

„**Biometall-Homöostase in *Escherichia coli***“

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t



zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dr. rer. nat. Gregor B. Grass

geb. am 8. Juni 1970 in Frankfurt am Main

Gutachter /in

1. Prof. Dr. D. H. Nies
2. Prof. Dr. W. G. Zumft
3. Prof. Dr. K. Hantke

Halle (Saale), 10. 1. 2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010059

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010059>]

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Was machte ein Metall zum Biometall?.....	1
1.2 Die Metallhomöostase von <i>E. coli</i>	3
2. METALL-HOMÖOSTASE-MECHANISMEN IN GRAM-NEGATIVEN BAKTERIEN	6
2.1 Metall-Aufnahme	6
2.1.1 Aufnahme von Fe(II) durch FeoB	9
2.1.2 Aufnahme divalenter Metall-Kationen durch den ZIP-Transporter ZupT	11
2.2 Metall-Efflux	14
2.2.1 Efflux divalenter Metallkationen durch <i>Cation Diffusion Facilitators</i> (CDF)	14
2.2.2 Zusammenspiel von Transportern der Cytoplasmamembran mit <i>Resistance Nodulation Cell Divison</i> (RND)–Transport-Systemen	20
2.2.3 Nickel-Transport durch den NreB bzw. CnrT aus <i>C. metallidurans</i>	26
2.3 Homöostase ohne Transport	27
2.3.1 Die Multi-Kupfer-Oxidase CueO: Schnittstelle zwischen Eisen- und Kupfer- Homöostase	27
2.3.2 Das Kupfer-Resistenz-System Pco	33
2.3.2 Schutz vor Eisen- und Kupfer-vermittelten Stress durch das Dps Protein.....	36
3. AUSBLICK	41
4. LITERATUR	43
5. VERZEICHNIS DER FÜR DIESE ARBEIT RELEVANTEN EIGENEN VERÖFFENTLICHUNGEN	56
6. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	58
7. LEBENSLAUF	59
8. DANKSAGUNG	60

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP- <i>binding cassette</i> -Transporter
aa	Aminosäure(n)
ATPase	Adenosintri-phosphatase
bp	Basenpaare
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i> (Proteinfamilie)
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen
C-Terminus	Carboxyterminus
DMT	<i>Drug/Metabolite Transporter Superfamily</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTPase	Guanosintri-phosphatase
HME	<i>heavy metal efflux</i> (Proteinfamilie)
IRT	<i>iron regulated transporter</i>
<i>kan</i>	Aminoglycosid-3'-O-Phosphotransferase Gen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Me	Metall
MFP	<i>membrane fusion protein</i> (Proteinfamilie)
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
mRNA	messenger RNA
MCO	Multi-Kupfer-Oxidase
NiCoT	Nickel-Cobalt Transporter (Proteinfamilie)
NRAMP	<i>natural-resistance-associated macrophage protein</i>
nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
OMF	<i>outer membrane factor</i> (Proteinfamilie)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
rCu	regulatorisches (fünftes) Kupfer
RNA	Ribonukleinsäure
RND	<i>resistance, nodulation, cell division</i> (Proteinfamilie)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoff-Spezies)
TMH	Transmembrane Helix
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett

ZIP ZRT, IRT-ähnliche Proteine
ZRT *zinc regulated transporter*

1. EINLEITUNG

1.1 Was machte ein Metall zum Biometall?

Die meisten Organismen benötigen für ihren Stoffwechsel eine Reihe von Übergangsmetall-Ionen insbesondere der 4. Periode des Periodensystems der Elemente. Darunter finden sich neben Eisen auch Kupfer, Mangan, Zink, Nickel und Cobalt. Etwa 30% der Proteine eines durchschnittlichen Bakteriums sind Metalloproteine. Obwohl die Übergangsmetalle nur etwa 1-2% der Masse einer bakteriellen Zelle ausmachen (208), verweist der hohe prozentuale Anteil an Metalloproteinen auf ihre enorme Wichtigkeit. Tabelle 1 gibt einen Überblick über repräsentative Beispiele von physiologischen Reaktionen oder Enzymen, die Kationen von Nebengruppenelementen als Co-Faktoren besitzen. Metalle, die an diesen Prozessen beteiligt sind, können als Biometalle bezeichnet werden.

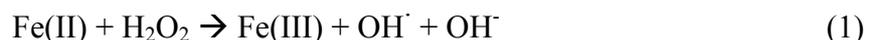
Tabelle 1: Physiologische Funktion, die von Metallenzymen katalysiert werden und minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) einiger Übergangsmetallkationen in *E. coli*

Übergangsmetallkation	Physiologische Funktion	MIC in [mM]
Eisen	Elektronentransportvorgänge in und Atmungsketten und Photosynthesen, Superoxiddismutase	N.D.
Kupfer	Elektronentransportvorgänge in und Atmungsketten und Photosynthesen, Superoxiddismutase	1.01-4.02
Zink	DNA- oder RNA-Polymerasen, Zink-Proteasen, Superoxiddismutase	1.01-2.02
Mangan	wasserspaltender Komplex der oxygenen Photosynthese, Superoxiddismutase	20.01
Cobalt	Zentralatom im Cobalamin von Methyltransferasen oder der Methylmalonyl-CoA Carboxytransferase	1.01-1.62
Nickel	Hydrogenasen, Ureasen, Methyl-Co-Enzym M Reduktase, Superoxiddismutase	1.01-4.02
Cadmium ³	Carboanhydrase einer marinen Diatomee	0.51-1.52
Quecksilber ³	-	0.011-0.032

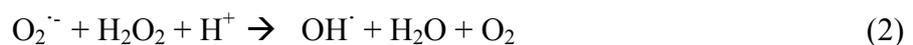
¹aus (142), ²aus (165), ³Cadmium und Quecksilber zum Vergleich als nicht-essentielle Metalle, N.D. nicht bestimmt

Die Übergangsmetalle Cadmium, Quecksilber, Blei oder Silber nehmen eine Sonderstellung ein, da sie im Gegensatz zu den Biometallen keine wichtige physiologische Funktion übernehmen (nur für Cadmium ist eine Ausnahme bekannt (103, 104)). Im Gegenteil, die Zellen müssen diese Metalle entgiften, da sie eine hohe Affinität zu Thiol-Gruppen haben und somit viele Enzyme meist über Bindung an Cysteine inaktivieren können. Zusätzlich verdrängt besonders Cadmium andere Metall-Co-Faktoren aus aktiven Zentren von Enzymen, was zur Enzyminaktivierung führt (146). Als Beispiel für eine physiologische Reaktion auf Cadmium kann angesehen werden, dass das Laubmoos *Physcomitrella patens* unter Cadmium-Stress die Cystein-Biosynthese über das nicht Cadmium-sensitive Enzym Phosphoadenosine-5'-phosphosulfatreduktase (PAPSR) umlenkt, da die Adenosine-5'-phosphosulfatreduktase (APR) Eisen-Schwefelkluster besitzt, die durch Cadmium inaktiviert werden (172).

Obwohl durch die genannten Beispiele die Notwendigkeit einiger Übergangsmetalle für das Leben deutlich wird, entstehen durch Redox-aktive Metalle in Nebenreaktionen freie (Sauerstoff)-Radikale, die die Zelle schädigen. Die wichtigsten Reaktionen sind als Fenton-((49), Reaktion 1) bzw. Haber-Weiss-Reaktionen ((76), Reaktion 2) bekannt. Jedoch findet die Reaktion (2) nur unter Anwesenheit eines Metall-Katalysators statt und beschreibt somit im Grunde nur die Fenton-Reaktion (99).



Metallkatalysator



Auf der anderen Seite sind aber diese Redox-aktiven Metalle (Kupfer und Eisen) wie auch Zink und Mangan als Metall-Co-Faktoren in Superoxiddismutasen an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt. Auch eine Nickel-abhängige Superoxiddismutase konnte kürzlich identifiziert und charakterisiert werden (44). Der Abbau von Wasserstoffperoxid erfolgt außer durch Peroxiredoxine meist durch die Eisenproteine Katalasen bzw. Peroxidasen.

Nur wenige Lebewesen können überhaupt ohne einzelne der genannten Biometalle auskommen. Prominente Beispiele hierfür sind einige Milchsäurebakterien und der durch Zecken übertragene Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, die wahrscheinlich völlig ohne Eisen und damit eisenhaltige Enzyme auskommen können (161).

1.2 Die Metallhomöostase von *E. coli*

Escherichia coli ist der mikrobielle Modell-Organismus für eine Vielzahl an Untersuchungen zur Physiologie, Biochemie und Genetik. Viele der in anderen Bakterien bekannten Metall-Homöostase-Mechanismen können ebenfalls in *E. coli* untersucht werden. Mit die ersten bakteriellen Vertreter einer Reihe von Metall-Transportern, so z.B. der ZIP-Transporter ZupT (70) oder die P-Typ ATPasen CopA (156, 163) und ZntA (11, 165) wurden in *E. coli* identifiziert. Ebenso ist CueO die erste und am Besten charakterisierte Multi-Kupfer-Oxidase aus Bakterien (67-69, 145, 167, 168, 185, 199). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Metall-Homöostase-Mechanismen aus *E. coli*.

Tabelle 2: Verteilung bekannter Metall-Homöostase-Systeme im *E. coli* Stamm W3110

Metall	Name	Funktion
Eisen	FeoABC MntH ¹ Rezeptor-gestützte ABC-Transporter (Fep, Fhu, Cir Fiu, Fec) ZupT ¹ FtnA, FtnB?, Bfr, Dps FieF	Fe(II)-Aufnahme Fe(II)/Mn(II)-Aufnahme Fe(III)-Siderophore-Aufnahme (Enterobaktin, Ferrioxamin, Catecholate, Citrat) Fe(II)-Aufnahme Eisenspeicherung Fe(II)-Efflux
Kupfer	CopA CusC(F)BA CueO	Kupfer-Efflux Kupfer-Efflux Cu(I)-Oxidation, Schutz vor ROS ²
Zink	ZnuABC ZupT ¹ ZntA ZitB	Zink-Aufnahme Zink-Aufnahme Zink-Efflux Zink-Efflux
Mangan	MntH ¹ ZupT ¹	Mangan-Aufnahme Mangan-Aufnahme
Cobalt	CorA	unspezifische Aufnahme
Nickel	NikABCDE	Nickel-Aufnahme
Cadmium	ZupT1	wahrscheinlich unspezifische Aufnahme

¹Mehrfachnennung, da mehr als ein Substrat transportiert wird, ²ROS, reactive Sauerstoffspezies

Ein wichtiger Vorteil von *E. coli* gegenüber anderen Bakterien ist seine geringe Redundanz in Transportsystemen. In der Regel kommen in *E. coli* nur ein bis zwei Vertreter der gleichen

Proteinfamilie vor, die ein überlappendes Substratspektrum besitzen. So kann durch Deletionsmutagenese relativ einfach die Funktionen einzelner Homöostase-Systeme untersucht werden. Hinzu kommt die große Vielfalt an etablierten molekulargenetischen Methoden für diesen Organismus.

Dennoch ist es erstaunlich, dass zum jetzigen Zeitpunkt noch mehr als ein Drittel aller Gene von *E. coli* in Datenbanken als „putative Gene“ annotiert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass auch weitere, bisher unbekannte Transporter in *E. coli* vorhanden sind und auf ihre Entdeckung warten. Besonders gilt dies für Nickel und Cobalt. Für keines dieser beiden Biometalle war bis vor kurzem in *E. coli* ein Efflux-System bekannt. Die recht hohe Resistenz sowohl gegenüber Ni(II) als auch gegenüber Co(II) (Tabelle 1) ließ unbedingt solche Transporter erwarten. Mit RcnA (YohM) konnte jetzt der wahrscheinlich erste Co(II)- und Ni(II)-Efflux-Transporter in *E. coli* identifiziert werden (171 und eigene unveröffentlichte Daten). Allerdings sprechen die vorliegenden Daten für weitere unbekannte Co(II)- und Ni(II)-Transporter in *E. coli*.

Am Besten von allen Biometallen ist die Eisenhomöostase in *E. coli* untersucht worden (als Review siehe (17)). Trotzdem konnten kürzlich zwei weitere Eisen-Transporter in *E. coli* identifiziert werden. Der eine, ZupT, wurde ursprünglich als Zink-Aufnahme-System charakterisiert (70), zusätzlich transportiert ZupT aber auch Eisen und eine Reihe weitere Metalle wahrscheinlich als divalente Kationen (63). Der zweite Transporter, FieF, ist in der Lage, Eisen aus dem Cytoplasma zu transportieren und damit die Zelle zu entgiften (66).

Bislang scheint Entgiftung durch Efflux der wichtigste Mechanismus der Kupfer-Homöostase in *E. coli* zu sein. Dabei übernehmen die P-Typ-ATPase CopA und das Cus-System den Kupfertransport aus der Zelle (164). In *E. coli* und den meisten anderen Bakterien ist aber völlig offen, wie Kupfer in die Zelle gelangt.

Deletionsmutanten der Gene der beiden bekannten Mn(II)-Transporter, *mntH* und *zupT*, wachsen auch ohne Zugabe von Mangan im Kultivierungsmedium ähnlich gut wie der Wildtyp (63). Gibt es einen weiteren Transporter für Mangan oder stellt *E. coli* seinen Stoffwechsel unter Manganmangel um?

Trotz dieser vielen offenen Fragen konnten mit dem Aufblühen der Molekulargenetik und der damit verbundenen großen Vielzahl an Deletionsmutanten in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis der bakteriellen Metallhomöostase gewonnen werden. Nach und nach kann nun ein Gesamtbild der Metallhomöostase beschrieben werden d.h. die Einzelkomponenten können zu einem größeren Ganzen zusammenzuführen und letztendlich

das Zusammenspiel der verschiedenen Systeme untersucht werden. Dies wird hoffentlich letztendlich dazu beitragen, die Frage zu beantworten, wie Leben funktioniert. In den folgenden Kapiteln werden wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Funktion von Aufnahme- und Efflux-Mechanismen und ihrem Zusammenspiel für die verschiedenen Biometalle näher beschrieben.

2. METALL-HOMÖOSTASE-MECHANISMEN IN GRAM-NEGATIVEN BAKTERIEN

2.1 Metall-Aufnahme

Eine Übersicht über die verschiedenen Mechanismen der Biometall-Aufnahme ist in Abbildung 1 dargestellt. In Gram-negativen Bakterien werden die Kationen Ni(II), Co(II), Zn(II) oder Mn(II) schnell und unspezifisch durch das CorA-Protein aufgenommen (85, 194). CorA, ein Transporter der Cytoplasmamembran, ist ein Homotetramer (212) wobei jede Untereinheit drei transmembrane Helices besitzt (186). Nicht nur in Bakterien ist CorA das wichtigste Mg(II)-Aufnahme-System. Verwandte Transporter der MIT-Familie wurden auch in Archäen (187), *Saccharomyces cerevisiae* (116) und in humanen Mitochondrien (97) identifiziert. Ursprünglich wurden bakterielle *corA*-Mutanten durch die resultierende Cobalt-Resistenz identifiziert (*Co-resistance A*) (153).

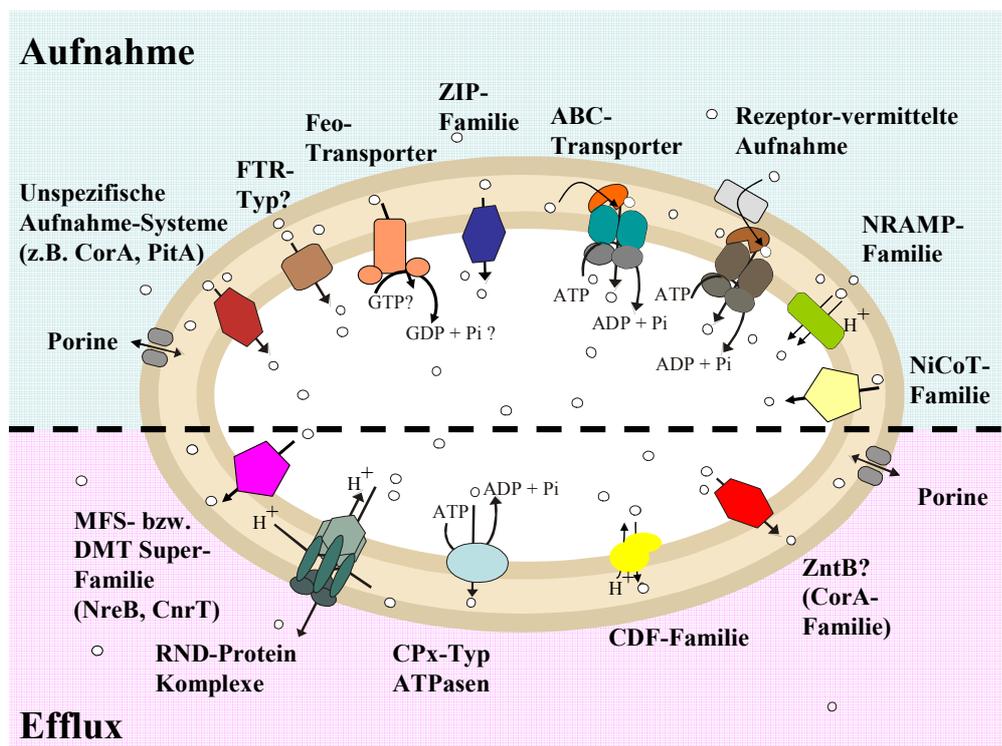


Abb. 1: Biometall-Aufnahme und Efflux-Systeme in Gram-negativen Bakterien. Dargestellt sind die wichtigsten Proteinfamilien, die Metallkationen transportieren können mit ihrer zellulären Lokalisation.

Daneben konnte für Zn(II) eine unspezifische Aufnahme über das Transport-System für anorganisches Phosphat, PitA, nachgewiesen werden (12). Möglicherweise gelangen unter Phosphatmangel auch andere Biometall-Kationen über dieses System in die Zelle. Wahrscheinlich gibt es daneben noch weitere, unspezifische Aufnahmesysteme mit geringer Effektivität.

ABC-Transporter. Als wichtigste Familie für spezifische Biometall-Kationen Aufnahme gelten jedoch die so genannten ABC (*ATP-Binding Cassette*) Transporter. Der Transport durch diese Familie, die außer Metallen auch viele andere Substanzen wie Peptide, Zucker, Siderophoren usw. als Substrate erkennen, wird in Bakterien oftmals durch ein dreiteiliges Proteinsystem bewerkstelligt: Im Periplasma befindet sich ein primäres Substrat-bindendes Protein, das bei Gram-positiven durch einen Membrananker mit der Cytoplasmamembran verbunden ist. In die Membran eingebettet ist eine Permease-Untereinheit, die für den Transport verantwortlich ist. An der Innenseite der Cytoplasmamembran in Kontakt mit der Permease ist die homodimere ATP-hydrolysierende Untereinheit (daher *ATP Binding Cassette*), die den Transport-Prozess antreibt. Die Permease- und die ATPase-Untereinheiten funktionieren dabei jeweils als Homo- oder Heterodimer. Unter den bekanntesten und am Besten untersuchten Metall-transportierenden Vertreter sind z.B. NikABCDE (135) und ZnuABC (154) (Ni(II)- bzw. Zn(II)-Aufnahme) aus *E. coli* oder YfeABC (Fe(III)- bzw. Mn(II)-Aufnahme) aus *Yersinia pestis* (13).

Rezeptor-gestützte ABC-Transporter. Eisen wird vielfach als Ferri-Siderophor-Komplex aufgenommen. Auch hierbei übernehmen ATP-getriebene Transporter (z.B. FepBCDG) den Eisen-Komplex (in diesem Falle Ferri-Enterobaktin) nach seiner Aufnahme in das Periplasma durch spezifische, mittels TonB/ExbB/ExbD energetisierte Rezeptoren (in diesem Falle FepA) in der äußeren Membran. FepB fungiert als periplasmatisches Bindeprotein, FepC als ATP-hydrolysierendes Protein, FepD und FepG als Permeasen (32, 182). Verschiedene Ferri-Siderophoren besitzen zwar unterschiedlich spezifische Rezeptoren in der äußeren Membran, für ihren Weitertransport vom Peri- in das Cytoplasma können jedoch diverse Ferri-Siderophoren gemeinsame ABC-Transporter nutzen. In *E. coli* wurde dies detailliert untersucht: Die Eisen-Siderophor-Rezeptoren FhuE und FhuA teilen sich das ABC-Transporter System FhuBCD (48, 101), während sich der Transport über die Rezeptoren FepA, Cir und Fiu über FepBCDG fortsetzt (147). Das Fec-System (Eisen-Dicitrat-*ferric*

citrate) Aufnahmesystem) aus *E. coli* (188, 205) hingegen besitzt einen eigenen Rezeptor: FecA (210). Über den Rezeptor, FecA in der äußeren Membran gelangt Eisen-Dicitrat ins Periplasma, wo es von FecB gebunden und durch FecCD und FecE ATP-abhängig ins Cytoplasma transportiert wird.

NiCoT-Familie. Neben den weit verbreiteten und diversen ABC-Transportern gibt es eine Reihe weiterer, kleinerer Familien, deren Vertreter mehr oder weniger spezifische Metall-Aufnahme-Transporter umfassen. Vertreter der NiCoT-(Nickel-Cobalt Transporter) Familie (38, 82) sind in einigen Bakterien, wie z.B. *Ralstonia eutropha* Stamm H16 (HoxN) oder *Rhodococcus rhodochrous* (NhlF) (45, 98) für eine spezifische Aufnahme von Ni(II) und Co(II) verantwortlich. Oftmals sind die Gene für Transporter dieser Familie in der Nähe von Genen lokalisiert, die entweder für Nickel- oder Cobalt-abhängige Enzyme codieren oder für Enzyme, die in der Cobalamin Biosynthese involviert sind (82, 98). So ist das *hoxN*-Gen Teil des Hydrogenase Gen-Clusters aus *Ralstonia eutropha* H16. Das HoxN-Protein ist somit für die Aufnahme für das für die Hox-Hydrogenase notwendige Ni(II) verantwortlich. Demzufolge könnten NiCoT-Proteine spezielle Transporter sein, die dafür sorgen, dass bestimmte Enzyme mit ihrem Metall-Co-Faktor versorgt werden (130). In *E. coli* findet sich kein Vertreter der NiCoT-Familie und das für Hydrogenasen nötige Ni(II) wird durch den ABC-Transporter Nik aufgenommen (117).

NRAMP-Transporter. Die NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) Transporter wurden ursprünglich in Eukaryoten identifiziert. Ihr Vorhandensein kontrolliert die natürliche Resistenz von Mäusen gegen Infektion mit intrazellulären Parasiten (208). Die Vertreter der NRAMP-Familie weisen als gemeinsames Merkmal zehn transmembrane Domänen auf (24). Menschliches Nramp1 ist ein integrales Membranprotein, das exklusiv in Zellen des Immunsystems gebildet wird und anschließend an die Membran von Phagosomen während der Phagozytose gelangt. Nramp2 ist ein divalenter Kationen-Transporter des Darms mit breitem Substrat-Spektrum (Fe(II), Mn(II) oder Zn(II)) (59).

Das erste bakterielle NRAMP wurde in *E. coli* nachgewiesen und charakterisiert (118). MntH (Manganese Transporter H-dependent) ist ein Transporter der Cytoplasmamembran und transportiert neben Mn(II) auch Fe(II) im Symport mit Protonen (36, 63). Kürzlich konnten für die Transportfunktion wichtige Aminosäure-Reste in MntH identifiziert werden (27, 77).

Die Topologie von MntH wurde erstmalig für ein NRAMP-Protein experimentell bestätigt (36).

Oxidase-Permease-Aufnahme-Systeme. In Eukaryoten wird Fe(III) spezifisch durch die Kooperation zwischen einer Multi-Kupfer-Oxidase und einer Permease aufgenommen. Das wahrscheinlich am besten untersuchte Paar ist Fet3 (Oxidase) und Ftr (Permease) aus Hefen (8, 189). Während des Aufnahmeprozesses wird Fe(II) durch membranständiges Fet3 zu Fe(III) oxidiert und anschließend durch Ftr spezifisch ins Cytoplasma aufgenommen. Dieser auf den ersten Blick unlogische Prozess, nämlich die Oxidation des sehr löslichen Fe(II) zu dem nahezu unlöslichen Fe(III), dient wahrscheinlich der Spezifizierung dieser Art der Eisen-Aufnahme. Ftr-Typ Eisen-Permeasen besitzen so genannte REXXE-Motive als mögliche Eisen-Bindestellen (189, 200). Putative bakterielle Ftr-Vertreter (z.B. das hypothetische YcdN-Protein aus *E. coli* oder *Streptomyces coelicolor*) besitzen ebenfalls zwei solche Motive (hier jeweils REGLE). Versuche, YcdN eine Funktion in der Eisenhomöostase zuzuweisen, blieben bisher jedoch erfolglos. Weder die Deletion von *ycdN* zusätzlich zur Deletion aller relevanten Eisen-Aufnahmesysteme in *E. coli* noch eine Überexpression von *ycdN* führten zu einem sichtbaren Phänotyp unter Eisenmangel (Grass, Daten nicht publiziert). Als einziger bakterieller Vertreter dieser Familie wurde unlängst aus einem marinen, magnetotaktischen *Vibrio* Stamm (MV-1) das ChpA-Protein charakterisiert. Die Ftr-Permease ChpA funktioniert wahrscheinlich mit einer Multi-Kupfer Oxidase analog zu Ftr1 und Fet3 und ist in diesem Organismus wichtig für die Eisenaufnahme (41).

2.1.1 Aufnahme von Fe(II) durch FeoB

FeoB Proteine bilden eine kleine, wahrscheinlich Fe(II)-transportierende Familie. FeoB wurde erstmalig in *E. coli* identifiziert und kloniert (92). Eine *feoAB*-Mutante des intrazellulären Parasiten *Legionella pneumophila* zeigt sowohl verringerte Eisenaufnahme als auch verringertes intrazelluläres Wachstum (169). Für andere pathogene Bakterien wird FeoB als Virulenzfaktor diskutiert (16, 174, 202, 206). Da Nukleotidbindestellen im N-terminalen hydrophilen Teil von FeoB zu finden sind, wurde spekuliert, dass der Feo-vermittelte Eisentransport durch ATP-Hydrolyse angetrieben wird. Der Feo-vermittelte Eisentransport konnte durch den ATPase-Inhibitor Vanadat inhibiert werden (206). Die lösliche, N-terminale Domäne von FeoB besitzt GTPase-, jedoch keine ATPase-Aktivität (120).

Direkter Fe(II)-Transport durch FeoB konnte bisher nicht gezeigt werden. Somit ist ebenfalls möglich, dass FeoB an sich gar kein Transporter ist. Allerdings führt die Expression von *feo* zu einer erhöhten Eisenaufnahme. Daraus schlussfolgernd wird für FeoB als Möglichkeiten diskutiert: (i) der Eisentransport wird durch das Membranpotential energetisiert und die GTPase Domäne ist wichtig für die Regulation, (ii) Eisentransport wird nicht durch FeoB katalysiert, sondern durch einen anderen Transporter, der von FeoB reguliert wird oder (iii) Eisentransport wird durch GTP-Hydrolyse katalysiert, wobei Hilfsproteine (z.B. FeoA oder FeoC) wichtige Regulatoren der Aktivität sind (80).

In *E. coli* und einigen anderen Bakterien ist das *feoB*-Gen Teil eines di- oder tricistronischen Operons. Je nach Organismus besteht es aus *feoAB*, *feoBC* oder *feoABC*. Das *feoA* Gen wurde bereits gleichzeitig mit *feoB* entdeckt (92), jedoch nicht weiter charakterisiert. Der offene Leserahmen (ORF) von FeoC war sogar nur als putatives Protein (YhgG bzw. o78) in Datenbanken annotiert. Wir konnten zeigen, dass beide offenen Leserahmen *feoA* und *feoC* von *E. coli* exprimiert werden (195). Interessant ist in diesem Zusammenhang ein putatives metallbindendes CXXC-Motiv in FeoC von *E. coli*, das auch in FeoC aus anderen Bakterien konserviert ist. Möglicherweise ist dieses Motiv für eine Fe(II)-Bindung verantwortlich oder FeoC ist sogar ein cytoplasmatisches Eisenchaperon. Mit Hilfe von Deletion der beiden Gene *feoA* bzw. *feoC* konnte demonstriert werden, dass beide resultierenden Proteine jeweils Komponenten der Feo-vermittelten Eisenaufnahme in *E. coli* sind. Beide haben Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* unter Eisenmangel und beide regulieren wahrscheinlich indirekt die Expression der *feo*-Determinante, doch konnte der genaue Mechanismus ihrer Funktion nicht aufgeklärt werden. Ein direkter Einfluss von FeoA oder FeoC auf die Eisen-Akkumulation konnte experimentell nicht gezeigt werden (195).

Da die Topologie aus membranständigen Helices und cytoplasmatisch bzw. periplasmatisch lokalisierten Schleifen wichtige Aussagen über die mögliche Funktion eines Proteins zulässt, wurde diese für FeoB aus *E. coli* untersucht (195). Es konnte gezeigt werden, dass FeoB wahrscheinlich acht transmembranen Helices besitzt und dass beide Termini im Cytoplasma lokalisiert sind (Abb. 2). Der umfangreiche GTPase-Aktivität besitzende N-Terminus (120) befindet sich damit im Cytoplasma.

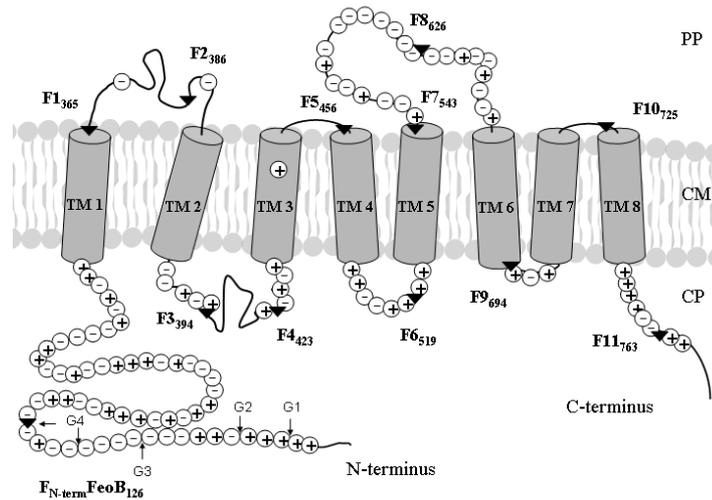


Abb. 2: Mögliches topologisches Modell des FeoB-Proteins aus *E. coli*. Die Projektion (Aminosäuren sind anhand ihrer Ladung dargestellt) wurde aus der Untersuchung der Aktivität von Fusionsproteinen mit alkalischer Phosphatase (PhoA) bzw. β -Galactosidase (LacZ) abgeleitet. F1-F11 bezeichnen Fusionsstellen und Aminosäurepositionen (tiefer gestellt). Die Nukleotid-Bindestellen innerhalb der GTPase-Domäne sind mit G1-G4 bezeichnet (wie beschrieben in (80)).

2.1.2 Aufnahme divalenter Metall-Kationen durch den ZIP-Transporter ZupT

ZIP-(*ZRT*, *IRT-like Protein*)-Transporter divalenter Kationen (73) wurden lange Zeit nur in Pflanzen und Tieren identifiziert und charakterisiert. In Pflanzenwurzeln ist IRT1 das wichtigste Eisenaufnahmesystem (207). Für den Menschen konnte gezeigt werden, dass hZIP1 wahrscheinlich das bedeutendste Zink-Aufnahmesystem ist (55). Der erste bakterielle ZIP Transporter konnte in *E. coli* identifiziert werden (70). Da für das 247 Aminosäure lange ZIP-Protein eine Beteiligung an der Zink-Homöostase festgestellt werden konnte, wurde es ZupT (*zinc uptake transporter*) genannt (70).

E. coli-Mutanten, bei dem die Gene des hoch-affinen ZnuABC-Zn(II)-Aufnahme Systems inaktiviert wurden, reagiert auf Zn(II)-Mangel mit verringertem Wachstum (154). Dieser Effekt verstärkt sich noch weiter, wenn zusätzlich ZupT deletiert wurde. Weiterhin führte die Expression von *zupT* in *E. coli* Stämmen, bei denen die Gene für alle bekannten Zn(II)-Homöostase-Mechanismen deletiert wurden, neben einer Verbesserung des Wachstums, zu einer erhöhten Akkumulation von Zn(II) (70).

Unter Verwendung von *E. coli* Stämmen, denen jeweils alle relevanten Transportsysteme deletiert wurden, konnte gezeigt werden, dass ZupT neben Zn(II) und Cd(II) auch für den Transport von Fe(II), Co(II) und vermutlich auch Mn(II) verantwortlich ist (63). Interessanterweise vermittelt die Überexpression von ZupT im Wild-Typ *E. coli* Stamm

W3110 diesem Sensitivität gegenüber den von ZupT transportierten Metallen. Mutmaßlich gelangen durch den übermäßigen, ZupT-vermittelten Einstrom zu große Mengen Metall-Kationen unkontrolliert ins Cytoplasma, so dass die Efflux-Systeme überlastet werden.

Im Gegensatz zu ZupT aus *E. coli* besitzen die meisten eukaryotischen Vertreter der ZIP-Familie eine zusätzliche Domäne und könnten damit das Problem der unkontrollierten Aufnahme unter Metall-Überschussbedingungen gelöst haben. Hier befindet sich eine Histidin-reiche Region zwischen Helix III und IV, die durch Metall-Bindung regulatorisch auf den Transport Einfluss nehmen könnte. Auch in einigen bakteriellen ZIP-Transportern ist diese Histidin-reiche Domäne vorhanden, so z.B. in ZupT aus *Cupriavidus metallidurans* CH34 (203). In diesem hochgradig Zn(II)-resistenten Bakterium würde ein doppelt negativ reguliertes Zink-Aufnahmesystem sehr sinnvoll sein. Neben einer Zn(II)-abhängigen transkriptionellen Kontrolle würde zusätzliche Kontrolle des Transportprozesses eine feiner abgestimmte Regulation zulassen. Kürzlich konnte für ZupT aus *C. metallidurans* CH34 eine durch Zn(II) reprimierte und durch EDTA stark stimulierte Genexpression gezeigt werden (Scherer, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu ist in *E. coli* die *zupT*-Expression jedoch nicht reguliert, und die *zupT*-Transkription erfolgt auf niedrigem konstitutiven Niveau (63). Die Expression von *zupT* aus *E. coli* wird durch Zink oder Eisenmangel nicht erhöht, auch nicht in Stämmen, bei denen die anderen relevanten Zn- bzw. Fe-Aufnahme-Systeme deletiert wurden (63). Dadurch, dass ZupT aus *E. coli* weder transkriptionell, noch auf Proteinebene durch eine Histidin-reiche Region reguliert wird, ist es hervorragend dazu geeignet, Me(II)-Transport zu untersuchen.

Wie für die meisten anderen ZIP Transporter, kann auch für ZupT (Abb. 3), eine Topologie aus acht transmembranen Helices und eine Lokalisierung der N- und C-Termini im Periplasma postuliert werden. Erste experimentelle Untersuchungen hierzu scheinen dies zu bestätigen (Grass et al., in Vorbereitung) und verifizieren damit die in Abb. 3 postulierte Architektur für ZupT.

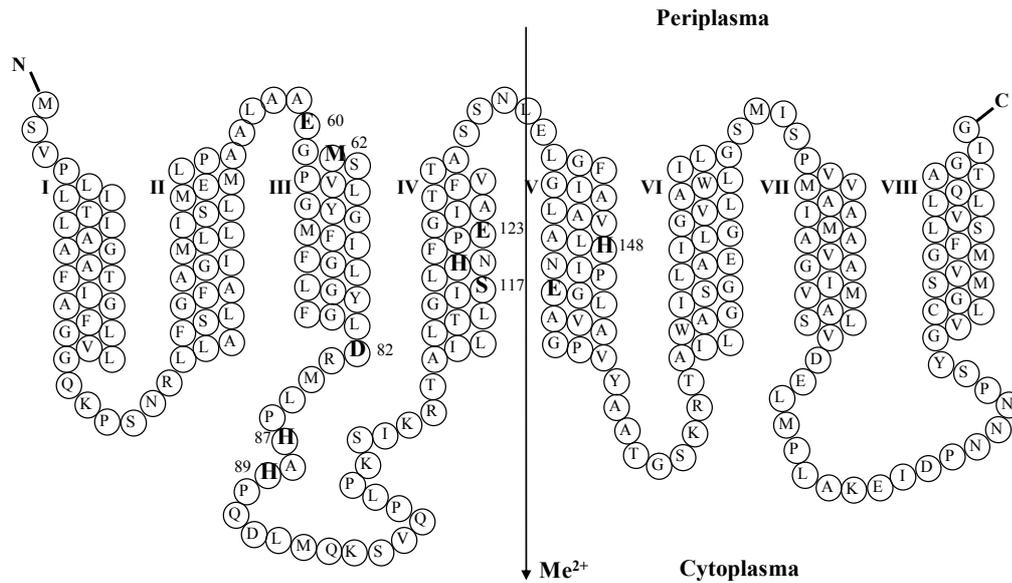


Abb. 3: Topologisches Modell des ZIP-Transporters divalenter Kationen ZupT aus *E. coli*. Dargestellt ist ein auf *in silico* Untersuchungen gestütztes Modell von ZupT. Transmembrane Helices sind mit I-VIII bezeichnet. Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode abgebildet. Zu anderen ZIP-Transportern konservierte Aminosäuren sind **fett** dargestellt.

Wie ZIP-Transporter energetisiert werden, ist noch ungeklärt. Die einzigen vorliegenden experimentellen Daten deuten auf einen Metall-Symport mit Bicarbonat hin (54). Möglicherweise kann eine Rekonstitution eines gereinigten ZIP Proteins in Proteoliposomen mit anschließender Transportmessung einen entscheidenden Fortschritt in dieser Richtung bringen. Ebenso ist zurzeit noch offen, wie die Substratspezifität bei ZIP-Transportern festgelegt wird.

2.2 Metall-Efflux

Während in Eukaryoten zellulärer Metall-Überschuss hauptsächlich durch Sequestrierung und Lagerung innerhalb der Vakuole begegnet wird, werden Schwermetallionen in den schneller wachsenden Prokaryoten hauptsächlich durch Energie-getriebenen Efflux entgiftet. Die Metall-Efflux-Systeme (als Review: (56)) umfassen *Cation Diffusion Facilitators* (CDF, (155)), *Resistance Nodulation Cell Division* (RND, (201)), *Major Facilitator Superfamily* (MFS, (119)), CPX-(oder P-)Typ-ATPase-Transporter (46), *Drug/Metabolite Transporter Superfamily* (DMT, (91)), vermutlich auch die CorA-Familie (56, 215), sowie Porine. Eine Übersicht dieser Familien ist in Abbildung 1 dargestellt.

2.2.1 Efflux divalenter Metallkationen durch *Cation Diffusion Facilitators* (CDF)

Proteine der *Cation Diffusion Facilitator* (CDF) Familie kommen in allen drei Domänen der Lebewesen vor. Alle bisher untersuchten Substrate von CDF-Proteinen sind divalente Kationen. Diese werden durch einen Protonen (oder K^+) Gradienten im Antiport zum Metallkation energetisiert (7, 28, 74, 106). Die einzige Ausnahme ist CepA aus *Klebsiella pneumonia*, das möglicherweise auch das Antiseptikum Chlorhexidin transportiert (47). Lange Zeit waren Cd(II), Zn(II), Co(II) die einzig bekannten Substrate von CDF-Proteinen. Kürzlich wurde die Liste jedoch um Mn(II) (39) und Fe(II) (66, 131) erweitert. In der Regel zeigen CDF-Proteine eine Topologie mit sechs transmembranen Helices (TMH) wobei sowohl der N- als auch der, für ein Membranprotein sehr umfassende (ca. 1/3 des Proteins), hydrophile C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind (Abb 4, (155)). Bei Zink-transportierenden CDF-Proteinen sind sowohl der N- und der C-Terminus als auch eine Schleife zwischen TMH IV und V Histidin-reich und dienen wahrscheinlich der Metallbindung und somit dem Transport und der Regulation (oder beidem) (7, 141).

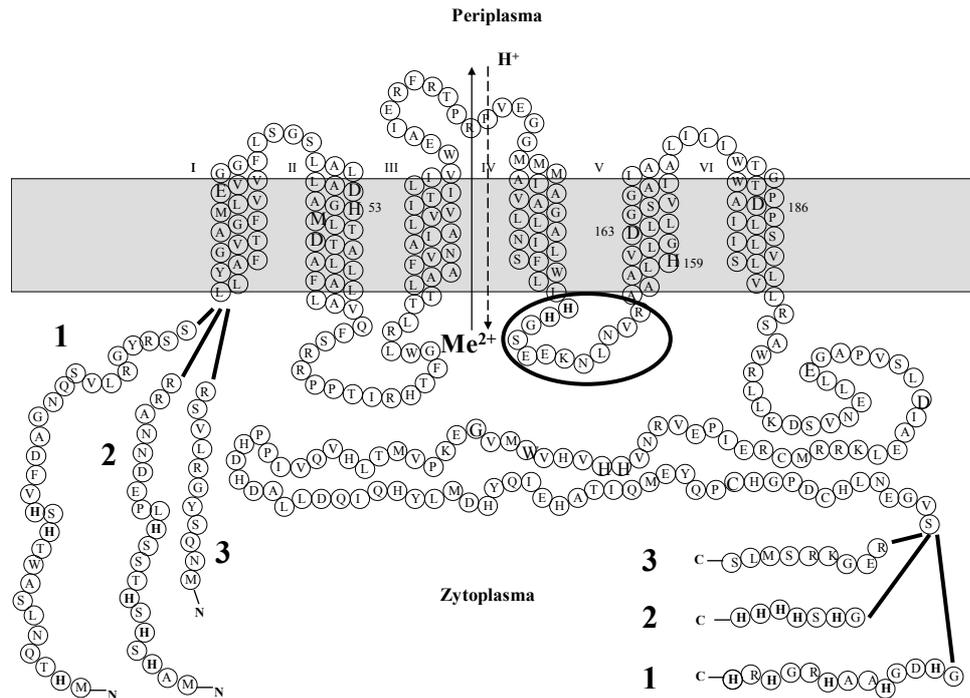


Abb. 4: **Vergleich und Topologie verschiedener Untergruppen der CDF-Proteine.** Die gezeigte Projektionen von DmeF (*C. metallidurans*, Gruppe 1), ZitB (*E. coli*, Gruppe 2) und FieF (*E. coli*, Gruppe 3) wurden aus computer-berechneten Vorhersagen abgeleitet (www.expasy.ch). Dargestellt ist die Membrantopologie von ZitB (Aminosäurereste im Einbuchstabencode) mit seinen Histidin-reichen Amino- und Carboxy-termini (2), die Termini von DmeF (1), das zusätzlich noch eine Histidin-reiche Region zwischen TMH IV und V besitzt (gekennzeichnet durch einen Kreis, für DmeF: HHGHDHGHGHDHGHQAAGHDHDDHGHGHHGHGHHGDDHGHRRHH) und die Termini von FieF (3), dem diese Histidin-reichen Regionen fehlen (141). Für ZitB sind die zu anderen CDF-Proteinen konservierten Positionen H53, H159, D163 and D186 dargestellt, die innerhalb von transmembranen Helices lokalisiert sind.

Während CDF-Transporter in Eukaryoten hauptsächlich der intrazellulären Homöostase dienen, also dem Transport von einem Kompartiment in ein anderes, sind sie in Prokaryoten bisher ausschließlich als Metall-Efflux-Systeme bekannt. Die Notwendigkeit von CDF-Proteinen wird z.B. beim so genannten „Lethal Milk“-Syndrom der Mäuse deutlich, bei denen das CDF-Protein ZNT-4 fehlt. Hierbei wird die Muttermilch nicht mit Zn(II) als Spurenelement beladen. Daher ist die Milch letztendlich toxisch und die Jungmäuse sterben an Zinkmangel (86, 150).

In Bakterien sind die CDF-Proteine, CzcD, ZitB und FieF (YiiP) die bestuntersuchten der gesamten Familie. CzcD kommt in *C. metallidurans* als Komponente der *czc* (Cobalt/Zink/Cadmium)-Resistenz-Determinante vor (7, 140). CzcD aus *Bacillus subtilis* war das erste bakterielle CDF-Protein für das der Metall-Transport in invertierten (*inside out*) Membranvesikeln und auch nach Rekonstitution in Proteoliposomen eindeutig nachgewiesen

werden konnte (74). Die bisher wohl umfassendste physiologisch-biochemische Untersuchung erfolgte zur Funktion von ZitB aus *E. coli* (7, 28, 61, 106). Physiologisch ist ZitB ein Zn(II) Transporter *in vivo*. *In vitro* konnte mit rekonstituiertem ZitB auch Cd(II) Transport gemessen werden. Das Verhältnis Zn(II) zu Protonen wurde als 1:1 bestimmt (28). Das würde jedoch bedeuten, dass der Transport nicht elektroneutral wäre. Weitere Studien müssen klären, ob nicht doch ein elektroneutraler Transport 1 Zn(II) zu 2 Protonen stattfindet. Durch gerichtete Mutagenese wurde ZitB funktionell charakterisiert. Ein Aminosäureaustausch in den zu anderen CDFs konservierten Positionen H53R, H159R, D163A and D186A, die innerhalb der transmembranen Helices lokalisiert sind, verursachte jeweils einen Funktionsverlust von ZitB (106). Diese geladenen bzw. polaren Aminosäurereste könnten am Zn(II)- bzw. Protonen-Transport beteiligt sein. Möglicherweise bilden sie ein *charge-relais* System (7, 155). Es konnte demonstriert werden, dass Aspartat-Reste an Protonentransfer-Reaktionen von Transportproteinen beteiligt sind (58, 148). In ZitB und in anderen CDF-Proteinen ist D50 neben H53 Teil eines konservierten DAxHMLTD-Motiv innerhalb der TMH II, wo D50 eine essentielle Aminosäure darstellen könnte, die periplasmatische Protonen gegen Zn(II) aus dem Cytoplasma austauschen könnte. Eine Mutation an dieser Stelle würde eine korrekte Protonierung verhindern. Periplasmatisches Zn(II) würde an diese Position gebunden und aufgenommen werden, indem es $\Delta\Psi$ folgen würde, anstatt aus dem Cytoplasma transportiert und gegen periplasmatische Protonen ausgetauscht zu werden (7). Andererseits könnten die genannten, konservierten Aminosäurereste schlicht zur allgemeinen Proteinstabilisierung beitragen oder an einem Konformationswechsel zwischen Substratbindung und Substratabgabe teilhaben. Erst eine Aufklärung der Proteinstruktur wird diese Frage beantworten können (79).

ZitB besitzt wie andere Zn(II)-transportierende CDF-Proteine eine Reihe von Histidin-Resten an seinen carboxy- und aminoterminalen Enden. Interessanterweise verursachte weder die Deletion des N- noch des C-Terminus einen Funktionsverlust (7, 106). Es bleibt zu untersuchen, in wieweit diese Domänen einen Einfluss auf die kinetischen Parameter von ZitB ausüben.

In invertierten (*inside out*) Membranvesikeln von *E. coli* transportierte ZitB $^{65}\text{Zn(II)}$ in Gegenwart von NADH mit einem K_m von $1.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ und einem V_{max} von $0.57 \text{ nmol Zn(II) min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$ (7). Diese Werte stehen im Widerspruch zu einer anderen Publikation, in der für in Proteoliposomen rekonstituiertes ZitB ein K_m von $104.9 \mu\text{M}$ bestimmt wurde (28). Die physiologische Rolle von ZitB sagt jedoch einen niedrigen K_m voraus: *E. coli* Zellen, die

zntA, das Gen für die Zn(II)-P-Typ ATPase ZntA exprimieren, jedoch in *zitB* deletiert sind, verhalten sich wie der Wild-Typ. Fehlen beide Transporter, sind die Zellen nur unwesentlich sensitiver als die *zntA*-Einzeldelentionsmutante (61), was darauf hindeutet, dass ZitB ein Homöostase-Faktor für Entgiftung geringfügigen Zn(II)-Überschusses ist. Im Gegensatz dazu ist ZntA in der Lage die Zellen vor hohen (mM) Konzentrationen Zn(II) zu schützen. Energetisch ist das sinnvoll, da ZntA große Mengen Zn(II) unter ATP-Verbrauch transportiert. Dafür spricht auch der K_m von ZntA für Zn(II), der mit 9 μ M höher als der von ZitB sein sollte, da ZntA erst aktiv werden sollte, wenn die Transportkapazität von ZitB nicht ausreicht (7, 61, 79).

Das zweite CDF-Protein aus *E. coli*, genannt FieF (*ferrous iron efflux*) ist vermutlich das erste beschriebene Eisen-Efflux-System in einem Lebewesen überhaupt. Eine frühere Studie über zwei CDF Proteinen der Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* deuteten ebenfalls auf Eisentransport durch Vertreter der CDF-Familie hin, jedoch wurden die Experimente nicht vertieft und Efflux letztendlich nicht bewiesen (112).

Eisenhomöostase durch Efflux mag auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheinen, da die Meinung verbreitet ist, dass die Eisenversorgung für die meisten Bakterien limitierend ist. Allerdings gibt es gute Gründe, die Eisen-Efflux doch als probates Mittel der Eisenhomöostase ausweisen:

Freies Eisen in der Zelle ist aufgrund der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies toxisch. *E. coli* besitzt wahrscheinlich bis zu vier verschiedene Eisenspeicherproteine, die bei Eisenüberschuss als Puffer wirken können: Ferritin (FtnA) (90), ein Ferritin-ähnliches Protein (FtnB) (1), Bakterioferritin (Bfr) (6) und das *DNA binding protein of starved cells* (Dps) (4). Damit wäre die Eisenhomöostase mechanistisch völlig verschieden von der von Kupfer oder Zink, bei denen Efflux-Proteine entscheidende Rolle spielen. Speicherproteine für Kupfer sind in *E. coli* nicht bekannt. Die Kupferhomöostase wird ausschließlich durch drei Komponenten bewerkstelligt. Die P-Typ-ATPase CopA, das *Resistance Nodulation Cell Division* (RND)-System CusCFBA und die Multi-Kupfer-Oxidase CueO tragen jeder auf seine Weise zur Entgiftung überschüssigen Kupfers bei (164). Ähnlich verhält es sich bei der Zink-Homöostase. Hier funktionieren die P-Typ ATPase ZntA und das CDF-Protein ZitB als effektive, mechanistisch verschiedene Efflux-Systeme (61) und kein Zink-Speicherprotein ist bekannt.

Für die Biometalle Zink, Cobalt, Nickel und Kupfer gibt es Efflux-Systeme, warum sollte Eisen eine Ausnahme bilden? Da sich die Zelle in einem Fließgleichgewicht befindet, wird es immer Bedingungen des Metallmangels bzw. des -überschusses geben. Je nachdem werden die entsprechenden Regelkreisläufe aktiviert, um ein optimales Gleichgewicht wieder einzustellen. Außerdem ist im Gegensatz zu Fe(III), das unter physiologischen Bedingungen nahezu unlöslich ist (10^{-18} M bei pH 7), Fe(II) unter anaeroben Bedingungen oder im sauren Milieu sehr löslich (136). Besonders also in seinem natürlichen Habitat, dem tierischen Darm, könnte ein Eisen-Efflux-System von Vorteil für *E. coli* sein (66).

Die CDF Proteine wurden in drei Unterfamilien eingeteilt (141). Gruppe 1 umfasst eine Reihe Zink-transportierender, eukaryotischer CDFs wie z.B. die ZnT-Reihe (125). Eines ihrer wichtigsten Merkmale ist eine Histidin-reiche Region zwischen TMH IV und V, die den CDF der anderen Unterfamilien fehlt (Abb.4). Zur Gruppe 2 gehören ebenfalls hauptsächlich Zink-Transporter. Zwar besitzen sie Histidin-reiche N- bzw. C-Termini, ihnen fehlt aber die Histidin-reiche Region zwischen TMH IV und V (Abb.4). Hierzu zählen die CzcD-Proteine (102, 140) und ZitB (61). Die weitaus größte und bis vor kurzem nicht charakterisierte Gruppe bildet die Unterfamilie 3. Diesen Transportern fehlen die Histidin-reichen Regionen, obwohl die konservierten Histidine, die in den TMH lokalisiert sind, auch in dieser Gruppe vorhanden sind (Abb.4). Proteine der Unterfamilie 3 kommen sogar in Rickettsien vor (annotiert als Rick02001526), einem Pathogenen mit reduziertem Genom, was auf eine wichtige Funktion dieser Transporter hindeutet. Für FieF konnten jetzt erstmalig CDF3-Vertretern eine zelluläre Funktion nachgewiesen werden (66, 131).

Andere Proteine der CDF3-Gruppe sind jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls am Eisentransport beteiligt. In *Magnetospirillum gryphiswaldense* sind zwei CDF3-Gene Teil des umfassenden *mam*-Clusters (63, 72, 180, 181). Die Deletion von *mamB* und *mamM* führt dazu, dass keine funktionsfähigen Magnetosomen mehr gebildet werden und sich die Bakterien folglich nicht mehr im magnetischen Feld orientieren können (179). Expression von *mamB*, *mamM* oder sogar *fieF* *in trans* in einer Δ *mamB*-Mutante resultierte in der Bildung von Magnetosomen (Schüler, pers. Mitteilung). Dies deutet stark darauf hin, dass diese Proteine am Eisentransport in die Magnetosomen beteiligt sind. Transport von Eisen vom Cytoplasma in die Magnetosomen würde in *E. coli* einem Transport vom Cytoplasma ins Periplasma entsprechen. Daher sind die entsprechenden Transportvorgänge (aus dem Cytoplasma heraus) miteinander vergleichbar.

In *E. coli* wird die Expression von *fieF* durch Zink induziert. Da jedoch die Deletion von *fieF* keinen Zink-sensitiven Phänotyp verursachte, blieb seine Funktion lange rätselhaft (61). Später konnte gezeigt werden, dass die *fieF*-Expression auch durch Eisen induziert wird (66). Dabei hat der globale Regulator der Eisenhomöostase, Fur, keinen direkten Einfluss auf die *fieF*-Expression in *E. coli*. Die Deletion von *fieF* in einem Δfur Stamm führte zu einem eisensensitiven Phänotypen, der *in trans* durch *fieF* (sowohl aus *E. coli* als auch aus *C. metallidurans*) komplementiert werden konnte (66, 131). Aufnahme-Experimente von ^{55}Fe in einem *E. coli* $\Delta fieF$ -Stamm demonstrierten, dass die Expression von *fieF* (sowohl aus *E. coli* als auch aus *C. metallidurans*) zu einer verringerten Eisenakkumulation im Vergleich zur Kontrolle führte. Mittels invertierter (*inside out*) Membranvesikeln konnte zwar kein direkter Eisentransport nachgewiesen werden, dafür war es möglich mit dieser Methode zu zeigen, dass FieF Zn(II) in Abhängigkeit vom Protonengradienten transportiert. Durch Rekonstitution des gereinigten FieF-Proteins in Proteoliposomen und Fluoreszenzquenching des Farbstoffes *Phen Green SK* gelang letztendlich *in vitro* der Nachweis des Eisentransports durch FieF (66).

Fu und Mitarbeiter charakterisierten ebenfalls die Funktion von FieF (hier unter der „Blattner“-Bezeichnung YiiP (29, 213)). Mittels isothermischer Titrations-Calorimetrie konnte demonstriert werden, dass Zn(II), Cd(II) und Hg(II) um die Bindung an YiiP konkurrieren. Jedoch existiert dabei je eine nicht-kompetitive Bindestelle für Cd(II) und Hg(II) und mindestens eine für Zn(II). Es wurden Hinweise gefunden, dass die Metall-Bindung zu einer Deprotonierung an FieF (YiiP) führt und dass die Zink-Bindung durch (einen) Histidinrest(e) zustande kommt (29). Die Bindung von Eisen wurde dabei aber nicht untersucht und auch die physiologische Relevanz der Zn(II)/Cd(II)/Hg(II)-Bindung bleibt noch offen. Mittlerweile konnte auch die Eisenbindung an FieF (YiiP) demonstriert werden (Fu et al., pers. Mitteilung). FieF (YiiP) liegt als Homodimer in der Cytoplasmamembran vor (213). Die Auflösung der Elektronen-Kristallografie an zweidimensionalen FieF-Kristallen reichte mit einer Auflösung von 25 Å jedoch noch nicht für eine genauere Darstellung der dreidimensionalen Struktur aus.

Im Rahmen der Sequenzierung des Genoms von *Cupriavidus metallidurans* CH34 (ehemals bekannt als *Pseudomonas* (126) *Alcaligenes* (127), *Ralstonia* (18), *Wautersia* (204)) CH34 (203) wurden neben dem Gen für das bekannte CDF-Protein CzcD zwei weitere potentielle, chromosomal codierte offene Leserahmen für CDF-Transporter identifiziert. Eines der Proteine wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu FieF aus *E. coli* ebenso benannt, das zweite

als DmeF (für *Divalent Metal Efflux*) bezeichnet (131). Die Expression von *fieF* aus *C. metallidurans* führte in *E. coli* zu verminderter Eisen- bzw. Zink-Akkumulation. Die *fieF*-Disruption resultierte in einem geringen Absinken der Minimalen Inhibitor Konzentration von Co(II), Ni(II) und Cd(II). Das DmeF-Protein zeigte dasselbe Substratspektrum wie FieF aus *C. metallidurans*. Für die Co(II)-Homöostase war jedoch ein größerer Einfluss zu verzeichnen: DmeF spielt die zentrale Rolle in der Co(II)-Homöostase in *C. metallidurans*. Eine Disruption von *dmeF* (131) verursachte eine funktionelle Inaktivierung der Resistenz-Systeme Czc (Co/Zn/Cd) (138) bzw. Cnr (Co/Ni) (113). Dies ist der bisher eindeutigste Beweis dafür, dass RND-Transporter der HME (*Heavy Metal Efflux*) Familie (201) ihr Substrat aus dem Periplasma beziehen und können dieses Kompartiment so entgiften.

Interessanterweise werden weder *dmeF* noch *fieF* in *C. metallidurans* transkriptionell reguliert. Die Transkription beider Gene erfolgt konstitutiv auf niedrigem Niveau (131). Demgegenüber wird die Expression von *czcD* in *C. metallidurans* bzw. *zitB* und *fieF* in *E. coli* metallabhängig induziert (61, 66, 71). Die *czcD*-Expression ist dabei wahrscheinlich abhängig von dem Zwei-Komponenten-System CzcRS und möglicherweise von weiteren, periplasmatischen Faktoren (71). Während in *E. coli* die Expression von *zitB* durch Zink, die von *fieF* durch Zink und Eisen induziert wird (61, 66), hat sich für *C. metallidurans* vermutlich die permanente Anwesenheit von CDF-Proteinen mit einer solch niedrigkonstitutiven Expression als vorteilhaft in einem von mit Metallen belasteten Standort bewährt.

2.2.2 Zusammenspiel von Transportern der Cytoplasmamembran mit *Resistance Nodulation Cell Division* (RND)–Transport-Systemen

RND-Systeme, auch *Transenvelope*-Transport-Systeme genannt, sind typische Transporter Gram-negativer Bakterien (201), obwohl verwandte Proteine auch in Archäen, in Gram-positiven Bakterien und im Menschen vorkommen. So spielt z.B. ein humaner Steroltransporter eine wichtige Rolle bei der intestinalen Absorption von Cholesterol (5). Seine Mutation verursacht den Typ C der Nieman-Pick-Krankheit (110).

Von den sieben Unterfamilien der RND-Permease-Superfamilie sind drei überwiegend auf die Gram-negativen Bakterien beschränkt. Dies sind die Schwermetalltransporter (HME, *Heavy Metal Efflux Family*), die Antibiotika-Effluxsysteme (HAE1, *Hydrophobe/Amphiphile Efflux-1 Family*) und die Transporter der Nodulationsfaktoren (NFE, *Nodulation Factor Exporter*

Family) (201). Im *E. coli*-Genom codieren acht Gene für RND-Transporter (15, 201). Die Transporter AcrB, AcrD, AcrF und MdtB (YhiV) sind an der Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika wie dem namensgebenden Acriflavin oder Erythromycin, verschiedenen Detergenzien (SDS), kationischen Farbstoffen (Kristallviolett) aber auch Gallensalzen beteiligt (96, 114, 115). YegNO (in MdtEF umbenannt) weisen Ähnlichkeit zu Transportern der NFE-Familie (*Nodulation Factor Exporter*) wie z.B. NolGHI aus *Rhizobium meliloti* auf (201). Die Gene *yegN* und *yegO* liegen wahrscheinlich translational gekoppelt in einem Operon vor, eine für RND-Proteine vermutlich einmalige Anordnung. Ein weiterer RND-Transporter aus *E. coli* wird vom *secDF*-Operon codiert. Er ist Teil des Sec-Efflux-Komplexes (157).

Das *ybdE*-Gen (201) schließlich, der einzige Vertreter der HME-Familie in *E. coli*, ist die zentrale Komponente des Cus-(*Cu-sensitivity*)-Systems, daher wurde es CusA genannt (145). In einer ersten Arbeit wurde vorgeschlagen, das Cus-System aufgrund des beobachteten Silber-sensitiven Phänotyps Agr (Ag-[Silber]-Resistenz) zu bezeichnen (50), mittlerweile hat sich jedoch der Name Cus durchgesetzt. Interessanterweise blieb in *E. coli* eine Deletion der *cus*-Determinante ohne Einfluss auf die Kupfer-Toleranz (50). Dieser Umstand ist das Ergebnis des komplexen Zusammenspiels verschiedener Mechanismen der Kupferhomöostase dieses Bakteriums.

Unter den Kupferhomöostase-Systemen in *E. coli* ist das Cus-System das komplexeste. Das *cusA* Gen ist Bestandteil des *cusCFBA*-Operons, während stromaufwärts und in Gegenrichtung ein Zwei-Komponenten System, CusRS, codiert wird, das sich selbst und die anderen *cus*-Gene Kupfer-abhängig reguliert (132). Weitere Bindestellen des *response regulators* CusR konnten in *E. coli* nicht identifiziert werden, allerdings existiert ein Zusammenspiel mit einem weiteren Zwei-Komponenten-System CopRS (YedWV), das ebenfalls auf Kupferstress reagiert (216). Das *cusC*-Gen codiert für einen *outer membrane factor* (OMF), *cusB* für ein *membrane fusion protein* (MFP) und *cusF* für ein kleines periplasmatisches Kupferbindeprotein (51).

Große Fortschritte wurden in letzter Zeit bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur aller Komponenten des RND-vermittelten Transports gemacht. Als erstes RND-Protein überhaupt konnte AcrB unabhängig von zwei Laboratorien als Homotrimer kristallisiert werden (133, 160). TolC, das zugehörige OMF, wurde ebenfalls als Trimer kristallisiert (100) und kürzlich mit MexA aus *Pseudomonas aeruginosa* erstmalig ein MFP (2, 84). Abbildung 5

zeigt die wahrscheinliche räumliche Anordnung von RND-MFP und OMF in Gram-negativen Bakterien am Beispiel des Cus-Systems aus *E. coli*.

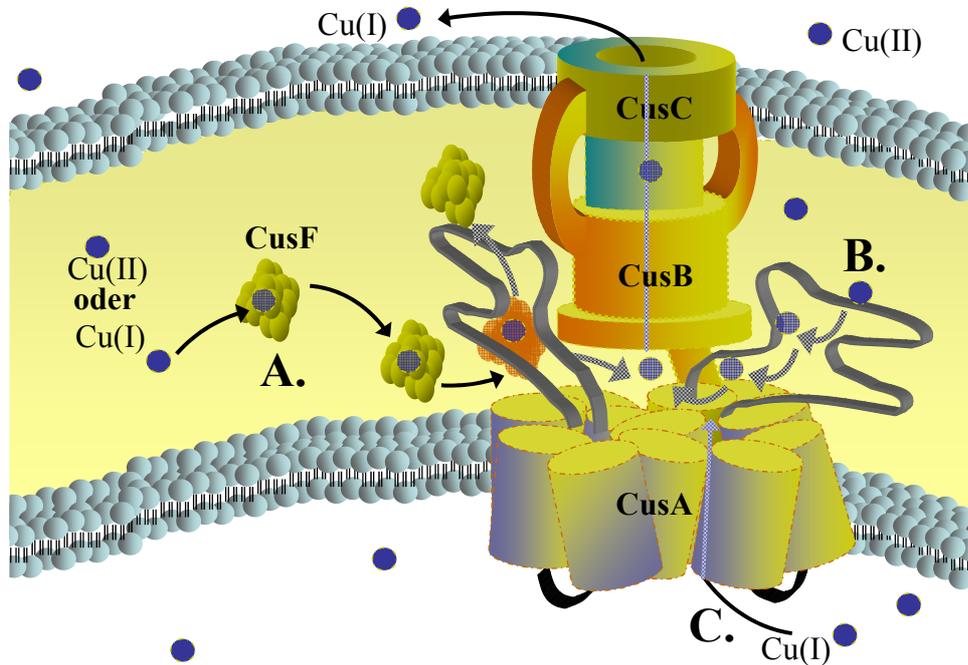


Abb. 5: Modell eines RND-Efflux-Komplexes am Beispiel von CusCFBA. RND-Transport-Komplexe sind Heteromultimere bestehend aus einem Trimer der zentralen, Protonen-getriebenen RND-Pumpe (z.B. CusA), einem stabilisierenden Membran-Fusions-Proteins, MFP (noch unbestimmtes Multimer) (z.B. CusB) und einem *Channel-Tunnel Outer Membrane Factor* Protein, OMF (z.B. CusC). Substrate werden wahrscheinlich vom RND-Protein im Periplasma aufgenommen (B.) und über das MFP und OMF nach außen transportiert. Viele vorliegende Daten sprechen gegen einen cytoplasmatischen Transport (C.), der jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann. Ein Spezial-Protein des Cus-Systems ist CusF. CusF ist ein Cu(I)-bindendes Chaperon im Periplasma, das für die volle Funktion des Komplexes nötig ist und vermutlich das Substrat zum Efflux-Komplex leitet (A.) (aus (164) leicht verändert).

Aus den vorliegenden Daten zum RND-vermittelten Transport und mit Hilfe theoretischer Überlegungen (149), kann man heute davon ausgehen, dass RND ihr Substrat nicht nur vom Cytoplasma, sondern auch vom Periplasma bzw. bei hydrophoben Substanzen aus der Cytoplasmamembran beziehen (108, 131, 144, 218). In Abbildung 5 ist am Beispiel von Cus dargestellt, wie die Substrataufnahme durch RND-Transporter-Komplexe (im weiteren als CBA-Typ-Transporter bezeichnet (164)) erfolgen könnte. Unter den Metall-transportierenden HME-CBA-Transportern sind CzcCBA und CusCBA die bestuntersuchten Vertreter. In *C. metallidurans* CH34 ist CzcCBA für eine ausgesprochen hohe Resistenz gegenüber Cadmium, Zink und Cobalt verantwortlich (143, 166). Die *czc*-Gene werden extrachromosomal auf dem größeren von zwei Megaplasmiden codiert (138). Das Czc-

System ist eine Efflux-Pumpe, die durch den Protonengradienten angetrieben wird (58, 139). Obwohl die Expression von *czcCBA* zu einer massiv erhöhten Metallresistenz führt, ist das System wahrscheinlich nicht alleine fähig, die Zelle von Metallen zu entgiften. So sind zusätzlich weitere Transporter der Cytoplasmamembran nötig.

Kürzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von P-Typ ATPase Genen und *CzcCBA* in *C. metallidurans* aufgeklärt werden (108). Die beiden P-Typ ATPasen *ZntA* und *CadA* aus *C. metallidurans* vermitteln $Zn(II)$ bzw. $Cd(II)$ Toleranz in *E. coli* und transportieren wahrscheinlich dieselben Substrate in *C. metallidurans*. In einem plasmidfreien Derivat von Stamm CH34, Stamm AE104, hatte die Einzeldelation von *zntA* bzw. *cadA* nur einen geringen Einfluss auf die Zink- bzw. Cadmium-Toleranz. In einem Doppelmutanten-Stamm jedoch verringerten sich die Zink-Resistenz 6-fach und die Cadmium-Resistenz 350-fach. Ist *CzcCBA* vorhanden, bleibt die Einzel- oder Doppelmutation der P-Typ-ATPase-Gene folgenlos auf die Zink-Resistenz, während sich die Cadmium-Resistenz in der Doppelmutante deutlich verringerte (108). Dies zeigte erstmalig, dass das *Czc*-System zumindest für Cadmium einen weiteren Transporter (hier eine P-Typ-ATPase) für seine Funktion benötigt. Ein noch eindeutigeres Ergebnis hinsichtlich des periplasmatischen Transports durch HME-CBA Systemen konnte durch die Untersuchung des Zusammenspiels mit CDF-Proteinen gewonnen werden. Das $Co(II)$ -transportierende CDF-Protein *DmeF* aus *C. metallidurans* ist essentiell für die $Co(II)$ -Resistenzvermittlung von *CzcCBA*. Ohne *DmeF*, aber in Anwesenheit von beiden Megaplasmiden mit *CzcCBA* und einem zweiten HME-RND-System, *CnrCBA* (113), verringerte sich die $Co(II)$ -Resistenz auf weniger als 1% des Wildtyps (131). Also ist auch für die Entgiftung von Cobalt neben einem HME-RND-System noch ein Transporter der Cytoplasmamembran nötig. Mit diesem Wissen ergibt nun die genetische Organisation vieler auf Plasmiden lokalisierter HME-RND-Determinanten Sinn: In direkter Nachbarschaft von CBA-Genen finden sich hier oft Gene von Transportern, die eine ähnliche oder gleiche Substratspezifität besitzen, wie die benachbarten CBA-Transporter. Darunter sind CDF-Proteine, *Major Facilitator Superfamily* (MFS) Proteine, *Drug/Metabolite Transporter Superfamily* (DMT, (91)) Proteine oder P-Typ-ATPasen. Als Beispiele seien hier *czcD* (CDF), *nreB* (MFS), *cnrT* (DMT) oder *silP* (P-Typ) genannt, die Teil der *czc*- $Co(II)$, $Zn(II)$, $Cd(II)$ -, der *ncc*- $Ni(II)$, $Co(II)$, $Cd(II)$ -, der *cnr*- $Co(II)$, $Ni(II)$ - oder der *sil*- $Ag(I)$ -Determinante sind (Abb. 6). Eine solche Determinante bildet damit eine

funktionelle Einheit, die auch nach horizontalem Gentransfer in Wirte funktioniert, die eine der Komponenten nicht selbst in ihrem Genom codieren.

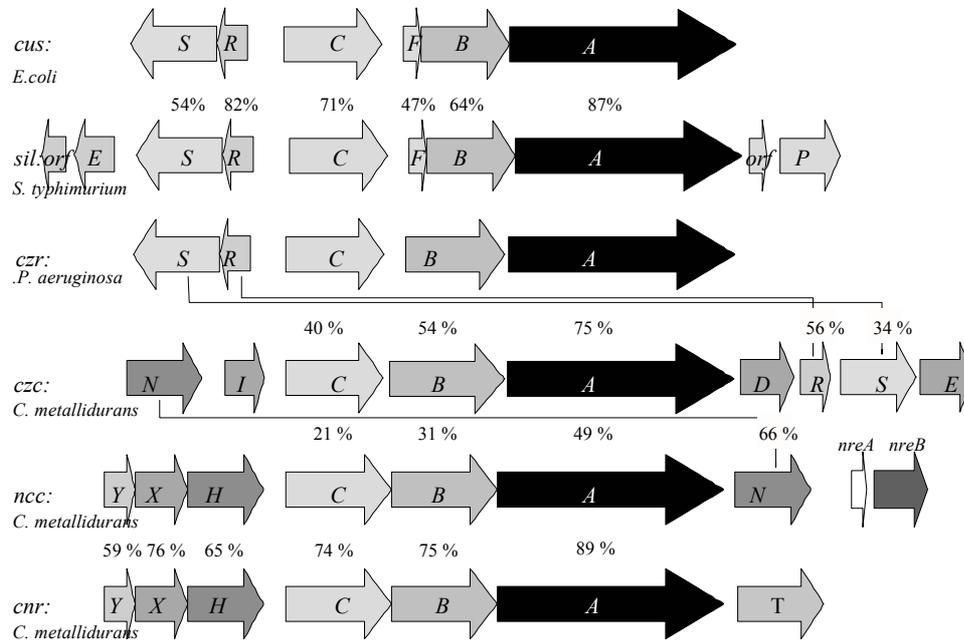


Abb. 6: Vergleich der genetischen Organisation plasmidal zu chromosomal codierter RND-Systeme.

Dargestellt ist die schematische Anordnung mit Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene folgender Schwermetall-Resistenzdeterminanten: *cnr* (Cobalt-Nickel), *ncc* (Nickel-Cobalt-Cadmium), *czc* (Cobalt-Zink-Cadmium), *czr* (Cadmium-Zink), *cus* (Kupfer-Silber) bzw. *sil* (Silber). Prozentzahlen geben die Identität entsprechender orthologer Proteine an. Nicht gezeigt sind (potenzielle) Promotoren. Regulation durch ein Zwei-Komponenten System scheint ein generelles Prinzip der Schwermetall-Resistenz-Systeme zu sein, da dieser Mechanismus am häufigsten vorkommt. „YXH“-artige Drei-Komponenten-Systeme sind bislang auf die Gattung *Cupriavidus* beschränkt.

Chromosomal-codierte RND-Systeme sind meist einfacher strukturiert und bestehen neben den CBA-Genen typischerweise zusätzlich nur aus einem Zwei-Komponenten-Regulations-System. Untersuchte Beispiele hierfür sind die Cd(II), Zn(II)-*czr*-Determinante aus *Pseudomonas aeruginosa* (81), das *hel*-Operon aus *Legionella pneumophila* (124) oder das *cus*-Operon aus *E. coli* (51). Beim Cus-System gibt es ein Zusammenspiel mit den anderen zentralen Komponenten der Kupferhomöostase. Zellen, die im *copA*-Gen mutiert sind (und denen daher die P-Typ-ATPase CopA fehlt), sind weniger Kupfer-tolerant als Wildtyp-Zellen. Eine Doppelmutante, die sowohl in *copA* als auch in *cus* deletiert wurde, ist nicht Kupfer-sensitiver als eine *copA*-Einzelmutante (68). Das deutet darauf hin, dass das Cus-System keine alternative Pumpe zu CopA für die Kupferentgiftung aus dem Cytoplasma ist. Demgegenüber zeigt eine Doppelmutante von *cus* und *cueO*, das die periplasmatische Multi-

Kupfer-Oxidase CueO codiert, eine gravierende Abnahme der Kupfer-Resistenz. Dass hier zwei Wege, zum einen CopA/Cus, zum anderen CueO, vorliegen, wurde durch die Untersuchung der dreifach-Mutante *copA/cus/cueO* ebenfalls deutlich. Diese ist nicht sensitiver gegenüber Kupfer als eine *cus/cueO*-Mutante (68). Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Cus-System nur dann aktiv ist, wenn Kupfer im Periplasma und nicht im Cytoplasma vorliegt. Die wichtige Rolle von Cus bei der zellulären Kupfer-Entgiftung wird unter anaeroben Bedingungen deutlich (145). Hier ist die sauerstoffabhängige Multi-Kupfer-Oxidase inaktiv und Cus das einzige periplasmatische Kupferentgiftungssystem.

Die herausragende Rolle von Vorgängen im Periplasma für den HME-vermittelten Transport, konnte besonders durch Untersuchungen der *cus*-Determinante gewonnen werden. Ähnlich anderer RND-Proteine besitzt CusA vermutlich 12 TMH und zwei große periplasmatische Schleifen, wie für CzcA experimentell gezeigt werden konnte (166). Mutantanalysen in CusA deuteten darauf hin, dass einige Methionin-Reste innerhalb der zweiten periplasmatischen Schleife wichtig für dessen Funktion sind (51). Während diese Methionin-Reste in Zn(II)/Co(II)/Cd(II)/Ni(II)-transportierenden RND nicht konserviert sind, finden sie sich bei anderen, putativen Kupfer-transportierenden RND. Möglicherweise sind diese konservierten Methionin-Reste an der Substratbindung beteiligt (164). Klarheit hierüber wird aber erst die dreidimensionale Struktur von CusA liefern.

Neben den Proteinen, die vom *cusCFBA*-Operon codiert werden, gehört ein Zwei-Komponenten System zur *cus*-Determinante. Histidinkinasen wie CusS besitzen wahrscheinlich periplasmatisch lokalisierte Erkennungstellen für ein spezifisches Signal (93, 151), sodass auch hier wahrscheinlich nicht die cytoplasmatische, sondern die periplasmatische Substrat-(Kupfer-) Konzentration gemessen wird, um die *cus*-Gene Kupfer-abhängig zu exprimieren.

Eine Besonderheit der Kupfer/Silber-transportierenden HME-RND ist ein kleines, etwas über 100 Aminosäuren langes, periplasmatisches Protein, CusF bzw. SilF (Abb. 5, 6). Das mature Protein bindet Kupfer im Verhältnis 1:1 und CusF-Lösungen sind rosa gefärbt (51). Wahrscheinlich sind CusF bzw. SilF periplasmatische Metallochaperone, die die Substratkationen zur CBA-Efflux-Maschine weiterleiten (164) (Abb. 5). Dafür würde auch der nur geringe, aber gut messbare, Effekt einer nicht-polaren Deletion von *cusF* innerhalb des *cusCFBA*-Operons sprechen (51).

2.2.3 Nickel-Transport durch den NreB bzw. CnrT aus *C. metallidurans*

Wie in Abbildung 6 dargestellt, werden in Nachbarschaft von vielen, hauptsächlich plasmid-codierten Metallresistenzsystemen des RND-Types weitere Transporter der Cytoplasmamembran codiert. Diese Transporter sind vermutlich für die Substratanlieferung für das RND-System zuständig und gleichzeitig ermöglichen sie die Entgiftung des Cytoplasmas, ähnlich wie es z.B. für das Paar CopA/Cus diskutiert wird (164, 209). Neben dem bereits gut charakterisierten CDF-Transporter CzcD, sind dies z.B. der *Major Facilitator* (119) NreB bzw. das *Drug/Metabolite Transporter Superfamily* Protein (91) CnrT aus *C. metallidurans* 31A bzw. CH34 (62, 141). Ähnliche, putative Transporter können in den Genomen anderer Bakterien, wie z.B. *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Legionella pneumophila*, *Hafnia alvei* (152), *Klebsiella oxytoca* (191) oder *Yersinia pestis* identifiziert werden. Als gemeinsames Merkmal besitzen sie außer den postulierten 12 transmembranen Helices (119) eine (sehr) histidinreiche Domäne an ihrem C-Terminus. Für NreB wäre dies HEHPDEEGMHVHLAEGERTGERSHRHAFTIDDQHPRWDAH, für CnrT HEHEHTHEPLEHSHSHRHDEHHQHEHDFWDGKEPHRHWHRHEVMVHKHPHYPDV HHRHSH (dargestellt sind jeweils die letzten C-terminalen Aminosäurereste). Für NreB konnte experimentell gezeigt werden, dass der C-Terminus zwar nicht essenziell, aber dennoch wichtig für die volle Funktion ist (62). Sowohl NreB als auch CnrT liegen stromabwärts der Gene „ihres“ RND-Systems. Während *nreB* wahrscheinlich einen eigenen Promotor besitzt, wird *cnrT* mit großer Wahrscheinlichkeit in einem gemeinsamen Transkript mit *cnrCBA* exprimiert. Die Expression des *nreB*-Gens wird spezifisch durch Nickel induziert (62), die von *cnrT*, weil es höchstwahrscheinlich im *cnr*-Operon liegt, zusätzlich durch Cobalt. Die Regulation der Transkription von *cnrT* erfolgt damit vermutlich wie für *cnrCBA* auch über das Drei-Komponenten-System CnrYXH (64, 65, 198). Der Regulationsmechanismus der Transkription von *nreB* ist noch weitgehend unbekannt, es wird aber ein kleines Protein, NreA, als spezifischer Regulator diskutiert (62), das auch bei anderen, nicht charakterisierten *nre*-Operons vorkommt. Nur für NreB konnten bisher Daten zum Metalltransport gewonnen werden: Expression von *nreB* verursacht verringerte Nickel-Akkumulation in *E. coli* (62).

Ökologisch ist das NreB-Protein recht interessant. Es konnte ein Transposon-System entwickelt werden, das keinen Antibiotika-Marker verwendet, sondern *nreB* als Nickel-Resistenz-Kassette. Nach Transposon-Mutagenese kann anschließend auf Nickel-Resistenz selektiert werden. Mit diesem innovativen System wurde also die Nutzung von Antibiotikaresistenz-Kassetten vermieden. Dieses *nre*-Minitransposon funktioniert in Vertretern der α , β und γ Proteobakterien (193).

2.3 Homöostase ohne Transport

2.3.1 Die Multi-Kupfer-Oxidase CueO: Schnittstelle zwischen Eisen- und Kupfer-Homöostase

Manche Organismen verfügen über spezielle Metall-Entgiftungsmechanismen, die ohne Transport auskommen. Bakterien mit Quecksilber-Resistenzen überführen mittels Hg(II)-Reduktasen Quecksilber in seine elementare Form, sodass dieses anschließend aufgrund seines niedrigen Siedepunktes in die Atmosphäre entweicht (183, 184).

Einen anderen Entgiftungsmechanismus katalysieren Multi-Kupfer-Oxidasen (MCO). MCO koppeln die Oxidation von Substraten mit der vollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Dabei bilden drei Typen von Kupfer-Bindestellen mit unterschiedlichen spektroskopischen wie funktionellen Eigenschaften eine Einheit. Typ 1 (blaues Kupfer) ist der primäre Elektronen-Akzeptor vom Substrat (mit einem typischen Absorptionsmaximum bei 610 nm). Ein so genanntes trinukleäres *Cluster* aus einem Typ 2 und zwei Typ 3 Kupfer bildet die Sauerstoff-Binde- und -Reduktions-Stelle (Abb. 7). Die Typ 3 Kupfer sind als binukleäres Zentrum spektroskopisch durch ein Absorptionsmaximum bei 330 nm charakterisiert.

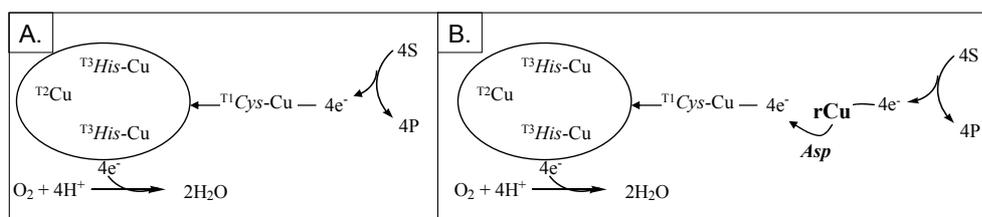


Abb. 7: Schema der Katalyse durch Multi-Kupfer-Oxidasen (MCO).

A. Oxidation durch Laccasen, Ascorbat-Oxidasen oder Ceruloplasmin, B. Oxidation durch CueO. (S)-Substrat; (P)-oxidiertes Produkt; T1-T3, Cu-klassische MCO Kupferzentren; rCu-regulatorisches, fünftes Kupfer-Atom in CueO

Prominente Vertreter dieser Gruppe sind Ceruloplasmin aus Säugern (178), pflanzliche Ascorbat Oxidase (158) sowie pilzliche Laccasen (177). Laccasen sind p-Phenol:O₂ Oxidoreduktasen (E.C. 1.10.3.2.) und katalysieren die Oxidation von p-Phenolen mit der nachfolgenden Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser, wobei die eigentliche Substratspezifität der Laccasen oft recht breit und von der jeweiligen Laccase abhängig ist.

Der Prozess der „Weißfäule“ des Holzes wird durch pilzliche Laccasen mitverursacht. Holz ist primär eher unzugänglich für Abbau, da die Cellulose der Pflanzenzellen durch Lignininkrustierung (Ligninbarriere) (109) geschützt wird. Lignin, die stabilisierende Matrix des Holzes, wird durch die von Pilzen ausgeschiedenen Exoenzyme Laccasen und Peroxidasen abgebaut, wobei Cellulose als weiches, brüchiges Material zurückbleibt und anschließend dem weiteren Abbau leicht zugänglich ist (111). Dabei gelangen die Laccasen jedoch nicht direkt an die Ligninmoleküle, sondern niedermolekulare Substanzen (Mediatoren) werden aktiviert und verursachen die Radikal-katalysierte Depolymerisation des Lignins (34). Demzufolge haben die Laccasen eine wichtige ökologische Rolle im Stoffkreislauf. Zusätzlich spielen pilzliche Laccasen bei Pigmentierung, Sporenbildung und sogar Pathogenität eine Rolle (83).

Bis vor kurzem waren kaum bakterielle Multi-Kupfer-Oxidasen bekannt, obwohl die wahrscheinlich erste Publikation, der Nachweis von Polyphenol-Oxidase Aktivität in *Azospirillum lipoferum*, bereits vor über einem Jahrzehnt erfolgte (57). Erst im Jahre 2000 wurden in einer Aufstellung die verschiedenen putativen Laccasen (= Multi-Kupfer-Oxidasen) in mehreren Bakterien katalogisiert (3). Interessanterweise waren aber einige bakterielle Multi-Kupfer-Oxidasen bereits vorher beschrieben worden, ohne dass ihre MCO-Aktivität untersucht wurde: Sowohl in *E. coli* als auch in *Pseudomonas syringae* oder *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* sind MCO in der Vermittlung der Kupfer-Resistenz beteiligt (14, 19, 26, 35).

Die erste bakterielle MCO deren dreidimensionale Protein-Struktur aufgeklärt werden konnte, war jedoch CueO (*Cu Efflux Oxidase*) aus *E. coli* ((167), Abb. 8). CueO wird vom *yacK* Gen codiert und besitzt die typischen Typ 1 bis 3 Kupferzentren der MCO. Zusätzlich findet sich eine Methionin-reiche Region ab Aminosäureposition 355 (MDPMLDMMGMQMLMEKYGDQAMAGMDHSQMMGHMGMHGNMNHM), die nur in MCO vorkommt, die an der Kupfer-Homöostase beteiligt sind. N-terminal findet sich bei Apo-CueO ein Leader-Peptid mit der typischen Signatur (MQRRDFLK) für TAT (*Twin Arginine Translocase* (40)) abhängigen Transport. Proteine, die durch TAT ins Periplasma transportiert werden, sind in der Regel Enzyme, die gefaltet und mit ihrem Co-Faktor beladen transloziert werden (21, 170, 176). Im Falle von CueO wären dies die vier MCO Kupfer-Zentren.

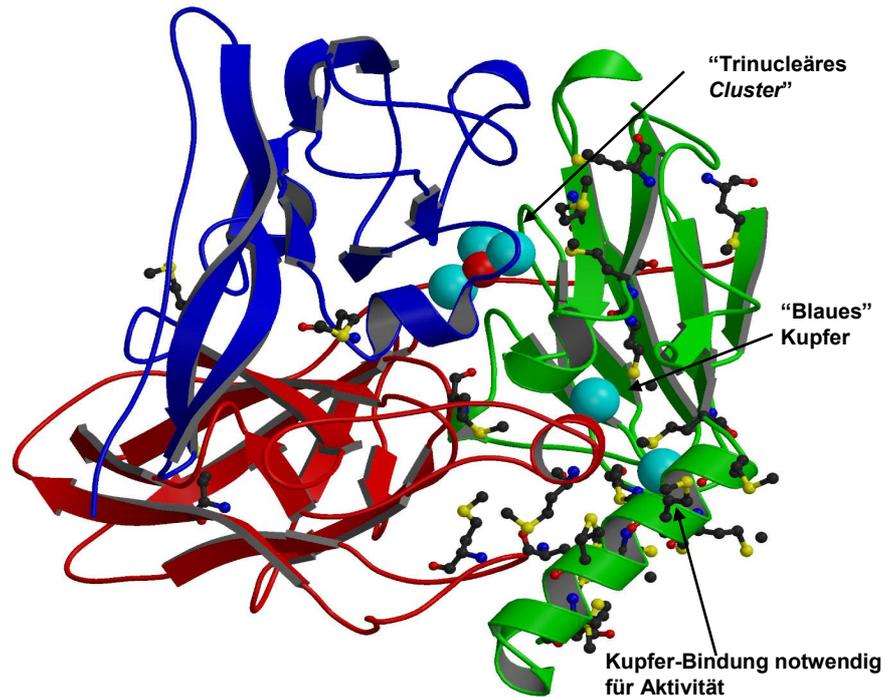


Abb. 8: Die Multi-Kupfer Oxidase CueO aus *E. coli* mit Kupfer Co-Faktoren.

Dargestellt ist die Projektion eines dreidimensionalen Modells von CueO mit seinen Kupferzentren (T1, „blaues Kupfer“; T2, T3, trinucleäres *Cluster*). Ein fünftes, regulatorisches Kupfer bindet an eine Methionin-reiche Helix und ist essenziell für die Oxidase-Aktivität von CueO (aus (164) leicht verändert).

Die MCO CueO ist neben den Efflux-Systemen CopA und Cus die dritte wichtige Komponente des Kupfer-Homöostases-Apparates in *E. coli*. CueO wird synthetisiert, wenn *E. coli* Kupferstress (ab ca. 5 μM CuCl_2) ausgesetzt wird (145). Ferner ist die Expression von *cueO* sauerstoffabhängig: Ohne Sauerstoff kann CueO seine Substrate nicht oxidieren und ist daher inaktiv (145, 164). Neben Sauerstoff ist die Enzymaktivität von CueO zusätzlich von der Kupferkonzentration abhängig. Die dreidimensionale Struktur von CueO konnte in einer Auflösung von 1.4 Å aufgeklärt werden (167). Die Struktur von CueO ähnelt der eukaryotischer Vertreter der MCO-Familie. Ein wichtiger Unterschied ist jedoch die Methionin-reiche Region, die anderen kristallisierten MCO fehlt. Diese Region bildet eine Helix, die den Zugang zum T1 Kupfer-Zentrum blockiert (167).

Unlängst konnten CueO-Kristalle, die in CuCl_2 getränkt worden waren, gewonnen und ihre dreidimensionale Struktur zu 1.7 Å aufgeklärt werden (168). Ein regulatorisches, fünftes Kupfer-Kation (rCu) konnte so identifiziert werden (Abb. 8). Dieses zusätzliche rCu liegt 7.5 Å vom T1-Kupfer-Zentrum entfernt innerhalb der Methionin-reichen Region. Die räumliche Koordinierung des rCu ist unüblich, trigonal-bipyramidal: Über Schwefelatome

zweier Methionine, über Carboxyl-Gruppen zweier Aspartate und ein Wasser-Molekül. Dabei bildet D439 sowohl eine Bindung zum regulatorischen, fünften Kupfer-Atom als auch Wasserstoffbrücken zum H443, welches wiederum ein Ligand des T1-Kupfer ist. Durch diese Architektur kann möglicherweise ein Elektronentransfer vom Substrat zum T1-Zentrum gewährleistet werden (Abb. 7). Der Austausch jedes einzelnen der vier Aminosäureliganden des rCu durch gerichtete Mutagenese (M₃₅₅L, D₃₆₀A, D₄₃₉A, M₄₄₁L), führte *in vivo* zur Verringerung der Kupfer-Toleranz von *E. coli* bzw. zum Verlust der Kupfer-Oxidase Aktivität der gereinigten CueO-Proteine *in vitro*. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das rCu für die Regulation der Enzymaktivität von CueO durch Kupfer essentiell ist (168).

Jüngst konnte für Fet3, die MCO aus *Saccharomyces cerevisiae*, gezeigt werden, dass sie Cu(I)-Oxidase Aktivität besitzt. Bis dahin wurde Fet3 allein eine wichtige Funktion in der Eisenaufnahme zugeordnet (9). Zusammen mit der Eisen-Permease Ftr ist Fet3 das wichtigste Eisenaufnahmesystem der Hefe. In der Hefe ist die Cu(I)-Oxidase Aktivität durch Fet3 wahrscheinlich wichtig für die Aufrechterhaltung einer stabilen Kupfer-Redox-Bilanz und damit der Kupfer-Homöostase (190).

Mittels Sauerstoffelektrode und einem relativ stabilem Cu(I)-Komplex (*Caged* Cu(I), Cu(I)(MeCN)₄) konnte nachgewiesen werden, dass CueO eine sehr effektive Cu(I)-Oxidase ist. Je nach experimentellen Bedingungen konnte ein K_m zwischen 90 und 169 µM und k_{cat} zwischen 57 und 914 min⁻¹ bestimmt werden (185). Durch die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) könnte CueO effektiv verhindern, dass Cu(I) zusammen mit Sauerstoffradikalen die Zelle schädigt.

Wie viele andere Multi-Kupfer-Oxidasen vermag auch CueO eine Reihe phenolischer Substanzen wie *p*-Phenylendiamin, 2, 6-Dimethoxy-Phenol, 3-Hydroxyanthranilat oder 2, 3-Dihydroxybenzoat zu oxidieren. Die K_m-Werte liegen dabei zwischen 0.3 und 3.2 mM und v_{max} wurden zwischen 3.8 und 95.9 U/mg bestimmt (95). Ähnlich wie Fet3 aus der Hefe oder menschlichem Ceruloplasmin besitzt CueO auch eine Ferro-Oxidase-Aktivität mit einem K_m von 70 (95) bzw. 129 ± 15 µM (69). Allerdings ist sowohl für die Phenol-Oxidase als auch für die Fe(II)-Oxidase-Aktivität von CueO die Anwesenheit von Kupfer zwingend notwendig. Ohne zusätzliches Kupfer sind beide Aktivitäten praktisch nicht vorhanden. Das bedeutet, dass das regulatorische fünfte Kupfer für alle diese Katalysen an die Methionin-reiche Domäne gebunden sein muss (168).

Was aber ist der Reaktionsmechanismus, durch den CueO im bakteriellen Periplasma Toleranz gegenüber Kupfer vermittelt? Und was ist *in vivo* das oxidierte Substrat? Eine Deletion von *cueO* verursacht einen leicht Kupfer-sensitiven Phänotyp. Dieser Effekt kann durch Deletion des Cus-Systems verstärkt werden. Dadurch konnte CueO neben Cus und CopA als drittes wichtiges Kupfer-Homöostase System in *E. coli* identifiziert werden (68, 145). Mittels *cueO* und *cueO/cus*-Doppelmutanten konnte auch erstmals gezeigt werden, was CueO in der Zelle bewirkt d.h. zu welchem Schaden das Fehlen von CueO führt: Ohne CueO werden unter Kupfer-Stress periplasmatische Enzyme geschädigt und diese konnten nur in geringerer Konzentration und damit niedrigerer Enzymaktivität nachgewiesen werden (gezeigt am Beispiel Alkalische Phosphatase) (67). Wahrscheinlich sind Superoxidradikale die reaktiven Sauerstoffspezies, die in Abwesenheit von CueO zu Schäden führen (199).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen (69, 95) wurde gezeigt, dass CueO neben der Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) auch verschiedene phenolische Verbindungen oxidieren kann. Überraschend war dabei die Oxidation von Enterobaktin, der catecholischen Eisen-Siderophore von *E. coli* und seinem Vorläufer 2,3-Dihydroxybenzoat. Die Affinität von CueO zu Ferric-Enterobaktin ist relativ hoch ($K_m = 1.5 \mu\text{M}$) (69). Damit ist es wahrscheinlich, dass der Catechol-Eisen-Komplex das von CueO bevorzugte organische Substrat ist.

Wildtyp *E. coli* Zellen, die unter Kupfer-Stress angezogen werden, färben sich unter Eisenmangel dunkel. Unter diesen Bedingungen werden sowohl CueO als auch Enterobaktin synthetisiert. Demgegenüber ist ein *E. coli* Stamm, der CueO defizient ist, einerseits Kupfer-sensitiver als der Wildtyp und andererseits farblos. Ohne CueO wirkt die Kombination Kupfer + Enterobaktin als Bakterizid auf *E. coli*-Zellen (69). Durch die Oxidation der Siderophoren wird vermutlich verhindert, dass Metall-katalysiert, reaktive Sauerstoffspezies innerhalb der Zelle entstehen (Abb. 9).

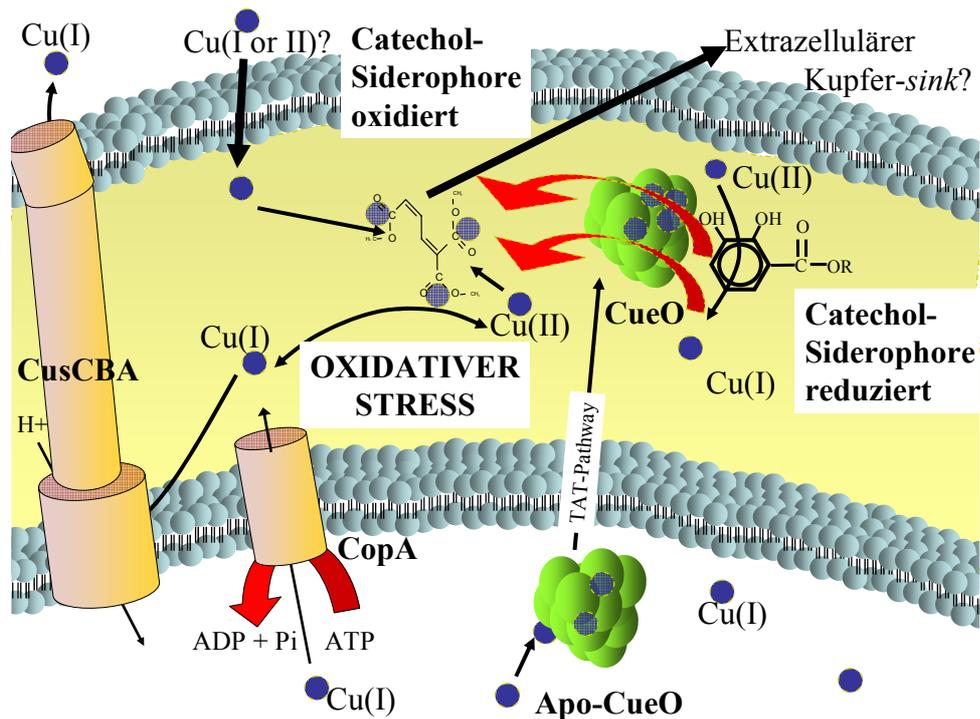


Abb. 9: Modell der zentralen Rolle von CueO innerhalb der Kupfer-Homöostase in *E. coli*.

Kupfer gelangt auf einem noch unbekanntem Weg in die Zelle und verursacht reaktive Sauerstoffspezies durch Kupfer-katalysierte zyklische Redox Reaktionen. Cytoplasmatische Kupfer-Entgiftung wird durch die P-Typ ATPase CopA und periplasmatische durch den CusCBA-Komplex vermittelt. Die Multi-Kupfer-Oxidase CueO setzt zum einen Cu(I) in das weniger schädliche Cu(II) um. Zum anderen oxidiert CueO Catechol-Siderophore wie Enterobaktin bei erhöhten Kupfer-Konzentrationen und verhindert damit die Enterobaktin-abhängige Reduktion von Cu(II) zu Cu(I). Das resultierende Oxidationsprodukt aus Enterobaktin komplexiert Kupfer und bildet so wahrscheinlich einen Kupfer-Sink nach Transport ins Außenmedium (aus (69) leicht verändert).

Das Oxidationsprodukt aus 2,3-Dihydroxybenzoat und CueO wurde als 2-Carboxy-Muconat identifiziert (69) und ist in der Lage, Kupfer zu binden. Sowohl im Periplasma als auch im Außenmedium kann eine Kupfer-Sequestrierung erfolgen und damit der Kupfer-Redox-Zyklus unterbunden werden (Abb. 9).

Zusätzlich gibt es noch einen zweiten Effekt, der mit der Siderophoren-Oxidation unmittelbar in Zusammenhang steht: Wenn *cueO* deletiert wird und *E. coli* unter sub-toxischen Konzentrationen an Kupfer angezogen wird, produzieren die Zellen deutlich mehr Enterobaktin als der Wildtyp (69). Diese Beobachtung lässt sich leicht erklären (Abb. 9). Fehlt CueO, kann Enterobaktin nicht länger unter Kupfer-Stress oxidiert werden und seine Konzentration steigt. Steigt die Kupferkonzentration weiter können die Zellen dem erhöhten oxidativen Stress durch Generierung von Hydroxylradikalen nicht länger standhalten und sterben. *E. coli*-Stämme ohne CueO zeigen auf Festmedium mit Kupfer einen mukoiden Phänotyp (68). Die Zellen versuchen wahrscheinlich durch Schleimbildung die

Sauerstoffzufuhr und damit die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies zu verringern. Vermutlich ist ein Exopolysaccharid bestehend aus colanischer Säure die schützende Substanz (30).

Somit konnte für *E. coli* mit CueO und Enterobaktin erstmalig eine direkte Verbindung zwischen der Kupfer- und Eisen-Homöostase gezeigt werden. Der Mechanismus ist jedoch ein anderer als der in Hefen, in manchen Prokaryoten und in anderen Eukaryoten, bei denen die Kupfer-Oxidase für die hochaffine Eisenaufnahme verantwortlich ist.

2.3.2 Das Kupfer-Resistenz-System Pco

Kupfer wird seit über 50 Jahren als Wachstumsbeschleuniger in der Schweinemast eingesetzt (43) und seit über 100 Jahren ist es ein wichtiger Bestandteil von Fungi- und Bakterioziden (20). Es ist daher nicht verwunderlich, dass Bakterien wie *E. coli* oder verschiedene Pseudomonaden spezielle Kupfer-Resistenzmechanismen erworben haben. Die verantwortlichen Gene dieser Kupfer-Resistenz Determinanten sind weitgehend homolog und haben ähnliche Funktionen. Das konjugative Plasmid pRJ1004 vermittelt Kupfer-Resistenz und wurde aus dem Darm von mit Kupfer-Sulfat als Wachstumsförderer gefütterten Schweinen isoliert (196). Die Kupfer-Resistenz dieses Plasmids wurde als das *pco*-(plasmid-encoded copper-resistance) Gen-Cluster benannt und umfasst die Gene *pcoABCDRSE* (19). Aufnahme-Experimente mit ⁶⁴Cu deuteten auf einen energieabhängigen Kupfer-Efflux-Mechanismus durch Pco hin. Allerdings ist verringerte Aufnahme nicht zwingenderweise mit einem aktiven Efflux-Mechanismus gleichzusetzen (164). Wahrscheinlich ähnelt der durch Pco-vermittelte Resistenzmechanismus in seinen Grundzügen eher dem von CueO. Abbildung 10 illustriert das aktuelle Modell des Pco-Systems.

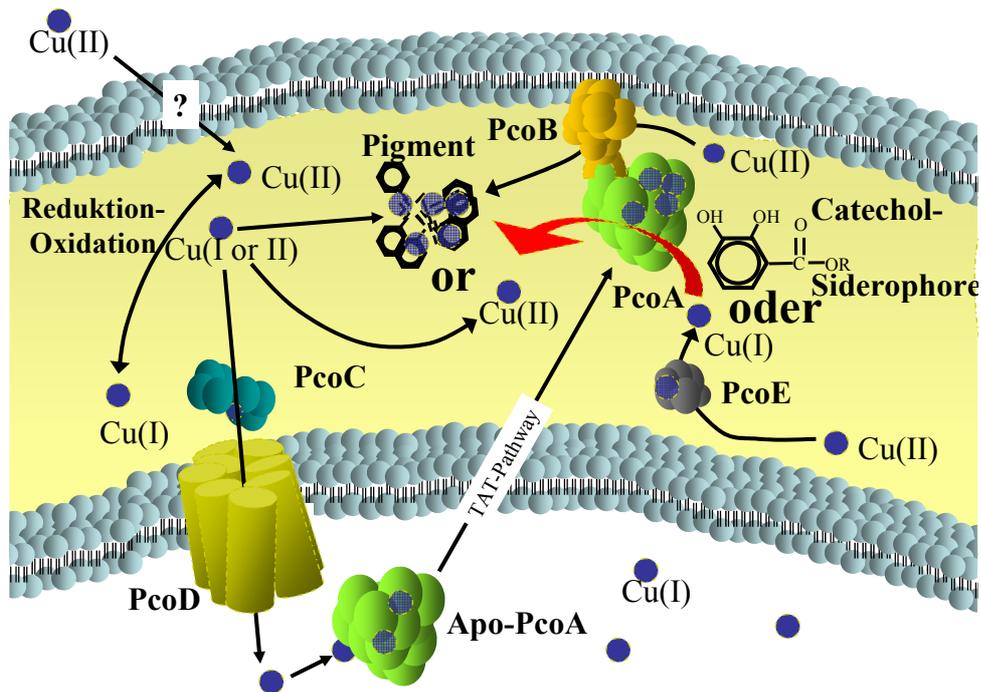


Abb. 10: Modell der Lokalisation und Funktion der Proteine des Pco-Systems aus *E. coli*.

PcoA, die zentrale, periplasmatische Multi-Kupfer-Oxidase des Pco-Systems vermittelt Kupfer-Resistenz wahrscheinlich durch Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) oder durch Oxidation von Catechol-Siderophoren und anschließende Bindung von Cu(II) an die pigmentierten Oxidationsprodukte. PcoB, wahrscheinlich ein Protein der äußeren Membran, ist wichtig für PcoA-Aktivität. Das Kupfer-Chaperon PcoC ist ein Dimer und liefert Kupfer an die putative Kupfer-Permease PcoD in der inneren Membran. Kupfer kann anschließend dazu dienen die Kupfer-Zentren innerhalb von PcoA zu füllen, bevor dieses durch das TAT-System ins Periplasma transloziert wird. PcoE ist wahrscheinlich ebenfalls ein periplasmatisches Kupfer-Chaperon, das möglicherweise die Konzentration freien Kupfers im Periplasma durch Sequestrierung verringert. Die Expression der *pco*-Gene (außer *pcoE*) erfolgt über ein Zwei-Komponenten System aus der Histidin-Kinase PcoS und dem Response-Regulator PcoR (aus (164) leicht verändert).

PcoA ist eine Multi-Kupfer-Oxidase und weitläufig mit CueO verwandt. Die Oxidase-Aktivität periplasmatischer Extrakte von Plasmid pRJ1004 tragender Zellen konnte PcoA zugewiesen werden (87). Ähnlich wie CueO, jedoch weitaus ausgeprägter, ist PcoA für eine intensive Braunfärbung von *E. coli* Kolonien in Gegenwart von Kupfer verantwortlich (196). Interessanterweise konnte PcoA CueO funktionell substituieren, d.h. beide Proteine haben ähnliche zelluläre Funktionen. Ebenso werden beide Proteine über den *TAT-Pathway* transloziert (107).

PcoB ist ein Protein der äußeren Membran. In einem Kupfer-sensitiven *E. coli* Stamm vermittelte die Expression von *pcoAB* eine wesentlich höhere Kupferresistenz als die von *pcoA* alleine. Möglicherweise gibt es eine wichtige Protein-Protein Interaktion zwischen beiden Proteinen PcoAB. Ein Blick zum Modellorganismus für Metallhomöostase,

C. metallidurans mag einen Hinweis zur Funktion von PcoB geben. Hier kommt ebenfalls ein Orthologes, CopB, vor. Während eine Methionin-reiche Region innerhalb PcoB-verwandter Protein relative kurz ist (in PcoB: HAGHDMSAMQMPADENFTEMTSM) entspricht diese Region in CopB aus *C. metallidurans* der Sequenz GQGSMQGMDHDKMQGMD
QGSMQGMDHDKMQGMD QGSMQGMDHDKMQGMD QGSMQGMDHDKMQGMD
QGSMQGMDOGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD
QGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD
QGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD
QGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD QGSMQGMHDKMQGMD, wobei ein 16 Aminosäure langes Peptid elf Mal, davon neun mal perfekt, wiederholt wird. Dieses Peptid ähnelt sehr bekannten Kupfer-bindenden Motiven, z.B. aus CueO (168). Daher könnte PcoB bzw. CopB einen periplasmatischen Kupfer-*sink* vor oder nach der Oxidation durch PcoA/CopA bilden. Allerdings erhöht die Expression von *pcoB* allein nicht die Kupfer-Toleranz von *E. coli* (107).

PcoCD sind für die volle Pco-abhängige Resistenzausprägung ebenso notwendig wie CopCD im homologen Cop-System aus *Pseudomonas syringae* (25). PcoC ist ein periplasmatisches, homodimeres Kupfer-Chaperon, das mit der Methionin-reichen Region von PcoA interagiert, wobei wahrscheinlich Cu(I) zu Cu(II) oxidiert und somit detoxifiziert werden kann. (87). PcoD ist wahrscheinlich ein Transmembranprotein der inneren Membran mit acht TMH. Die heutige Vorstellung der Funktion von PcoD ist die der Kupfer-Aufnahme zur vollständigen Beladung der Kupferzentren der Multi-Kupfer-Oxidase PcoA (164). Interessanterweise werden auf dem Genom von *E. coli* K12 zwei Proteine in einem Operon codiert, die Ähnlichkeit zu PcoCD haben. Leider konnte weder YobA (PcoC) noch YebZ (PcoD) bisher eine Funktion zugewiesen werden. Auch war ihre Deletion ohne Auswirkung auf die Kupferresistenz von *E. coli* ((164) und eigene unveröffentlichte Beobachtungen).

Das letzte Gen der *pco*-Determinate *pcoE* ist nicht Teil des *pcoABCD*-Operons, sondern steht unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten Systems CusRS (107, 132, 173). Trotzdem ist es für die volle Pco-vermittelte Kupfer-Resistenz notwendig (19). Außer in wenigen anderen Enterobakterien gibt es keine homologen Proteine zu PcoE. Die Expression von *pcoE* alleine vermittelte zwar keine Kupfertoleranz in *E. coli*, führte aber zu einer Kupfer-Akkumulation im Periplasma. Von den 144 Aminosäuren aus denen PcoE besteht, sind 18 Methionine. Möglicherweise ist PcoE ebenfalls ein periplasmatisches Kupfer-Chaperon bzw. Kupfer-Speicherprotein, das Kupfer-Redox-Cycling verhindert.

2.3.2 Schutz vor Eisen- und Kupfer-vermittelten Stress durch das Dps Protein

Die komplexe Regulation des Repressors der globalen Eisenhomöostase, Fur, macht deutlich, dass der Eisenhaushalt mit dem Redoxhaushalt der Zelle korreliert ist. Die Expression des *fur* Gens wird durch das SoxR/SoxS System reguliert. Darüber hinaus besitzt *fur* einen eigenen, durch OxyR regulierten Promoter (220). Somit ist die Regulation des Eisenhaushaltes direkt mit der zellulären Antwort auf oxidativen Stress verbunden. Fur wirkt mit seinem Co-Faktor Eisen als Repressor, dies gilt vor allem für die Transkription der Eisenaufnahmesysteme, aber auch für eine Vielzahl anderer Gene wie für die manganabhängige Superoxiddismutase (*sodA*) und die kleine regulatorische RNA *ryhB* (123, 137). Dennoch ist Fur in der Lage, eine Vielzahl von Genen positiv zu regulieren, darunter sind die Gene der Eisenspeicherproteine Bacterioferritin und Ferritin, wie auch die eisenabhängige Superoxiddismutase (SodB) (1, 42, 123). Diese positive Regulation wird allerdings nur indirekt über die sRNA *ryhB* vermittelt (123). *RyhB* bindet an die mRNA des Zielgens, dadurch wird dieser *ryhB*/mRNA Komplex von der RNase E spezifisch erkannt und abgebaut (122). Durch ein aktiviertes Fur wird die Transkription der Eisenimportsysteme herunterreguliert und die der Eisenspeicherproteine gefördert. Somit wird im Cytosol die Eisenkonzentration verringert und gleichzeitig der Fenton Stress vermindert.

Eine Entgiftung von überschüssigem Eisen und reaktiven Sauerstoffspezies wird zusätzlich durch das DNA bindenden Protein Dps (DNA binding protein from starved cells) (4) erreicht. Dps ist *in vivo* ein sphärisches Dodecamer, welches zu den Eisenspeicherproteinen gezählt wird (211). Das *dps* Gen wird σ^S abhängig exprimiert (105). Wie für das *fur* Operon liegt auch bei *dps* eine zusätzliche, OxyR abhängige Regulation vor (221). Dieses Protein verfügt über ein Ferroxidasezentrum in dem Eisen(II) gebunden und zu Eisen(III) oxidiert wird. Eisen(III) wird dann an ein Kernbildungszentrum weitergeleitet, wo es unter Verbrauch von Disauerstoff oder Wasserstoffperoxid zu einem Eisen-Sauerstoffkristall zusammengelagert und somit unschädlich für die Zelle gespeichert werden (Abb. 11 (60, 217)). Dps ist also ein multifunktionelles Protein, welches Eisen(II) direkt oxidieren und damit entgiften kann. Des weiteren verbraucht Dps bei der Einlagerung reaktive Sauerstoffspezies und durch die Bindung an die DNA kann Dps die DNA direkt vor dem Einfluss des oxidativen Stresses schützen (Abb 11, (121)).

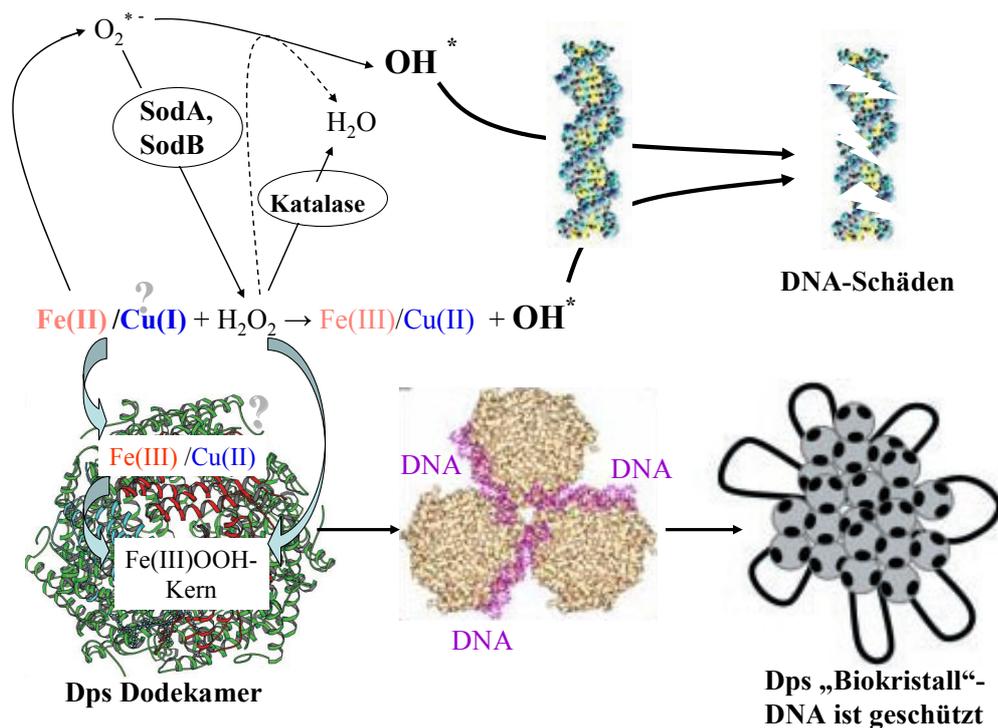


Abb. 11: Modell der Funktionen des Dps-Proteins aus *E. coli*.

In Anwesenheit der Redox-aktiven Metalle Eisen oder Kupfer entstehen reaktive Sauerstoff-Spezies in der Zelle, von denen insbesondere das aggressive Hydroxyl-Radikal (OH^*) die DNA schädigt. Das Dps-Protein schützt die Zelle auf zweierlei Arten: Zum einen wird Fe(II) und wahrscheinlich auch Cu(I) unter Umsatz von Wasserstoffperoxid oxidiert und in das sphärische Dps-Dodekamer eingelagert. Dadurch verringert Dps sowohl die intrazelluläre Fe(II)/Cu(I) - als auch die Wasserstoffperoxid-Konzentration. Zweitens vermag sich Dps unspezifisch an DNA zu binden. Durch vermehrte Bindung, vor allem in der stationären Phase entstehen hierbei hochmolekulare Dps-DNA Komplexe (Biokristalle (214)), die die DNA vor oxidativem Stress schützen (Dps-Strukturen aus (22, 23, 60)).

Obwohl Dps zu den Eisenspeicherproteinen gezählt wird, ist seine Regulation in *E. coli* für unabhängig (175), nicht jedoch in *Borellia burgdorferi*. In diesem eisenunabhängigen Bakterium wird der Promotor des Dps Homologe NapA durch ein Fur-Orthologes peroxidabhängig reguliert (94). Der Schutz vor oxidativem Stress ist in diesem Organismus die Hauptaufgabe der Dps- und Fur-Orthologen. Dps-Orthologe finden sich ebenfalls in vielen weiteren Bakterien (22, 31, 75, 88, 159) und sogar dem Archäon *Halobacterium salinarum* (162). Bei nahezu allen Homologen wurde ein Schutz der Zelle vor oxidativem Stress nachgewiesen. Durch seine Eiseneinlagerung entzieht Dps dem Cytosol Fe(II) . Dabei wird reaktives Fe(II) zu Fe(III) oxidiert und an Dps gebunden (23, 88, 89, 134, 219). Zusätzlich zu diesem präventiven Schutz wurde für das Dps aus *E. coli* eine unspezifische DNA Bindung gezeigt (4, 10). Die Bildung eines Dps-DNA Biokristalls schützt die DNA

direkt vor Schaden (Abb. 11 (52, 121, 214)). Mittels Dps werden also multiple Strategien des Schutzes vor oxidativem Stress verfolgt. Dabei zeigt sich, dass eine Toleranz vor oxidativem Stress vornehmlich durch einen aktiven Eisen- und Wasserstoffperoxid-Umsatz gegen einen Angriff auf die DNA schützt (Abb. 11).

Die geringen Mengen an Eisen, die Dps aufnehmen kann, scheinen im Vergleich zu den anderen Ferritinen zu wenig, um einen effektiven Speicher darzustellen (37, 60). Die Fähigkeit des Dps Proteins, über den Eisenumsatz Wasserstoffperoxid zu entgiften, ist für den Schutz der Zelle und insbesondere der DNA wahrscheinlich von übergeordneter Bedeutung (22, 94). Untersuchungen zeigen, dass die Eisenabgabe aus den Ferritinen auch über radikalische Reduktion vermittelt wird. Dies scheint paradox, da durch Eisenstress ebensolche radikalischen Spezies entstehen und demnach eine Eisenabgabe physiologisch unsinnig erscheint (128, 129). Betrachtet man jedoch den Einfluss von Fur auf den Redoxhaushalt, ergibt eine erhöhte Eisenkonzentration unter Stressbedingungen durchaus Sinn. Gerade für oxidativen Stress, der durch Kupfer induziert wird, zeigt sich, wie wichtig Fur für die zelluläre Stressantwort ist (69). Wird also durch die ROS, die durch die Fenton Chemie entstehen, Eisen aus den Speicherproteinen freigesetzt, kommt es zur Aktivierung von Fur und damit zu einer verringerten Metall-Aufnahme. Die vermehrte Bildung von Eisenspeicherproteinen kann über Inkorporation von Eisen die Entstehung von ROS wiederum vermindern. Da die Regulation von *dps* OxyR abhängig ist, wird der Umweg über Fur hier nicht mehr benötigt (192), da die ROS die *dps*-Expression direkt induzieren.

Dps ist an der Vermittlung von Toleranz gegenüber kupferinduziertem, oxidativem Stress beteiligt (197). Die gesteigerte Kupferaufnahme in Δfur -Stämmen ist wahrscheinlich ein Hauptgrund für deren Kupfer-Sensitivität (69). In einer *fur* Mutante wirkt sich das zusätzliche Fehlen des Dps-Proteins drastisch auf das Wachstum in Anwesenheit von Kupfer(I) aus. In einem solchen *E. coli* Stamm mit deregulierten Eisenaufnahmesystemen ist das Dps Protein von großer Bedeutung für die Kupfertoleranz (197). Die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften, spielt bei kupferinduziertem Stress eine wichtige Rolle, da Kupfer, insbesondere in seiner Cu(I) Form, als Prooxidant wirkt und somit massiv für die Entstehung von Hydroxylradikalen aus dem Umsatz von Superoxidradikalen *via* der Fenton-Reaktion verantwortlich ist (Abb.11, (78)). Durch die so gebildeten Radikale wird die DNA angegriffen und geschädigt (Abb. 11, (33)).

Von Ceci und Mitarbeitern (23) wurde postuliert, dass der flexible N-Terminus des Dps-Proteins aus *E. coli* die DNA-Bindung vermittelt. In vergleichenden *Alignments* des Dps-Orthologen aus *Agrobacterium tumefaciens*, das nicht in der Lage ist, *in vitro* DNA zu binden, mit Dps aus *E. coli* konnte als wichtigster Unterschied ein verlängerte N-Terminus des Dps aus *E. coli* ausgemacht werden (22). Um den Einfluss des N-Terminus auf die DNA Binfähigkeit zu untersuchen, wurde eine Variante des Dps Proteins konstruiert, der dieser Terminus fehlt (Δ_{1-13} L14M Dps) (197). Mutanten, denen der N-Terminus des Dps Proteins fehlt, bilden nach wie vor Dodecamere und die Eisenbindung wird nicht beeinflusst, obgleich sie nicht in der Lage sind, *in vitro* DNA zu binden (22, 197). Dennoch sind sie in der Lage unter Stressbedingungen DNA zu schützen.

Eine Δ *dps*-Mutante, in der *in trans* ein verkürztes Dps-Gen für ein Δ_{1-13} L14M Dps-Protein exprimiert wurde, war *in vivo* vor kupferinduziertem oxidativem Stress geschützt. Zwar war Wild-Typ Dps effizienter als Δ_{1-13} L14M Dps, jedoch zeigten Zellen, die das variante Dps-Protein trugen, ein deutlich besseres Wachstum als die Kontrolle mit Leervektor (197). Der N-Terminus des Dps Proteins ist also nicht essenziell für den Schutz der DNA, trotzdem wird durch ihn der Schutz vor den Auswirkungen des oxidativen Stresses verbessert.

Erstaunlicherweise besaß Δ_{1-13} L14M Dps unter Stress-Bedingungen DNA-Binfähigkeit, während es unter nicht-Stressbedingungen im Gegensatz zum Wild-Typ-Protein DNA nicht band (197). Durch das Fehlen des N-Terminusses von Dps wird also nur die DNA Bindung unter nicht-Stressbedingungen verhindert, nicht jedoch der Schutz der DNA vor dem Angriff metallinduzierter reaktiver Sauerstoffspezies. Dps Δ_{1-13} L14M schützt also die DNA vor oxidativer Zersetzung *in vitro*.

Es ist bemerkenswert, dass die DNA Bindung erst zustande kommt, wenn die DNA direkt angegriffen wird, d.h. wenn reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) gebildet werden (197). Bei vielen Dps-Orthologen ist ein Fehlen der DNA Binfähigkeit dokumentiert, obwohl diese Proteine die Zelle ebenfalls vor oxidativem Stress schützen (22, 89, 217). Es stellt sich die Frage, ob die DNA Bindung nicht sogar unter Einfluss von ROS induziert oder die bestehende Fähigkeit DNA zu binden verstärkt wird.

Mittels Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass sowohl Dps als auch Δ_{1-13} L14M Dps Eisen binden konnten (197). Die Fluoreszenzmessungen lassen ferner darauf schließen, dass Kupfer möglicherweise auf eine ähnliche Weise von Dps gebunden wird wie Eisen. Der fehlende N-Terminus von Δ_{1-13} L14M Dps beeinträchtigte nicht die Eisen- oder Kupfer-

Bindung. Die Zugabe anderer divalenter Kationen (Mg(II) oder Zn(II)) führte zu keinerlei Veränderung der Fluoreszenz (197). Die Interaktion von Kupfer bzw. Eisen mit Dps ist daher wahrscheinlich spezifisch, da Kupfer und Eisen von Dps gebunden werden, die untersuchten anderen zweiwertigen Metallkationen wahrscheinlich aber nicht. Zum jetzigen Zeitpunkt kann jedoch nur spekuliert werden, ob Dps *in vivo* nicht nur ein Eisen- sondern auch ein cytoplasmatisches Kupfer-Speicherprotein in *E. coli* ist.

3. AUSBLICK

Die wichtigsten unmittelbar experimentell zu lösenden Fragen im Rahmen des Themen-*Clusters* Biometall-Homöostase in Bakterien sind:

1. Wie werden (bakterielle) ZIP Transporter (ZupT) energetisiert? Wie funktionieren ZIP-Transporter, d.h. welche Aminosäurereste sind essentiell für ihre Funktion, gibt es Metallbindestellen?
2. Wie funktionieren CDF-Proteine? Der Metalltransport durch CDF-Proteine wird durch Protonen angetrieben, wie aber sind die „Flüsse“ von Proton und Me(II), gibt es einen Kanal, zwei oder nur eine Konformationsänderung? Wo liegen Transport-Metallbindestellen, gibt es regulatorische Me(II)-Bindestellen? Warum transportiert FieF Zn(II) *in vitro*, zeigt aber keine Zink-Resistenz (so wie ZitB) *in vivo* (61)? Ungerichtete (evolutionäre) Mutagenese von FieF könnte ein Protein entstehen lassen, dass auch *in vivo* Zink-Resistenz vermittelt. Die Identität der Aminosäureaustausche könnte Licht auf die Frage werfen, wie in CDF-Proteinen Substratspezifität und Resistenz bewirkt wird.
3. Wie werden CDF-Proteine transkriptionell reguliert? Die Gene beider *E. coli* CDF Transporter ZitB und FieF werden durch Metalle induziert. ZitB durch Zn(II) und FieF durch Zn(II) und Fe(II) (61, 66). Wie kommt es zu dieser metallabhängigen Induktion? Die jeweiligen Regulatoren von ZitB und FieF müssen identifiziert werden. Dazu wird Transposonmutagenese in Stämmen die $\Phi(zitB-lacZ)$ - bzw. $\Phi(fieF-lacZ)$ -Operon Fusionen tragen, durchgeführt. Disruptions-Mutanten von potentiellen Regulatoren würden sich dann auf Festmedium mit Zn(II)/Fe(II) und chromogenem LacZ-Substrat durch weiße bzw. hellblaue Kolonien verraten. Dieses System würde auch bei einem Aktivator funktionieren. Zur Identifikation eines Repressors würde einfach Zn(II)/Fe(II) durch einen Metall-Chelator wie z.B. EDTA ausgetauscht werden und entsprechend blaue unter weißen bis hellblauen Kolonien gesucht werden.

Ferner wurde damit begonnen zu untersuchen, wie Siderophoren *E. coli* verlassen. Kürzlich konnte der erste Enterobaktin-Efflux-Transporter, EntS, identifiziert werden (53). EntS ist ein Transporter der *Major Facilitator Superfamily* (119) und Stämme die in *entS* deletiert sind, scheiden weniger Enterobaktin aus als der Wildtyp. Die Fragen, die sich hierzu stellen, sind

unter anderem: i) Wie funktioniert EntS (Energie, biochemische Parameter), (ii) wie verlassen andere Siderophore (Salmochelin, Aerobactin) das Cytoplasma, (iii) wie gelangen sie vom Periplasma nach außen? Zur letzten Frage konnte jetzt eine mögliche Antwort gefunden werden. HPLC-Untersuchungen und Wachstumsversuche mit Mutantenstämmen deuten stark darauf hin, dass TolC der Kanal ist, durch den Enterobaktin vom Periplasma nach außen geschleust wird (Grass et al., eingereicht; McIntosh, pers. Mitteilung, eingereicht).

4. LITERATUR

1. **Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest, and S. C. Andrews.** 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**:1415-1428.
2. **Akama, H., T. Matsuura, S. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, T. Tsukihara, A. Nakagawa, and T. Nakae.** 2004. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**:25939-25942.
3. **Alexandre, G., and I. B. Zhulin.** 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol* **18**:41-42.
4. **Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter.** 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**:2646-2654.
5. **Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., L. J. Zhu, X. Yao, L. M. Hoos, G. Tetzloff, S. P. Iyer, M. Maguire, A. Golovko, M. Zeng, L. Wang, N. Murgolo, and M. P. Graziano.** 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**:1201-1204.
6. **Andrews, S. C., P. M. Harrison, and J. R. Guest.** 1989. Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin gene (*bfr*) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **171**:3940-3947.
7. **Anton, A., A. Weltrowski, C. J. Haney, S. Franke, G. Grass, C. Rensing, and D. H. Nies.** 2004. Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7499-7507.
8. **Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe, and J. Kaplan.** 1994. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**:403-410.
9. **Askwith, C., and J. Kaplan.** 1997. An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**:401-405.
10. **Azam, T. A., and A. Ishihama.** 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**:33105-33113.
11. **Beard, S. J., R. Hashim, J. Membrillo Hernandez, M. N. Hughes, and R. K. Poole.** 1997. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (*o732*) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* **25**:883-891.
12. **Beard, S. J., R. Hashim, G. Wu, M. R. Binet, M. N. Hughes, and R. K. Poole.** 2000. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**:231-235.
13. **Bearden, S. W., and R. D. Perry.** 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol* **32**:403-414.
14. **Bender, C. L., and D. A. Cooksey.** 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J Bacteriol* **169**:470-474.

15. **Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
16. **Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**:6032-6042.
17. **Braun, V.** 2003. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* **8**:s1409-1421.
18. **Brim, H., M. Heyndrickx, P. de Vos, A. Wilmotte, D. Springael, H. G. Schlegel, and M. Mergeay.** 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* **22**:258-268.
19. **Brown, N. L., S. R. Barrett, J. Camakaris, B. T. Lee, and D. A. Rouch.** 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol* **17**:1153-1166.
20. **Brown, N. L., D. A. Rouch, and B. T. Lee.** 1992. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* **27**:41-51.
21. **Bruser, T., and C. Sanders.** 2003. An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* **158**:7-17.
22. **Ceci, P., S. Cellai, E. Falvo, C. Rivetti, G. L. Rossi, and E. Chiancone.** 2004. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus. *Nucleic Acids Res* **32**:5935-5944.
23. **Ceci, P., A. Ilari, E. Falvo, and E. Chiancone.** 2003. The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage: x-ray crystal structure, iron binding, and hydroxyl-radical scavenging properties. *J Biol Chem* **278**:20319-20326.
24. **Cellier, M., G. Prive, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodrigues, W. Chia, and P. Gros.** 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10089-10093.
25. **Cha, J., and D. Cooksey.** 1993. Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1671-1674.
26. **Cha, J. S., and D. A. Cooksey.** 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:8915-8919.
27. **Chaloupka, R., P. Courville, F. Veyrier, B. Knudsen, T. A. Tompkins, and M. F. Cellier.** 2005. Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport *in vivo*. *Biochemistry* **44**:726-733.
28. **Chao, Y., and D. Fu.** 2004. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* **279**:12043-12050.
29. **Chao, Y., and D. Fu.** 2004. Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the *Escherichia coli* zinc transporter YiiP. *J Biol Chem* **279**:17173-17180.
30. **Chen, J., S. M. Lee, and Y. Mao.** 2004. Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress. *Int J Food Microbiol* **93**:281-286.
31. **Chen, L., and J. D. Helmann.** 1995. *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol Microbiol* **18**:295-300.

32. **Chenault, S. S., and C. F. Earhart.** 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol* **5**:1405-1413.
33. **Chiancone, E., P. Ceci, A. Ilari, F. Ribacchi, and S. Stefanini.** 2004. Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals* **17**:197-202.
34. **Claus, H., and Z. Filip.** 1998. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta hydrochim hydrobiol* **26**:180-185.
35. **Cooksey, D. A.** 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **14**:381-386.
36. **Courville, P., R. Chaloupka, F. Veyrier, and M. F. Cellier.** 2004. Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *J Biol Chem* **279**:3318-3326.
37. **Dautant, A., J. B. Meyer, J. Yariv, G. Precigoux, R. M. Sweet, A. J. Kalb, and F. Frolow.** 1998. Structure of a monoclinic crystal from of cytochrome b1 (Bacterioferritin) from *E. coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54 (Pt 1)**:16-24.
38. **Degen, O., and T. Eitinger.** 2002. Substrate specificity of nickel/cobalt permeases: insights from mutants altered in transmembrane domains I and II. *J Bacteriol* **184**:3569-3577.
39. **Delhaize, E., T. Kataoka, D. M. Hebb, R. G. White, and P. R. Ryan.** 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**:1131-1142.
40. **DeLisa, M. P., P. Samuelson, T. Palmer, and G. Georgiou.** 2002. Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* **277**:29825-29831.
41. **Dubbels, B. L., A. A. DiSpirito, J. D. Morton, J. D. Semrau, J. N. Neto, and D. A. Bazylinski.** 2004. Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* **150**:2931-2945.
42. **Dubrac, S., and D. Touati.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**:3802-3808.
43. **Edmonds, M. S., O. A. Izquierdo, and D. H. Baker.** 1985. Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. *J Anim Sci* **60**:462-469.
44. **Eitinger, T.** 2004. *In vivo* production of active nickel superoxide dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 is dependent on its cognate peptidase. *J Bacteriol* **186**:7821-7825.
45. **Eitinger, T., L. Wolfram, O. Degen, and C. Anthon.** 1997. A Ni²⁺ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. *J Biol Chem* **272**:17139-17144.
46. **Fagan, M. J., and M. H. Saier, Jr.** 1994. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol* **38**:57-99.
47. **Fang, C. T., H. C. Chen, Y. P. Chuang, S. C. Chang, and J. T. Wang.** 2002. Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2024-2028.
48. **Fecker, L., and V. Braun.** 1983. Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **156**:1301-1314.
49. **Fenton, H. J. H.** 1876. On a new reaction of tartaric acid. *Chem. News* **33**:190- 190.

50. **Franke, S., G. Grass, and D. H. Nies.** 2001. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* **147**:965-972.
51. **Franke, S., G. Grass, C. Rensing, and D. H. Nies.** 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:3804-3812.
52. **Frenkiel-Krispin, D., S. Levin-Zaidman, E. Shimoni, S. G. Wolf, E. J. Wachtel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter, and A. Minsky.** 2001. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection. *EMBO J* **20**:1184-1191.
53. **Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard, and M. A. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol* **44**:1225-1234.
54. **Gaither, L. A., and D. J. Eide.** 2000. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem* **275**:5560-5564.
55. **Gaither, L. A., and D. J. Eide.** 2001. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **276**:22258-22264.
56. **Gibson, M. M., D. A. Bagga, C. G. Miller, and M. E. Maguire.** 1991. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co²⁺ resistance on the CorA Mg²⁺ transport system. *Mol Microbiol* **5**:2753-2762.
57. **Givaudan, A., A. Effosse, D. Faure, P. P. Potier, M.-L. M.-L. Bouillant, and R. Bally.** 1993. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett* **108**:205-210.
58. **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**:26065-26070.
59. **Govoni, G., and P. Gros.** 1998. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* **47**:277-284.
60. **Grant, R. A., D. J. Filman, S. E. Finkel, R. Kolter, and J. M. Hogle.** 1998. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol* **5**:294-303.
61. **Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies, and C. Rensing.** 2001. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:4664-4667.
62. **Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, K. Lemke, H. G. Schlegel, and C. Rensing.** 2001. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J Bacteriol* **183**:2803-2807.
63. **Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. 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**:1604-1611.
64. **Grass, G., B. Fricke, and D. H. Nies.** 2005. Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals*. **Accepted for publication**.
65. **Grass, G., C. Grosse, and D. H. Nies.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* **182**:1390-1398.
66. **Grass, G., M. Otto, B. Fricke, C. J. Haney, C. Rensing, D. H. Nies, and D. Munkelt.** 2005. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**:9-18.

67. **Grass, G., and C. Rensing.** 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **286**:902-908.
68. **Grass, G., and C. Rensing.** 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:2145-2147.
69. **Grass, G., K. Thakali, P. E. Klebba, D. Thieme, A. Muller, G. F. Wildner, and C. Rensing.** 2004. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:5826-5833.
70. **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**:864-866.
71. **Grosse, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder, and D. H. Nies.** 2004. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Arch Microbiol* **182**:109-118.
72. **Grünberg, K., C. Wawer, B. M. Tebo, and D. Schüler.** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**:4573-4582.
73. **Guerinot, M. L.** 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**:190-198.
74. **Guffanti, A. A., Y. Wei, S. V. Rood, and T. A. Krulwich.** 2002. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K⁺ and H⁺. *Mol Microbiol* **45**:145-153.
75. **Gupta, S., S. B. Pandit, N. Srinivasan, and D. Chatterji.** 2002. Proteomics analysis of carbon-starved *Mycobacterium smegmatis*: induction of Dps-like protein. *Protein Eng* **15**:503-512.
76. **Haber, F., and J. Weiss.** 1932. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwiss* **51**:948-950.
77. **Haemig, H. A., and R. J. Brooker.** 2004. Importance of conserved acidic residues in MntH, the Nramp homolog of *Escherichia coli*. *J Membr Biol* **201**:97-107.
78. **Halliwell, B., and J. M. Gutteridge.** 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* **307**:108-112.
79. **Haney, C. J., G. Grass, S. Franke, and C. Rensing.** 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol.* (online first)
80. **Hantke, K.** 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* **11**:192-195.
81. **Hassan, M. T., D. van der Lelie, D. Springael, U. Romling, N. Ahmed, and M. Mergeay.** 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238**:417-425.
82. **Hebbeln, P., and T. Eitinger.** 2004. Heterologous production and characterization of bacterial nickel/cobalt permeases. *FEMS Microbiol Lett* **230**:129-135.

83. **Henson, J. M., M. J. Butler, and A. W. Day.** 1999. THE DARK SIDE OF THE MYCELIUM: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **37**:447-471.
84. **Higgins, M. K., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis.** 2004. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9994-9999.

85. **Hmiel, S. P., M. D. Snavely, C. G. Miller, and M. E. Maguire.** 1986. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *J Bacteriol* **168**:1444-1450.
86. **Huang, L., and J. Gitschier.** 1997. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* **17**:292-297.
87. **Huffman, D. L., J. Huyett, F. W. Outten, P. E. Doan, L. A. Finney, B. M. Hoffman, and T. V. O'Halloran.** 2002. Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli* *pco* copper resistance operon. *Biochemistry* **41**:10046-10055.
88. **Ilari, A., P. Ceci, D. Ferrari, G. L. Rossi, and E. Chiancone.** 2002. Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core. *J Biol Chem* **277**:37619-37623.
89. **Ishikawa, T., Y. Mizunoe, S. Kawabata, A. Takade, M. Harada, S. N. Wai, and S. Yoshida.** 2003. The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **185**:1010-1017.
90. **Izuhara, M., K. Takamune, and R. Takata.** 1991. Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* K12 gene which encodes a polypeptide having similarity to the human ferritin H subunit. *Mol Gen Genet* **225**:510-513.
91. **Jack, D. L., N. M. Yang, and M. H. Saier, Jr.** 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* **268**:3620-3639.
92. **Kammler, M., C. Schön, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:6212-6219.
93. **Kaspar, S., R. Perozzo, S. Reinelt, M. Meyer, K. Pfister, L. Scapozza, and M. Bott.** 1999. The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol* **33**:858-872.
94. **Katona, L. I., R. Tokarz, C. J. Kuhlow, J. Benach, and J. L. Benach.** 2004. The *fur* homologue in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* **186**:6443-6456.
95. **Kim, C., W. W. Lorenz, J. T. Hoopes, and J. F. Dean.** 2001. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *J Bacteriol* **183**:4866-4875.
96. **Klein, J. R., B. Henrich, and R. Plapp.** 1991. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **230**:230-240.
97. **Kolisek, M., G. Zsurka, J. Samaj, J. Weghuber, R. J. Schweyen, and M. Schweigel.** 2003. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO J* **22**:1235-1244.
98. **Komeda, H., M. Kobayashi, and S. Shimizu.** 1997. A novel transporter involved in cobalt uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:36-41.
99. **Koppenol, W. H.** 2001. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep* **6**:229-234.
100. **Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**:914-919.
101. **Koster, W.** 1991. Iron(III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol Met* **4**:23-32.
102. **Kuroda, M., H. Hayashi, and T. Ohta.** 1999. Chromosome-determined zinc-responsible operon *czr* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol Immunol* **43**:115-125.
103. **Lane, T. W., and F. M. Morel.** 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4627-4631.

104. **Lane, T. W., M. A. Saito, G. N. George, I. J. Pickering, R. C. Prince, and F. M. Morel.** 2005. A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**:42.
105. **Lange, R., and R. Hengge-Aronis.** 1994. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol Microbiol* **13**:733-743.
106. **Lee, S. M., G. Grass, C. J. Haney, B. Fan, B. P. Rosen, A. Anton, D. H. Nies, and C. Rensing.** 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol Lett* **215**:273-278.
107. **Lee, S. M., G. Grass, C. Rensing, S. R. Barrett, C. J. Yates, J. V. Stoyanov, and N. L. Brown.** 2002. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:616-620.
108. **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**:4354-4361.
109. **Leonowicz, A., A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtas-Wasilewska, N. S. Cho, M. Hofrichter, and J. Rogalski.** 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet Biol* **27**:175-185.
110. **Levrán, O., R. J. Desnick, and E. H. Schuchman.** 1991. Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acid sphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients. *J Clin Invest* **88**:806-810.
111. **Lewis, N. G., and E. Yamamoto.** 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**:455-496.
112. **Li, L., and J. Kaplan.** 1997. Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *J Biol Chem* **272**:28485-28493.
113. **Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, and H. G. Schlegel.** 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **175**:767-778.
114. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**:45-55.
115. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:6299-6313.
116. **MacDiarmid, C. W., and R. C. Gardner.** 1998. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.* **273**:1727-1732.
117. **Maier, T., and A. Böck.** 1996. Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form. *Biochemistry* **35**:10089-10093.
118. **Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* **35**:1065-1078.
119. **Marger, M. D., and M. H. Saier, Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* **18**:13-20.
120. **Marlovits, T. C., W. Haase, C. Herrmann, S. G. Aller, and V. M. Unger.** 2002. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16243-16248.
121. **Martinez, A., and R. Kolter.** 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* **179**:5188-5194.

122. **Masse, E., F. E. Escorcía, and S. Gottesman.** 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**:2374-2383.
123. **Masse, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4620-4625.
124. **McClain, M. S., M. C. Hurley, J. K. Brieland, and N. C. Engleberg.** 1996. The *Legionella pneumophila* *hel* locus encodes intracellularly induced homologs of heavy-metal ion transporters of *Alcaligenes* spp. *Infect Immun* **64**:1532-1540.
125. **McMahon, R. J., and R. J. Cousins.** 1998. Mammalian zinc transporters. *J Nutr* **128**:667-670.
126. **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*. *Arch Int Physiol Biochim* **86**:440-442.
127. **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**:328-334.
128. **Monteiro, H. P., G. F. Vile, and C. C. Winterbourn.** 1989. An iron chelator is not required for reductive iron release from ferritin by radical generating systems. *Free Radic Res Commun* **7**:33-35.
129. **Monteiro, H. P., G. F. Vile, and C. C. Winterbourn.** 1989. Release of iron from ferritin by semiquinone, anthracycline, bipyridyl, and nitroaromatic radicals. *Free Radic Biol Med* **6**:587-591.
130. **Mulrooney, S. B., and R. P. Hausinger.** 2003. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **27**:239-261.
131. **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**:8036-8043.
132. **Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten, and T. V. O'Halloran.** 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**:5864-5871.
133. **Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587-593.
134. **Nair, S., and S. E. Finkel.** 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol* **186**:4192-4198.
135. **Navarro, C., L. F. Wu, and M. A. Mandrand-Berthelot.** 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* **9**:1181-1191.
136. **Neilands, J. B., K. Konopka, B. Schwyn, M. Coy, R. T. Francis, B. H. Paw, and A. Bagg.** 1987. In iron transport in microbes, plants and animals. (Winkelmann, G., van der Helm, D., and Neilands, J. B., eds) pp. 3-33, VCH Press, Weinheim.
137. **Niederhoffer, E. C., C. M. Naranjo, K. L. Bradley, and J. A. Fee.** 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* **172**:1930-1938.
138. **Nies, D., M. Mergeay, B. Friedrich, and H. G. Schlegel.** 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **169**:4865-4868.
139. **Nies, D. H.** 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:2707-2712.

140. **Nies, D. H.** 1992. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **174**:8102-8110.
141. **Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**:313-339.
142. **Nies, D. H.** 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* **4**:77-82.
143. **Nies, D. H., A. Nies, L. Chu, and S. Silver.** 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:7351-7355.
144. **Nikaido, H., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg.** 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol* **180**:4686-4692.
145. **Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale, and T. V. O'Halloran.** 2001. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**:30670-30677.
146. **Ouyang, H., and H. J. Vogel.** 1998. Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies. *Biometals* **11**:213-222.
147. **Ozenberger, B. A., M. S. Nahlik, and M. A. McIntosh.** 1987. Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:3638-3646.
148. **Paddock, M. L., G. Feher, and M. Y. Okamura.** 2003. Proton transfer pathways and mechanism in bacterial reaction centers. *FEBS Lett* **555**:45-50.
149. **Palmer, M.** 2003. Efflux of cytoplasmically acting antibiotics from gram-negative bacteria: periplasmic substrate capture by multicomponent efflux pumps inferred from their cooperative action with single-component transporters. *J Bacteriol* **185**:5287-5289.
150. **Palmiter, R. D., and L. Huang.** 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* **447**:744-751.
151. **Pappalardo, L., I. G. Janausch, V. Vijayan, E. Zientz, J. Junker, W. Peti, M. Zweckstetter, G. Unden, and C. Griesinger.** 2003. The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**:39185-39188.
152. **Park, J. E., H. G. Schlegel, H. G. Rhie, and H. S. Lee.** 2004. Nucleotide sequence and expression of the *ncr* nickel and cobalt resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *Int Microbiol* **7**:27-34.
153. **Park, M. H., B. B. Wong, and J. E. Lusk.** 1976. Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: genetics and physiology. *J Bacteriol* **126**:1096-1103.
154. **Patzer, S. I., and K. Hantke.** 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**:1199-1210.
155. **Paulsen, I. T., and M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **156**:99-103.
156. **Petersen, C., and L. B. Moller.** 2000. Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene* **261**:289-298.
157. **Pogliano, J. A., and J. Beckwith.** 1994. SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J* **13**:554-561.

158. **Poillon, W. N., and C. R. Dawson.** 1963. On the nature of copper in ascorbate oxidase. I. The valence state of copper in the denatured and native enzyme. *Biochim Biophys Acta* **77**:27-36.
159. **Polidoro, M., D. De Biase, B. Montagnini, L. Guarrera, S. Cavallo, P. Valenti, S. Stefanini, and E. Chiancone.** 2002. The expression of the dodecameric ferritin in *Listeria* spp. is induced by iron limitation and stationary growth phase. *Gene* **296**:121-128.
160. **Pos, K. M., and K. Diederichs.** 2002. Purification, crystallization and preliminary diffraction studies of AcrB, an inner-membrane multi-drug efflux protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**:1865-1867.
161. **Posey, J. E., and F. C. Gherardini.** 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**:1651-1653.
162. **Reindel, S., S. Anemuller, A. Sawaryn, and B. F. Matzanke.** 2002. The DpsA-homologue of the archaeon *Halobacterium salinarum* is a ferritin. *Biochim Biophys Acta* **1598**:140-146.
163. **Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, and B. P. Rosen.** 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:652-656.
164. **Rensing, C., and G. Grass.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**:197-213.
165. **Rensing, C., B. Mitra, and B. P. Rosen.** 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14326-14331.
166. **Rensing, C., T. Pribyl, and D. H. Nies.** 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol* **179**:6871-6879.
167. **Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, and W. R. Montfort.** 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2766-2771.
168. **Roberts, S. A., G. F. Wildner, G. Grass, A. Weichsel, A. Ambrus, C. Rensing, and W. R. Montfort.** 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem* **278**:31958-31963.
169. **Robey, M., and N. P. Cianciotto.** 2002. *Legionella pneumophila feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun* **70**:5659-5669.
170. **Robinson, C., and A. Bolhuis.** 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:350-356.
171. **Rodrigue, A., G. Effantin, and M. A. Mandrand-Berthelot.** 2005. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:2912-2916.
172. **Rother, M., G.-J. Krauss, and D. Wesenberg.** 2005. Differential transcript induction and thiol synthesis upon Cd²⁺ stress in *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **submitted**.
173. **Rouch, D. A., and N. L. Brown.** 1997. Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiology* **143** (Pt 4):1191-1202.
174. **Runyen-Janecky, L. J., S. A. Reeves, E. G. Gonzales, and S. M. Payne.** 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun* **71**:1919-1928.

175. **Rychlewski, L., B. Zhang, and A. Godzik.** 1999. Functional insights from structural predictions: analysis of the *Escherichia coli* genome. *Protein Sci* **8**:614-624.
176. **Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, and T. Palmer.** 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* **17**:3640-3650.
177. **Sariaslani, F. S.** 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Crit Rev Biotechnol* **9**:171-257.
178. **Scheinberg, I. H., and D. Gitlin.** 1952. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science* **116**:484-485.
179. **Schübbe, S., M. Kube, A. Scheffel, C. Wawer, U. Heyen, A. Meyerdierks, M. H. Madkour, F. Mayer, R. Reinhardt, and D. Schüler.** 2003. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J Bacteriol* **185**:5779-5790.
180. **Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch Microbiol* **181**:1-7.
181. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch Microbiol* **179**:89-94.
182. **Shea, C. M., and M. A. McIntosh.** 1991. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**:1415-1428.
183. **Silver, S., and T. K. Misra.** 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annu Rev Microbiol* **42**:717-743.
184. **Silver, S., and M. Walderhaug.** 1992. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* **56**:195-228.
185. **Singh, S. K., G. Grass, C. Rensing, and W. R. Montfort.** 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7815-7817.
186. **Smith, R. L., J. L. Banks, M. D. Snavely, and M. E. Maguire.** 1993. Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein. *J Biol Chem* **268**:14071-14080.
187. **Smith, R. L., E. Gottlieb, L. M. Kucharski, and M. E. Maguire.** 1998. Functional similarity between archaeal and bacterial CorA magnesium transporters. *J Bacteriol* **180**:2788-2791.

188. **Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi, and V. Braun.** 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:2626-2633.
189. **Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, and A. Dancis.** 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**:1552-1557.
190. **Stoj, C., and D. J. Kosman.** 2003. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Lett* **554**:422-426.
191. **Stoppel, R. D., M. Meyer, and H. G. Schlegel.** 1995. The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*: conjugational

- transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. *Biometals* **8**:70-79.
192. **Storz, G., J. A. Opdyke, and A. Zhang.** 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**:140-144.
193. **Taghavi, S., H. Delanghe, C. Lodewyckx, M. Mergeay, and D. van der Lelie.** 2001. Nickel-resistance-based minitransposons: new tools for genetic manipulation of environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**:1015-1019.
194. **Tao, T., P. F. Grulich, L. M. Kucharski, R. L. Smith, and M. E. Maguire.** 1998. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: biphasic magnesium and time dependence of the transcription of the *mgtA* and *mgtCB* loci. *Microbiology* **144**:655-664.
195. **Taudte, N.** 2003. Charakterisierung des Eisen-Aufnahmesystems Feo aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
196. **Tetaz, T. J., and R. K. Luke.** 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **154**:1263-1268.
197. **Thieme, D.** 2004. Bedeutung von Fur und Dps für die Kupferhomöostase in *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
198. **Tibazarwa, C., S. Wuertz, M. Mergeay, L. Wyns, and D. van Der Lelie.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol* **182**:1399-1409.
199. **Tree, J. J., S. P. Kidd, M. P. Jennings, and A. G. McEwan.** 2005. Copper sensitivity of *cueO* mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* **328**:1205-1210.
200. **Trikha, J., E. C. Theil, and N. M. Allewell.** 1995. High resolution crystal structures of amphibian red-cell L ferritin: potential roles for structural plasticity and solvation in function. *J Mol Biol* **248**:949-967.
201. **Tseng, T.-T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, and M. H. J. Saier.** 1999. The RND superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:107-125.
202. **Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron, and I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**:4549-4556.
203. **Vandamme, P., and T. Coenye.** 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:2285-2289.
204. **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**:317-327.
205. **Veitinger, S., and V. Braun.** 1992. Localization of the entire *fec* region at 97.3 minutes on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol* **174**:3838-3839.
206. **Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews, and D. J. Kelly.** 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol* **37**:274-286.

207. **Vert, G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J. F. Briat, and C. Curie.** 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**:1223-1233.
208. **Vignais, P. M., B. Billoud, and J. Meyer.** 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **25**:455-501.
209. **von Rozycki, T., D. H. Nies, and M. H. J. Saier.** 2005. Genomic analyses of transport proteins in *Ralstonia metallidurans*. Comparative and functional genomics. **in press**.
210. **Wagegg, W., and V. Braun.** 1981. Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein FecA. *J Bacteriol* **145**:156-163.
211. **Waidner, B., S. Greiner, S. Odenbreit, H. Kavermann, J. Velayudhan, F. Stahler, J. Guhl, E. Bisse, A. H. van Vliet, S. C. Andrews, J. G. Kusters, D. J. Kelly, R. Haas, M. Kist, and S. Bereswill.** 2002. Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun* **70**:3923-3929.
212. **Warren, M. A., L. M. Kucharski, A. Veenstra, L. Shi, P. F. Grulich, and M. E. Maguire.** 2004. The CorA Mg²⁺ transporter is a homotetramer. *J Bacteriol* **186**:4605-4612.
213. **Wei, Y., H. Li, and D. Fu.** 2004. Oligomeric state of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *J Biol Chem* **279**:39251-39259.
214. **Wolf, S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter, and A. Minsky.** 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* **400**:83-85.
215. **Worlock, A. J., and R. L. Smith.** 2002. ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**:4369-4373.
216. **Yamamoto, K., and A. Ishihama.** 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* **56**:215-227.
217. **Zeth, K., S. Offermann, L. O. Essen, and D. Oesterhelt.** 2004. Iron-oxo clusters biomineralizing on protein surfaces: structural analysis of *Halobacterium salinarum* DpsA in its low- and high-iron states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13780-13785.
218. **Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido.** 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* **37**:219-225.
219. **Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone, and N. D. Chasteen.** 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:27689-27696.
220. **Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider, and G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**:4639-4643.
221. **Zheng, M., and G. Storz.** 2000. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol* **59**:1-6.

5. VERZEICHNIS DER FÜR DIESE ARBEIT RELEVANTEN EIGENEN VERÖFFENTLICHUNGEN

1. **Grass, G.**, C. Grosse, and D. H. Nies. 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* 182:1390-1398.
2. Franke, S., **G. Grass**, and D. H. Nies. 2001. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* 147:965-972.
3. **Grass, G.**, and C. Rensing. 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:2145-2147.
4. **Grass, G.**, B. Fan, B. P. Rosen, K. Lemke, H. G. Schlegel, and C. Rensing. 2001. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J Bacteriol* 183:2803-2807.
5. **Grass, G.**, B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies, and C. Rensing. 2001. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:4664-4667.
6. **Grass, G.**, and C. Rensing. 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 286:902-908.
7. Lee, S. M., **G. Grass**, C. Rensing, S. R. Barrett, C. J. Yates, J. V. Stoyanov, and N. L. Brown. 2002. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 295:616-620.
8. **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* 184:864-866.
9. Lee, S. M., **G. Grass**, C. J. Haney, B. Fan, B. P. Rosen, A. Anton, D. H. Nies, and C. Rensing. 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol Lett* 215:273-278.
10. Roberts, S. A., A. Weichsel, **G. Grass**, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2766-2771.
11. Franke, S., **G. Grass**, C. Rensing, and D. H. Nies. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:3804-3812.
12. 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* 185:4354-4361.
13. Rensing, C., and **G. Grass**. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27:197-213.

14. Roberts, S. A., G. F. Wildner, **G. Grass**, A. Weichsel, A. Ambrus, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem* 278:31958-31963.
15. **Grass, G.**, K. Thakali, P. E. Klebba, D. Thieme, A. Muller, G. F. Wildner, and C. Rensing. 2004. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:5826-5833.
16. Anton, A., A. Weltrowski, C. J. Haney, S. Franke, **G. Grass**, C. Rensing, and D. H. Nies. 2004. Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:7499-7507.
17. Singh, S. K., **G. Grass**, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:7815-7817.
18. 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* 186:8036-8043.
19. **Grass, G.**, S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. 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* 187:1604–1611.
19. **Grass, G.**, M. Otto, B. Fricke, C. J. Haney, C. Rensing, D. H. Nies, and D. Munkelt. 2005. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* 183:9-18.
20. Haney, C. J., **G. Grass**, S. Franke, and C. Rensing. 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol*. Online first.
21. **Grass, G.**, B. Fricke, and D. H. Nies. 2005. Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals*. Accepted for publication.

6. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 25. Januar 2006

Gregor Grass

7. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Gregor Grass
Geburtsdatum	8.6. 1970 in Frankfurt/Main
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Anschrift	Opalweg 9 06120 Halle/Saale

Seit 1.7. 2002	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Ziel der Habilitation im Fach Mikrobiologie
Juni 2000 -Juni 2002	Postdoctoral Research Associate am Institut für „Soil, Water And Environmental Science“ der Universität von Arizona, Tucson, USA
Juni 2000	Verteidigung der Dissertation am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Ernennung zum Dr. rer. nat. (summa cum laude)
Okt.1996-Juni 2000	Promotion am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1996	Verteidigung der Diplom Arbeit (Note 1.3)
Okt. 1991-Sept. 1996	Studium der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1990-1991	Mitarbeiter im Lehrmittelhaus Riedel, Reutlingen
1990	Abitur am Bildungszentrum Reutlingen/Nord
1977-1990	Grundschule, Gymnasium

Halle, den 25. Januar 2006

Gregor Grass

8. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dietrich H. Nies herzlich für die sehr produktive Atmosphäre unserer Zusammenarbeit danken, sowie für die große Freiheit und seine Unterstützung, die es mir ermöglichte, eine eigene Arbeitsgruppe aufbauen zu können. Die vielen (durchaus auch hitzigen) Diskussionen und seine Anteilnahme an meiner Arbeit haben mir sehr geholfen.

Meinem *postdoc adviser* Chris Rensing danke ich für die wunderbaren Jahre in Tucson, Arizona, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft, sowie seine Unterstützung und seine Aufmunterung bei Rückschlägen („Locker bleiben“).

Sylvia danke ich für die schöne gemeinsame Zeit in Halle und Tucson und für das Korrekturlesen.

Prof. Dr. Jan R. M. Andreesen möchte ich mich für die Aufnahme in sein Institut und seine unbürokratische Unterstützung danken.

Meinem Kollegen Dirk Wesenberg aus der Biochemie danke ich für die Kooperation in vielen kleineren, gemeinsamen Projekten und für das Korrekturlesen. Nicht zu vergessen die vielen gemeinsamen *business lunches*. Ebenso danke ich Prof. Dr. Gerd J. Krauss für gemeinsame Projekte und dass er es mir ermöglichte, mich ins Graduierten-Kolleg „Stress“ einzubringen.

Mein besonderer Dank gilt den ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern meiner kleinen Arbeitsgruppe, die kräftig Rohdaten für unsere Publikationen produzieren. Namentlich bedanken möchte ich mich bei Nadine Taudte, Markus Otto, Daniel Thieme, Doreen Koch und Doreen Munkelt. Für außergewöhnlich talentierte und sorgfältige technische Assistenz danke ich unserer technischen Assistentin Grit Schleuder. Grit, Du bist die Beste!

Bei Dr. Cornelia Große möchte ich mich für die langjährige gute Zusammenarbeit bedanken.

Ferner sage ich Antje Legatzki und Andreas (Ede) Anton, sowie Susanne Juhnke vielen Dank für schöne Jahre der gemeinsamen Laborarbeit und unsere fruchtbaren Diskussionen.

Ein Dankeschön für ihre Unterstützung bei den normalen kleinen Problemen des Laboraltags gebührt den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie.

Dank gilt auch meinen in- und ausländischen Kooperationspartnern für gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und der Fonds der Chemischen Industrie haben die meisten der hier dargestellten Arbeiten finanziell gefördert und dafür möchte ich danken.