle (GCxCC-Motiv) und zum anderen auf der Flexibilität bzw. der *disorderd*-Struktur des C-terminalen Histidin-Einschubs.

Für eine quantitative Aussage ist das Zincon-Assay nicht geeignet, da zum einen große Abweichungen zur Metallbestimmung per ICP-MS vorhanden sind und selbst bei Substanzen mit bekannter Zink-Bindekapazität, wie EDTA keine genaue Aussage getroffen werden können (Hilario *et al.*, 1990, Sabel *et al.*, 2010). Es sollten daher Experimente wie die isotherme Titrationskalometrie (ITC) für Bestimmungen der Bindeaffinitäten genutzt werden und ICP-MS-Messungen für die Bestimmung der mol-Verhältnisse.

Die Daten der zur Bindekapazität von CobW_{1/2/3} lassen außerdem den Schluss zu, dass für die Bindung des Co-Faktors die Bindung des Nukleotids nicht notwendig ist und die GTPase-Funktion beispielsweise notwendig ist für die Übertragung des Co-Faktors an ein Targetprotein oder für die Herstellung der Interaktion zwischen Chaperon und Targetprotein. Für die genaue Klärung dieser Funktion sind zunächst Basisexperimente notwendig, wie die Sicherstellung der Magnesium und Nukleotidbindung. Dafür muss die Inkubation validiert werden, denn nach der Inkubation mit Zinkchlorid, GTP und Magnesium war lediglich Zink in der Probe messbar und kein Magnesium (0.04 mol/mol Protein). Möglicherweise kann die Magnesium- und GTP-Bindung durch anaerobe Bedingungen, wie sie von Blaby-Haas *et al.*, 2012 beschrieben wurden, verbessert werden. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Bindung der Nukleotide an die Chaperone während der Größenausschlusschromatographie verloren geht, sollte dem Puffer GTP und Magnesium zugesetzt werden (Sydor *et al.*, 2013). Auch die Bindung des Nukleotids an das Protein muss sichergestellt werden, wobei noch die Frage beantwortet werden muss, ob eine Bindung von GTP oder GDP erfolgt. Erste Versuche um die Enzymaktivität und den Umsatz von GTP mit Malachitgrün nachzuweisen waren nicht erfolgreich, da entweder der Trigger für die Hydrolyse gefehlt hat oder aber die Hydrolyse innerhalb der ersten Minuten stattfand und somit keine kinetische Messung möglich war (Lanzetta *et al.*, 1979). Eine Diskriminierung zwischen GMP, GDP und GTP mit der ICP-MS ist aufgrund der Sensitivitäten für Phosphor ebenfalls nicht möglich gewesen (Daten nicht gezeigt). Daher ist eine Phosphorbestimmung mit dem Element2 (Thermo Fisher) oder der Nachweis von GTP, GDP und GMP in einem isokratischer Lauf mit 7.5 mM Acetonitril als Laufmittel auf einer RP-Säule denkbar (Hubert and Porath, 1980; Rubio *et al.*, 2004). Erst nach Klärung dieser Punkte kann experimentell der Kreislauf der putativen GTPasen geklärt werden, d.h. worauf die GTPase-Funktion beruht, was der Trigger für die Interaktion und die Freilassung des Targetproteins ist, und wie es zur Freilassung des Co-Faktors kommt. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Suche nach Targetproteinen durch *fishing*-Experimente.

Zusammenfassend kann eine Hierarchie aufgebaut werden, wobei CobW₂ die höchste Bindekapazität für Zink besitzt und CobW₁ die niedrigste, jedoch binden beiden Proteine jeweils 1 mol Zink mit hoher Affinität, vermutlich an das GCxCC-Motiv und weitere Zinkionen werden durch CobW_{1/2/3} an stickstoff-/sauerstoffreiche Aminosäuren mit geringerer Affinität gebunden (Outten *et al.*, 2001, Leipe *et al.*, 2002, Gilston *et al.*, 2014). Allerdings beruht nicht nur die Affinität für Zink auf den beteiligten Aminosäuren, sondern auch die Selektivität. So wird davon ausgegangen, dass eine optimale Zinkbindung mit hoher Affinität und Selektivität

Aminosäuren der $S_3(N/O)$ -Struktur benötigt und eine $S(N/O)_3$ -Struktur keine hohe Selektivität aufweist, was einhergeht mit der Bindung von z.B. Nickel und Kobalt, die durch Titration mit Zink verdrängt werden (Outten *et al.*, 2001).

Das Metall-bindende Proteine verschiedene Ionen binden können, wurde bereits an YjiA_{E. coli} gezeigt, dass in Lösung 1 mol Co, 2 mol Ni oder 4 mol Zn/mol Protein binden kann. Die Aktivität des Proteins mit Zink als Co-Faktor ist im Vergleich zu den anderen Metallen höher (Sydor *et al.*, 2013). CobW₂ bindet als *His*-tag-Version nach der Inkubation mit einem Metallmix, wobei Nickel, Kobalt, Cadmium und Zink im gleichen Verhältnis vorlagen, ebenfalls Nickel und Kobalt, allerdings mit niedrigerer Affinität als Zink (Bauer, 2013). Die Bindung der Metallionen an den *His*-tag kann in diesem Experiment allerdings nicht ausgeschlossen werden, da dieser eine hohe Metallaffinität besitzt (Hengen, 1995). Für CobW₁ und CobW₃ zeigte sich das gleiche Resultat, denn bei Inkubation mit dem Metallmix wurde Zink bevorzugt gebunden (Bauer, 2013). Diese Co-Faktorbestimmung lässt vermuten, dass es sich um cambialitische Proteine handeln könnte. Sollte dies der Fall sein, führt eine Bindung dieser Metalle nicht zu einem Aktivitätsverlust der Proteine. Die Untersuchung anderer G3E P-loop GTPasen ergab, dass z.B. UreG, welches ein Nickel-abhängiges Enzym mit einer Funktion in der Reifung der Urease ist, Zink mit höherer Affinität als Nickel bindet (Mehta *et al.*, 2003; Zambelli *et al.*, 2005). Die GTPase Aktivität dieses Proteins beruht jedoch auf der Bindung von Nickel und wird durch Zink nicht beeinflusst. In diesem Protein hat Zink eine postulierte strukturelle Funktion (Zambelli *et al.*, 2005; Fong *et al.*, 2013). Für die zweite Unterfamilie der HypB-ähnlichen Proteine konnte ähnliches beobachtet werden. Auch diese Proteine binden Zink mit höherer Affinität als Nickel, obwohl es sich um Nickel-abhängige Proteine handelt (Mehta *et al.*, 2003, Leach *et al.*, 2005). Trotz der präferierten Bindung von Zink vor Nickel führt die Bindung von Zink zu einer verminderten GTPase Aktivität, allerdings nicht zu einem Aktivitätsverlust (Cai *et al.*, 2011). MeaB-ähnliche Proteine sind im Gegensatz zu den anderen Unterfamilien an der Insertion des Cobalamin-Co-Faktors in die Methylmalonyl-CoA-Mutatase beteiligt, wobei die Aktivität ebenfalls Co-Faktor spezifisch ist (Padovani *et al.*, 2006). Wenn alle Unterfamilien der G3E P-loop GTPasen ähnliche Metall-spezifische Chaperonfunktionen besitzen, dann ist davon auszugehen, dass CobW_{1/2/3} keine cambialistischen Proteine sind und eine Zink-abhängige GTPase-Aktivität vorhanden sein sollte.

4.7 FolE_{IB2} ist ein mögliches Targetprotein von CobW_{1/2/3} in *C. metallidurans*

Das *fishing* Experiment resultierte in einer Vielzahl von möglichen Interaktionspartnern, die zunächst auf ihre Metallabhängigkeit überprüft werden mussten und anschließend auf ihre Lokalisation in der Zelle. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass falsch positive Proteine gemessen wurden, die nicht an das *bait*-Protein sondern an die Matrix gebunden haben. Allerdings lieferte diese Methode auch putative Targetproteine die in weiteren Experimenten untersucht werden sollten. Eines dieser Experimente ist der spezifische *Pulldown* mit *bait*- und *prey*-Proteinen. Dabei wurde der putative Interaktionspartner an MagStrep “type3“ XT *magnetic Beads* gebunden und anschließend mit den Chaperonen CobW_{1/2/3} mit und ohne Affinitätstag inkubiert. Für dieses experimentelle *Set up* wurden 2 putative Bindepartner ausgesucht, die aufgrund der Kodierung im *zur*-Cluster bzw. im *cobW₁*-Cluster gewählt wurden. Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die Chaperone an der Übertragung des strukturellen oder funktionellen Zinks auf das Apo-Monomer von Zur beteiligt sind. Vor dem Experiment wurde sichergestellt, dass die Chaperone nicht an die *StrepTactin-bead*-Matrix binden (Daten nicht gezeigt).

Nach Durchführung des *Pulldowns* mit immobilisiertem Apo-*Strep*-Zur und CobW_{1/2/3} unter Zugabe von Zink, sind lediglich schwache Banden in den Elutionsfraktionen sichtbar, die Verunreinigung aufgrund der experimentellen Herangehensweise sein könnten (Abb. 37). Es kann damit die Hypothese bestätigt werden, dass CobW_{1/2/3} nicht mit Zur interagieren, um funktionelles Zink zu übertragen. Somit ist vermutlich im Zytoplasma frei verfügbares Zink für die Funktion des globalen Zink-Aufnahme-Regulators verantwortlich.

Im *cobW₁*-Cluster sind Gene kodiert, deren Proteine Paraloge von Zink-abhängigen Proteinen sind. Zu diesen Proteinen gehört die GTP-Cyclohydrolase FolE_{IB2}, die kodiert ist durch das Gen *rmet_1099*. Diese Enzymklasse ist für die initiale Katalyse in der Tetrahydrofolatbiosynthese verantwortlich, wodurch der für die Synthese von Pyrimidin, Serin und Methionin und weiterer Substanzen notwendige Co-Faktor gebildet wird (Nichol *et al.*, 1985). In *E. coli* kodiert *folE* für die GTP-Cyclohydrolase IA, die GTP zu 7,8-Dihydroneopterintriphosphat umsetzt (Yim and Brown, 1976; Katzenmeier *et al.*, 1991). Für den nukleophilen Angriff am Purin-Ring des GTP an Position C8 ist die Aktivierung eines Wassermoleküls durch Zink notwendig (Auerbach *et al.*, 2000). Zink nimmt in dieser Reaktion die Rolle einer Lewis-Base ein (Nies, 2016). 26 % der Bakterien kodieren für ein Paralog der GTP-Cyclohydrolase IA, die als *folE2* annotiert sind und als GTP-Cyclohydrolase IB bezeichnet werden, wobei 65 % der Bakterien

das Enzym IA besitzen, 14 % IB, 12 % besitzen beide und 9 % keines (Sun and Budde, 1999). *C. metallidurans* kodiert *rmet_3990* (*folE_{IA1}*), eine GTP-Cyclohydrolase IA und *rmet_2614* (*folE_{IB1}*), *rmet_1099* (*folE_{IB2}*) GTP-Cyclohydrolasen IB, wobei letzteres im *cobW₁*-Cluster direkt *downstream* von *cobW₁* liegt. Die GTP-Cyclohydrolasen IB zeichnen sich durch eine Zur-Regulation aus bei Zink limitierenden Bedingungen (Gaballa *et al.*, 2002). Für *N. gonorrhoeae* konnte festgestellt werden, dass es sich bei diesem Enzym um ein cambialistisches Protein handelt mit einem Mangan- oder Zinkion als Co-Faktor (Sankaran *et al.*, 2009). Die Aktivität von FolE_{IB} aus *B. subtilis* basiert auf Mangan und nimmt ab durch die Bindung von Eisen, Magnesium, Kobalt, Zink und Nickel (Sankaran *et al.*, 2009). Um die Aktivität von FolE_{IA} und FolE_{IB} aus *C. metallidurans* nach der Bindung verschiedener Kationen zu bestimmen, müssen die Proteine gereinigt werden und in einem Fluoreszenz-Assay der Umsatz des Metabolits GTP bestimmt werden (El Yacoubi *et al.*, 2006). Bestandteil der vorliegenden Arbeit war es allerdings zu testen, ob FolE_{IB2} mit CobW₁ oder CobW_{2/3} interagiert und möglicherweise ein Co-Faktortransfer stattfindet. FolE_{IB2} wurde als *Strep*-tag Fusionsprotein gereinigt (Anhang 11.11) und das Apo-Protein mit einem Zinkgehalt von 0.3 ± 0.2 mol Zn/mol Protein in *Pulldown* Versuche eingesetzt. Bei einer Interaktion und einem Transfer sollte FolE_{IB2} als Holo-Protein 1 mol Zn/mol Protein binden (Rebelo *et al.*, 2003). Um die Hypothese zu überprüfen, ob CobW₁ mit FolE_{IB2} interagiert und somit den Co-Faktor überträgt, wurde zunächst ein *Pulldown* durchgeführt mit den Zusätzen Zink, GTP und Magnesium. FolE_{IB2} und CobW₁ konnten in gleichen Konzentrationen in der Elution visualisiert werden, was eine Interaktion unter diesen Bedingungen bestätigt (Abb. 33).

Um den Effekt des GTP und des Magnesiums auf die Interaktion zu testen, erfolgte in einem zweiten Ansatz der *Pulldown* ausschließlich mit Zink im Reaktionsansatz. Auch unter diesen Bedingungen waren FolE_{IB2} und CobW₁ nach mehreren Waschfraktionen ohne Verunreinigungen im Eluat nachweisbar (Abb. 34). Für die Interaktion beider Proteine ist demzufolge kein GTP notwendig, was die Frage offen lässt welche Funktion das Nukleotid hat. Um unspezifische Interaktionen auszuschließen, wurde das Experiment ohne Zusätze durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass es sich um eine Zink-abhängige Interaktion der Proteine FolE_{IB2} und CobW₁ handelt. Erste *Pulldown*-Experimente mit Kobalt und Mangan im Ansatz führten ebenfalls zu einer Interaktion, wobei sich beide Proteine nicht im gleichen Verhältnis im Eluat befanden (Daten nicht gezeigt). Diese Ansätze müssen jedoch reproduziert und per Western Blot bestätigt werden. Wenn sich dieses Ergebnis bestätigt, könnte die Bindung von Metallen an CobW₁ zu einer Konformationsänderung führen, die die Präsentation

der Interaktionsfläche zur Folge hat. Experimentell muss dies allerdings durch *size exclusion* Chromatographie, ITC und Kristallisation, sowie *cross linking* bestätigt werden. Erste Versuche auf der SEC lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, weswegen eine Validierung der Methodik erfolgen muss (Daten nicht gezeigt). Ein weiteres folgendes Experiment in diesem Zusammenhang ist die Bestätigung des Metalltransfers von CobW₁ auf FolE_{IB2}, einher gehend mit der Bestätigung einer FolE_{IB2}-Aktivität.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Interaktion auf CobW₁ beschränkt ist, indem der *Pulldown* mit CobW₂ und CobW₃ als *bait*-Proteinen wiederholt wurde. In den Coomassie-Blau-Färbungen ist eindeutig zu erkennen, dass auch diese beiden Chaperone unter Zugabe von Zink mit FolE_{IB2} interagieren, dabei ist kein Konzentrationsunterschied zwischen *bait*- und *prey*-Protein in der Elutionsfraktion zu erkennen. Dieses Ergebnis sollte ebenfalls in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden, welches die Interaktion, mit anschließendem Nachweis der Übertragung des Co-Faktors auf FolE_{IB2} zeigt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass CobW_{1/2/3} in ähnlichen Stoffwechselwegen im Zytoplasma agieren könnten. Es muss jedoch geprüft werden, ob auch alle ein Metallion übertragen können.

Aus den aufgestellten Thesen konnte das folgende Modell (Abb. 39) erstellt werden: Zur liegt nach der Reinigung als Apo-Protein mit 0.9 ± 0.2 mol Zink/mol Protein vor. Dieses entspricht dem strukturellen Zink. Bei Zinkmangel bindet Zur aufgrund der niedrigen intrazellulären Zinkkonzentration nicht an die Promotorbereiche, was zur Expression von *zur*, *zupT*, *cobW₁*, *cobW₂* und *cobW₃* führt. Unter diesen Bedingungen stellt ZupT den Import eines Minimums von 20 000 Zinkatomen/Zelle sicher und könnte dieses direkt an CobW₁ übergeben, welches essentielle Zink-abhängige Proteine beliefert, die für das Überleben des Organismus notwendig sind. Gezeigt werden konnte dies *in vitro* für FolE_{IB2}, welches ebenfalls nur unter Mangelbedingungen exprimiert wird und an der Synthese von Pterin-Co-Faktoren beteiligt ist (Nichol *et al.*, 1985). Unter dieser Bedingung sind CobW_{2/3} vermutlich nicht mit Zink beladen, da die Zinkspeicher in der Zelle aufgebraucht wurden. Steigt die interne Zinkkonzentration in der Zelle bindet Zur als intrazellulärer Sensor Zink und bindet als Repressor an die Zur-Bindeboxen, wobei die Expression von *cobW₁* zunächst reprimiert ist. ZupT sorgt bei leicht erhöhten Zinkkonzentrationen für die Aufnahme von Zink, welches durch CobW_{2/3} vermutlich gespeichert wird, um es an Targetproteine weiter zu geben. Aus den Daten wurde CobW₂ als möglicher primärer Speicher für Zink identifiziert und CobW₃ wirkt unterstützend und komplementierend. Steigt die Konzentration des Zinks in der Zelle weiter an, fungiert Zur als Repressor, reprimiert die Expression von *cobW_{2/3}* aber nicht vollständig. Demnach werden bei

steigenden Zinkkonzentrationen im Zytoplasma vermutlich alle Zinkbindestellen von CobW_{2/3} besetzt werden und CobW₃ sorgt durch die Belieferung von Effluxsystemen für die Aufrechterhaltung der Homöostase. Sowohl CobW₂ als auch CobW₃ sind bei dieser Bedingung vermutlich auch an der Übergabe von Zink auf Zink-abhängige Proteine verantwortlich.

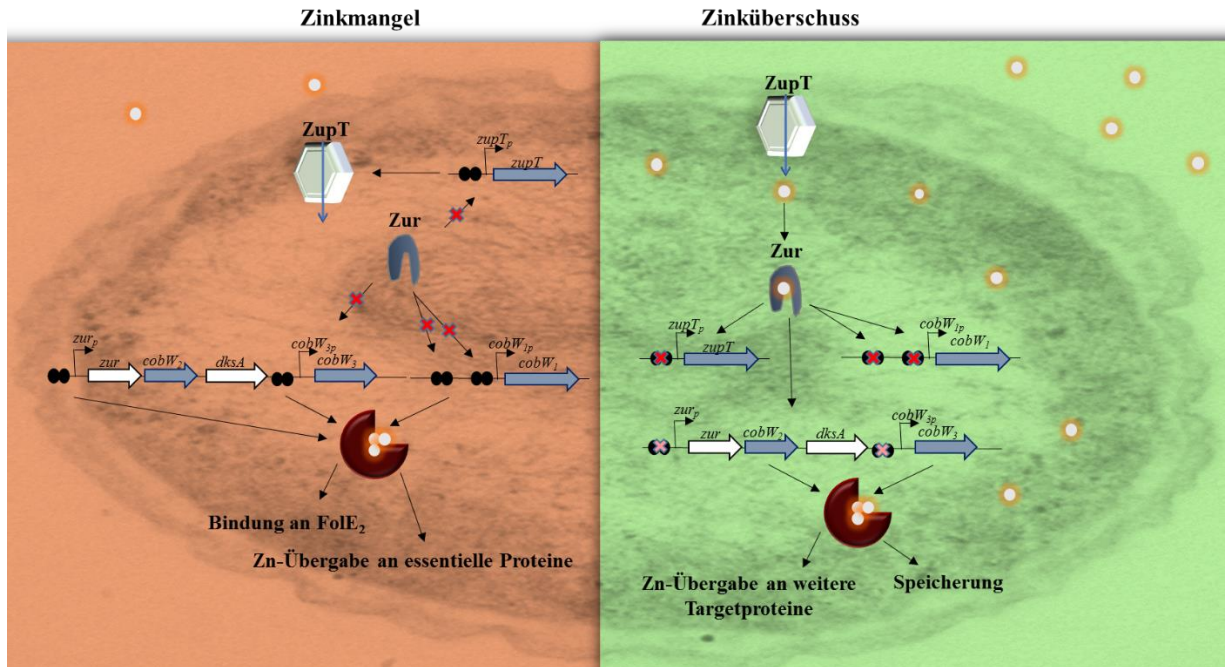


Abbildung 39: Darstellung der hypothesierten Funktionen der Chaperone CobW_{1/2/3} in der Zelle. Unter Zinkmangel (in rot) und bei Zinküberschuss (in grün) werden die Chaperone unterschiedlich stark exprimiert, was an der Regulation durch Zur liegt. Wenn in den Zellen ein Zinkmangel vorherrscht, werden alle Gene des Zur-Regulons exprimiert, da Zur kein funktionelles Zink gebunden hat. Zinküberschuss in der Zelle führt zur Repression der Gene, wobei *cobW₁* am stärksten reprimiert wird, gefolgt von *zurT* und den Genen des Zur-Clusters, welche konstitutiv exprimiert werden (TEM-Aufnahme Dr. N. Wiesemann und Dr. G. Hause).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Aspekte in der Zinkhomöostase des Modellorganismus *C. metallidurans* untersucht, die Aufschluss über das Zur-Regulon und dessen Funktion bei der Übergabe und Speicherung von Zink lieferten.

1. *cobW_{1/3}*, *zur* und *zupT* bilden ein Regulon, kontrolliert durch den Zinkaufnahmeregulator Zur, welcher im Promotorbereich der Gene bei steigenden intrazellulären Zinkkonzentrationen an die Zur-Bindeboxen bindet, die Expression reprimiert und unter Zinkmangel sich vom Bindemotiv löst. Diese Hypothese konnte in EMSA's und mit Hilfe von Reporterfusionen mit *lacZ* verifiziert werden.
2. Im Δ_{zur} erhöht sich der Zinkgehalt in den Zellen im Vergleich zum AE104 und ist im Stamm $\Delta_{zur} \phi(cobW_2::lacZ)299$ vermindert und sogar unterhalb des AE104 Gehaltes.
3. Die P-loop GTPasen CobW_{1/2/3} sind in *C. metallidurans* an der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase beteiligt. So kommt es durch die Deletion aller Chaperone im CH34 zu einer Zinksensitivität. Außerdem führen die Deletionen zu Nickel- und Kobalt sensitiven Phänotypen. Das veränderte Verhalten in Bezug zu diesen beiden Metallen zeigt sich auch in den verminderten Nickel- und Kobaltgehalten in den Zellen und lässt auf eine gestörte Metallhomöostase, einhergehend mit einer Fehlleitung der Metalle schließen. In den Stammhintergründen des AE104, Δ_{zupT} und Δ_{zur} konnten die gleichen Phänotypen beobachtet werden, wobei es keine Unterschiede im Metallgehalt gibt.
4. Eine Deletion eines oder mehrerer Gene des Zur-Regulons in der Effluxdeletionsmutante $\Delta e4$ hat in jedem Fall einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Cadmium, wobei der IC50-Wert um bis zu Faktor 10 vermindert ist.
5. Die Expression von *cadA* ist durch die Deletionen des *cobW₁*-Clusters und *cobW₃* bei Zugabe von Zink erhöht.
6. Proteinbiochemische Untersuchungen der Chaperone zeigten, dass CobW_{1/2/3} Zink mit hoher Affinität binden, wobei CobW₂ die höchste und CobW₁ die niedrigste Bindekapazität besitzt. Dieses Resultat konnte in Konkurrenzexperimenten mit Zincon und in Co-Faktorbestimmungen mittels ICP-MS ermittelt werden. Eine Veränderung

der Sekundär- und Tertiärstruktur durch die Bindung von Zink konnte durch CD-Spektroskopie nicht gezeigt werden.

7. Die Chaperone CobW_{1/2/3} interagieren *in vitro* mit FolE2, einem Protein aus der Folatbiosynthese, welches einen Metall-Co-Faktor benötigt und im *cobW*₁-Cluster kodiert ist. *Pulldown*-Experimente führten zur Bestätigung dieser These. Weitere mögliche Interaktionspartner konnte nicht identifiziert werden, allerdings wurden in *Pulldowns* mit den Chaperonen und dem Rohextrakt des Stammes Δ_{zur} mögliche Kandidaten gefunden.

6 Ausblick

Aufgrund der publizierten Zur-Bindeboxen von Haas *et al.*, 2009 konnten *in vitro* Untersuchungen zur Bindung von Zur vorgenommen werden, allerdings weisen die palindromischen Sequenzen in den Promotorbereichen der Gene Unterschiede auf, was auf variable Affinitäten hinweist. Um zu klären, welchen Einfluss einzelne Basenaustausche auf die Affinität haben, sollten Mutageneseexperimente durchgeführt werden. Dadurch ist eine Aufklärung der idealen Zur-Bindebox möglich. Zusätzlich zu den bisher durchgeführten EMSA könnten auch SRP- und ITC-Experimente durchgeführt werden, was eine Bestimmung der Bindungsaffinität ermöglichen würde. Bei SRP-Versuchen am Biacore wird eines der Moleküle, in diesem Fall Zur an einem Chip immobilisiert und der Analyt in verschiedenen Konzentrationen über die Probe gegeben. Änderungen an der Chip-Oberfläche können gemessen und analysiert werden (Myszka *et al.*, 1998; Jason-Moller *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu werden ITC-Messungen mit definierten Mengen an Liganden durchgeführt, die sich in Lösung befinden und zeitabhängig die Entstehung von Energie gemessen (Krell *et al.*, 2014).

Die Bestimmung der Bindeaffinität sollte allerdings auch für die Chaperone CobW_{1/2/3} erfolgen, indem mittels ITC die Bindung von Zink und anderen Metallen an die Proteine untersucht wird. Dies würde Aufschluss über die Spezifität und die Bindungsstärke liefern (Quinn *et al.*, 2016). Dieses Experiment geht einher mit der Erstellung von Punktmutationen zur Identifizierung der Metallbindestellen. Das ist jedoch nicht das einzige proteinbiochemische Experiment, welches noch getätigt werden muss. Bis zum derzeitigen Zeitpunkt ist die GTPase Funktion der Proteine nicht geklärt. Ob die Bindung von Zink, die Abgabe von Zink oder die Bindung eines Targetproteins zur Hydrolyse von GTP führt, konnte noch nicht geklärt werden. Da zeitabhängige Experimente bisher nicht funktionierten, weil die Autohydrolyse des GTP ein mögliches Signal der GTPase überlagerte, ist die Bestimmung von GTP, GDP und GMP beispielsweise mittels HPLC, wie von Rubio *et al.*, 2004 publiziert, eine Alternative. Eine quantitative Bestimmung mittels ICP-MS stellte sich aufgrund der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen als schwierig heraus, könnte allerdings unter Zuhilfenahme eines Element2 der ICP-MS Serie von Thermo Fisher erfolgen. Mit diesem Gerät ist es möglich in tieferen Bereichen zu messen. Auch die Diskriminierung zwischen GMP, GDP und GTP mittels HPLC ist eine Alternative für die Bestimmung des gebundenen Nukleotids (Hubertand Porath, 1980; Rubio *et al.*, 2004).

Im Zusammenhang mit der Nukleotidbestimmung sollte, wie bereits erwähnt, die Bindung an einen Interaktionspartner nicht außer Acht gelassen werden. Hierfür muss auch dieses Experiment validiert werden. Im Moment konnte eine Interaktion der Chaperone mit FolE_{IB2} ausschließlich mit einem *Pulldown* nachgewiesen werden. Durch Inkubation der beiden Proteine auf einer Gelfiltrationssäule mit variierenden Konditionen können die Bindungsbedingungen gefunden werden und durch zusätzliche Experimente ermittelt werden, ob das GTP hydrolysiert wurde. Anschließend muss der Trigger für die Freilassung des Targetproteins identifiziert werden. Um den Übergang von Zink auf das Targetprotein zu zeigen, könnten die Chaperone mit radioaktiv markiertem Zink beladen werden. Nach der Übertragung des Co-Faktors und dem Freilassen des Targetproteins, können die Proteine durch eine Chromatographie getrennt werden und das Zink in den Proteinen gemessen werden. Auch in diesem Fall würden die ITC-Messungen Aufschluss über die Bindungsstärken der Protein-Protein-Interaktion liefern (Damian, 2013). Nach der Übergabe des Co-Faktors an FolE_{IB2} müsste die Aktivität des Proteins bestimmt werden, was photometrisch durch den Umsatz von GTP erfolgen kann (Lehmann *et al.*, 2009).

Weitere Untersuchungen der Proteine können auf Basis einer Kristallstruktur erfolgen. Zu diesem Zweck müssten die gereinigten Proteine mit und ohne Bindung von Metall bzw. Nukleotiden oder Interaktionspartnern für die Kristallisation in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Stubbs durchgeführt werden. Dies würde Aufschluss über die Metallbindestellen, das Interaktionsface und die Konformation der Chaperone geben.

Nicht zu vergessen ist die Vervollständigung der physiologischen Daten mit sauberen Deletionsmutanten aller Gene der Chaperone und der Komplementation der möglicherweise auftretenden Phänotypen. Das experimentelle *Set up* beinhaltet Wachstumskurven, *Dose Response* und MIC, aber auch die Bestimmung des Metallgehalts und der Zinkaufnahmezeiten (Nies and Silver, 1989). Da EDTA Metallionen im extrazellulären Raum bindet, um den Mangel zu erzeugen, wären physiologische Experimente mit membrangängigen Chelatoren denkbar. Ein möglicher Kandidat wäre TPEN, welches mit den Chaperonen im Zytoplasma in Konkurrenz treten würde (Cho *et al.*, 2007). Wird davon ausgegangen, dass die Chaperone sich gegenseitig komplementieren können, dann müssen auch die fehlenden Reporterfusionen in den Einzel- und Doppeldeletionsmutanten gemessen werden. Da CobW_{1/2/3} mit FolE_{IB2} einem Protein der Folatbiosynthese interagieren, könnte in den Deletionsmutanten auch die Funktion des Enzyms getestet werden, wobei mittels HPLC die Reaktionsprodukte im Rohextrakt identifiziert werden können (Nakanishi *et al.*, 1990).

7 Literaturverzeichnis

- Andregg, G., E. Hubmann, G. P. Nitya and F. Wenk (1977).** Pyridinderivate als Komplexbildner. XI†. Die Thermodynamik der Metallkomplexbildung mit Bis-, Tris- und Tetrakis[(2-pyridyl)methyl]-aminen. *Helvetica Chimica Acta* **60**(1): 123-140.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini and A. Rosato (2006a).** Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* **5**(11): 3173-8.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini and A. Rosato (2006b).** Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* **5**(1): 196-201.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini, S. Elmi and A. Rosato (2007).** Non-heme iron through the three domains of life. *Proteins* **67**(2): 317-24.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini and A. Rosato (2008).** Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. *J Proteome Res* **7**(1): 209-16.
- Auerbach, G., A. Herrmann, A. Bracher, G. Bader, M. Gutlich, M. Fischer, M. Neukamm, M. Garrido-Franco, J. Richardson, H. Nar, R. Huber and A. Bacher (2000).** Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13567-72.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith and K. Struhl (1993).** Current protocols in molecular biology. *ec, Edition ed. Green. Publishing Associates and John Wiley and Sons Inc. New York.*
- Ballantine, S. P. and D. H. Boxer (1985).** Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**(2): 454-9.
- Banci, L., I. Bertini, R. Del Conte, J. Markey and F. J. Ruiz-Duenas (2001).** Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry* **40**(51): 15660-8.
- Banci, L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, R. Del Conte and L. Gonnelli (2003).** Understanding copper trafficking in bacteria: interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase CopA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **42**(7): 1939-49.
- Bauer, L. (2013).** Metall-Chaperone in *Cupriavidus metallidurans*. *Masterarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Beasley, F. C., J. Cheung and D. E. Heinrichs (2011).** Mutation of L-2,3-diaminopropionic acid synthase genes blocks staphyloferrin B synthesis in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* **11**(199).
- Beauchamp, C. and I. Fridovich (1971).** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**(1): 276-87.
- Bertini, I. and G. Cavallaro (2008).** Metals in the "omics" world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. *J Biol Inorg Chem* **13**(1): 3-14.
- Bhubhanil, S., P. Sittipo, P. Chaoprasid, S. Nookabkaew, R. Sukchawalit and S. Mongkolsuk (2014).** Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via zur and the zinc uptake genes *znuABC* and *zinT*. *Microbiology* **160**(Pt 11): 2452-63.

- Blaby-Haas, C. E., R. Furman, D. A. Rodionov, I. Artsimovitch and V. de Crecy-Lagard (2011).** Role of a Zn-independent DksA in Zn homeostasis and stringent response. *Mol Microbiol* **79**(3): 700-15.
- Blaby-Haas, C. E., J. A. Flood, V. Crecy-Lagard and D. B. Zamble (2012).** YeiR: a metal-binding GTPase from *Escherichia coli* involved in metal homeostasis. *Metallomics* **4**(5): 488-97.
- Blokesch, M., S. P. Albracht, B. F. Matzanke, N. M. Drapal, A. Jacobi and A. Bock (2004).** The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *J Mol Biol* **344**(1): 155-67.
- Boal, A. K. and A. C. Rosenzweig (2009).** Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev* **109**(10): 4760-79.
- Böhm, G., R. Muhr and R. Jaenicke (1992).** Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* **5**(3): 191-5.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick (1991).** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**(6305): 117-27.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**(248-254).
- Brocklehurst, K. R., J. L. Hobman, B. Lawley, L. Blank, S. J. Marshall, N. L. Brown and A. P. Morby (1999).** ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**(3): 893-902.
- Bucheder, F. and E. Broda (1974).** Energy-dependent zinc transport by *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **45**(2): 555-9.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez and S. J.M. (1987).** XL1 Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galactosidas selection. *BioTechniques* **5**(376-78).
- Bütöf, L., C. Schmidt-Vogler, M. Herzberg, C. Grosse and D. H. Nies (2017).** The components of the unique Zur regulon of *Cupriavidus metallidurans* mediate cytoplasmic zinc handling. *J Bacteriol* **199**(21): 1-20.
- Cai, F., T. T. Ngu, H. Kaluarachchi and D. B. Zamble (2011).** Relationship between the GTPase, metal-binding, and dimerization activities of *E. coli* HypB. *J Biol Inorg Chem* **16**(6): 857-68.
- Chanfreau, G. F. (2013).** Zinc'ing down RNA polymerase I. *Transcription* **4**(5): 217-20.
- Chaoprasid, P., T. Dokpikul, J. Johnrod, S. Sirirakphaisarn, S. Nookabkaew, R. Sukchawalit and S. Mongkolsuk (2016).** *Agrobacterium tumefaciens* Zur Regulates the High-Affinity Zinc Uptake System TroCBA and the Putative Metal Chaperone YciC, along with ZinT and ZnuABC, for Survival under Zinc-Limiting Conditions. *Appl Environ Microbiol* **82**(12): 3503-14.
- Cho, Y. E., R. A. Lomeda, S. H. Ryu, J. H. Lee, J. H. Beattie and I. S. Kwun (2007).** Cellular Zn depletion by metal ion chelators (TPEN, DTPA and chelex resin) and its application to osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutr Res Pract* **1**(1): 29-35.
- Choi, S. and A. J. Bird (2014).** Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics* **6**(7): 1198-215.

- Choi, S. H., K. L. Lee, J. H. Shin, Y. B. Cho, S. S. Cha and J. H. Roe (2017).** Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by Zur. *Nat Commun* **8**(15812).
- Collard, J. M., P. Corbisier, L. Diels, Q. Dong, C. Jeanthon, M. Mergeay, S. Taghavi, D. van der Lelie, A. Wilmotte and S. Wuertz (1994).** Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications. *FEMS Microbiol Rev* **14**(4): 405-14.
- Colvin, R. A., W. R. Holmes, C. P. Fontaine and W. Maret (2010).** Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics* **2**(5): 306-17.
- Crooks, G. E., G. Hon, J. M. Chandonia and S. E. Brenner (2004).** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**(6): 1188-90.
- Crouzet, J., S. Levy-Schil, B. Cameron, L. Cauchois, S. Rigault, M. C. Rouyez, F. Blanche, L. Debussche and D. Thibaut (1991).** Nucleotide sequence and genetic analysis of a 13.1-kilobase-pair *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing five cob genes and identification of structural genes encoding Cob(D)alamin adenosyltransferase, cobyrinic acid synthase, and bifunctional cobinamide kinase-cobinamide phosphate guanylyltransferase. *J Bacteriol* **173**(19): 6074-87.
- Cruz, K. J., J. B. Morais, A. R. de Oliveira, J. S. Severo and D. D. Marreiro (2017).** The Effect of Zinc Supplementation on Insulin Resistance in Obese Subjects: a Systematic Review. *Biol Trace Elem Res* **176**(2): 239-243.
- Culotta, V. C., L. W. Klomp, J. Strain, R. L. Casareno, B. Krems and J. D. Gitlin (1997).** The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**(38): 23469-72.
- Culotta, V. C., M. Yang and T. V. O'Halloran (2006).** Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* **1763**(7): 747-58.
- Cvetkovic, A., A. L. Menon, M. P. Thorgersen, J. W. Scott, F. L. Poole, 2nd, F. E. Jenney, Jr., W. A. Lancaster, J. L. Praissman, S. Shanmukh, B. J. Vaccaro, S. A. Trauger, E. Kalisiak, J. V. Apon, G. Siuzdak, S. M. Yannone, J. A. Tainer and M. W. Adams (2010).** Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* **466**(7307): 779-82.
- Dagert, M. and S. D. Ehrlich (1979).** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**(1): 23-8.
- Dalbey, R. E., M. Chen, F. Jiang and J. C. Samuelson (2000).** Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 435-42.
- Dalet, K., E. Gouin, Y. Cenatiempo, P. Cossart and Y. Hechard (1999).** Characterisation of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **174**(1): 111-6.
- Damian, L. (2013).** Isothermal titration calorimetry for studying protein-ligand interactions. *Methods Mol Biol* **1008**(103-18).
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay and D. Nies (1985).** Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch Int Physiol Biochim* **93**(27-28).
- Dudev, T. and C. Lim (2014).** Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins. *Chem Rev* **114**(1): 538-56.

- El Yacoubi, B., S. Bonnett, J. N. Anderson, M. A. Swairjo, D. Iwata-Reuyl and V. de Crecy-Lagard (2006).** Discovery of a new prokaryotic type I GTP cyclohydrolase family. *J Biol Chem* **281**(49): 37586-93.
- Ellison, M. L., J. M. Farrow, 3rd, W. Parrish, A. S. Danell and E. C. Pesci (2013).** The transcriptional regulator Np20 is the zinc uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**(9): e75389.
- Enoch, H. G. and R. L. Lester (1975).** The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250**(17): 6693-705.
- Farrugia, M. A., L. Macomber and R. P. Hausinger (2013).** Biosynthesis of the Urease Metallocenter. *J Biol Chem* **288**(19): 13178-85.
- Fernandes, S., B. Geueke, O. Delgado, J. Coleman and R. Hatti-Kaul (2002).** Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**(3): 313-21.
- Finney, L. A. and T. V. O'Halloran (2003).** Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**(5621): 931-6.
- Fong, Y. H., H. C. Wong, M. H. Yuen, P. H. Lau, Y. W. Chen and K. B. Wong (2013).** Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins facilitate maturation of *Helicobacter pylori* urease. *PLoS Biol* **11**(10): e1001678.
- Forzi, L. and R. G. Sawers (2007).** Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biomaterials* **20**(3-4): 565-78.
- Foster, A. W., D. Osman and N. J. Robinson (2014).** Metal preferences and metallation. *J Biol Chem* **289**(41): 28095-103.
- Fridovich, I. (1986).** Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **247**(1): 1-11.
- Fu, C. and R. J. Maier (1994).** Nucleotide sequences of two hydrogenase-related genes (hypA and hypB) from *Bradyrhizobium japonicum*, one of which (hypB) encodes an extremely histidine-rich region and guanine nucleotide-binding domains. *Biochim Biophys Acta* **1184**(1): 135-8.
- Fu, C., J. W. Olson and R. J. Maier (1995).** HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *PNAS* **92**(6): 2333-7.
- Furukawa, Y., A. S. Torres and T. V. O'Halloran (2004).** Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* **23**(14): 2872-81.
- Gaballa, A. and J. D. Helmann (1998).** Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**(22): 5815-21.
- Gaballa, A., T. Wang, R. W. Ye and J. D. Helmann (2002).** Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J Bacteriol* **184**(23): 6508-14.
- Gabriel, S. E., F. Miyagi, A. Gaballa and J. D. Helmann (2008).** Regulation of the *Bacillus subtilis* *yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *J Bacteriol* **190**(10): 3482-8.

- Gasymov, O. K., A. R. Abduragimov and B. J. Glasgow (2014).** Probing tertiary structure of proteins using single Trp mutations with circular dichroism at low temperature. *J Phys Chem B* **118**(4): 986-95.
- Giedroc, D. P. and A. I. Arunkumar (2007).** Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans* 3107-20.
- Gilston, B. A., S. Wang, M. D. Marcus, M. A. Canalizo-Hernandez, E. P. Swindell, Y. Xue, A. Mondragon and T. V. O'Halloran (2014).** Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biol* **12**(11): e1001987.
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke and D. H. Nies (1999).** Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem* **274**(37): 26065-70.
- Goris, J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diels, M. Mergeay, K. Kersters and P. Vandamme (2001).** Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 5): 1773-82.
- Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith and C. Rensing (2002).** ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**(3): 864-6.
- Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire and C. Rensing (2005).** The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**(5): 1604-11.
- Greenfield, N. J. (2006).** Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* **1**(6): 2876-90.
- Griffith, K. L. and R. E. Wolf, Jr. (2002).** Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 397-402.
- Grosse, C., M. Herzberg, M. Schüttau, N. Wiesemann, G. Hause and D. H. Nies (2016).** Characterization of the $\Delta 7$ Mutant of *Cupriavidus metallidurans* with Deletions of Seven Secondary Metal Uptake Systems. *mSystems* **1**(1):
- Haas, C. E., D. A. Rodionov, J. Kropat, D. Malasarn, S. S. Merchant and V. de Crecy-Lagard (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): 239-49.
- Hantke, K. (2005).** Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* **8**(2): 196-202.
- Haraguchi, H. (2004).** Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom* **19**(5-14).
- Hassan, H. M. and I. Fridovich (1977).** Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **129**(3): 1574-83.
- Heldt, D., A. D. Lawrence, M. Lindenmeyer, E. Deery, P. Heathcote, S. E. Rigby and M. J. Warren (2005).** Aerobic synthesis of vitamin B12: ring contraction and cobalt chelation. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 815-9.
- Hengen, P. (1995).** Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* **20**(7): 285-6.

- Hers, H. G. (1983).** Fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem Soc Trans* **11**(3): 250-1.
- Herzberg, M., L. Bauer and D. H. Nies (2014a).** Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* **6**(3): 421-36.
- Herzberg, M., D. Dobritzsch, S. Helm, S. Baginsky and D. H. Nies (2014b).** The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **6**(11): 2157-65.
- Herzberg, M., M. Schuttau, M. Reimers, C. Grosse, S. Hans Gunther and D. H. Nies (2015).** Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands. *Metallomics* **7**(4): 632-49.
- Herzberg, M., L. Bauer, A. Kirsten and D. H. Nies (2016).** Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **8**(3): 313-26.
- Hilario, E., I. Romero and H. Celis (1990).** Determination of the physicochemical constants and spectrophotometric characteristics of the metallochromic Zincon and its potential use in biological systems. *J Biochem Biophys Methods* **21**(3): 197-207.
- Hitomi, Y., C. E. Outten and T. V. O'Halloran (2001).** Extreme zinc-binding thermodynamics of the metal sensor/regulator protein, ZntR. *J Am Chem Soc* **123**(35): 8614-5.
- Houghton, L. A., W. R. Parnell, C. D. Thomson, T. J. Green and R. S. Gibson (2016).** Serum Zinc Is a Major Predictor of Anemia and Mediates the Effect of Selenium on Hemoglobin in School-Aged Children in a Nationally Representative Survey in New Zealand. *J Nutr* **146**(9): 1670-6.
- Huang, D. L., D. J. Tang, Q. Liao, H. C. Li, Q. Chen, Y. Q. He, J. X. Feng, B. L. Jiang, G. T. Lu, B. Chen and J. L. Tang (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 Res* **36**(13): 4295-309.
- Hubert, P. and J. Porath (1980).** Metal chelate affinity chromatography. I. Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds. *J Chromatogr* **198**(3): 247-55.
- Igic, P. G., E. Lee, W. Harper and K. W. Roach (2002).** Toxic effects associated with consumption of zinc. *Mayo Clin Proc* **77**(7): 713-6.
- Imlay, J. A. (2008).** Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* **77**(755-76).
- Irving, H. and R. J. P. Williams (1948).** Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* **162**(4123): 746-747.
- Janssen, P. J., R. Van Houdt, H. Moors, P. Monsieurs, N. Morin, A. Michaux, M. A. Benotmane, N. Leys, T. Vallaes, A. Lapidus, S. Monchy, C. Medigue, S. Taghavi, S. McCorkle, J. Dunn, D. van der Lelie and M. Mergeay (2010).** The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* **5**(5): e10433.
- Jason-Moller, L., M. Murphy and J. Bruno (2006).** Overview of Biacore systems and their applications. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 19*(Unit 19 13).
- Johnson, D. C., D. R. Dean, A. D. Smith and M. K. Johnson (2005).** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**(247-81).

- Kaluarachchi, H., M. Altenstein, S. R. Sugumar, J. Balbach, D. B. Zamble and C. Haupt (2012).** Nickel binding and [NiFe]-hydrogenase maturation by the metallochaperone SlyD with a single metal-binding site in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **417**(1-2): 28-35.
- Karimova, G., E. Gaudiard, M. Davi, S. P. Ouellette and D. Ladant (2017).** Protein-Protein Interaction: Bacterial Two-Hybrid. *Methods Mol Biol* **1615**(159-176).
- Katzenmeier, G., C. Schmid, J. Kellermann, F. Lottspeich and A. Bacher (1991).** Biosynthesis of tetrahydrofolate. Sequence of GTP cyclohydrolase I from *Escherichia coli*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**(11): 991-7.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes and A. Drummond (2012).** Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**(12): 1647-9.
- Kelley, L. A. and M. J. Sternberg (2009).** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**(3): 363-71.
- Kenworthy, A. K. (2001).** Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**(3): 289-96.
- Khil, P. P., G. Obmolova, A. Teplyakov, A. J. Howard, G. L. Gilliland and R. D. Camerini-Otero (2004).** Crystal structure of the *Escherichia coli* YjiA protein suggests a GTP-dependent regulatory function. *Proteins* **54**(2): 371-4.
- Kim, J. K., S. B. Mulrooney and R. P. Hausinger (2005).** Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. *J Bacteriol* **187**(20): 7150-4.
- Kirsten, A., M. Herzberg, A. Voigt, J. Seravalli, G. Grass, J. Scherer and D. H. Nies (2011).** Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **193**(18): 4652-63.
- Kocyla, A., A. Pomorski and A. Krezel (2017).** Molar absorption coefficients and stability constants of Zincon metal complexes for determination of metal ions and bioinorganic applications. *J Inorg Biochem* **176**(53-65).
- Koonin, E. V., Y. I. Wolf and L. Aravind (2000).** Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem* **54**(245-75).
- Krell, T., J. Lacal, C. Garcia-Fontana, H. Silva-Jimenez, M. Rico-Jimenez, A. C. Lugo, J. A. Darias and J. L. Ramos (2014).** Characterization of molecular interactions using isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol* **1149**(193-203).
- Krezel, A. and W. Maret (2007).** Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *J Am Chem Soc* **129**(35): 10911-21.
- Kuchar, J. and R. P. Hausinger (2004).** Biosynthesis of metal sites. *Chem Rev* **104**(2): 509-25.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**(7): 1870-4.
- Kurtz, D. M., Jr. (1999).** Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. *Essays Biochem* **34**(85-100).
- Lacasse, M. J., C. D. Douglas and D. B. Zamble (2016).** Mechanism of Selective Nickel Transfer from HypB to HypA, *Escherichia coli* [NiFe]-Hydrogenase Accessory Proteins. *Biochemistry* **55**(49): 6821-6831.

- Lacasse, M. J. and D. B. Zamble (2016).** [NiFe]-Hydrogenase Maturation. *Biochemistry* **55**(12): 1689-701.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lamb, A. L., A. K. Wernimont, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O'Halloran and A. C. Rosenzweig (1999).** Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* **6**(8): 724-9.
- Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, P. S. Reinach and O. A. Candia (1979).** An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* **100**(1): 95-7.
- Leach, M. R., S. Sandal, H. Sun and D. B. Zamble (2005).** Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB. *Biochemistry* **44**(36): 12229-38.
- Leach, M. R. and D. B. Zamble (2007).** Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **11**(2): 159-65.
- Leach, M. R., J. W. Zhang and D. B. Zamble (2007).** The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* **282**(22): 16177-86.
- Lee, J. W. and J. D. Helmann (2007).** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**(3-4): 485-99.
- Lee, M. S., G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case and P. E. Wright (1989).** Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* **245**(4918): 635-7.
- Legatzki, A., G. Grass, A. Anton, C. Rensing and D. H. Nies (2003).** Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol* **185**(15): 4354-61.
- Lehmann, M., S. Degen, H. P. Hohmann, M. Wyss, A. Bacher and N. Schramek (2009).** Biosynthesis of riboflavin. Screening for an improved GTP cyclohydrolase II mutant. *FEBS J* **276**(15): 4119-29.
- Leipe, D. D., Y. I. Wolf, E. V. Koonin and L. Aravind (2002).** Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**(1): 41-72.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Dervedde, M. Eitinger and B. Friedrich (1994).** The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* **176**(14): 4385-93.
- Li, Y. and W. Maret (2009).** Transient fluctuations of intracellular zinc ions in cell proliferation. *Exp Cell Res* **315**(14): 2463-70.
- Li, Y., Y. Qiu, H. Gao, Z. Guo, Y. Han, Y. Song, Z. Du, X. Wang, D. Zhou and R. Yang (2009).** Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* **9**(128).
- Lindsay, J. A. and S. J. Foster (2001).** *zur*: a Zn(2+)-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **147**(Pt 5): 1259-66.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-75.

- Ma, Z., S. E. Gabriel and J. D. Helmann (2011).** Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res* **39**(21): 9130-8.
- Maier, T., A. Jacobi, M. Sauter and A. Bock (1993).** The product of the *hypB* gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein. *J Bacteriol* **175**(3): 630-5.
- Maier, T., F. Lottspeich and A. Bock (1995).** GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**(1): 133-8.
- Malle, K.-G. (1992).** Zink in der Umwelt. *Acta hydrochim. hydrobiol.* **20**(4):
- Mandelli, F., J. P. Franco Cairo, A. P. Citadini, F. Buchli, T. M. Alvarez, R. J. Oliveira, V. B. Leite, A. F. Paes Leme, A. Z. Mercadante and F. M. Squina (2013).** The characterization of a thermostable and cambialistic superoxide dismutase from *Thermus filiformis*. *Lett Appl Microbiol* **57**(1): 40-6.
- Maret, W. (2013a).** Zinc and the zinc proteome. *Met Ions Life Sci* **12**(479-501).
- Maret, W. (2013b).** Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* **4**(1): 82-91.
- Maret, W. (2016).** Metallomics: A Prime of Integrated Biometal Sciences. *New Jersey: Imperial College Press*
- Maret, W. (2017).** Zinc in Pancreatic Islet Biology, Insulin Sensitivity, and Diabetes. *Prev Nutr Food Sci* **22**(1): 1-8.
- Markov, D., T. Naryshkina, A. Mustaeu and K. Severinov (1999).** A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev* **13**(18): 2439-48.
- Martin, M. E., B. R. Byers, M. O. Olson, M. L. Salin, J. E. Arceneaux and C. Tolbert (1986).** A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J Biol Chem* **261**(20): 9361-7.
- Marx, C. J. and M. E. Lidstrom (2002).** Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques* **33**(5): 1062-7.
- McCord, J. M., B. B. Keele, Jr. and I. Fridovich (1971).** An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(5): 1024-7.
- Mehta, N., S. Benoit and R. J. Maier (2003).** Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb Pathog* **35**(5): 229-34.
- Mergeay, M., C. Houba and J. Gerits (1978).** Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas* [proceedings]. *Arch Int Physiol Biochim* **86**(2): 440-2.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles and F. Van Gijsegem (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* **162**(1): 328-34.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie and R. Wattiez (2003).** *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 385-410.

- Miller, J., A. D. McLachlan and A. Klug (1985).** Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J* **4**(6): 1609-14.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Miller, J. H. (1992).** A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Monchy, S., M. A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. van der Lelie and M. Mergeay (2007).** Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol* **189**(20): 7417-25.
- Monsieurs, P., H. Moors, R. Van Houdt, P. J. Janssen, A. Janssen, I. Coninx, M. Mergeay and N. Leys (2011).** Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals* **24**(6): 1133-51.
- Munkelt, D., G. Grass and D. H. Nies (2004).** The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* **186**(23): 8036-43.
- Murakami, K. S. (2013).** X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} holoenzyme. *J Biol Chem* **288**(13): 9126-34.
- Myszka, D. G., X. He, M. Dembo, T. A. Morton and B. Goldstein (1998).** Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys J* **75**(2): 583-94.
- Nakanishi, N., S. Ozawa, M. Iwanaga, I. Akatsuka, E. Sawada, R. Asaumi, H. Hasegawa and S. Yamada (1990).** Simultaneous determination of GTP cyclohydrolase activity and biopterin content in pheochromocytoma PC12h cells. *Meikai Daigaku Shigaku Zasshi* **19**(2): 197-203.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley and S. J. Upton (1994).** A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**(3): 239-42.
- Nichol, C. A., G. K. Smith and D. S. Duch (1985).** Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu Rev Biochem* **54**(729-64).
- Nies, D. H. and S. Silver (1989).** Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171**(2): 896-900.
- Nies, D. H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(6): 730-50.
- Nies, D. H. *Essential and Toxic Effects of Elements on Microorganisms*,** in *Elements and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*, ed. E. Merian, M. Anke, M. Ihnat and M. Stoeppler, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2004, part II.1.
- Nies, D. H. and G. Grass (2009).** Transition Metal Homeostasis. *EcoSal Plus* **3**(2):
- Nies, D. H. (2016).** The biological chemistry of the transition metal "transportome" of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **8**(5): 481-507.
- Nikaido, H. (1992).** Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol Microbiol* **6**(4): 435-42.

- Nikaido, H. and M. H. Saier, Jr. (1992).** Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258**(5084): 936-42.
- Nriagu, J. O. Part I, Ecological cycling,** in Zinc in the environment, ed. J. O. Nriagu, John Wiley, New York, 1980.
- Ogiso, T., N. Ogawa and T. Miura (1979).** Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats. II. Binding of copper and zinc to cytosol proteins in the intestinal mucosa. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **27**(2): 515-21.
- Olson, J. W., C. Fu and R. J. Maier (1997).** The HypB protein from Bradyrhizobium japonicum can store nickel and is required for the nickel-dependent transcriptional regulation of hydrogenase. *Mol Microbiol* **24**(1): 119-28.
- Outten, C. E. and T. V. O'Halloran (2001).** Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**(5526): 2488-92.
- Outten, C. E., D. A. Tobin, J. E. Penner-Hahn and T. V. O'Halloran (2001).** Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* **40**(35): 10417-23.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray (1995).** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**(11): 2411-23.
- Pace, C. N. and J. M. Scholtz (1997).** Measuring the Conformational Stability of a Protein by Hydrogen Exchange. *Protein structure: a practical approach*. IRL press, Oxford, UK 299-322.
- Padilla-Benavides, T., C. J. McCann and J. M. Arguello (2013).** The mechanism of Cu⁺ transport ATPases: interaction with Cu⁺ chaperones and the role of transient metal-binding sites. *J Biol Chem* **288**(1): 69-78.
- Padovani, D., T. Labunska and R. Banerjee (2006).** Energetics of interaction between the G-protein chaperone, MeaB, and B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase. *J Biol Chem* **281**(26): 17838-44.
- Palumaa, P. (2013).** Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett* **587**(13): 1902-10.
- Paracelsus, T. (1529/30).** Das Buch Paragranum - Septem Defensiones. *Wissenschaftliche Buchgesellschaft Darmstadt*
- Passerini, A., M. Lippi and P. Frasconi (2011).** MetalDetector v2.0: predicting the geometry of metal binding sites from protein sequence. *Nucleic Acids Res* **39**(Web Server issue): W288-92.
- Patzer, S. I. and K. Hantke (1998).** The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**(6): 1199-210.
- Patzer, S. I. and K. Hantke (2000).** The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(32): 24321-32.
- Paul, B. J., M. M. Barker, W. Ross, D. A. Schneider, C. Webb, J. W. Foster and R. L. Gourse (2004).** DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**(3): 311-22.

- Pawlik, M. C., K. Hubert, B. Joseph, H. Claus, C. Schoen and U. Vogel (2012).** The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *J Bacteriol* **194**(23): 6594-603.
- Peroza, E. A., A. A. Kaabi, W. Meyer-Klaucke, G. Wellenreuther and E. Freisinger (2009).** The two distinctive metal ion binding domains of the wheat metallothionein Ec-1. *J Inorg Biochem* **103**(3): 342-53.
- Pfennig, N. (1974).** *Rhodospseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol.* **100**(1): 197-206.
- Plum, L. M., L. Rink and H. Haase (2010).** The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health* **7**(4): 1342-65.
- Potrykus, K. and M. Cashel (2008).** (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62**(35-51).
- Quinn, C. F., M. C. Carpenter, M. L. Croteau and D. E. Wilcox (2016).** Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Metal Ions Binding to Proteins. *Methods Enzymol* **567**(3-21).
- Rabilloud, T., G. Carpentier and P. Tarroux (1988).** Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9**(6): 288-91.
- Rebelo, J., G. Auerbach, G. Bader, A. Bracher, H. Nar, C. Hosl, N. Schramek, J. Kaiser, A. Bacher, R. Huber and M. Fischer (2003).** Biosynthesis of pteridines. Reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *J Mol Biol* **326**(2): 503-16.
- Remaut, H., N. Safarov, S. Ciurli and J. Van Beeumen (2001).** Structural basis for Ni(2+) transport and assembly of the urease active site by the metallochaperone UreE from *Bacillus pasteurii*. *J Biol Chem* **276**(52): 49365-70.
- Rensing, C., T. Pribyl and D. H. Nies (1997).** New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol* **179**(22): 6871-9.
- Robinson, N. J. and D. R. Winge (2010).** Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**(537-62).
- Rubio, I., R. Pusch and R. Wetzker (2004).** Quantification of absolute Ras-GDP/GTP levels by HPLC separation of Ras-bound [(32)P]-labelled nucleotides. *J Biochem Biophys Methods* **58**(2): 111-7.
- Sabel, C. E., J. M. Neureuther and S. Siemann (2010).** A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Anal Biochem* **397**(2): 218-26.
- Saier, M. H., Jr., C. V. Tran and R. D. Barabote (2006).** TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D181-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. . *Cold Spring Harbor, New York*.
- Sankaran, B., S. A. Bonnett, K. Shah, S. Gabriel, R. Reddy, P. Schimmel, D. A. Rodionov, V. de Crecy-Lagard, J. D. Helmann, D. Iwata-Reuyl and M. A. Swairjo (2009).** Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. *J Bacteriol* **191**(22): 6936-49.
- Saraste, M., P. R. Sibbald and A. Wittinghofer (1990).** The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**(11): 430-4.

- Scheffzek, K. and M. R. Ahmadian (2005).** GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* **62**(24): 3014-38.
- Scherer, J. and D. H. Nies (2009).** CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Mol Microbiol* **73**(4): 601-21.
- Schirrmeister, S. (2015).** Die Transkriptionsregulatoren DksAs in *Cupriavidus metallidurans*. *Masterarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Schmidt, C., C. Schwarzenberger, C. Grosse and D. H. Nies (2014).** FurC regulates expression of *zupT* for the central zinc importer ZupT of *Cupriavidus metallidurans*. *J Bacteriol* **196**(19): 3461-71.
- Schmidt, C. (2016).** Die Zur- und ZntR-vermittelte Regulation der Zinktransportsysteme in *Cupriavidus metallidurans*. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Schröder, J., N. Jochmann, D. A. Rodionov and A. Tauch (2010).** The Zur regulon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* **11**(12).
- Schroeder, S., A. D. Lawrence, R. Biedendieck, R. S. Rose, E. Deery, R. M. Graham, K. J. McLean, A. W. Munro, S. E. Rigby and M. J. Warren (2009).** Demonstration that CobG, the monooxygenase associated with the ring contraction process of the aerobic cobalamin (vitamin B12) biosynthetic pathway, contains an Fe-S center and a mononuclear non-heme iron center. *J Biol Chem* **284**(8): 4796-805.
- Schüttau, M. (2013).** Screening von Disruptionsmutanten nach unbekanntem Zinktransportern in *Cupriavidus metallidurans*. *Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Schwarz, D., F. Junge, F. Durst, N. Frolich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dotsch and F. Bernhard (2007a).** Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc* **2**(11): 2945-57.
- Schwarz, D., C. Klammt, A. Koglin, F. Lohr, B. Schneider, V. Dotsch and F. Bernhard (2007b).** Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods* **41**(4): 355-69.
- Schwarzenberger, C. (2007).** Eisenaufnahmesysteme in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Schwuchow, T. (1995).** Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Shi, W. and M. R. Chance (2008).** Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol Life Sci* **65**(19): 3040-8.
- Shin, J. H., S. Y. Oh, S. J. Kim and J. H. Roe (2007).** The zinc-responsive regulator Zur controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **189**(11): 4070-7.
- Shin, J. H. and J. D. Helmann (2016).** Molecular logic of the Zur-regulated zinc deprivation response in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun* **7**(12612).
- Sillen, L. G. and A. E. Martell (1971).** Stability Constants of Metal-Ion Complexes. *Special Publication No. 25. The Chemical Society, Burlington House; London 733-735.*

- Simon R, P. U., Pühler A (1983).** A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature Biotechnologie* **1**(784-791).
- Smith, K. F., L. A. Bibb, M. P. Schmitt and D. M. Oram (2009).** Regulation and activity of a zinc uptake regulator, Zur, in *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **191**(5): 1595-603.
- Song, H. K., S. B. Mulrooney, R. Huber and R. P. Hausinger (2001).** Crystal structure of *Klebsiella aerogenes* UreE, a nickel-binding metallochaperone for urease activation. *J Biol Chem* **276**(52): 49359-64.
- Soriano, A., G. J. Colpas and R. P. Hausinger (2000).** UreE stimulation of GTP-dependent urease activation in the UreD-UreF-UreG-urease apoprotein complex. *Biochemistry* **39**(40): 12435-40.
- Strickland, E. H. (1974).** Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **2**(1): 113-75.
- Stripp, S. T., B. Soboh, U. Lindenstrauss, M. Brausseman, M. Herzberg, D. H. Nies, R. G. Sawers and J. Heberle (2013).** HypD is the scaffold protein for Fe-(CN)₂CO cofactor assembly in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Biochemistry* **52**(19): 3289-96.
- Sun, G. and R. J. Budde (1999).** Substitution studies of the second divalent metal cation requirement of protein tyrosine kinase CSK. *Biochemistry* **38**(17): 5659-65.
- Sydor, A. M., M. Jost, K. S. Ryan, K. E. Turo, C. D. Douglas, C. L. Drennan and D. B. Zamble (2013).** Metal binding properties of *Escherichia coli* YjiA, a member of the metal homeostasis-associated COG0523 family of GTPases. *Biochemistry* **52**(10): 1788-1801.
- Szpunar, J. (2005).** Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* **130**(4): 442-65.
- Taghavi, S., M. Mergeay and D. van der Lelie (1997).** Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid* **37**(1): 22-34.
- Tang, D. J., X. J. Li, Y. Q. He, J. X. Feng, B. Chen and J. L. Tang (2005).** The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**(7): 652-8.
- Taudte, N. (2010).** Eisen und Mangan: Wechselwirkungen und Homöostase in *Escherichia coli* mit dem Schwerpunkt ZupT. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Taudte, N. and G. Grass (2010).** Point mutations change specificity and kinetics of metal uptake by ZupT from *Escherichia coli*. *Biometals* **23**(4): 643-56.
- Teramoto, H., M. Inui and H. Yukawa (2012).** *Corynebacterium glutamicum* Zur acts as a zinc-sensing transcriptional repressor of both zinc-inducible and zinc-repressible genes involved in zinc homeostasis. *FEBS J* **279**(23): 4385-97.
- Ternes, W.** *Biochemie der Elemente: Anorganische Chemie biologischer Prozesse*, in ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- Tsaneva, I. R. and B. Weiss (1990).** *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**(8): 4197-205.
- Vahrenkamp, H. (1973).** Metalle in Lebensprozessen. . *Chemie in unserer Zeit* **4**(97-105).

- Vallee, B. L. and W. E. C. Wacker.** *Composition, Structure and Function*, in *Proteins: Metalloproteins*, ed. H. Neurath, New York-London, 1970.
- van den Berg, S., P. A. Lofdahl, T. Hard and H. Berglund (2006).** Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J Biotechnol* **121**(3): 291-8.
- Vandamme, P. and T. Coenye (2004).** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 6): 2285-9.
- Vaneechoutte, M., P. Kampfer, T. De Baere, E. Falsen and G. Verschraegen (2004).** *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 2): 317-27.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001).** The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**(5545): 1299-304.
- von Rozycki, T. and D. H. Nies (2009).** *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**(2): 115-39.
- Waldron, K. J. and N. J. Robinson (2009).** How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* **7**(1): 25-35.
- Waldron, K. J., J. C. Rutherford, D. Ford and N. J. Robinson (2009).** Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**(7257): 823-30.
- Watanabe, S., T. Arai, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka and K. Miki (2009).** Crystal structure of HypA, a nickel-binding metallochaperone for [NiFe] hydrogenase maturation. *J Mol Biol* **394**(3): 448-59.
- Watanabe, S., D. Sasaki, T. Tominaga and K. Miki (2012).** Structural basis of [NiFe] hydrogenase maturation by Hyp proteins. *Biol Chem* **393**(10): 1089-100.
- Watanabe, S., T. Kawashima, Y. Nishitani, T. Kanai, T. Wada, K. Inaba, H. Atomi, T. Imanaka and K. Miki (2015).** Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe] hydrogenase by Ni-metallochaperone HypA and its enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(25): 7701-6.
- Weber, K. and M. Osborn (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**(16): 4406-12.
- Wellenreuther, G., M. Cianci, R. Tucoulou, W. Meyer-Klaucke and H. Haase (2009).** The ligand environment of zinc stored in vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **380**(1): 198-203.
- Westenberg, D. J. and M. L. Guerinot (1997).** Regulation of bacterial gene expression by metals. *Adv Genet* **36**(187-238).
- Wilkins, M. R., I. Lindskog, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser and R. D. Appel (1997).** Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis* **18**(3-4): 403-8.
- Williams, R. J. P. (2001).** Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**(583-595).
- Wimmer, R., T. Herrmann, M. Solioz and K. Wuthrich (1999).** NMR structure and metal interactions of the CopZ copper chaperone. *J Biol Chem* **274**(32): 22597-603.
- Wu, F. Y., W. J. Huang, R. B. Sinclair and L. Powers (1992).** The structure of the zinc sites of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **267**(35): 25560-7.

- Yim, J. J. and G. M. Brown (1976).** Characteristics of guanosine triphosphate cyclohydrolase I purified from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **251**(16): 5087-94.
- Zambelli, B., M. Stola, F. Musiani, K. De Vriendt, B. Samyn, B. Devreese, J. Van Beeumen, P. Turano, A. Dikiy, D. A. Bryant and S. Ciurli (2005).** UreG, a chaperone in the urease assembly process, is an intrinsically unstructured GTPase that specifically binds Zn²⁺. *J Biol Chem* **280**(6): 4684-95.
- Zambelli, B., K. Banaszak, A. Merloni, A. Kiliszek, W. Rypniewski and S. Ciurli (2013).** Selectivity of Ni(II) and Zn(II) binding to *Sporosarcina pasteurii* UreE, a metallochaperone in the urease assembly: a calorimetric and crystallographic study. *J Biol Inorg Chem* **18**(8): 1005-17.
- Zhang, J. W., G. Butland, J. F. Greenblatt, A. Emili and D. B. Zamble (2005).** A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **280**(6): 4360-6.
- Zhang, R., V. Villeret, W. N. Lipscomb and H. J. Fromm (1996).** Kinetics and mechanisms of activation and inhibition of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase by monovalent cations. *Biochemistry* **35**(9): 3038-43.
- Zheng, J., X. Mao, J. Ling, Q. He and J. Quan (2014).** Low serum levels of zinc, copper, and iron as risk factors for osteoporosis: a meta-analysis. *Biol Trace Elem Res* **160**(1): 15-23.
- Zheng, Y., R. J. Roberts and S. Kasif (2004).** Segmentally variable genes: a new perspective on adaptation. *PLoS Biol* **2**(4): E81.

8 Lebenslauf und Publikationsliste

Persönliche Daten

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| Name | Lucy Bütöf (geb. Bauer) |
| Adresse | Bernhardystr. 8, 06110 Halle (Saale) |
| Geburtsdatum | 24.05.1989 |
| Geburtsort | Wolmirstedt |
| Nationalität | deutsch |
| Familienstand | verheiratet (keine Kinder) |

Ausbildung und beruflicher Werdegang

- 02/2014 - 12/2017 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/Naturwissenschaftliche Fakultät I/ Institut für Biologie/ molekulare Mikrobiologie Prof. Nies
Thema: Metall-Chaperone in *Cupriavidus metallidurans* CH34: Charakterisierung der GTPasen CobW_{1/2/3}.
- 12/2013 - 2/2014 wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/Naturwissenschaftliche Fakultät I/ Institut für Biologie/ molekulare Mikrobiologie Prof. Nies
Thema: Bestimmung des Metallgehalts in Zellen und Zellkompartimenten der Organismen *E. coli*, *Y. pestis*, *F. tularensis* und MRSA nach Exposition auf Kupferoberflächen.
- 10/2013 - 12/2013 Praktikum an der Sanitätsakademie der Bundeswehr München/ Institut für Mikrobiologie/Teileinheit Spezialdiagnostik
Thema: Antimikrobielle Wirkung von Kupferoberflächen auf pathogene Bakterien
- 01/2012 - 02/2012 wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/Naturwissenschaftliche Fakultät I/ Institut für Biologie/ molekulare Mikrobiologie Prof. Nies
Thema: Expression und Reinigung des Zip-Transporters ZupT aus *Cupriavidus metallidurans*.
- 08/2011 - 09/2011 Praktikum bei der GMBU e.V. Halle (Saale) Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e.V.
Thema: Entwicklung eines Testverfahrens zur Bestimmung des Fettsäuregehaltes in Fruchtsäften, am Beispiel von *Hippophae rhamnoides* (Sanddorn).
- 10/2011 - 09/2013 Studium Master of Science Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema der Abschlussarbeit: Metall-Chaperone in *Cupriavidus metallidurans*: CobW_{1/2/3}

- 10/2007 - 09/2011 Studium Bachelor of Science an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema der Abschlussarbeit: Reinigung von rekombinantem HypD aus *Escherichia coli*
- 2007 Abitur am Werner-von-Siemens Gymnasium Magdeburg Gymnasium mit mathematisch-naturwissenschaftlichem-technischem Schwerpunkt

Peer-review Veröffentlichungen

- Herzberg, M., **L. Bauer** and D. H. Nies (2014). Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* **6**(3): 421-36.
- Herzberg, M., **L. Bauer**, A. Kirsten and D. H. Nies (2016). Interplay between seven secondary metal Aufnahme systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **8**(3): 313-26.
- Bütof, L.**, C. Schmidt-Vogler, M. Herzberg, C. Grosse and D. H. Nies (2017). The components of the unique Zur regulon of *Cupriavidus metallidurans* mediate cytoplasmic zinc handling. *J Bacteriol* **199**(21): 1-20.
- Wiesemann, N., **L. Bütof**, M. Herzberg, G. Hause, L. Berthold, B. Etschmann, J. Brugger, G. Martinez-Criado, D. Dobritzsch, S. Baginsky, F. Reith and D. H. Nies (2017). Synergistic toxicity of copper and gold compounds in *Cupriavidus metallidurans*. *Appl Environ Microbiol* **83**(23): 1-17.
- Bütof, L.**, Wiesemann, N., Herzberg, M., Altschner, M., Holleitner, A., Hause, G., Reith, F. and D.H. Nies (2018). Synergetic gold-copper detoxification at the core of gold biomineralisation in *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **10**(2): 278-86.
- Bütof, L.** and D.H.Nies (2018). Three metal-chaperoning GTPases are central to cytoplasmic zinc homeostasis in *Cupriavidus metallidurans*. (in preparation).

Nationale und internationale Konferenzbeiträge

- Bütof, L., M. Herzberg and D.H. Nies. "The components of the unique Zur regulon of *Cupriavidus metallidurans*." VAAM Annual Conference: Wolfsburg 2018 (Vortrag).
- Bütof, L., M. Herzberg, S. Helm, D. Dobritzsch and D.H. Nies. „Zinc trafficking in *Cupriavidus metallidurans*” – ISZB Meeting: Pyla (Zypern) 2017 (Vortrag/Posterpräsentation) – **Auszeichnung als Jungwissenschaftlerin**
- Bauer, L., N. Wiesemann, M. Herzberg, M. Altschner, A. Holleitner, G. Hause, L. Berthold, B. Etschmann, J. Brugger, G. Martinez-Criado, D. Dobritzsch, S. Baginsky, F. Reith and D.H. Nies. „Synergetic gold and copper detoxification at the core of gold biomineralization” - VAAM Annual Conference: Würzburg 2017 (Posterpräsentation/Posterblitzvortrag)
- Bauer, L., M. Herzberg, S. Helm, D. Dobritzsch and D.H. Nies. „Zinc trafficking in *Cupriavidus metallidurans*” - Biometals Conference: Dresden 2016 (Vortrag)
- Bauer, L., M. Herzberg, S. Helm, D. Dobritzsch and D.H. Nies. „Zinc trafficking in *Cupriavidus metallidurans*” - FASEB Meeting: Trace Elements in Biology and Medicine, Big Sky MT (USA) 2016 (Posterpräsentation/ Posterblitzvortrag)

Bauer, L., M. Herzberg, S. Helm, D. Dobritzsch and D.H. Nies. „Zinc trafficking in *Cupriavidus metallidurans*” - VAAM Annual Conference: Jena 2016 Posterpräsentation)

Bauer, L., M. Herzberg and D.H. Nies. „A metal-binding GTPase from *Cupriavidus metallidurans* is involved in metal homeostasis” - Mosbacher Kolloquium: Mosbach 2015 (Posterpräsentation)

Bauer, L., M. Herzberg and D.H. Nies. „Deletion of the ZIP-transporter ZupT influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans*” - VAAM Annual Conference: Marburg 2015 (Posterpräsentation)

Bauer, L., M. Herzberg and D.H. Nies. „Deletion of the ZIP-transporter ZupT influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans*” - Biometals Conference: Durham NC (USA) 2014 (Posterpräsentation)

Bauer, L., M. Herzberg and D.H. Nies. „Deletion of the ZIP-transporter ZupT influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans*” - VAAM Annual Conference: Dresden 2014 (Posterpräsentation)

Herzberg, M., L. Bauer, P. Bleichert, G. Grass, S. Riemschneider, D. Dobritzsch, and D.H. Nies. „Cellular biometal contents of highly pathogenic biothreat agents do not differ from non-pathogenic organisms” - Biodefense Conference: München 2013 (Posterpräsentation)

Bauer, L., M. Herzberg and D.H. Nies. „ZupT, a member of the ZIP family of zinc/iron transporters in *Cupriavidus metallidurans*” - VAAM Annual Conference: Bremen 2013 (Posterpräsentation)

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir mit Rat und Tat während der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. D. H. Nies, der es mir ermöglichte dieses sehr interessante Thema über meine Masterarbeit hinaus zu bearbeiten, für das Interesse am Fortgang der Arbeit und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Sowie die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Austausch auf nationalen und internationalen Konferenzen.

Bei Prof G. Sawers und Prof. W. Maret möchte ich mich für die Übernahme der weiteren Gutachten bedanken.

Für die Proteommessungen und die Hilfestellung mit der Äkta und HPLC möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern Dr. Dirk Dobritzsch und Stefan Helm bedanken. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Hauke Lilie für Einarbeitung am CD-Spektrometer und die aufschlussreichen Gespräche zum Thema Proteinfaltung bedanken.

Für die viele moralische und wissenschaftliche Unterstützung in den letzten Jahren, sowohl in meiner Masterarbeit, als auch meiner Dissertation möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Nies und der AG Sawers danken. Marco und Dörte für die Hilfe bei diversen Assays, Doreen für die Unterstützung an der HPLC und bei diversen anderen Fragen. Frau Otto, Diana, Susan, Nicole, Vlada und Conny (um nur einige zu nennen) danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Taudti danke ich für das Korrekturlesen und die Hilfe mit der Gelfi-Säule.

Mein besonderer Dank gilt allerdings Martin für alle Hilfestellungen, Diskussionen und Unterstützung während der letzten Jahre und meiner Labormutti Grit, die für Motivation und Ablenkung zu gleich gesorgt hat (und bei einigen Klonierungen eine große Hilfe war).

Meinen Eltern, vor allem meiner Mama, meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die vielen unterstützenden Worte und die positive Ablenkungen während des gesamten Studiums danken.

Das Beste kommt zum Schluss und deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Mann Albert bedanken. Ohne dich hätte ich die ganzen Höhen und Tiefen der letzten Jahre nicht so gut gemeistert. Du hast einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit und dem Erreichen dieses Traums. DANKE!

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre Ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit zur Erlangung des akademischem Grades Dr. rer. nat. selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle, den 01.02.2018

.....

Lucy Bütöf (geb. Bauer)

11 Anhang

11.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 19 aufgelistet, wobei die Nomenklatur der Genotypen nach dem *Journal of Bacteriology* erfolgte (http://jb.asm.org/site/misc/journal-ita_nom.xhtml).

Tabelle 19: Bakterienstämme und Plasmide

| Stamm | Plasmid | wichtige Charakteristika | Referenz/Herkunft |
|-------------------------|-----------------|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> | | | |
| XL1-Blue | plasmidfrei | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> (F^+ , <i>proAB</i> , <i>lacIqZΔM15</i> , Tn10), <i>tet^R</i> | Stratagene GmbH, Heidelberg (Bullock <i>et al.</i> , 1987) |
| Rosetta (DE3) pLysS | pLysSRARE | F^- , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> , ($r_B^- m_B^-$) λ (DE3), pLysSRARE; <i>cam^R</i> ; BL21 (DE3) Derivat für rekombinante Expression | Stratagene GmbH, Heidelberg |
| S17/1 | plasmidfrei | <i>pro</i> , Tra ⁺ <i>recA</i> | Simon R, 1983 |
| VS208 | pASK-IBA7 | Expressionsvektor mit N-terminalem <i>Strep-tag[®]II</i> , <i>amp^R</i> | IBA-GmbH, Göttingen |
| VS218 | pCM157 | Expressionsvektor für die <i>Cre</i> -Rekombinase des <i>cre-lox</i> -Systems; <i>tet^R</i> | Marx and Lidstrom, 2002 |
| VS585 | pECD794-1 | pLO2:: <i>lacZ</i> für <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion in <i>C. metallidurans</i> ; <i>kan^R</i> | Scherer and Nies, 2009 |
| VS600 | pRHB152 | pET28A TEV, <i>kan^R</i> | Novagen, Californien (USA) |
| VS619 | plasmidfrei | F^- , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> , ($r_B^- m_B^-$) λ (DE3); Rosetta (DE3) Derivat für rekombinante Expression | diese Arbeit |
| VS621 | pG-Tf2 | Expressionsvektor für Helfer-chaperone GroEL/GroES; <i>cm^R</i> | diese Arbeit |
| VS622 | pG-Tf2 | VS619 mit pG-Tf2; <i>cm^R</i> ; Expression löslicher Proteine | diese Arbeit |
| VS623 | pCold pG-Tf2 | BL21 (DE3) mit pCold/pG-Tf2; <i>cm^R</i> <i>amp^R</i> | TaKaRa Bio Inc., Shiga (Japan) |

Anhang

Fortsetzung Tabelle 19: Bakterienstämme und Plasmide

| Stamm | Plasmid | wichtige Charakteristika | Referenz/Herkunft |
|-------------------------|--------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | | |
| VS624 | pTH24:: <i>tev</i> | pET24-Derivat für Expression Tev-Protease mit C-terminalem <i>His-tag</i> ; Amp ^R | van den Berg <i>et al.</i> , 2006 |
| ECA61 | pECD795 | <i>zntA</i> in pECD1794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion $\phi(zntA-lacZ)$, kan ^R | Legatzki <i>et al.</i> , 2003 |
| ECA62 | pECD796-1 | <i>cadA</i> in pECD1794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion $\phi(cadA-lacZ)$, kan ^R | Legatzki <i>et al.</i> , 2003 |
| ECA483 | pECD1003 | <i>lacZ</i> , <i>sacB</i> ; km ^R , tet ^R , amp ^R ; Derivat von pCM184 (Rekombinationsvektor <i>cre-lox</i> -System) mutierte <i>loxP66</i> & <i>loxP71</i> | Scherer and Nies, 2009 |
| ECA779 | pECD1204 | pECD794-1 Derivat mit <i>Rmet_1098</i> als <i>PstI/XbaI</i> Fragment $\phi(cobW_1'::lacZ)354$, kan ^R | Schütttau, 2013 |
| ECA814 | pECD1239 | pET28A TEV Derivat <i>cobW₁</i> als <i>SacI/BamHI</i> -Fragment kloniert, kan ^R | Bauer, 2013 |
| ECA815 | pECD1240 | pET28A TEV Derivat <i>cobW₂</i> als <i>SacI/BamHI</i> -Fragment kloniert, kan ^R | Bauer, 2013 |
| ECA816 | pECD1241 | pET28A TEV Derivat <i>cobW₃</i> als <i>SacI/BamHI</i> -Fragment kloniert, kan ^R | Bauer, 2013 |
| ECA819 | pECD1244 | pECD794-1 Derivat mit <i>cobW₂</i> als <i>PstI/XbaI</i> Fragment für $\phi(cobW_2'::lacZ)299$, kan ^R | Bauer, 2013 |
| ECA914 | pECD1339 | pASK-IBA7 Derivat mit <i>zur</i> als <i>Sall/XbaI</i> Fragment, amp ^R | Schmidt <i>et al.</i> , 2014 |
| ECB018 | pECD1442 | <i>fieF</i> in pECD1794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion $\phi(fieF-lacZ)$, kan ^R | Schmidt, 2016 |
| ECB187 | pECD1605 | pECD1003-Konstrukt für <i>cobW₂</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System | diese Arbeit |
| ECB188 | pECD1606 | pECD1003-Konstrukt für <i>cobW₃</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System | diese Arbeit |
| ECB189 | pECD1607 | pECD1003-Konstrukt für <i>cobW₁</i> -Cluster (<i>Rmet_1098</i> bis <i>Rmet_1103</i>) Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System | diese Arbeit |
| ECB190 | pECD1608 | <i>cobW₃</i> in pECD1794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion $\phi(cobW_3-lacZ)$, kan ^R | diese Arbeit |
| ECB191 | pECD1609 | <i>cobW₂</i> in pECD1794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion $\phi(cobW_2-lacZ)$, kan ^R | diese Arbeit |

Anhang

Fortsetzung Tabelle 19: Bakterienstämme und Plasmide

| Stamm | Plasmid | wichtige Charakteristika | Referenz/Herkunft |
|----------------------------------|------------------|---|--------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | | |
| ECB195 | pECD1612 | <i>dmeF</i> in pECD1794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion $\phi(dmeF-lacZ)$, kan ^R | diese Arbeit |
| ECB194 | pECD1611 | pASK-IBA3 Derivat mit <i>Rmet_1099</i> als <i>SacI/NcoI</i> Fragment, amp ^R | diese Arbeit |
| <i>Cupriavidus metallidurans</i> | | | |
| CH34 | pMOL28 pMOL30 | | Mergeay <i>et al.</i> , 1985 |
| AE104 | plasmidfrei | | Mergeay <i>et al.</i> , 1985 |
| DN515 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zurT</i> | Kirsten <i>et al.</i> , 2011 |
| DN578 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zntA</i> Δ <i>cadA</i> Δ <i>fieF</i> Δ <i>dmeF</i> (Δ e4) | Scherer and Nies, 2009 |
| DN579 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zntA</i> Δ <i>cadA</i> Δ <i>fieF</i> Δ <i>dmeF</i> Δ <i>zurT</i> (Δ e4 Δ <i>zurT</i>) | Herzberg <i>et al.</i> , 2014a |
| DN728 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zur</i> | Schmidt <i>et al.</i> , 2014 |
| DN817 | pECD1244 | AE104 Δ <i>zur</i> mit $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ Disruption | diese Arbeit |
| DN818 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>cobW_3</i> | diese Arbeit |
| DN819 | pMOL28 pMOL30 | CH34 Δ <i>cobW_3</i> | diese Arbeit |
| DN820 | pMOL28 pMOL30 | CH34 Δ <i>cobW_1</i> -Cluster | diese Arbeit |
| DN821 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW_3</i> | diese Arbeit |
| DN822 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW_1</i> -Cluster | diese Arbeit |
| DN823 | pMOL28 pMOL30 | CH34 Δ <i>cobW_1</i> -Cluster Δ <i>cobW_3</i> | diese Arbeit |
| DN824 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zurT</i> Δ <i>cobW_3</i> | diese Arbeit |
| DN825 | pECD1244 | AE104 Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW_3</i> mit $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ Disruption | diese Arbeit |
| DN826 | pECD1244 | AE104 Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW_1</i> -Cluster mit $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ Disruption | diese Arbeit |
| DN828 | plasmidfrei | AE104 Δ <i>zntA</i> Δ <i>cadA</i> Δ <i>fieF</i> Δ <i>dmeF</i> Δ <i>cobW_1</i> -Cluster | diese Arbeit |

Anhang

Fortsetzung Tabelle 19: Bakterienstämme und Plasmide

| Stamm | Plasmid | wichtige Charakteristika | Referenz/Herkunft |
|----------------------------------|------------------------------|---|-------------------|
| <i>Cupriavidus metallidurans</i> | | | |
| DN829 | pMOL28 pMOL30 pECD1244 | CH34 mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN830 | pMOL28 pMOL30 pECD1244 | CH34 $\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN831 | pMOL28 pMOL30 | CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN832 | pMOL28 pMOL30 pECD1244 | CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN833 | plasmidfrei | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta cobW_3$ | diese Arbeit |
| DN834 | plasmidfrei | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta zurT\Delta cobW_3$ | diese Arbeit |
| DN835 | pECD1204 | AE104 $\Delta zurT\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ | diese Arbeit |
| DN836 | pECD1244 | AE104 $\Delta zurT\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN837 | pECD1204 | AE104 $\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ | diese Arbeit |
| DN838 | pECD1244 | AE104 $\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN839 | pECD1244 | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta cobW_1$ - Cluster mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN840 | pECD1204 | AE104 $\Delta zur\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ | diese Arbeit |
| DN841 | pECD1204 | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ | diese Arbeit |
| DN842 | pECD1204 | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta zurT\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_1'::lacZ)354$ | diese Arbeit |
| DN843 | pECD1244 | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |
| DN844 | pECD1244 | AE104 $\Delta zntA\Delta cadA\Delta fieF\Delta dmeF\Delta zurT\Delta cobW_3$ mit Disruption $\phi(cobW_2'::lacZ)299$ | diese Arbeit |

11.2 Übersicht der für die Klonierungen verwendeten Primer und Kontrollprimer

In der vorliegenden Arbeit wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer für die Klonierung, Sequenzierung und Kontrolle verwendet.

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Primer

| Name/Orientierung →/← | 5'→3' Sequenz ^{a)} | Beschreibung |
|---|--|---|
| Disruptionsprimer | | |
| <i>Rmet_0125 PstI</i> Dis → | AA <u>ACTGCAG</u> CCGCTTCTTGCAGGACTA C | Disruptionsprimer bindet 318 bp stromaufwärts vom ATG _{Rmet_0125} |
| <i>Rmet_0125 XbaI</i> Dis → | AAAT <u>CTAGAT</u> TGCCAGCCGGCGGCGTT | Disruptionsprimer bindet 591 bp stromabwärts vom TGA _{Rmet_0125} |
| <i>Rmet_0127 PstI</i> Dis → | AA <u>ACTGCAGG</u> CTCGACAAGCAGGAAG AAG | Disruptionsprimer bindet 412 bp stromaufwärts vom ATG _{Rmet_0127} |
| <i>Rmet_0127 XbaI</i> Dis ← | AAAT <u>CTAGAG</u> CAATCGGTGCCGCAGTG T | Disruptionsprimer bindet 376 bp stromabwärts vom TGA _{Rmet_0127} |
| <i>Rmet_0128 PstI2</i> Dis → | AA <u>ACTGCAGAC</u> ATGCGGCTGCGTCCGA | Disruptionsprimer bindet 17 bp stromaufwärts vom ATG _{Rmet_0128} |
| <i>Rmet_0128 XbaI</i> Dis ← | AAAT <u>CTAGAG</u> TCGTTGCCGGCGCGTTT | Disruptionsprimer bindet 231 bp stromabwärts vom TGA _{Rmet_0128} |
| <i>Rmet_1098 PstI</i> Dis → | AA <u>ACTGCAGG</u> GCCGCAGTCTCAATGAG G | bindet ca. 270 bp stromaufwärts vom Start-Cordon ATG _{Rmet_1098} |
| <i>Rmet_1098 XbaI</i> Dis ← | AAAT <u>CTAGAG</u> GGGCGCTTTCGATGCTTC C | bindet ca. 550 bp strom-abwärts vom Stopp-Cordon TGA _{Rmet_5377} |
| Testprimer für die Disruption | | |
| <i>Rmet_0128</i> Dis Test → | GCCGGAACCACTCGAAATTG | Testprimer bindet 15 bp stromaufwärts vom ATG _{Rmet_0128} |
| <i>Rmet_1098 lacZ</i> Test → | TGTTGCCACGCTCGTCCCTTTG | Testprimer, ca. 260 bp stromaufwärts vom Start-Codon ATG _{Rmet_1098} |
| Primer für <i>cre-lox</i> Mutagenese | | |
| <i>Cre 0125 Age</i> → | AAA <u>ACCGGT</u> TCGAATCCGGCGACTATG GCTG | bindet 332 bp strom-abwärts vom ATG _{cobW3} |
| <i>Cre 0125 Apa</i> ← | AAAGGGCCCGATGATCGATGTTGATGC AACAAAG | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{cobW3} |
| <i>Cre 0125 NotI</i> → | AAAGCGGCCCGCAGTCTGCACCCTCTC TC | bindet direkt strom-aufwärts vom TGA _{cobW3} |
| <i>Cre 0125 NcoI</i> → | AAACCATGGCCAGGTTGGCTGGCTTGA C | bindet 311 bp strom-aufwärts vom TGA _{cobW3} |

Anhang

| | | |
|-----------------------|---|---|
| <i>Cre 0127 Age</i> → | AAA <u>ACCGGT</u> ACCGCGTGACCGTGTACC G | bindet 355 bp strom-abwärts vom ATG _{cobW2} |
| <i>Cre 0127 Apa</i> ← | AAAGGGCCCGTTGTGGTACTCCGAGAA AA | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{cobW2} |

Fortsetzung Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Primer

| Name/Orientierung →/← | 5'→3' Sequenz ^{a)} | Beschreibung |
|--|--|---|
| Primer für <i>cre-lox</i> Mutagenese | | |
| <i>Cre 0127 NotI</i> → | AAAGCGGCCCGCCTTTACGTTTAGTGCGC CATC | bindet direkt strom-aufwärts vom TGA _{cobW2} |
| <i>Cre 0127 NcoI</i> → | AAACCATGGCTCTCTACGCGTCGAAGAG TG | bindet 310 bp strom-aufwärts vom TGA _{cobW2} |
| <i>Cre 1098 Mun</i> → | AAACAATTGGTTACCCACTTCGGATACG | bindet 385 bp strom-abwärts vom ATG _{cobW1} |
| <i>Cre 1098 Not</i> ← | AAAGCGGCCCGCGGGGATTTGGTTTGCCC G | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{cobW1} |
| <i>Cre cobW₁-Cluster Apa</i> → | AAAGGGCCCAATCAGGCGGCAGGGG | bindet direkt stromaufwärts vom TGA _{Rmet_1103} |
| <i>Cre cobW₁-Cluster Age</i> ← | AAA <u>ACCGGT</u> AAGGTAACCGGCGATATG | bindet 296 bp stromaufwärts vom TGA _{Rmet_1103} |
| Primer zur Amplifizierung des Promotorbereiches | | |
| <i>Cre 0128 Age</i> → | AAA <u>ACCGGT</u> TCTCGCGCTTGCTGTAGG | bindet 399 bp strom-abwärts vom ATG _{zur} |
| <i>Cre 0128 Apa</i> ← | AAAGGGCCCGCGAAGGATTTAACCATAG G | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{zur} |
| <i>Cre 0126 Age</i> → | AAA <u>ACCGGT</u> CGTTTAGTGCGCCATCAGA C | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{dkSA} |
| <i>Cre 0126 Apa</i> ← | AAAGGGCCCGGGGACACCTCTCTACG | bindet 319 bp strom-abwärts vom ATG _{dkSA} |
| <i>zupTp HindIII</i> → | AAAAAGCTTCTGCGCTGGCCGCTTCTTC | bindet 293 bp strom-abwärts vom GTG _{zupT} |
| <i>zupTp KpnI</i> ← | AAAGGTACCCGATTAACGCAACAATGTT GC | bindet direkt strom-abwärts vom GTG _{zupT} |
| <i>zupTp2 SpeI</i> → | AAA <u>ACTAGT</u> TGGCGCCTGCCCGACTC | bindet 158 bp strom-abwärts vom ATG _{zupT} |
| <i>zupTp2 KpnI</i> ← | AAAGGTACCCACCATGCGCTCCACCAC | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{zupT} |

Anhang

| | | | |
|-------|------------------|-------------------|---|
| Promo | <i>Rmet_1102</i> | CATGTTGCGGATTCCTG | bindet direkt strom-abwärts vom ATG _{<i>Rmet_1102</i>} |
| | | downstream← | |
| Promo | <i>Rmet_1102</i> | CTTCTTGCTGGTGGATG | bindet 263 bp strom-abwärts vom ATG _{<i>Rmet_1102</i>} |
| | | upstream→ | |

Fortsetzung Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Primer

| Name/Orientierung →/← | 5'→3' Sequenz ^{a)} | Beschreibung |
|--|------------------------------------|---|
| Expressionsprimer | | |
| <i>1098 BamHI His</i> → | AAAGGATCCCTTCCAGCCAAGCTTCC TG | 5' kodierender Bereich von <i>cobW₁</i> ohne Start-Codon für die Klonierung in pRHB152 |
| <i>1098 SacI His</i> ← | AAAGAGCTCAGTGTCCAGGGCCAGTCA GG | 3' kodierender Bereich von <i>cobW₁</i> mit Stopp-Codon für die Klonierung in pRHB152 |
| pRHB152 0127 <i>BamHI</i> → | AAAGGATCCTCCAAACTGATTCCGGT CACG | 5' kodierender Bereich von <i>cobW₂</i> ohne Start-Codon für die Klonierung in pRHB152 |
| pRHB152 0127 <i>SacI</i> ← | AAAGAGCTCTAAAGTCAGGCGAGGC AGGC | 3' kodierender Bereich von <i>cobW₂</i> mit Stopp-Codon für die Klonierung in pRHB152 |
| pRHB152 0125 <i>BamHI</i> → | AAAGGATCCGCCGTTCTGCTGCCCCG CA | 5' kodierender Bereich von <i>cobW₃</i> ohne Start-Codon für die Klonierung in pRHB152 |
| pRHB152 0125 <i>SacI</i> ← | AAAGAGCTCTCAGTGTGCATGTCCGC AATC | 3' kodierender Bereich von <i>cobW₃</i> mit Stopp-Codon für die Klonierung in pRHB152 |
| pASK3 <i>Rmet_1099 SacI</i> → | AAAGAGCTCCGCCAGGACATTGGG GATGC | 5' kodierender Bereich von <i>Rmet_1099</i> ohne Start-Codon für die Klonierung in pASK-IBA3 |
| pASK3 <i>Rmet_1099 NcoI</i> ← | AAACCATGGGCGGCCACCTCCCGTGA ATG | 3' kodierender Bereich von <i>Rmet_1099</i> ohne Stopp-Codon für die Klonierung in pASK-IBA3 |
| Primer für die Konstruktion der <i>lacZ</i>-Reportergenfusion | | |
| <i>cobW₃-lacZ PstI</i> → | AAACTGCAGCAGCGATCGACGCCGA AG | bindet 329 bp stromabwärts vom TGA _{<i>cobW₃</i>} |
| <i>cobW₃-lacZ XbaI</i> → | AAACTGCAGCAGCGATCGACGCCGA AG | bindet direkt stromabwärts vom TGA _{<i>cobW₃</i>} |
| <i>cobW₂-lacZ PstI</i> → | AAACTGCAGATCGCGTTCGTTCTT C | bindet 285 bp stromabwärts vom TGA _{<i>cobW₂</i>} |

Anhang

| | | |
|-------------------------------------|---|--|
| <i>cobW₂-lacZ XbaI</i> → | AAAT <u>CTAGATA</u> AAAGTCAGGCGAGGC AG | bindet direkt stromabwärts vom TGA _{<i>cobW₂</i>} |
| <i>dmeF-lacZ PstI</i> → | AAACTGCAGAGCGGGACGGTGCTGC TC | bindet 315 bp stromabwärts vom TAG _{<i>dmeF</i>} |
| <i>dmeF-lacZ XbaI</i> → | AAAT <u>CTAGATT</u> GCCGCCTAGTGACGG TG | bindet direkt stromabwärts vom TAG _{<i>dmeF</i>} |

Fortsetzung Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Primer

| Name/Orientierung →/← | 5'→3' Sequenz ^{a)} | Beschreibung |
|---|---|---|
| Sequenzierungs- und Vektorprimer | | |
| pASK up ← | CGGTAAACGGCAGACAAAAAAATG | Sequenzierungsprimer für die pASK-IBA3/pASK-IBA7 Konstrukte |
| pASK down → | AAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAA A | Sequenzierungsprimer für die pASK-IBA3/pASK-IBA7 Konstrukte |
| <i>lacZ</i> Ralsti fusion Test ← | CACAGATGAAACGCCGAGTTAACG | Sequenzierungs-/Test-primer für die pECD794-1 Konstrukte |
| pLO2 <i>lacZ</i> 5519 → | GGCGAAAATCGTGTGTTGAGGC | Sequenzierungs-/Test-primer für die pECD794-1 Konstrukte |
| T7 term up ← | CCGCTGAGCAATAACTAG | Sequenzierungsprimer für die pRHB152 Konstrukte |
| T7 prom down → | CCTATAGTGAGTCGTATTA | Sequenzierungsprimer für die pRHB152 Konstrukte |
| pBBR fwd ← | TAACCAATAGCCGACTGCG | Sequenzierungsprimer für die pBBR1MSC-2 Konstrukte |
| pBBR reverse → | CGGCTCGTATGTTGTGTGGAA | Sequenzierungsprimer für die pBBR1MSC-2 Konstrukte |
| pGEM <i>fwd</i> → | GCGAAAGGGGGATGTGCTGC | <i>forward</i> Sequenzierprimer (ABI) für pGEM-T Easy-Konstrukte |
| pGEM <i>rev</i> ← | CGCCTGCAGGTCGACCATAT | <i>reverse</i> Sequenzierprimer (ABI) für pGEM-T Easy-Konstrukte |
| Kan 1909 → | CCTATGGAAGTGCCTCGGTGA | Test für Fragmenteinbau in pCM184, bindet in Km-Kassette |
| Kan 1362 ← | TAACATACCTTCGGGCTACG | Test für Fragmenteinbau in pCM184, bindet in Km-Kassette |
| Primer zur Überprüfung der Megaplasmide in <i>C. metallidurans</i> | | |
| <i>czcA</i> <i>NdeI</i> 5932 → | AAACATATGACGGGGGTGGAAGGCA AGATG TT | <i>NdeI</i> -Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>czcA</i> |
| <i>czcA</i> <i>XbaI</i> 6459 ← | AAAT <u>CTAGAGG</u> ATGGCGGACAGACG TTCGGCA | <i>XbaI</i> -Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>czcA</i> |

Anhang

| | | |
|-------------------------|--|---|
| <i>cnrA</i> NdeI 1539 → | <u>AAACATATGCTCTGCCTTCGTGCTCG</u> CTCA | NdeI-Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>cnrA</i> |
| <i>cnrA</i> XbaI 1962 ← | AAAT <u>CTAGAGCCATTCGCTTTTCGGTT</u> TCAGA | XbaI-Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>cnrA</i> |

^{a)} Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet.

11.3 Zur bindet Zink mit hoher Affinität

Für die Optimierung der EMSA wurde eine Holo- und eine Apo-Form des rekombinanten *Strep-Zur* hergestellt. Das Protein wurde als Holo-*Strep-Zur* mit einer Größe von 28. kDa gereinigt (siehe 3.4.1; Abb. 40). Holo-*Strep-Zur* mit 2.9 ± 0.8 mol Zn/mol Protein diente als Grundlage für das Apo-Protein und wurde durch Inkubation mit EDTA und anschließender Eliminierung der EDTA-Metall-Komplexe hergestellt (siehe 2.3.8). Die Co-Faktorbestimmung ergab für das Apo-Protein einen Zinkgehalt von 0.9 ± 0.2 mol/mol Protein (Tabelle 21).

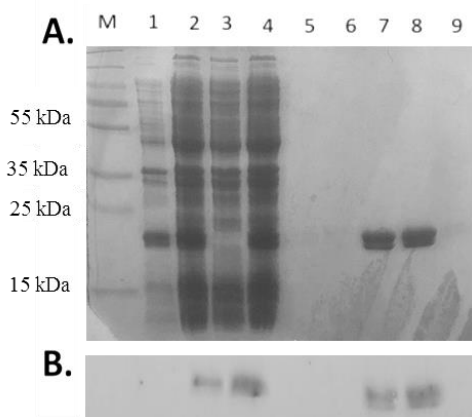


Abbildung 40: Coomassie-Blau-Färbung und Autoradiogramm nach Western-Blot der Reinigung des rekombinanten *Strep-Zur*. *Strep-Zur* wurde per *Strep-Tactin*-Affinitätschromatographie gereinigt und die Proteine in den Fraktionen mittels Coomassie-Blau-Färbung einer 12,5 %igen SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) mit 1: 100 000 *Strep-Tactin*-HRP-Konjugat detektiert. Es wurden 25 µg Gesamtprotein vom Zelltrümmerpellet (1), löslicher Fraktion (2), Durchfluss (3) und erster Waschfraktion (4) aufgetragen. Von der letzten Waschfraktion (5) und den Elutionsfraktionen (6-9) wurden jeweils 20 µl der Fraktionen aufgetragen. Als Größenstandard diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus.

Tabelle 21: Metallgehalt Apo-*Strep-Zur* und Holo-*Strep-Zur*.

| | Metall [mol/mol Protein] | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Zn | Mg | Fe | Ni | Co | Cd |
| Apo- <i>Strep-Zur</i> | $0.93^{\pm 0.22}$ | $0.09^{\pm 0.10}$ | $0.06^{\pm 0.04}$ | $0.01^{\pm 0.01}$ | $0.00^{\pm 0.00}$ | $0.00^{\pm 0.00}$ |
| Holo- <i>Strep-Zur</i> | $2.93^{\pm 0.75}$ | $0.06^{\pm 0.04}$ | $0.04^{\pm 0.03}$ | $0.01^{\pm 0.01}$ | $0.00^{\pm 0.00}$ | $0.00^{\pm 0.00}$ |

Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels *Strep-Tactin*-Affinitätschromatographie ohne Chelatoren im Puffer, was ein Holo-Protein zur Folge hatte. Im nächsten Schritt wurde ein Apo-Protein durch Zugabe eines 10fachen Überschusses an EDTA hergestellt und die gebundenen Metalle mittels ICP-MS bestimmt (n=3).

11.4 Zur bindet nicht als Apo-Protein an den Promotorbereich von *cobW_I*

Für den Nachweis einer Zink-abhängigen Interaktion zwischen Zur und den Zur-Bindeboxen wurde die Apo-Form des Proteins, mit 0.9 ± 0.2 mol Zn/mol Protein, in den EMSA eingesetzt und mit *cobW_I* inkubiert. Eine Bindung des Proteins konnte unter dieser Bedingung nicht beobachtet werden (Abb. 41A/D).

Durch Zugabe von 100 μ M ZnCl₂ zum Ansatz sollte eine Metallierung während des Experiments erreicht werden. Ein beginnender Schmier und somit die Bindung von Zur an *cobW_I*, ist ab einem Verhältnis von 1:15.7 (Abb. 41B/E Spur 3) zu beobachten, wobei eine verzögert laufende Bande nach der Silberfärbung bei einem Verhältnis von 1:23.7 (Spur 4) auf Höhe der 1 500 bp Markerbande erkennbar ist.

Für die Umkehrung dieses Versuchs wurde Holo-*Strep*-Zur eingesetzt und dem EMSA 100 μ M EDTA zugefügt. Die Zugabe von EDTA verhindert nicht die Bindung des Proteins an *cobW_I*, denn bei einem Verhältnis von 1:15.7 ist die DNA geshiftet (Abb. 41C/F Spur 3), was an einer verzögert laufenden Bande bei einer Höhe von 2 000 bp zu sehen ist.

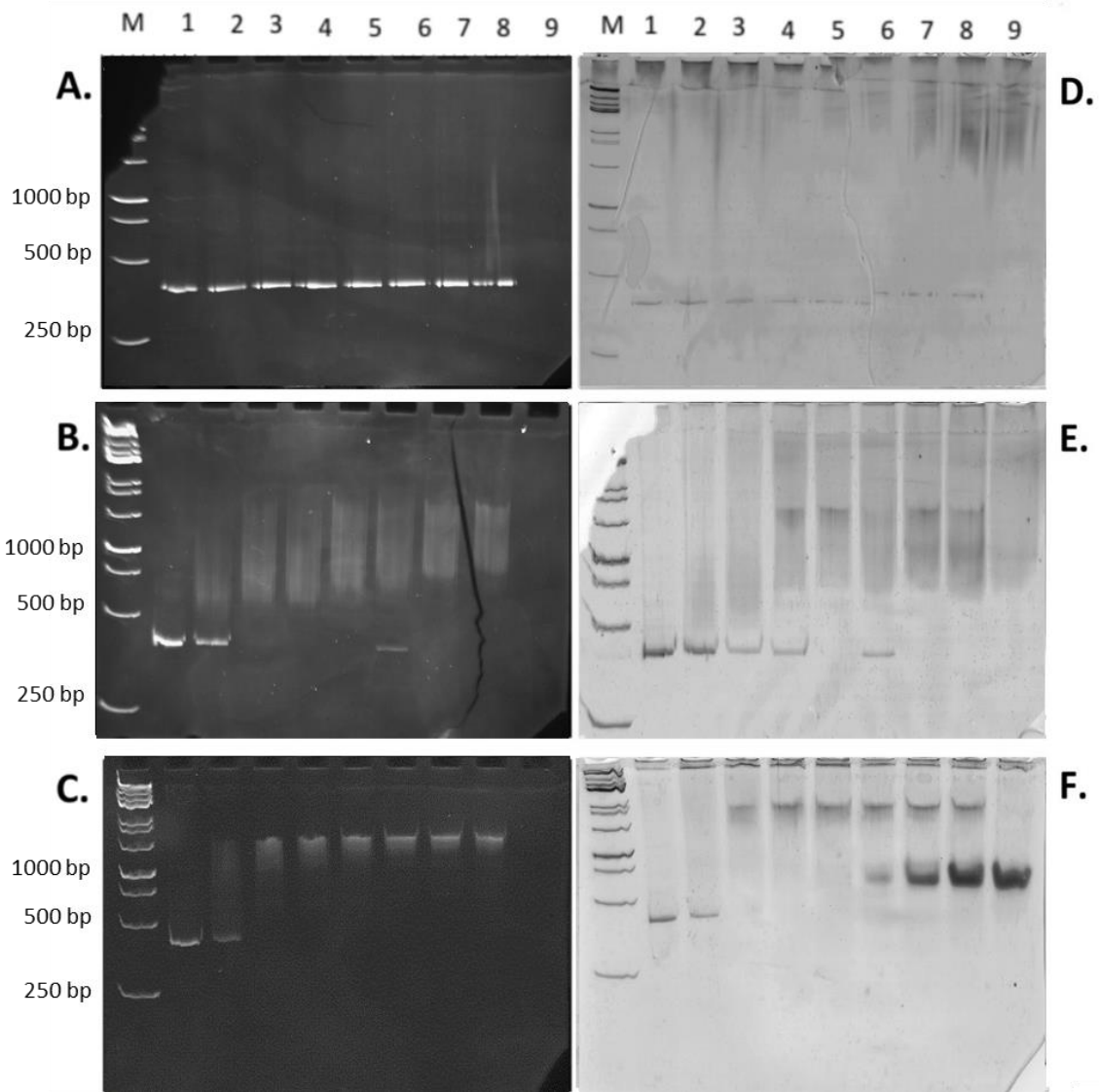


Abbildung 41: Ethidiumbromid- (A-C) und Silberfärbung (D-F) einer nativen 10 %igen PAGE nach EMSA von 0.68 pmol *cobW*_{1p} mit Apo-Strep-Zur (A,D), Apo-Strep-Zur + 100 µM ZnCl₂ (B,E) und Holo-Strep-Zur + 100 µM EDTA (C,F) (Bütof *et al.*, 2017). DNA von *cobW*_{1p} wurde mit 0, 5.4, 10.7, 16.1, 21.4, 26.8, 40.2 oder 53.6 pmol (Spur 1-Spur 8) Apo-Strep-Zur bzw. Holo-Strep-Zur für 30 min bei 30 °C inkubiert. In Spur 9 sind 53.6 pmol des Proteins ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Der 1 kb DNA-Ladder diente als Größenstandard (M).

11.5 EMSA mit Kontrollbereichen von *dksA*, *zupT* und *cobW*₂

Um zu überprüfen ob die Bindung von Zur an DNA spezifisch erfolgt, wurden Kontrollbereiche ohne annotierte Zur-Bindebox im *zur*-Cluster und in näherer Umgebung des alternativen Start-Codons von *zupT* untersucht. Dies waren DNA-Abschnitte *upstream* des Start-Codons von *cobW*₂, *dksA* und 156 bp *downstream* vom GTG von *zupT* (ATG). Für alle getesteten DNA-Bereiche konnte kein Shift bei steigenden Holo-Strep-Zur beobachtet werden (Abb. 42). Die Interaktion des Regulators Zur mit DNA-Abschnitten ist daher spezifisch.

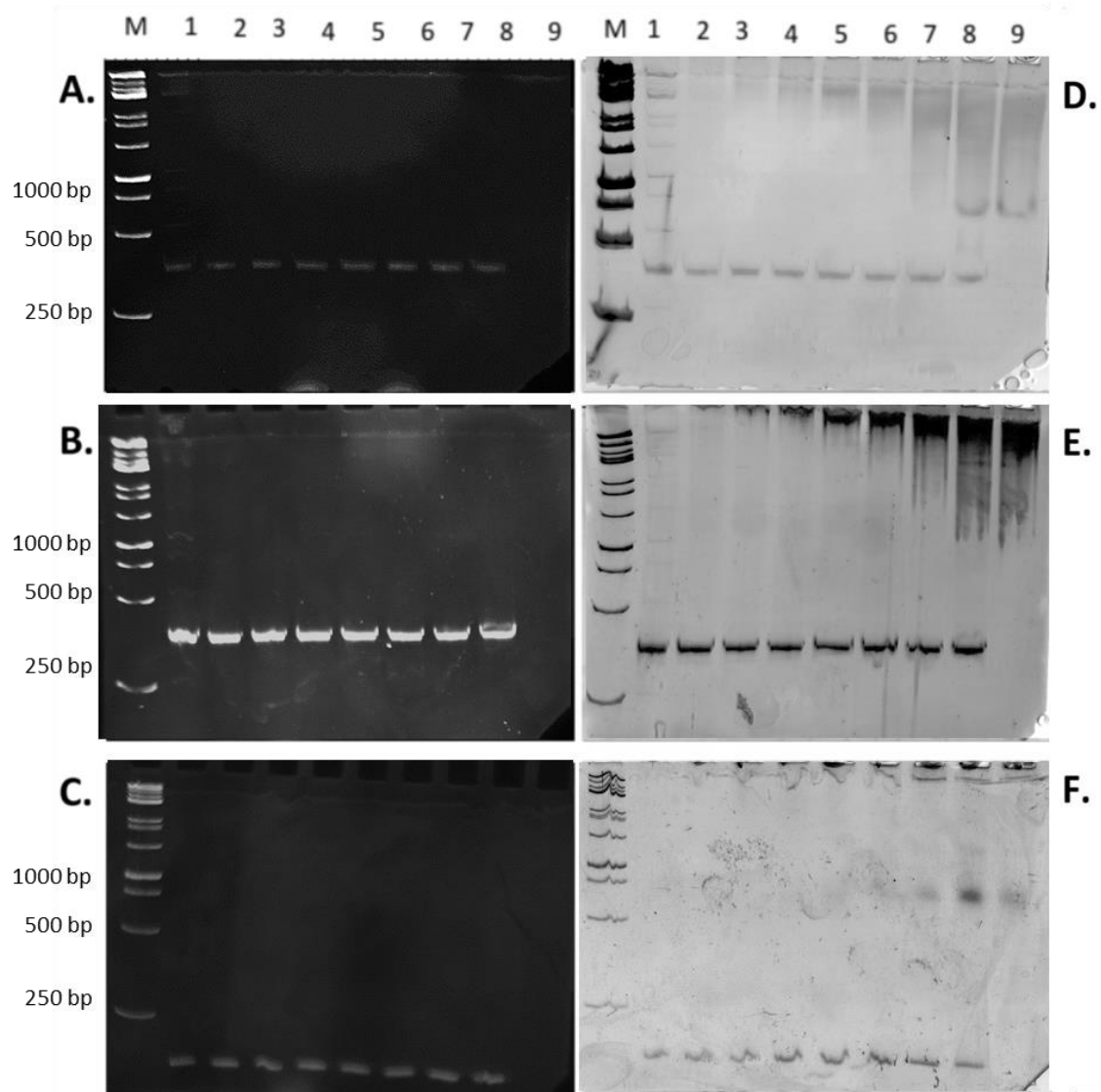


Abbildung 42: Ethidiumbromidfärbung (A-C) und Silberfärbung (D-F) eines nativen 10 %igen Polyacrylamidgels nach EMSA von 0.68 pmol *cobW*_{2p} (A,D), *dksA*_p (B,E) und *zupT*_{p2} (C,F) mit Holo-*Strep-Zur* (Bütöf *et al.*, 2017). DNA der Promotorbereiche von wurde mit 0, 5.4, 10.7, 16.1, 21.4, 26.8, 40.2 oder 53.6 pmol (Spur 1-Spur 8) Holo-*Strep-Zur* für 30 min bei 30 °C inkubiert. In Spur 9 sind 53.6 pmol des Proteins ohne DNA als Kontrolle aufgetragen. Der 1 kb DNA-Ladder diente als Größenstandard (M).

11.6 Konstruktion von *C. metallidurans* Deletions- und Disruptionsmutanten

Für die physiologische Charakterisierung von CobW_{1/2/3} wurden Mutanten mit Hilfe des *cre-lox* Systems erzeugt, deren Konstruktion im weiteren Verlauf am Beispiel von *cobW*₃ erklärt ist (Marx and Lidstrom, 2002; Abb. 43). Zunächst wurden ca. 300 bp Fragmente direkt stromaufwärts des Start-Codons ATG und stromabwärts des Stopp-Codons TGA amplifiziert. Die Fragmente wurden dann über die eingefügten Restriktionsschnittstellen nacheinander in den Rekombinationsvektor pECD1003 kloniert, welcher keinen *origin of replication* in *C. metallidurans* besitzt, sodass sie eine Kanamycin-Resistenzkassette flankieren. Der *E. coli*-Stamm S17/1 wurde mit dem daraus entstandenen Vektor pECD1606 transformiert und mit

dessen Hilfe die *C. metallidurans*-Stämme konjugiert. Im ersten Rekombinationsschritt ist der Vektor in das Genom über die klonierten Sequenzen stromaufwärts bzw. stromabwärts des Gens inseriert worden, was zur Bildung eines Cointegrates (*single crossie*) führte. Erst mit dem folgenden zweiten Rekombinationsschritt entstand die Kanamycin-Insertionsmutante. Die markerlose Deletion wurde durch den darauffolgenden konjugativen Transfer des Vektors pCM157 erreicht, auf dem das Gen *cre* aus dem P1-Phagen kodiert ist und dessen Expression vom *lacZ*-Promotor aus *E. coli* gesteuert wird. Die Cre-Rekombinase erkennt die Kanamycin-Kassette flankierenden *loxP*-sites und katalysiert die Exzision der Resistenzkassette. Die Deletionsmutanten wurden durch PCR mit den beiden äußeren Deletionsprimern überprüft. Dabei wurde in der Mutante ein durch den Deletionsbereich verkürztes PCR-Fragment detektiert (Daten nicht gezeigt).

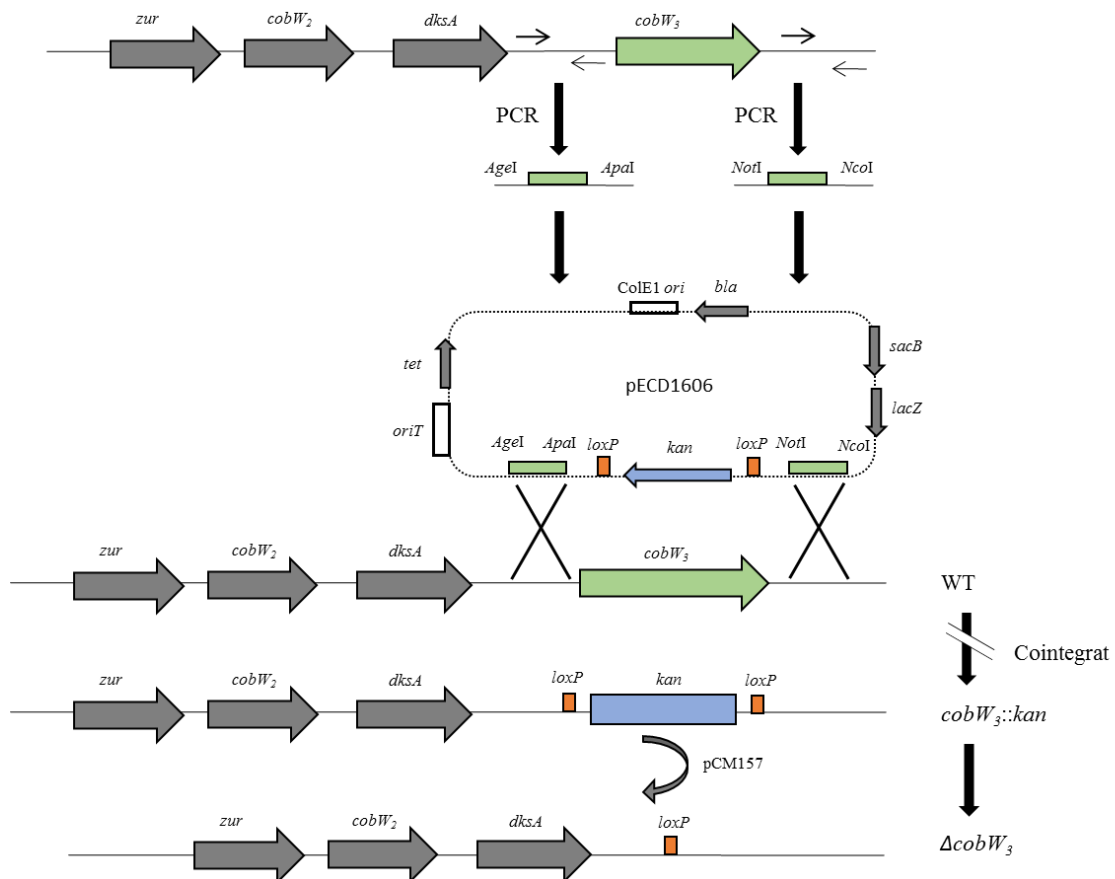


Abbildung 43: Konstruktion einer Gendelelation in *C. metallidurans* mittels *cre-lox*-System am Beispiel von *cobW3* (nach Marx and Lidstrom, 2002). Upstream und downstream von *cobW3* wurden ca. 300 bp Fragmente amplifiziert. Nach Klonierung dieser Fragmente in den Vektor *pECD1003*, der *kan* flankiert von *loxP*-sites trägt, wurde der so konstruierte Vektor *pECD1606* im *E. coli* Stamm S17/1 zur Konjugation mit CH34, AE104 und Mutanten eingesetzt. In zwei nacheinander stattfindenden homologen Rekombinationsschritten wurde das Gen gegen die Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Die markerlose Deletion wurde durch den konjugativen Transfer des Vektors *pCM157* erreicht, auf dem das Gen *cre* der Cre-Rekombinase kodiert ist und die die Exzision der Resistenzkassette bewirkt.

Anhang

Da es nicht möglich war in allen Stammhintergründen markerfreie Deletionen zu erzeugen wurden zusätzlich Disruptionen erstellt. Dies erfolgte durch Insertion eines Suizid-Vektors pECD794-1 (pLO2::*lacZ*), was am Beispiel von *cobW*₂ gezeigt ist (Abb. 44). Dazu wurde ein zentral im Zielgen liegendes, etwa 350 bp großes Fragment mittels PCR amplifiziert. Über eingefügte Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment in die *multiple cloning site* des Vektors pECD794-1 kloniert. Der *E. coli*-Stamm S17/1 wurde mit dem konstruierten Plasmid transformiert und anschließend erfolgte die Konjugation in die *C. metallidurans*-Stämme. Durch ein homologes Rekombinationsereignis erfolgte die Insertion des Vektors in das Genom von *C. metallidurans*, was zu einer Unterbrechung der kodierenden Sequenz des Zielgens führte. Die korrekte Position der Insertion wurde mittels PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dabei bindet ein Testprimer im Reportergen *lacZ*, das auf dem inserierten Plasmid kodiert ist und ein Testprimer etwa 150 bp stromaufwärts der Insertionsstelle und damit außerhalb des Rekombinationsereignisses.

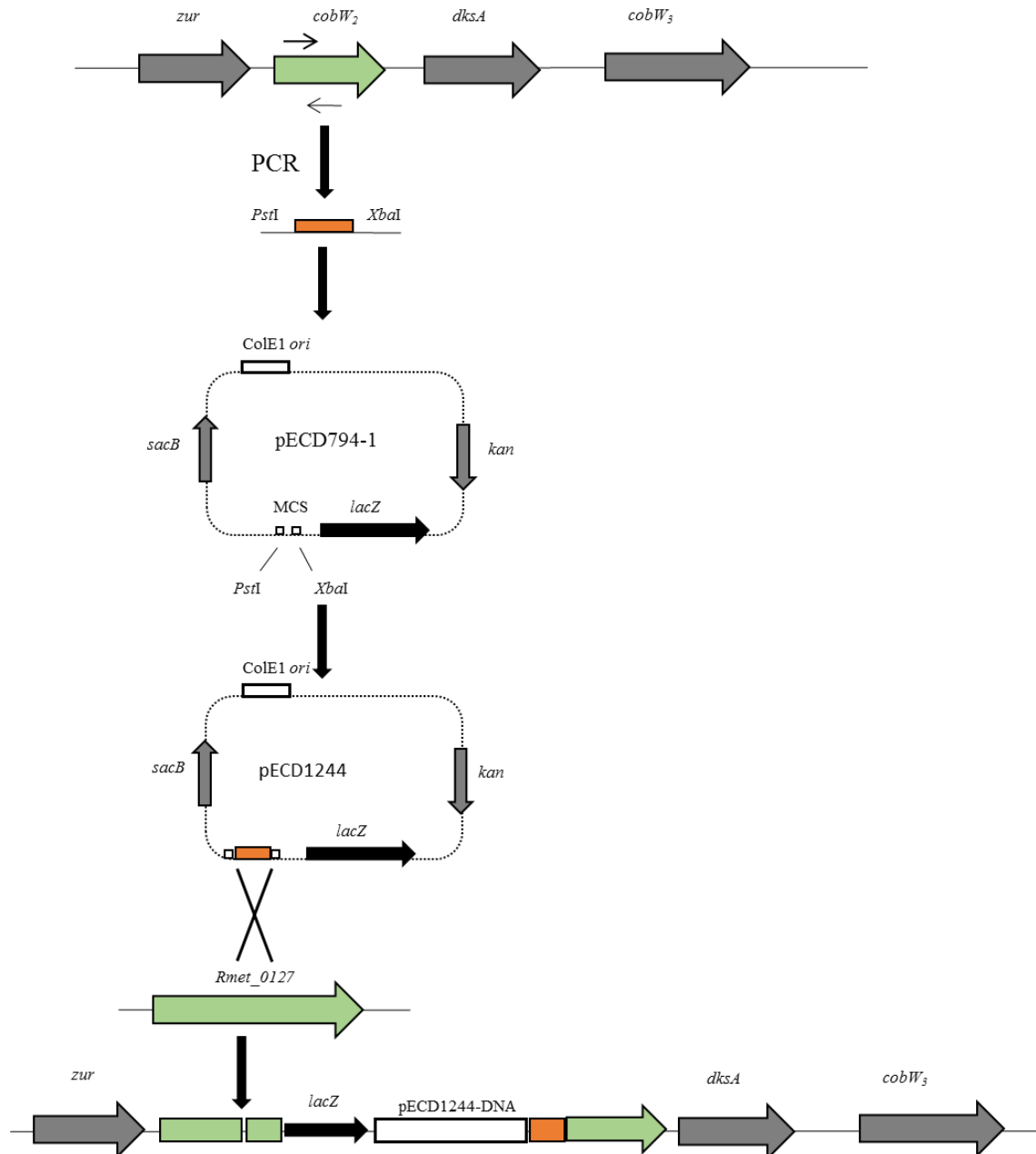


Abbildung 44: Konstruktion einer Disruption in *C. metallidurans* mit Hilfe des pLO2-Vektorsystems am Beispiel von *cobW*₂. Mit Hilfe abgeleiteter Primer wurde ein ca. 350 bp großes Fragment zentral liegend in *cobW*₂ amplifiziert. Das Fragment wurde in den Vektor pECD794-1 kloniert und der *E. coli*-Stamm S17/1 mit dem konstruierten Vektor pECD1244 transformiert. Durch Konjugation erfolgte der Transfer in *C. metallidurans*. Über ein homologes Rekombinationsereignis inserierte der Vektor ins Genom.

11.7 Aufreinigung der rekombinanten Tev-Protease

Die Chaperone CobW_{1/2/3} wurden als rekombinante Proteine mittels *His*-Tag gereinigt. Dieser *Tag* musste aufgrund seiner metallbindenden Eigenschaft entfernt werden. Am N-Terminus der Proteine befindet sich eine *Tev-cleavage site*. Die *Tev* Protease schneidet in der Sequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, zwischen Glutamin und Glycin. Die Expression im *E. coli*-Stamm Rosetta erfolgte mit dem Plasmid pTH24::*tev*, welches von der AG Stubbs zur Verfügung gestellt wurde, mit anschließender Reinigung einer aktiven *Tev-His*, mit einem

Anhang

Molekulargewicht von 33.4 kDa, über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.3.1; Abb.45).

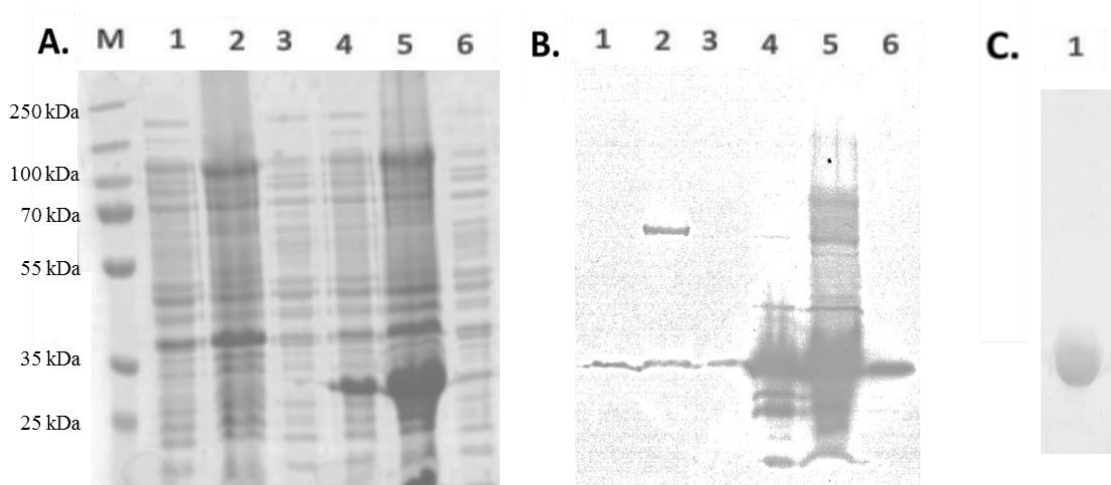


Abbildung 45: Nachweis der rekombinanten Tev-Protease in den Zellen und nach der Reinigung. Die Expression erfolgte in TB-Medium bei 37 °C bis zum Erreichen der $OD_{600}=2$, dann erfolgte ein Temperaturshift auf 30 °C und die Induktion mit 0.1 mM IPTG für 2 h. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion vom Zelltrümmerpellet getrennt. Der Nachweis der Tev-His (33 kDa) erfolgte durch Färbung der SDS-PAGE mit Coomassie-Blau (A) und Western-Blot (B) mit 1:2 500 Anti His-Antikörper und 1:5 000 Anti Mouse-Antikörper. Aufgetragen wurden in A/B: (1) 50 µg Zellen vor Induktion, (2) 25 µg Zelltrümmerpellet vor Induktion, (3) 25 µg lösliche Fraktion vor Induktion, (4) 50 µg Zellen nach Induktion, (5) 25 µg Zelltrümmerpellet nach Induktion, (6) 25 µg lösliche Fraktion nach Induktion. Panel C zeigt die Coomassie-Blau-Färbung nach der Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. In Spur 1 wurden 5 µg Protein aufgetragen. Als Größenstandard diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus*.

11.8 Ermittlung einer Kalibriergeraden für die Größenausschlusschromatographie

Die *size exclusion* Chromatographie trennt Proteine der Größe nach auf. Dies wird durch die Matrix der Säule ermöglicht, wobei größere Proteine und Substanzen früher eluieren als Niedermolekulare. Um Verunreinigungen nach der Affinitätschromatographie zu eliminieren und potentielle Multimere voneinander zu trennen wurden die gereinigten rekombinanten Proteine auf eine HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 High Resolution Säule mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min aufgetragen und mit Puffer A eluiert. Für die Berechnung der Proteingrößen wurde eine Kalibriergerade unter Zuhilfenahme des GE Healthcare Gel Filtration Kit LMW erstellt. 0.5 mg der Proteine Aprotinin, Ribonuklease, Carbonic Anhydrase, Ovalbumin und Conalbumin wurden gemeinsam mit 0.5 mg Blue Dextran 2000 zur Leervolumenbestimmung auf die Säule aufgetragen. Das Chromatogramm zeigte 5 Peaks, welche zur Identifizierung der Proteine auf eine 12.5 %ige SDS-PAGE aufgetragen wurden (Abb. 46A/Daten SDS-PAGE nicht gezeigt). Die Analyse ergab, dass die Proteine Conalbumin und Ovalbumin gemeinsam in Peak 2 eluierten. Mit Hilfe der Formel $K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)$ wurde der K_{av} der Kalibrierproteine berechnet und die Kalibriergerade erstellt. V_t entspricht

Anhang

dabei dem Säulenvolumen von 320 ml, V_e dem Elutionsvolumen bis Peakmitte, V_o ist das Leervolumen der Säule bzw. das Elutionsvolumen von Blue Dextran 2000 mit 101 ml (Panel B). Für die Kalibriergerade wurden der K_{av} -Wert und der natürliche Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine gegeneinander aufgetragen und die Geradengleichung nach linearer Regression bestimmt. Die sich daraus ergebene Geradengleichung ist $y = -0.3233x + 3.6189$ mit y dem K_{av} -Wert und x dem \ln des Molekulargewichtes (Panel C).

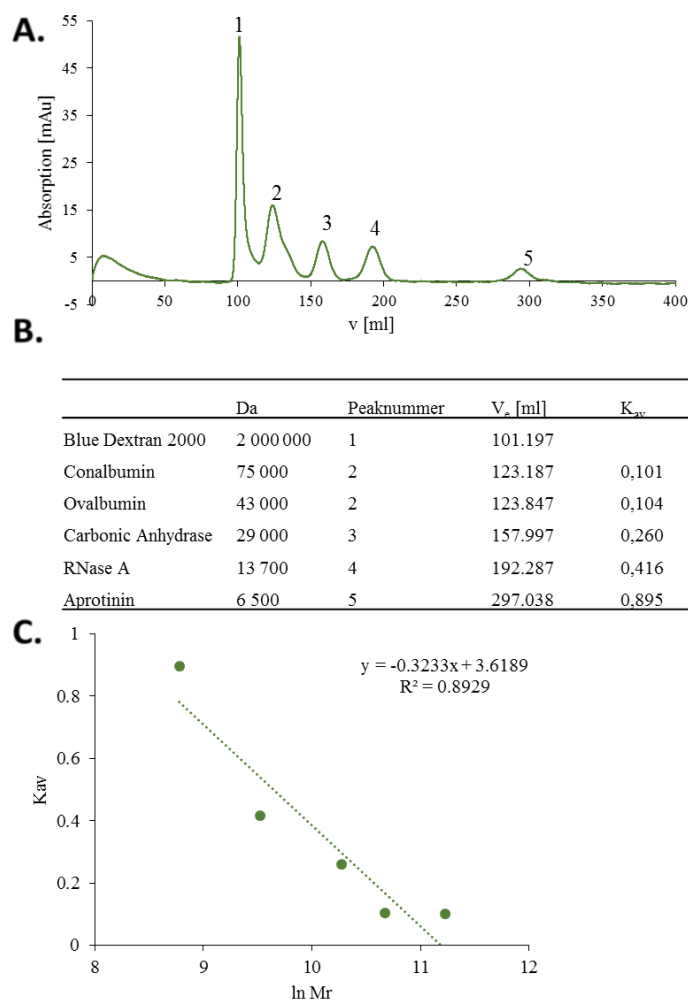


Abbildung 46: Chromatogramm und Auswertung des LMW Gelfiltrationsmarkers. 0.5 mg der in B aufgelisteten Substanzen wurden in Puffer A gelöst und bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 mg/ml auf eine HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR Säule aufgetragen. Die Elutionspeaks (A) wurden nach Analyse durch eine SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt) den Proteinen zugeordnet und der K_{av} -Wert der Proteine berechnet. Aus den K_{av} -Werten und dem natürlichen Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine (Mr) wurde eine Kalibriergerade (C) mit der Formel $y = -0.3233x + 3.6189$ und einem Bestimmtheitsmaß von 0.8929 erstellt.

11.9 CobW₁ konnte per MALDI-TOF-MS in Multimerbanden nachgewiesen werden

Bei der Reinigung von Apo-CobW₁ über Größenausschlusschromatographie sind 2 Peaks unterschiedlicher Größe entstanden (Abb. 30A). Im denaturierenden Polyacrylamidgel konnte gezeigt werden, dass es sich bei beiden Peaks um CobW₁ handelt (Abb. 30C). Für eine 2.

Anhang

Bestätigung wurden Banden aus dem nativen Polyacrylamidgel ausgeschnitten, die ein unterschiedliches Laufverhalten zeigten und per Massenspektrometrie in Kooperation mit Dr. Angelika Schierhorn, per MALDI-TOF mit der Masse + H⁺ gemessen (Abb. 47). Durch tryptischen Verdau wurde das Protein in Peptide definierter Größe geschnitten und konnten mit Hilfe des Programms PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/; Wilkins *et al.*, 1997) den theoretischen Werten zugeordnet werden (Tabelle 22). In alle Polyacrylamidstücken konnten 86-66 % der theoretisch vorhandenen Fragmente von CobW₁ gefunden werden. Das Chromatogramm von Bande 3 zeigte zusätzliche Peptide die nach Auswertung in Kooperation mit Dr. Dobritzsch auf eine Verunreinigung durch eine Pyruvatkinase II aus *E. coli* hinweisen.

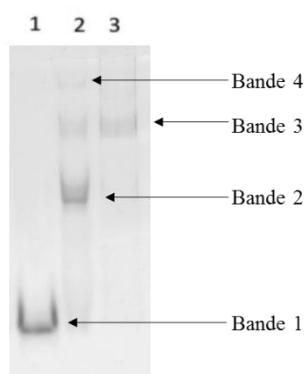


Abbildung 47: Coomassie-Blau-Färbung der Native-PAGE zum Nachweis von CobW₁-Multimeren MALDI-TOF. Die Elutionsfraktionen der SEC wurden mit VivaSpin-Säulen eingeeengt und 5 µg auf die PAGE aufgetragen. (1) Peak 2, (2) Peakfläche zwischen Peak 1 und Peak 2, (3) Peak 1.

Anhang

Tabelle 22: Übersicht der gefundenen Trypsinfragmente für CobW₁ in den Banden der Native-PAGE.

| theoretische Fragmente tryptischer Verdau von CobW ₁ | Fragmentgrößen [Da] | Fragment gefunden in den Banden: | | | |
|---|------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| CLDACLLTDDEMAQGPDVWTTWHNPPFDWP | 3 473.49 | x | x | x | x |
| FDQLVIESTGISEPLVAETFTFEGEDGR | 3 183.54 | x | x | x | x |
| SLNEVAHLDTMVTVVDAFNFLR | 2 491.26 | x | x | | x |
| GFFWLASHPTLAGTWSQAGAVAR | 2 431.23 | x | x | x | |
| TVVDLLIDQVEFCDLVVLNK | 2 275.23 | x | | | |
| TEETLVEMSNCGICCTLR | 2 001.87 | | | | |
| VAVIVNDMSDVNIDAGLVR | 2 000.05 | x | x | x | x |
| QEIVLIGVDMDEFELR | 1 905.96 | x | x | x | x |
| HGPAGYWAAVPPER | 1 693.82 | x | x | x | x |
| FHAFVAAEWPGVVR | 1 585.83 | x | x | x | x |
| GQHPETEYEGIR | 1 514.72 | x | x | x | x |
| VLGTGLDFDFEASK | 1 512.76 | x | x | x | x |
| WPDDPESVALIR | 1 397.71 | x | x | x | x |
| LPVTVLSGFLGAGK | 1 358.80 | x | x | x | x |
| TLLNHILHNR | 1 331.75 | x | x | x | x |
| EDLLEVER | 1 115.59 | x | x | x | x |
| APGWLQEMR | 1 087.54 | x | x | x | x |
| GESLGEEDAR | 1 062.47 | x | x | x | |
| WDDSVGDAR | 1 020.44 | x | x | x | |
| VDLIADADR | 987.51 | x | | | |
| RPFHPQR | 937.51 | x | x | x | x |
| IEIAEFGR | 934.50 | x | x | x | x |
| SFVYGAR | 799.41 | x | x | x | x |
| DGGANLSR | 789.38 | | | | |
| DSLQSR | 705.35 | | | | |
| LLAILR | 698.49 | x | | | |
| VPLER | 613.37 | | | | |
| DYGSR | 597.26 | | | | |
| ALNPR | 570.34 | | | | |
| MLPAK | 559.33 | | | | |
| Summe [kDa] | 42.64 | | | | |
| Summe gefunden [kDa] | | 36.80 | 32.84 | 30.35 | 28.32 |
| Coverage [%] | | 86.31 | 77.02 | 71.18 | 66.43 |

Die Banden aus Abbildung 31 wurden ausgeschnitten und zur Analyse an Dr. Schierhorn übergeben, welche mittels MALDI-TOF nach einem Trypsinverdau die Peptide (Masse + H⁺) bestimmte. Die erhaltenen Peptide wurden dann mit den theoretischen Werten für einen tryptischen Verdau von CobW₁ verglichen. Die Wiederfindungsrate wurde aus den gefundenen Fragmenten berechnet.

11.10 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von CobW_{1/2/3} nach *Pulldown* mit der löslichen Fraktion des Δ *zur*

Um Interaktionspartner zu identifizieren wurde eine *fishing* Methode durchgeführt. Der *Pulldown* wurde zu diesem Zweck mit den rekombinanten Proteinen vor der Abspaltung des *His*-tags und dem Rohextrakt des Δ *zur* vorgenommen. In Kooperation mit Stefan Helm und Dr. Dobritzsch wurden die Peptide in den Elutionsfraktionen mit der Synapt G2S bestimmt. Als Kontrollprotein wurden 10 fmol einer humanen Glykogenphosphorylase eingesetzt und anhand dessen die Konzentrationen der anderen Proteine berechnet. Die Abundanz gibt dabei den Quotienten aus der Konzentration des gefunden Proteins und der Konzentration des Kontrollproteins an. Beim *Pulldown* mit CobW₁ wurden Peptide von 1170 Proteinen gefunden, wobei CobW₂ die höchste Abundanz aufwies (Tabelle 23). Zu den gefunden zinkabhängigen Proteinen gehört auch die RNA-Polymerase mit den Untereinheiten RpoA, RpoB und RpoC. Rmet_3234 ist als Porin der äußeren Membran annotiert und wurde ebenso gefunden wie hypothetische Proteine. Als potentielle Interaktionspartner von CobW₂ wurden ähnliche Proteine gefunden. In einer Gesamtheit von 934 Treffern sind die abundantesten Proteine ebenfalls die Untereinheiten der RNA-Polymerase und das Porin. Im Gegensatz dazu wurde für CobW₃ unter den 1133 gefunden Proteinen am abundantesten HypD gefunden, welches an der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen beteiligt ist (Forzi and Sawers, 2007). Es wurden noch weitere mögliche Interaktionspartner identifiziert, wie eine putative Deoxygenase oder GntR-Regulatoren. Auch für CobW₃ wurden in der Elutionsfraktion das Porin und die Untereinheiten der RNA-Polymerase gefunden. Da es sich bei all diesen Proteinen um metallbindende Proteine handeln könnte, wurde als Kontrolle die lösliche Fraktion des Stammes Δ *zur* zu der *magnetic* Beads gegeben, ohne vorherige *bait*-Inkubation. Nach der Messung mit der Synapt G2S konnten 1185 Proteine identifiziert werden. 132 Proteine wurden mit einer Konzentration höher als 10 fmol gefunden. Aus diesem Grund sind in Tabelle 24 nur Proteine mit einer Konzentration größer als 20 fmol aufgelistet. Zu diesen gehören die Untereinheiten der RNA-Polymerase, aber auch CobW₂, sowie andere Proteine die auch im *Pulldown* mit *His*-CobW_{1/2/3} als *bait*-Protein gefunden wurden. Die identifizierten Proteine können demnach Kontaminationen sein oder Interaktionspartner darstellen, wobei ersteres durch die Absättigung der Beads mit dem *bait*-Protein ausgeschlossen werden sollte. Eine Verdrängung der *bait*-Proteine durch Proteine mit höherer Affinität für Nickel kann nicht ausgeschlossen werden.

Anhang

Tabelle 23: Übersicht der abundantesten Proteine im *His-CobW*_{1/2/3} *Fishing-Pulldown*.

| Rmet-Nummer | Annotation | Abundanz | Funktion | Co-Faktor |
|------------------------------|-----------------------------------|----------|--|--|
| Rmet_0127 | CobW ₂ | 6.5 | Chaperon | Zn ²⁺ , Mg ²⁺ |
| Rmet_3234 | putatives Porin | 6.4 | | |
| Rmet_0965 | putativer Transkriptionsregulator | 6.0 | | |
| Rmet_3334 | RpoB | 5.9 | β -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_3324 | Tuf ₁ | 4.8 | Elongationsfaktor | GTP |
| Rmet_3291 | RpoA | 4.6 | α -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_4395 | UspA | 4.5 | universales Stressprotein | Zn ²⁺ |
| Rmet_3333 | RpoC | 3.7 | β' -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_1970 | PhoH | 3.6 | Phosphatmangel Protein | ATP |
| Rmet_1044 | MurR/RpiR ähnlicher Regulator | 3.5 | Transkriptionsregulator | |
| Rmet_2877 | Sun ₁ | 3.5 | SAM-abhängige Methyltransferase | Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ |
| Rmet_2034 | Rsu | 3.3 | Pseudouridinsynthase | Zn ²⁺ |
| Rmet_2092 | Rnr | 3.2 | Ribonuklease R | Cu ²⁺ , Zn ²⁺ |
| Rmet_5562 | HNS-family Protein | 3.0 | Histon-like Protein | Zn ²⁺ |
| Rmet_4749 | HU-family Protein | 3.0 | Histon-like Protein | Zn ²⁺ |
| <i>His-CobW</i> ₂ | | | | |
| Rmet_3234 | putatives Porin | 3.3 | | |
| Rmet_3334 | RpoB | 3.2 | β -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_0965 | putativer Transkriptionsregulator | 3.1 | | |
| Rmet_3291 | RpoA | 2.9 | α -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_3497 | AtpH | 2.8 | δ -Untereinheit F ₁ F ₀ -ATPase | Mg ²⁺ |
| Rmet_3324 | Tuf ₁ | 2.6 | Elongationsfaktor | GTP |
| Rmet_4395 | UspA | 2.6 | universales Stressprotein | Zn ²⁺ |
| Rmet_2565 | EgtB | 2.6 | Sulfatase | Zn ²⁺ |
| Rmet_1984 | AsdA | 2.5 | Aspartat 4-Decarboxylase | |
| Rmet_0284 | RsmD | 2.4 | Methyltransferase | Zn ²⁺ |
| Rmet_4566 | hypothetisches Protein | 2.2 | | |
| <i>His-CobW</i> ₃ | | | | |
| Rmet_1282 | HypD | 34.2 | Hydrogasenreifungsprotein | Mg ²⁺ |
| Rmet_5065 | putativer ATPase-Aktivator | 30.8 | | Mg ²⁺ |
| Rmet_0875 | CbbF ₃ | 11.1 | Fructose 1,6-bisphosphatase | Zn ²⁺ |
| Rmet_4954 | Transkriptionsregulator | 10.3 | Aminotransferase; GntR family | |
| Rmet_4603 | Transkriptionsregulator | 5.9 | Aminotransferase; GntR family | |

Anhang

Fortsetzung Tabelle 23: Übersicht der abundantesten Proteine im *His-CobW_{1/2/3} Fishing-Pulldown*.

| Rmet-Nummer | Annotation | Abundanz | Funktion | Co-Faktor |
|-----------------------------|------------------------------------|----------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>His-CobW₃</i> | | | | |
| Rmet_1075 | MutS | 5.4 | <i>mismatch repair</i> | |
| Rmet_2605 | Nitronat Monooxygenase | 4.5 | 2-Nitropropane dioxygenase | |
| Rmet_0965 | putativer Transkriptions-regulator | 4.1 | | |
| Rmet_3234 | Porin | 4.0 | | |
| Rmet_0127 | CobW ₂ | 3.9 | Chaperon | Zn ²⁺ , Mg ²⁺ |
| Rmet_3671 | putativer Transporter | 3.7 | Aromatenaufnahme | |
| Rmet_3334 | RpoB | 3.7 | β -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_3324 | Tuf ₁ | 3.6 | Elongationsfaktor | GTP |
| Rmet_4395 | UspA | 3.4 | universales Stressprotein | Zn ²⁺ |
| Rmet_3291 | RpoA | 3.2 | α -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_4626 | Histidinkinase | 3.2 | Zweikomponentensystem | ATP |
| Rmet_3880 | hypothetisches Protein | 3.0 | | |

Es wurde ein *Pulldown* mit *His-CobW_{1/2/3}* und dem Rohextrakt des Δ *zur* durchgeführt, indem das rekombinante Protein an Ni-NTA *magnetic* Beads gebunden wurde. Die nicht gebundenen Proteine wurden in mehreren Waschschritten entfernt und anschließend die Proteine mit Puffer A + 500 mM Imidazol eluiert. Für die Massenspektrometrie wurden die Proteine der Elutionsfraktion mit Aceton gefällt und ein tryptischer In-Lösungsverdau durchgeführt. Die Bestimmung der Peptide erfolgte in Kooperation mit Stefan Helm und Dr. Dobritzsch (AG Prof. Baginsky) mit anschließendem Abgleich gegen das Proteom von *C. metallidurans*. Als Kontrolle wurden 10 fmol einer humanen Glykogenphosphorylase hinzugegeben. Die Abundanz gibt an um welchen Faktor das Protein häufiger gefunden wurde als das Kontrollprotein.

Tabelle 24: Übersicht der abundantesten Proteine die an die *magnetic* Beads gebunden haben.

| Rmet-Nummer | Anotation | Abundanz | Funktion | Co-Faktor |
|-------------|--------------------------|----------|--|--|
| Rmet_3325 | FusA ₁ | 33.14 | Elongationsfaktor | GTP |
| Rmet_0127 | CobW ₂ | 29.05 | Chaperon | Zn ²⁺ , Mg ²⁺ |
| Rmet_3334 | RpoB | 28.81 | β -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_2807 | PepA | 28.09 | cytosolische Aminopeptidase | Mn ²⁺ ; Zn ²⁺ |
| Rmet_2195 | CarA | 27.80 | kleine UE der Carbamoylphosphat synthase | ATP |
| Rmet_3324 | Tuf ₁ | 27.74 | Elongationsfaktor | GTP |
| Rmet_2481 | GltA | 26.89 | Citratsynthase | |
| Rmet_1099 | FolE2 | 25.63 | GTP-Cyclohydrolase | Zn ²⁺ ; Mn ²⁺ |
| Rmet_2877 | Sun ₁ | 25.35 | SAM-abhängige Methyltransferase | Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ |
| Rmet_2096 | PurA | 23.84 | Adenylosuccinat-Synthase | Mg ²⁺ |
| Rmet_4373 | Transkriptions-regulator | 23.20 | XRE-Familie | |
| Rmet_0965 | Transkriptions-regulator | 22.12 | | |
| Rmet_3677 | StpA | 21.97 | Endonuklease | |

Fortsetzung Tabelle 24: Übersicht der abundantesten Proteine die an die *magnetic* Beads gebunden haben.

| Rmet-Nummer | Anotation | Abundanz | Funktion | Co-Faktor |
|-------------|-------------------------|----------|--|-----------------------------------|
| Rmet_0142 | Transkriptionsregulator | 21.63 | TetR-Familie | |
| Rmet_3333 | RpoC | 21.41 | β' -Untereinheit RNA-Polymerase | Zn ²⁺ |
| Rmet_0156 | MetK | 20.85 | S-Adenosylmethionin-Synthetase | Mg ²⁺ , K ⁺ |
| Rmet_2031 | InfB | 20.63 | Translationsinitiationsfaktor IF-2 | |
| Rmet_0002 | DnaN | 20.46 | β -Untereinheit DNA-Polymerase III | Zn ²⁺ |
| Rmet_5562 | HNS-family Protein | 20.27 | Histon-like Protein | Zn ²⁺ |

Es wurde ein *Pulldown* mit dem Rohextrakt des Δ zur durchgeführt, ohne *bait*-Inkubation durchgeführt. Die nicht gebundenen Proteine wurden in mehreren Waschschrinen entfernt und anschließend die Proteine mit Puffer A + 500 mM Imidazol eluiert. Für die Massenspektrometrie wurden die Proteine der Elutionsfraktion mit Aceton gefällt und ein tryptischer In-Lösungsverdau durchgeführt. Die Bestimmung der Peptide erfolgte in Kooperation mit Stefan Helm und Dr. Dobritzsch (AG Prof. Baginsky) mit anschließendem Abgleich gegen das Proteom von *C. metallidurans*. Als Kontrolle wurden 10 fmol einer humanen Glykogenphosphorylase hinzugegeben. Die Abundanz gibt an um welchen Faktor das Protein häufiger gefunden wurde als das Kontrollprotein.

11.11 Reinigung von FolE_{IB2} als *Strep*-tag Fusionsprotein

FolE_{IB2} wird kodiert durch *Rmet_1099* und ist das zweite Gen im *cobW*₁-Cluster. Um die Interaktion zwischen diesem Protein und CobW₁ untersuchen zu können, wurde es zunächst als *Strep*-tag-Fusionsprotein gereinigt. Nach der Induktion der Genexpression war FolE_{IB2}-*Strep* mit einem Molekulargewicht von 38 kDa in den Zellen detektierbar und wurde per Affinitätschromatographie mit EDTA im Puffer gereinigt (siehe 2.3.1; Abb. 48). Per ICP-MS wurde gezeigt, dass 0.3 ± 0.2 mol Zn/mol Protein gebunden hatten und auf die Herstellung eines Apo-Proteins verzichtet (siehe 2.6.4; Tabelle 27).

Anhang

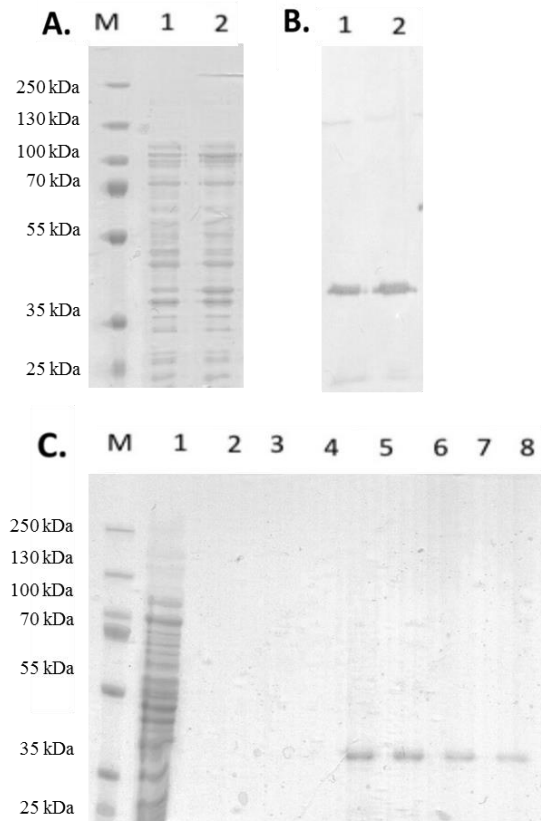


Abbildung 48: Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE und Autoradiogramm nach dem Antikörpernachweis, zur Identifizierung von Fole_{IB2} in den Fraktionen. In *E. coli* Rosetta Zellen wurde im Vektor pASK-IBA3::*folE_{IB2}* das Gen exprimiert, wobei die Induktion mit 50 ng/ml AHT bei einer OD = 0.7 erfolgte. Das synthetisierte Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kDa wurde durch Coomassie-Blau-Färbung (A) und Western-Blot mit 1:100 000 *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat (B) in 50 µg Zellen vor (1) und nach der Induktion (2) nachgewiesen. Die Reinigung des rekombinanten Proteins über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie mit Puffer W + 1 mM EDTA ist in Panel C zu sehen. Aufgetragen wurden (1) 25 µg lösliche Fraktion, (2) Durchfluss, (3) letzte Waschfraktion, (4-8) Elutionsfraktionen. Der *PageRuler™* Prestained Protein Ladder Plus wurde verwendet.

Tabelle 25: Co-Faktorbestimmung des gereinigten Fole_{IB2}-*Strep*.

| | Metall [mol/mol Protein] | | | | | |
|------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Zn | Mg | Fe | Ni | Co | Mn |
| Fole _{IB2} - <i>Strep</i> | 0.27 ^{±0.16} | 0.13 ^{±0.05} | 0.21 ^{±0.21} | 0.00 ^{±0.00} | 0.00 ^{±0.00} | 0.01 ^{±0.00} |

Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie mit EDTA als Chelator im Puffer, was ein Apo-Protein zur Folge hatte. Die gebundenen Metalle wurden mittels ICP-MS bestimmt (n=3).

11.12 Die Deletion der Chaperone führt zu multiplen MIC-Effekten

Auf Festmedium mit definierten Mengen an EDTA und divalenten Kationen wurde die minimale inhibitorische Konzentration der *C. metallidurans*-Stämme im Vergleich zu den IC50-Werten bestimmt (siehe 2.4.2). Lediglich die Einzeldelation von des *cobW₁*-Clusters im CH34 hatten keinen Einfluss auf die Resistenz (Tabelle 26). Jede andere Mutante zeigt einen sensitiven Phänotypen, wobei die Dreifachdeletionsmutante um Faktor 10 sensitiver ist als der

Anhang

CH34. Dies spricht dafür, dass durch die Deletionen bei Metallmangel nicht genügend Zink akquiriert werden kann und, dass sich CobW₂ und CobW₃ gegenseitig komplementieren können. Auf festem Medium wird außerdem die Rolle von CobW₂ in der Zinkhomöostase anhand der verminderten Zinkresistenz in allen Stammhintergründen sichtbar, welche einher geht mit einem Cadmium sensitiven Phänotypen und eine gestörte Metallhomöostase bestätigt. Im AE104 führen die Disruptionen von *cobW*₁ und *cobW*₂ zu Steigerungen der Kobaltresistenz, was auf eine gestörte Metallhomöostase schließen lässt, da der Stamm AE104 $\phi(cobW_1::lacZ)354$ zusätzlich einen Cadmium resistenten Phänotypen aufweist.

Tabelle 26: Minimale inhibitorische Konzentration von EDTA und Metallen auf *C. metallidurans*.

| Stamm | MIC | | | |
|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [mM] | CoCl ₂ [mM] | CdCl ₂ [μM] |
| CH34 | 2.0 ^{±0.0} | 7.0 ^{±0.0} | 8.2 ^{±1.2} | 2.2 ^{±0.3} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ -Cluster | 1.9 ^{±0.1} | 7.0 ^{±0.0} | 7.4 ^{±1.1} | 2.2 ^{±0.3} |
| CH34 $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 1.8^{±0.0} | 4.0^{±0.0} | 9.0 ^{±0.0} | 1.0^{±0.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₃ | 1.7^{±0.1} | 6.3 ^{±1.1} | 8.5 ^{±0.5} | 2.0 ^{±0.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 1.0^{±0.0} | 4.0^{±0.0} | 9.0 ^{±0.0} | 1.0^{±0.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ -Cluster Δ <i>cobW</i> ₃ | 1.1^{±0.1} | 6.3 ^{±1.1} | 8.5 ^{±0.5} | 2.0 ^{±0.5} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₃ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 1.5^{±0.0} | 4.0^{±0.0} | 7.0 ^{±0.0} | 1.0^{±0.0} |
| CH34Δ <i>cobW</i> ₁ -Cluster Δ <i>cobW</i> ₃ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 0.2^{±0.0} | 4.0^{±0.0} | 9.0 ^{±0.0} | 1.0^{±0.0} |
| | EDTA [mM] | ZnCl ₂ [μM] | CoCl ₂ [μM] | CdCl ₂ [μM] |
| AE104 | 2.0 ^{±0.0} | 175 ^{±25} | 262 ^{±94} | 255 ^{±27} |
| AE104 $\phi(cobW_1::lacZ)354$ | 2.0 ^{±0.0} | 200 ^{±0.0} | 425^{±0.0} | 350^{±33} |
| AE104 $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 2.0 ^{±0.0} | 200 ^{±0.0} | 450^{±0.0} | 240 ^{±32} |
| AE104Δ <i>cobW</i> ₃ | 2.0 ^{±0.0} | 150 ^{±0.0} | 250 ^{±44} | 217 ^{±22} |
| Δ <i>zur</i> T | 0.4^{±0.04} | 138 ^{±13} | 267 ^{±67} | 181.3 ^{±31} |
| Δ <i>zur</i> T Δ <i>cobW</i> ₃ | 0.2^{±0.0} | 142 ^{±11} | 200 ^{±0.0} | 217 ^{±22} |
| Δ <i>zur</i> | 2.0 ^{±0.0} | 207 ^{±24} | 410 ^{±92} | 400 ^{±0.0} |
| Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW</i> ₁ -Cluster | 1.8 ^{±0.1} | 200 ^{±0.0} | 300 ^{±22} | 400 ^{±0.0} |
| Δ <i>zur</i> $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 2.0 ^{±0.0} | 221 ^{±24} | 390 ^{±100} | 400 ^{±0.0} |
| Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW</i> ₃ | 2.0 ^{±0.0} | 200 ^{±0.0} | 300 ^{±0.0} | 400 ^{±0.0} |
| Δ <i>zur</i> Δ <i>cobW</i> ₃ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ | 1.8 ^{±0.1} | 200 ^{±0.0} | 300 ^{±22} | 400 ^{±0.0} |
| Δe4 | 2.0 ^{±0.0} | 25 ^{±0.0} | 5.0 ^{±0.0} | 0.3 ^{±0.04} |
| Δe4Δ <i>zur</i> T | 0.5^{±0.04} | 16 ^{±8.1} | 5.0 ^{±0.0} | 0.2 ^{±0.04} |

Die MIC wurde auf Tris-Minimal Medium Platten mit 2 % Agar bestimmt. Dafür wurden definierte Mengen an EDTA und ZnCl₂, CoCl₂ und CdCl₂ verwendet. Ausgestrichen wurden 1:100 verdünnte 2. Vorkulturen der späten stationären Phase und deren Wachstum auf den Platten nach 4 Tagen bei 30 °C beobachtet.

Die Deletion von *zurT* führt im AE104 und im $\Delta e4$ zu einem EDTA sensitiven Phänotypen, welcher durch eine zusätzliche Deletion von *cobW₃* verstärkt werden kann. CobW₃ scheint daher im $\Delta zurT$ essentiell für das Wachstum bei Metallmangel zu sein.

Für die Δzur -Derivate konnten keine veränderten MIC's bestimmt werden.

11.13 Die in Gel-Aktivität der Fe-Superoxiddismutase ist nicht beeinflusst

C. metallidurans kodiert für eine Fe-SOD und eine Cu/Zn-SOD, welche das Periplasma entgiften, indem sie reaktive Sauerstoffspezies in Wasserstoffperoxid umwandeln. Katalasen

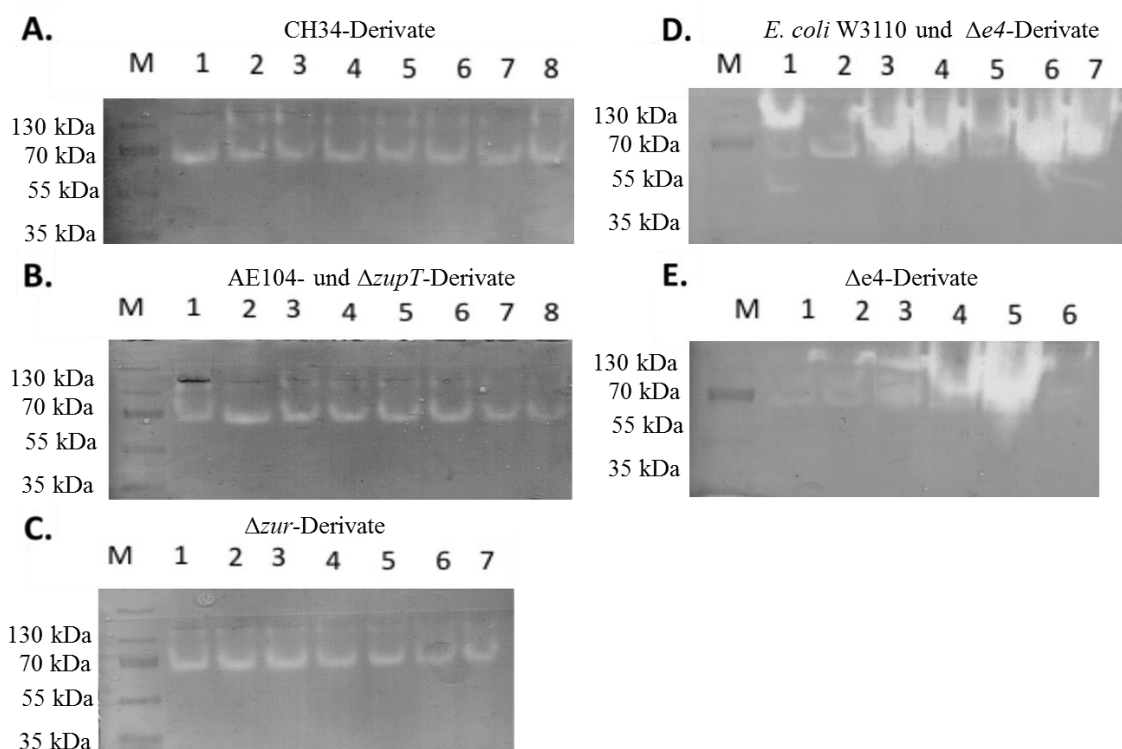


Abbildung 49: Native-PAGE zum Nachweis der Aktivität der Fe-SOD in den *C. metallidurans* Stämmen.

100 μ g der Rohextrakte aller *C. metallidurans*-Stämme wurden auf eine 10 %ige Native-PAGE aufgetragen. Die in Gel-Aktivität wurde durch Zugabe von Lösung A (0.3 mM NBT, 0.26 mM Riboflavin in $H_2O_{bidest.}$) und Inkubation für 20 min im Dunkeln gestartet. Die Zugabe von 0.3 % TEMED als Radikalstarter sorgt für die Oxidation von Riboflavin und die Freisetzung von Radikalen, die die Färbung des NBT bewirken. A: CH34-Derivate (1) CH34, (2) CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster, (3) CH34 $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (4) CH34 $\Delta cobW_3$, (5) CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (6) CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$, (7) CH34 $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (8) CH34 $\Delta cobW_1$ -Cluster $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ B: AE104-Derivate und $\Delta zurT$ -Derivate (1) AE104, (2) AE104 $\Delta cobW_3$, (3) AE104 $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1::lacZ)354$, (4) AE104 $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (5) $\Delta zurT$, (6) $\Delta zurT\Delta cobW_3$, (7) $\Delta zurT\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1::lacZ)354$, (8) $\Delta zurT\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ C: Δzur -Derivate (1) Δzur , (2) Δzur *cobW₁*-Cluster, (3) Δzur $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (4) $\Delta zur\Delta cobW_3$, (5) Δzur *cobW₁*-Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (6) Δzur $\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1::lacZ)354$, (7) $\Delta zur\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ D: Effluxdeletionsmutanten (1) *E. coli* W3110, (2) $\Delta e4\Delta cobW_3$, (3) $\Delta e4\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1::lacZ)354$, (4) $\Delta e4\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (5) $\Delta e4\Delta zurT\Delta cobW_3$, (6) $\Delta e4\Delta zurT\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_1::lacZ)354$, (7) $\Delta e4\Delta zurT\Delta cobW_3$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$ E: Effluxdeletionsmutanten (1) $\Delta e4$, (2) $\Delta e4\Delta zurT$, (3) $\Delta e4\Delta zur$, (4) $\Delta e4\Delta zur$ $\phi(cobW_2::lacZ)299$, (5) $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster, (6) $\Delta e4\Delta cobW_1$ -Cluster $\phi(cobW_2::lacZ)299$. Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus diente als Größenstandard.

sorgen dann für die Umwandlung des Wasserstoffperoxids in Sauerstoff und Wasser (McCord *et al.*, 1971). In den *Dose Response*-Kurven mit Paraquat und Wasserstoffperoxid kam es zu unterschiedlichen Phänotypen, die nun durch in Gel-Aktivitätsbestimmung spezifiziert werden sollten. In allen Gelen zeigt sich nach dem Assay eine Bande unterhalb von 70 kDa, die der Fe-SOD in *C. metallidurans* entspricht (Abb. 49). Die Cu/Zn-SOD kann durch das Assay nicht nachgewiesen werden, so kann indirekt aus dem Ergebnis des Assays geschlossen werden, dass die Wachstumseffekte auf einer veränderten Aktivität der Cu/Zn-SOD beruhen. Als Kontrolle wurde der *E. coli*-Stamm W3110 aufgetragen, welcher 3 Banden auf Höhe von 55 kDa, 70 kDa und 130 kDa zeigt. Die Mn-SOD und die Fe-SOD konnten in den Aktivitätsgelen bereits von Taudte, 2010 nachgewiesen werden. Die dritte Bande im Bereich von 70 kDa kann nicht zugeordnet werden, wurde aber als Hybrid-SOD bezeichnet.

11.14 Die Aktivität der löslichen Hydrogenase der *C. metallidurans*-Mutanten ist nicht eindeutig

Die Deletionen der Gene des Zur-Regulons führen zu veränderten Nickelgehalten in den Zellen und Unterschieden in den IC50-Werten für das Metall. Wichtige Nickel abhängige Enzyme in *C. metallidurans* sind die Hydrogenasen. Der Organismus kodiert für eine lösliche und eine membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase (Herzberg *et al.*, 2015). Um die Aktivität dieser Enzyme nachzuweisen wurden in Gel-Aktivitäten bestimmt, die in den Stämmen CH34, CH34 Δ cobW₃, CH34 Δ cobW₃ φ (cobW₂'::lacZ)299, Δ zur Δ cobW₁-Cluster, Δ zur Δ cobW₃ φ (cobW₁'::lacZ)354 und Δ zur Δ cobW₁-Cluster φ (cobW₂'::lacZ)299 zu einer zusätzlichen Bande bei ca. 100 kDa führte. Dies könnte ein Indiz für einen Einfluss der Chaperone in der Nickelhomöostase darstellen. Jedoch waren nicht alle Ergebnisse reproduzierbar, was auch für die publizierten Daten von Herzberg *et al.*, 2015 der Fall war, sodass das hier gezeigte Ergebnis mit weiteren Experimenten validiert werden muss.

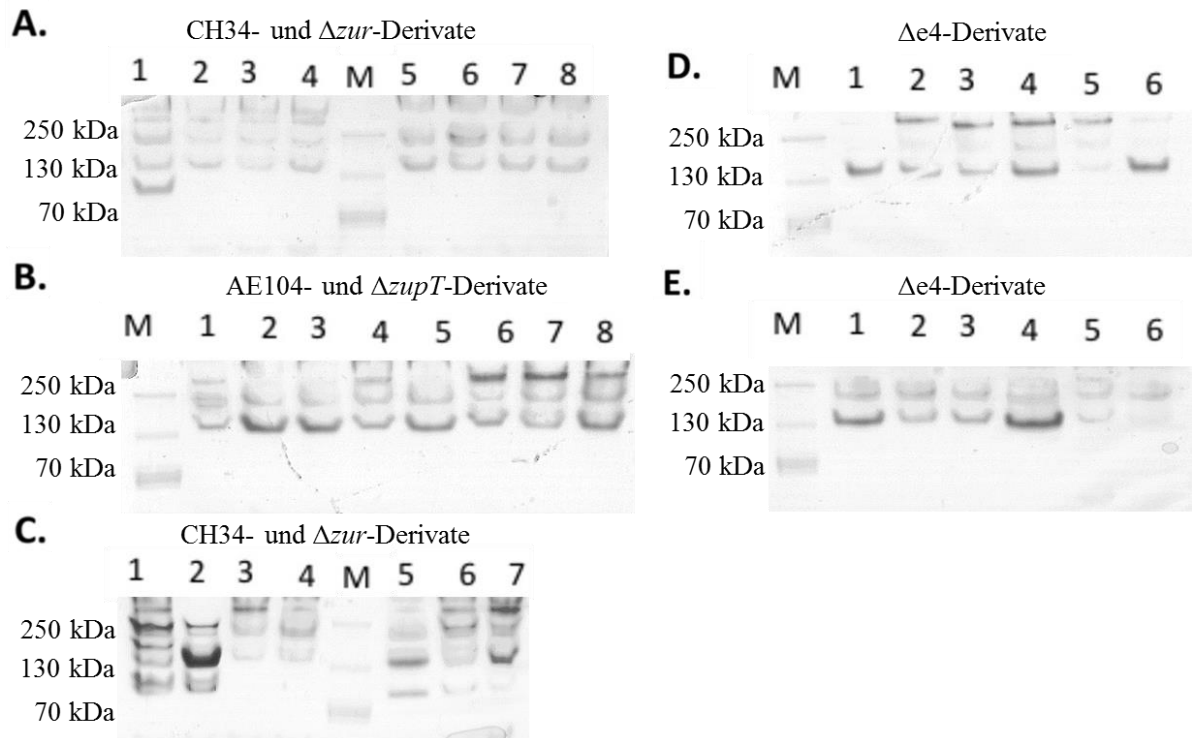


Abbildung 50: In Gel-Aktivität der löslichen Hydrogenase durch Benzylviologen und $\text{NADH}+\text{H}^+$. 100 μg der Rohextrakte aller *C. metallidurans*-Stämme wurden auf eine 10 %ige Native-PAGE aufgetragen. A: CH34- und Δzur -Derivate (1) CH34 ΔcobW_3 , (2) CH34 ΔcobW_1 -Cluster, (3) CH34 ΔcobW_1 -Cluster ΔcobW_3 , (4) CH34 $\phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (5) Δzur , (6) $\Delta\text{zur}\Delta\text{cobW}_3$, (7) $\Delta\text{zur}\Delta\text{cobW}_1$ -Cluster, (8) $\Delta\text{zur}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$ B: AE104- und ΔzupT -Derivate (1) AE104, (2) AE104 ΔcobW_3 , (3) AE104 $\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_1'::\text{lacZ})354$, (4) AE104 $\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (5) ΔzupT , (6) $\Delta\text{zupT} \Delta\text{cobW}_3$, (7) $\Delta\text{zupT}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_1'::\text{lacZ})354$, (8) $\Delta\text{zupT} \Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$ C: CH34- und Δzur -Derivate (1) CH34, (2) CH34 $\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (3) CH34 ΔcobW_1 -Cluster $\phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (4) CH34 ΔcobW_1 -Cluster $\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (5) $\Delta\text{zur} \Delta\text{cobW}_1$ -Cluster, (6) $\Delta\text{zur}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (7) $\Delta\text{zur}\Delta\text{cobW}_1$ -Cluster $\phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$ D Efflux-deletionsmutanten: (1) $\Delta\text{e4}\Delta\text{cobW}_3$, (2) $\Delta\text{e4}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_1'::\text{lacZ})354$, (3) $\Delta\text{e4}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (4) $\Delta\text{e4}\Delta\text{zupT}\Delta\text{cobW}_3$, (5) $\Delta\text{e4}\Delta\text{zupT}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_1'::\text{lacZ})354$, (6) $\Delta\text{e4}\Delta\text{zupT}\Delta\text{cobW}_3 \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$ E Efflux-deletionsmutanten: (1) $\Delta\text{e4}\Delta\text{cobW}_1$ -Cluster $\phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (2) $\Delta\text{e4}\Delta\text{cobW}_1$ -Cluster, (3) $\Delta\text{e4}\Delta\text{zur} \phi(\text{cobW}_2'::\text{lacZ})299$, (4) $\Delta\text{e4}\Delta\text{zur}$, (5) $\Delta\text{e4}\Delta\text{zupT}$, (6) Δe4 . Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus diente als Größenstandard.

11.15 Aminosäurealignment der CobW's aus *E. coli* und *C. metallidurans*

Mit dem Programm Geneious 8 wurden die Aminosäuresequenzen von YeiR und YjiA aus *E. coli* und CobW_{1/2/3} aus *C. metallidurans* aligniert, putative metallbindende Aminosäuren markiert und die G-Motive eingezeichnet (Abb. 51).

