

# **Alte Faktoren mit neuen Funktionen - Kupferentgiftung in *Escherichia coli***

## **KUMULATIVE DISSERTATION**

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

vorgelegt der

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I -  
BIOWISSENSCHAFTEN

DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von

Herrn Daniel Thieme

GEBOREN AM 08.07.1978 IN LEIPZIG

**GUTACHTERIN bzw. Gutachter**

- 1.**
- 2.**
- 3.**

Halle(Saale),

## **Veröffentlichungen**

### **Publikation 1**

**Grass G, Thakali K, Klebba PE, Thieme D, Muller A, Wildner GF, Rensing C.** 2004. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. (2004)

**doi: 10.1128/JB.186.17.5826-5833.2004**

### **Publikation 2**

**Thieme D, Grass G.** 2009. The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis. Microbiol. Res. (2009),

**doi: 10.1016/j.micres.2008.12.003**

### **Publikation 3**

**Thieme D, Neubauer P, Nies DH, Grass G.** 2008. Sandwich hybridization for mRNA quantification from crude extracts of *Escherichia coli*: sensitive detection of dynamic changes in transcript levels of the copper response. Appl. Environ. Microbiol. (2008)

**doi: 10.1128/AEM.01370-08**

## Zusammenfassung

Trotz vielfältiger Untersuchungen im Bereich der Umweltforschung bleiben nach wie vor Fragen über den Umgang von Umweltorganismen mit Kupfer unbeantwortet. Durch die Vielfalt der natürlich vorkommenden Organismen müssen grundlegende Mechanismen an Modellorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* beschrieben werden.

Doch obwohl die Kupferhomöostase in *E. coli* sehr gut untersucht ist, bleibt eines der wichtigsten Probleme, die Kupferaufnahme, nach wie vor ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Siderophors Enterobaktin auf die Toxizität von Kupfer untersucht. Obwohl die Ergebnisse den Einfluss dieses Catecholates und seiner Vorstufen auf den Kupferimport ins Cytosol nahe legen, bleibt die genaue Rolle von Enterobaktin in der Kupferhomöostase unklar. Anhand der vorliegenden Daten muss die Multikupferoxidase CueO nun als zentraler Bestandteil der Kupferhomöostase verstanden werden. Die Oxidation von Catecholaten und ihrer Verwandten ist ein signifikanter Beitrag zur Kupferentgiftung in *E. coli*.

Auch die Erkenntnisse über den cytosolischen Kupferhaushalt beschränken sich bei *E. coli* bisher auf regulatorische Binde- und membrangebundene Exportproteine. Es stellte sich die Frage, ob sich bei Dps, ebenso wie bei Enterobaktin, eine Teil der Eisenhomöostase mit einem Teil der Kupferhomöostase überlagert. Die Deletion von Dps wirkte sich ausschliesslich bei geringen Kupferkonzentrationen aus. Zwar konnte der Einfluss von Dps auf die Kupferhomöostase nachgewiesen werden, jedoch wurde die These der Akkumulation von Kupferionen nach dem Mechanismus der Eiseneinlagerung im Dps Protein widerlegt.

Während also im Fall des Enterobaktins eine direkte Reaktion mit Kupferionen gezeigt werden konnte, begründet sich der Effekt von Dps nicht auf einer direkten Interaktion mit Kupfer, sondern auf der Fähigkeit, DNA generell gegen äussere Einflüsse schützen zu können. Warum jedoch das Fehlen von Dps die Akkumulation von Kupfer in der Zelle bewirkt, konnte nicht erklärt werden.

Dieses Ergebnis rückte jedoch die Kupferexportsysteme in den Fokus der Arbeit. Dazu sollte die transkriptionelle Kontrolle der Kupferexportsysteme mittels des *sandwich hybridization assay* (SHA) untersucht werden. Diese Technik wurde mit Hinblick auf zukünftige Projekte gewählt. Die Schritte der RNA Extraktion und cDNA Synthese sind kritische Punkte bei etablierten Methoden der Transkriptionsanalyse, die möglichst unter *in vivo* Bedingungen durchgeführt werden sollten. Der SHA hatte das Potential ohne diese Schritte auszukommen und daher erstmals Messungen von Transkripten direkt aus einer biologischen Probe zu ermöglichen. Des Weiteren wurde hier erstmalig ein extern generierter Standard etabliert, der eine echte Quantifizierung der Transkriptzahlen ermöglichte. In Vorarbeiten musste dazu die Prozedur im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und ein möglichst geringes Signal-Rausch Verhältnis optimiert werden.

Es gelang die Induktionsprofile der beteiligten Kupferhomöostasegene *copA*, *cueO* und *cusA* zu ermitteln und eine zeitabhängige Verlaufskurve der Transkription zu erstellen. Zusätzlich wurde erstmalig eine zellzahlbasierte Quantifizierung der Transkriptmenge erreicht. Mit Hilfe dieser Analysetechnik konnte auch der Einfluss des Sauerstoffs auf die Kupferhomöostase eingehender untersucht werden. Sowohl cytoplasmatisch, wie auch periplasmatisch regulierte Gene konnten so unabhängig voneinander transkriptionell nachgewiesen werden. Da nur in Anwesenheit von Kupferionen eine Transkriptionsinitiation stattfindet, konnte unter diesen Umständen die zelluläre Lokalisation von Kupferionen gezeigt werden.

Dass Sauerstoff einen Einfluss auf die Kupferhomöostase hat, ist unumstritten. Jedoch müssen die Mechanismen dieses Einflusses weiter erforscht werden. Insbesondere die periplasmatischen Reaktionen des Sauerstoffs, sei es durch Reaktion der Multikupferoxidase CueO oder auf direktem Wege der chemischen Oxidation mittels Chatecholaten, sind von besonderem Interesse, denn sie scheinen der Schlüssel zum genaueren Verständnisses des Kupferhaushalts von *E. coli* zu sein.

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1. Einleitung.....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1. Kupfer als bio-aktives Metall .....   | 7         |
| 1.1.1. Kupferaufnahme .....  | 8         |
| 1.1.2. Regulation der intrazellulären Kupferkonzentration.....                               | 10        |
| 1.1.3. Mechanismen der Kupferhomöostase .....  | 11        |
| 1.1.4. Der cytosolische Kupferhaushalt.....  | 13        |
| 1.1.5. Periplasmatischer Kupferhaushalt.....   | 16        |
| 1.2. Riskante <i>ménage à trois</i> – Kupfer, Eisen und Sauerstoff .....                     | 19        |
| 1.2.1 Sauerstoff und seine Verbindungen .....  | 20        |
| 1.2.2 Umgang mit reaktiven Sauerstoffspezies.....  | 20        |
| 1.2.3 Proteine als Anti-Oxidantien .....   | 21        |
| 1.2.4 Übergangsmetalle und ihr Einfluss auf die Redoxchemie.....                             | 22        |
| 1.2.5 Strategien gegen metallinduzierten, oxidativen Stress .....                            | 24        |
| 1.3. Transkriptionsstudien in der Umweltforschung.....                                       | 28        |
| 1.3.1. Reporterfusion .....  | 31        |
| 1.3.2. PCR basierte Techniken.....   | 32        |
| 1.3.3. RNA Extraktion als methodische Grundlage .....  | 32        |
| 1.3.4. Grundlagen der Array-Technologien.....  | 33        |
| 1.3.5. <i>Sandwich hybridization assay</i> .....   | 35        |
| 1.4. Zielstellung der Arbeit .....   | 38        |
| <b>2. Ergebnisse .....</b>   | <b>40</b> |
| 2.1. Einfluss von Enterobaktin und CueO auf die Kupferaufnahme von <i>E. coli</i> .....      | 40        |
| 2.1.1 Publikation 1 .....  | 40        |
| 2.1.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....   | 49        |
| 2.2. Aufklärung der Rolle des Dps Proteins in der Kupferhomöostase in <i>E. coli</i> . ..... | 51        |
| 2.2.1 Publikation 2 .....  | 51        |
| 2.2.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....  | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3. Etablierung und Validierung des <i>sandwich hybridization assay</i> für Messungen aus dem Rohextrakt..... | 61        |
| 2.3.1. Publikation 3 .....   | 61        |
| 2.3.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....  | 70        |
| 2.4. Eigentanteil an den Publikationen .....   | 72        |
| <b>3. Diskussion und Ausblick.....</b>   | <b>74</b> |
| 3.1. Catecholate als Substrat von CueO .....   | 74        |
| 3.2. Dps als cytoplasmatischer Faktor der Kupferhomöostase .....   | 76        |
| 3.3. Die dynamische Adaption von <i>E. coli</i> an Kupferstress .....  | 78        |
| 3.4. Vom Cytoplasma ins Periplasma - und zurück ? .....  | 82        |
| 3.8. Die Transkriptionsanalyse in der Systembiologie .....   | 83        |
| <b>4. Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>85</b> |
| <b>5. Anhang.....</b>  | <b>93</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1. Kupfer als bio-aktives Metall

Es gibt nur wenige natürliche Elemente, welche die Zweiseitigkeit von Toxizität und Nutzen besser illustrieren, als die Übergangsmetalle. Insbesondere Kupfer stellt mit seinen Redoxzuständen Cu(I) und Cu(II) einen potenten Cofaktor für Elektronentransportvorgänge dar, jedoch bedingen eben diese elektrochemischen Eigenschaften auch die Toxizität von Kupfer (53).

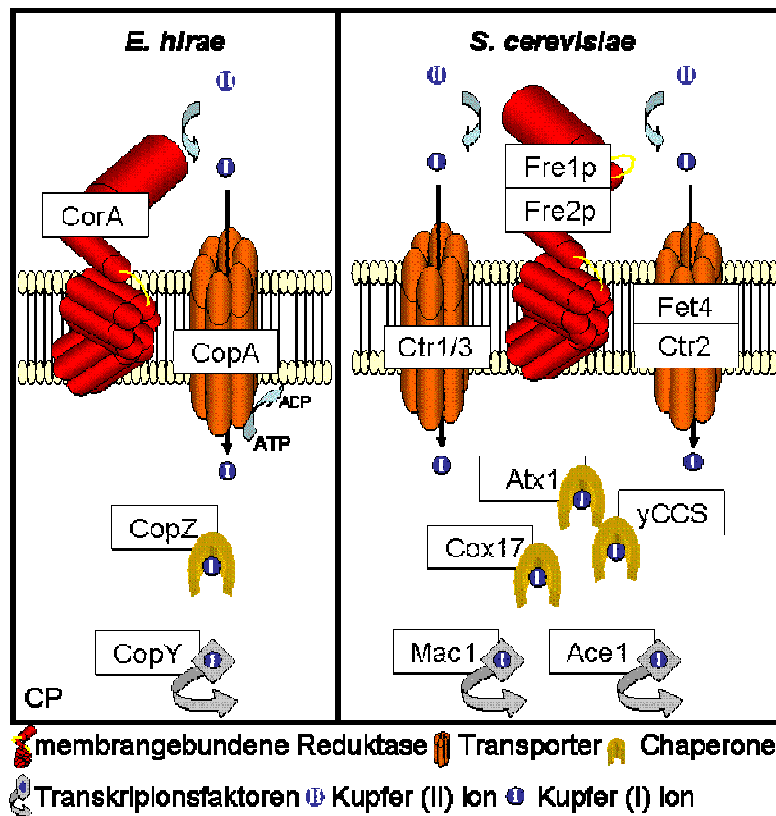
Die Verwendung von Kupfer in biologischen Prozessen erfuhr erst mit der Entstehung von Sauerstoff ihre Blüte. Vor dieser Periode der Erdgeschichte lag Kupfer vornehmlich als unlösliche Cu(I)-Salze vor und war damit den Organismen weitgehend unzugänglich (67). Durch die Verbreitung von Sauerstoff in der Biosphäre wurde Cu(I) zu Cu(II) oxidiert und das, im Vergleich zum Eisen, höhere Redoxpotential von Kupfer für biologische Prozesse attraktiv. Diese Prozesse finden hauptsächlich im Bereich des Elektronentransports Anwendung (14, 34). Proteine, welche Kupfer als Cofaktor benötigen, sind in allen Domänen des Lebens weit verbreitet. Neueste Analysen von bakteriellen Genomdaten zeigen, dass über 70% der Bakterien Kupfer nutzen können. Unter den Archaeen erweist sich dagegen derselbe Anteil als unfähig zur KupfERNutzung. Dies unterstreicht, dass sich die Verwendung von Kupfer erst später in der Evolution als Antwort auf eine aerobe Lebensweise entwickelt hat (68). Nichtsdestoweniger muss die KupfERAufnahme in allen Lebewesen strikt reguliert werden, um die Funktionalität kupferabhängiger Enzyme sicherzustellen, ohne dabei die Zelle zu vergiften.

### 1.1.1. Kupferaufnahme

Obwohl hochaffine Kupferaufnahme-systeme eher im Reich der Eukaryoten verbreitet sind, gibt es auch einige Prokaryoten, für deren Stoffwechselprozesse die Kupferaufnahme essentiell ist. Dazu zählen neben den Cyanobakterien insbesondere die methanotrophen Bakterien, welche für die initialen Schritte der Kohlenstoffassimilation kupferabhängige Monooxygenasen nutzen (12). Dadurch sind diese Organismen stark von einer kontinuierlichen Verfügbarkeit von Kupfer abhängig. Als evolutionäre Konsequenz ergab sich die Entwicklung eines Chalkophors, analog zur Entwicklung der Siderophore im Eisenstoffwechsel (11). Dieses Methanobactin bindet extrazelluläres Kupfer und sorgen so für dessen biologische Verfügbarkeit, aber auch gleichzeitig für eine Kontrolle der Reaktivität. Es können strukturelle Parallelen zu den niedermolekularen Verbindungen der Klasse der Metallothioneine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* oder der Leber der Maus gezogen werden (22).

Diese ausgeschiedenen Verbindungen zur Kupfermobilisierung stellen jedoch eine Besonderheit dar. Für den aktiven Transport über Membranen muss das Cu(II) zu Cu(I) reduziert werden, um von spezifischen Kupfertransportern gebunden zu werden. Es sind durchaus derartige spezifische Aufnahmesysteme für Kupfer in Bakterien, wie *Enterococcus hirae* bekannt, jedoch scheint es für viele Prokaryoten nicht zwingend notwendig zu sein, Kupfer ins Cytoplasma aufzunehmen. Im Gegensatz dazu werden Kupferionen bei Eukaryoten aktiv importiert. Dies geschieht mittels membrangebundener Aufnahme-proteine der Ctr- oder der Fet-Familie (25). Hierbei werden vornehmlich Cu(I)-Ionen ATP-unabhängig transportiert. Um auch Cu(II) für die Zelle nutzbar zu machen, muss das Kupferion wahrscheinlich zuvor reduziert werden. Dies geschieht mittels membrangebundenen Kupferreduktasen in einem der Aufnahme vorgeschalteten Prozess (74, 78) (Abb.1).





### Abb. 1: Kupferaufnahmesysteme im Vergleich

Gezeigt sind die beiden Kupferimportsysteme aus *E. hirae* (78) und *S. cerevisiae* (25). Mittels der farblichen Markierungen sind die ausgeprägten Analogien in beiden Systemen zu erkennen. Auch wenn die eukaryotischen Systeme eine grössere Vielfalt an Kupferaufnahmesystemen entwickelt haben, sind ähnliche Komponenten des prokaryotischen Systems auch in den Eukaryoten wiederzufinden.

Obwohl man auch in bakteriellen Systemen diese Reduktion des Kupfers findet, sind nur wenigen Proteine eindeutig dem aktiven Kupferimport zuzuordnen. Dazu gehören die P-Type ATPasen CopA in *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) und den CtaA Transporter der Cyanobakterien (20, 18).

Die Aufnahme von Kupfer bleibt daher für die meisten Prokaryoten, wie auch *Escherichia coli*, ein Gegenstand der Forschung. Das putative CopCD System und seine Varianten in verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen, wie auch das PcoCD System, als Teil des plasmidgebundenen Operons *pcoABCD RSE* in *E. coli*, gelten zwar als Kupferaufnahmesysteme, jedoch sind dafür noch keine belastbaren experimentellen Beweise erbracht worden (57, 2).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit einer aktiven Kupferaufnahme. Cu(I) ist wahrscheinlich in der Lage, Cytoplasmamembranen durch Diffusion zu überwinden (15, 59). Da jedoch in allen Eukaryoten, wie auch in spezialisierten Bakterien, hochaffine Systeme entwickelt wurden, um Kupfer aufzunehmen, scheint es unwahrscheinlich, dass durch Diffusion der Bedarf der Zelle gedeckt werden kann.

Bei dieser Betrachtung darf man jedoch Verwendung und Verfügbarkeit von Kupfer nicht außer Acht lassen. Wird Kupfer in sehr wenigen Prozessen essentiell benötigt, kann bei ausreichender externer Versorgung auch der geringe Eintrag durch Diffusion genügen. Die Expression von spezialisierten Aufnahmesystemen ist dann überflüssig.

### **1.1.2. Regulation der intrazellulären Kupferkonzentration**

Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen nach der Aufnahme sind die stabile Bindung des intrazellulären Kupfer und der Transport zu den Zielproteinen wichtig. Diese intrazelluläre Bindung wird in allen Eukaryoten durch Metallothioneine und Chaperone geleistet (62). Diese Cystein-reichen Verbindungen werden auf niedrigem Niveau konstitutiv exprimiert. Bei erhöhten Konzentrationen an Metallionen steigt jedoch die Expressionsrate stark an (10). Beispiele solcher Chelatoren sind die Kupferthioneine Cup1 und CRS5 in *S. cerevisiae* (19). Auch in höheren Eukaryoten, wie *Drosophila melongaster*, finden sich Homologe dieser Verbindungen. So existieren im Darm der Fruchtfliege so genannte „Kupferzellen“, in denen mittels Kupfer-Metallothionein-Komplexen grosse Mengen Kupferionen von der zellulären Biochemie separiert werden (9).

In Prokaryoten sind chemisch verwandte Verbindungen bekannt, jedoch bei weitem nicht derart verbreitet, wie unter Eukaryoten. In Bakterien wird seit längerem Glutathion in der Rolle eines unspezifischen cytosolischen Chelators gesehen (40). Direkte Beweise für eine Bindung von Metallionen *in vivo* bleiben vorerst aus, jedoch gibt es

Untersuchungen, nach denen die Konzentration von ungebundenen Kupferionen innerhalb des Cytosols extrem niedrig ist (63).

Die Herausforderung an die Biochemie der Zelle besteht darin, dass die Bindung des Kupfers zum Schutz der Zelle dem Einbau in die Kupferproteine entgegensteht. Die Lösung dieses Problems stellen Chaperone für Kupfer dar. Diese Chaperone, die Kupferionen hochaffin binden, sind in der Lage das Kupfer spezifisch dem Zielprotein zu vermitteln. Beispiele für solche Metallochaperone sind CopZ aus *E. hirae*, Atx1p aus *S. cerevisiae* oder die beiden Atmungskettenchaperone der Mitochondrien COX17 und Sco1 (54, 62, 22). Während COX17 kein Homologes in Prokaryoten hat, wird vermutet, dass das Protein Hyp1 dessen Rolle beim Beladen des Cytochrom C Komplexes im Cytosol mit Kupfer übernimmt (6). Bakterielle Verwandte von Sco1 und Hyp1 könnten demnach auch Kupferchaperone darstellen, welche mit der bakteriellen Cytochrom C Oxidase assoziiert sind. Nach wie vor ist unklar, wie Chaperone das Kupferion rekrutieren. Ob sie es von unspezifischen Chelatoren, wie Glutathion oder Cystein, aus dem Cytoplasma aufnehmen oder spezifisch von einem Importer beladen werden, ist aktuell noch Gegenstand der Forschung.

### **1.1.3. Mechanismen der Kupferhomöostase**

Für die meisten Prokaryoten gilt, dass das Kupfer scheinbar unmittelbar von regulatorischen Proteinen gebunden wird, welche die Transkription von Kupferhomöostasemechanismen regulieren. Die Priorität vieler, insbesondere gram-negativer, Bakterien liegt auf der aktiven Vermeidung von cytosolischem Kupfer. Eine aktive Aufnahme von Kupferionen ist demnach ein Ergebnis der Anpassung an eine jeweilige ökologische Nische und wird von der Entwicklung spezifischer Kupferchaperone begleitet (11). Eine derart ambivalente Homöostase weist *E. hirae* auf. Dieses Bakterium besitzt zwei P-Typ ATPasen, welche Cu(I)-Ionen transportieren. CopA fungiert als Kupferimporter unter Kupfermangelbedingungen und CopB

wird bei hohen Kupferkonzentrationen als Kupferexporter vermehrt exprimiert. Im Cytosol wird Kupfer von CopZ gebunden und zu CopY vermittelt, welches die Balance zwischen Kupferim- und -export steuert (78). Ein solcher molekularer Schalter, der zwischen hohen und niedrigen Kupferkonzentrationen unterscheidet, scheint jedoch im Reich der Bakterien nur vereinzelt vorhanden zu sein, wohingegen der gesteigerte Efflux aus dem Cytosol die für Prokaryoten typische Reaktion auf schädliche Kupferkonzentrationen darstellt, auch bei *E. hirae*.

Bei eukaryotischen Organismen, wie der Hefe, ist diese Art der Regulation ubiquitär (19). Jedoch werden zuerst Metallothioneine als Antwort auf exzessiven Kupfereinstrom synthetisiert, bevor die Kupferionen aktiv aus dem Cytosol transportiert werden. Dies geschieht in erster Linie über die ATP7 und Ctr2 Transporter, welche Kupfer in die Golgi-Apparate oder Vakuolen transportieren (10).

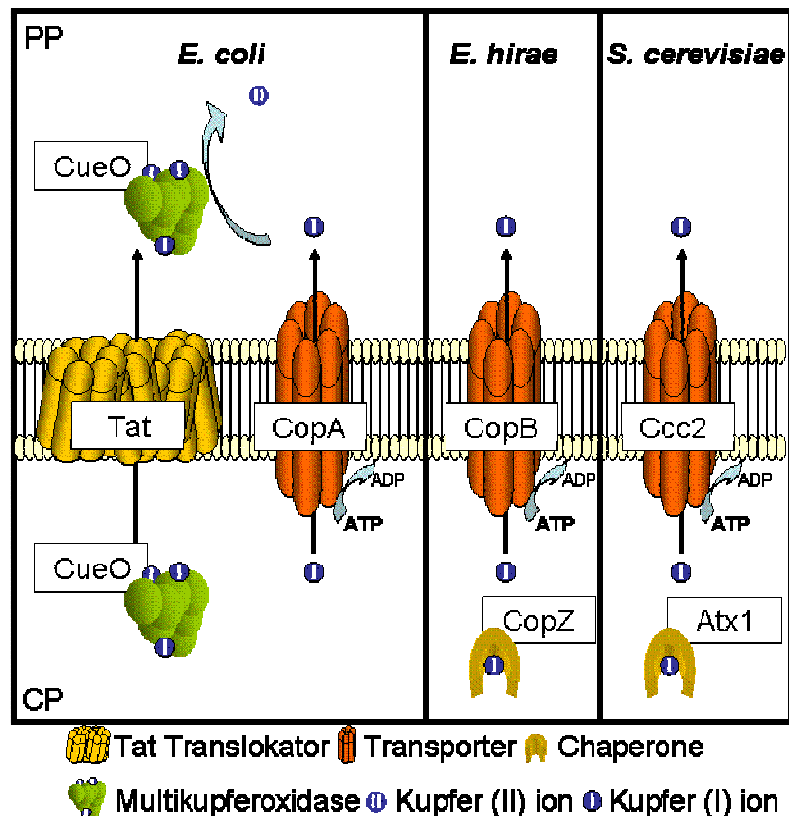
Daran werden die unterschiedlichen Prioritäten des Kupferhaushaltes deutlich. Während bakterielle Organismen die Vermeidung von cytosolischem Kupfer anstreben, versuchen eukaryotische Systeme das Kupfer erst zu lagern, bevor sie tatsächlich Exportmechanismen aktivieren.

In letzter Konsequenz funktioniert so auch die humane Kupferentgiftung mittels des Wilson Transporters ATP7B in der Leber. Dieser sorgt für den Transport von Kupfer in die Gallenblase (92). Eine Fehlfunktion von ATP7B führt zu einem Krankheitsbild, das als Wilson Syndrom bekannt ist. Obwohl verschiedenste Mutationen bekannt sind, so ist doch immer eine veränderte Funktion der ATPase und damit ein veränderter Kupferhaushalt die Ursache dieser Krankheit (26)

#### **1.1.4. Der cytosolische Kupferhaushalt**

Der wichtigste cytosolische Regulator in *E. coli* ist CueR. Dieses Kupferbindeprotein der MerR Familie bindet direkt an Promotoren von Homöostasegenen und kontrolliert deren Transkription (83). MerR Systeme sind oft in Bakterien vorhanden und regulieren neben Kupfer auch andere Metallionen, wie Zink und Blei (17). Die regulatorischen Proteine weisen zwar ähnliche Eigenschaften auf, sprechen jedoch nur spezifische Zielpromotoren an. Für CueR sind das die Gene von CueO, einer periplasmatischen Multikupferoxidase und die P-Typ ATPase CopA, einem membrangebundenen Transporter für Cu(I) (35, 66).

P-typ ATPasen sind ubiquitär verbreitet. Dazu zählen die eukaryotischen ATP7 Transporter, genauso wie CopB von *E. hirae* und Ccc2 der Hefe. Im Gegensatz zu den Mitgliedern der Ctr Familie benötigen diese Kupferexporter ATP als Energiequelle.



## Abb. 2: Kupferexportsysteme im Vergleich

Analoge Proteine der Kupferexportsysteme aus *E. hirae* (78) und *S. cerevisiae* (25) sind mittels farblichen Markierungen gegenübergestellt. Links ist der Export von cytosolischem Kupfer in *E. coli* gezeigt (36). Hier erfolgt ebenfalls der primäre Export mittels einer P-Type ATPase, jedoch ist kein Kupfer-Chaperon bekannt. Zusätzlich ist eine (kupferabhängige) Oxidation des Kupfers nach dem Export gut dokumentiert.

In vielen prokaryotischen Organismen stellen Exporter der P-Typ Familie die Grundlage der Kupfertoleranz dar. Eine Deletion der entsprechenden Gene sorgt dafür, dass sich ein stark kupfersensitiver Phänotyp entwickelt, welcher auch durch andere Mechanismen der Kupferhomöostase nicht ausgeglichen werden kann. In Ermangelung von Verbindungen wie Metallothioneinen verfügen die meisten Bakterien wahrscheinlich nur über einen geringfügigen Puffer, welcher Kupfer im Cytosol binden kann, bevor die toxischen Eigenschaften des Kupfers den Organismus schädigen. Da sich einige Kupferproteine, wie die Kupfer-Zink Superoxiddismutase 1 der Säugetiere, auch durch einen Glutathion-Kupfer Komplex beladen lassen, ist es möglich, dass dieser Kurzzeitpuffer in Bakterien mittels Glutathion-Kupfer Komplexen gebildet werden kann (96).

Zusätzlich gibt es in manchen Prokaryoten Homologe des Atx1 Chaperones von *S. cerevisiae*. Dieses Chaperon beliefert in Hefe den Kupfertransporter Ccc2. Während bei den Cyanobakterien dieser Mechanismus der Kupfermobilisierung experimentell ebenfalls belegt ist, werden derartige Mechanismen in *E. hirae* oder *B. subtilis* bisher nur theoretisch diskutiert (77, 85).

Eine aus dem Eisenstoffwechsel bekannte Reaktion auf erhöhte Konzentrationen von Metallionen ist die verstärkte Expression von Proteinen, welche diese Ionen so binden, dass sie keine Bedrohung der Zellchemie mehr darstellen. Eisenionen werden so als Cofaktor oder als chemisch modifizierte Variante eines Oxids gebunden (7). Es gibt jedoch nur sehr wenige bekannte Proteine im Cytosol, die Kupfer auf diese Weise binden können und diese gehören zur Klasse der Regulatoren. Es sind jedoch Vorstufen von Enzymen bekannt, welche im Cytosol möglicherweise Kupfer binden können. Zu diesen gehören in *E. coli* die Cu-Zn SOD oder die Multikupferoxidase CueO und ihr Ortholog PcoA (33). Diese Enzyme sind nicht cytoplasmatisch lokalisiert, sondern werden mittels des *twin arginine translocation systems* (TAT) ins Periplasma transportiert. Dieses System befördert bereits gefaltete Proteine samt ihrer Cofaktoren mittels eines pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran (70). Es liegt nahe, dass die strukturell nötigen Metallionen der Kupferbindeproteine bereits im Cytosol integriert werden. Ob diese Kupferbindung einen Beitrag zur Kupfertoleranz leistet, ist strittig, da die Exportmechanismen der ATPasen weitaus effizienter arbeiten und den wichtigsten Beitrag zur cytosolischen Kupferhomöostase leisten. Der Fakt, dass *E. coli* auch unter anaeroben Bedingungen CueO bei Kupferstress verstärkt exprimiert, obwohl für die Funktion Sauerstoff benötigt wird, könnte der Bindung und dem Export von Kupfer mittels Kupferbindeproteinen eine gewisse Relevanz in der Kupferhomöostase einräumen (36).

### 1.1.5. Periplasmatischer Kupferhaushalt

Es ist unbestritten, dass der direkte Transport über die Cytoplasmamembran einen wichtigen Beitrag zur Kupferentgiftung darstellt. Bei gram-negativen Organismen ist dies jedoch nur der erste Schritt. Bei diesen Bakterien würde sich das Problem jedoch nur in das Periplasma verlagern. Es bedarf demnach Strategien, um der Toxizität des Kupfers auch in diesem Kompartiment zu begegnen.

Durch die periplasmatische Aktivität der Multikupferoxidase CueO wird Cu(I), mittels Sauerstoff als Elektronenakzeptor, zu Cu(II) oxidiert (76). Damit verliert das Kupfer einen Grossteil seines toxischen Potentials schon im Periplasma. Ob sich die höhere Toxizität in der besseren Membrangängigkeit oder der höheren Reaktivität der Cu(I) Spezies allgemein begründet, wird genauso diskutiert, wie der Import von Kupfer in die Zelle allgemein. Fest steht, dass Cu(I) im Vergleich zu Cu(II) die weichere Lewis-Säure darstellt und deswegen im Bezug auf Thiolgruppen, die weiche Lewis-Basen sind, reaktiver ist.

Es gibt Hinweise, dass Siderophore eine Rolle beim Kupferimport spielen könnten. Obwohl die genaue Rolle von Enterobaktin im Kupferhaushalt von *E. coli* unklar bleibt, konnte der Einfluss des Siderophors auf die Toxizität von Kupfer nachgewiesen werden (48). Da CueO ebenfalls in der Lage ist, Enterobaktin zu oxidieren, muss davon ausgegangen werden, dass sich der Einfluss von CueO auf die periplasmatische Kupferchemie nicht auf die reine Oxidation des Kupfers beschränkt (46).

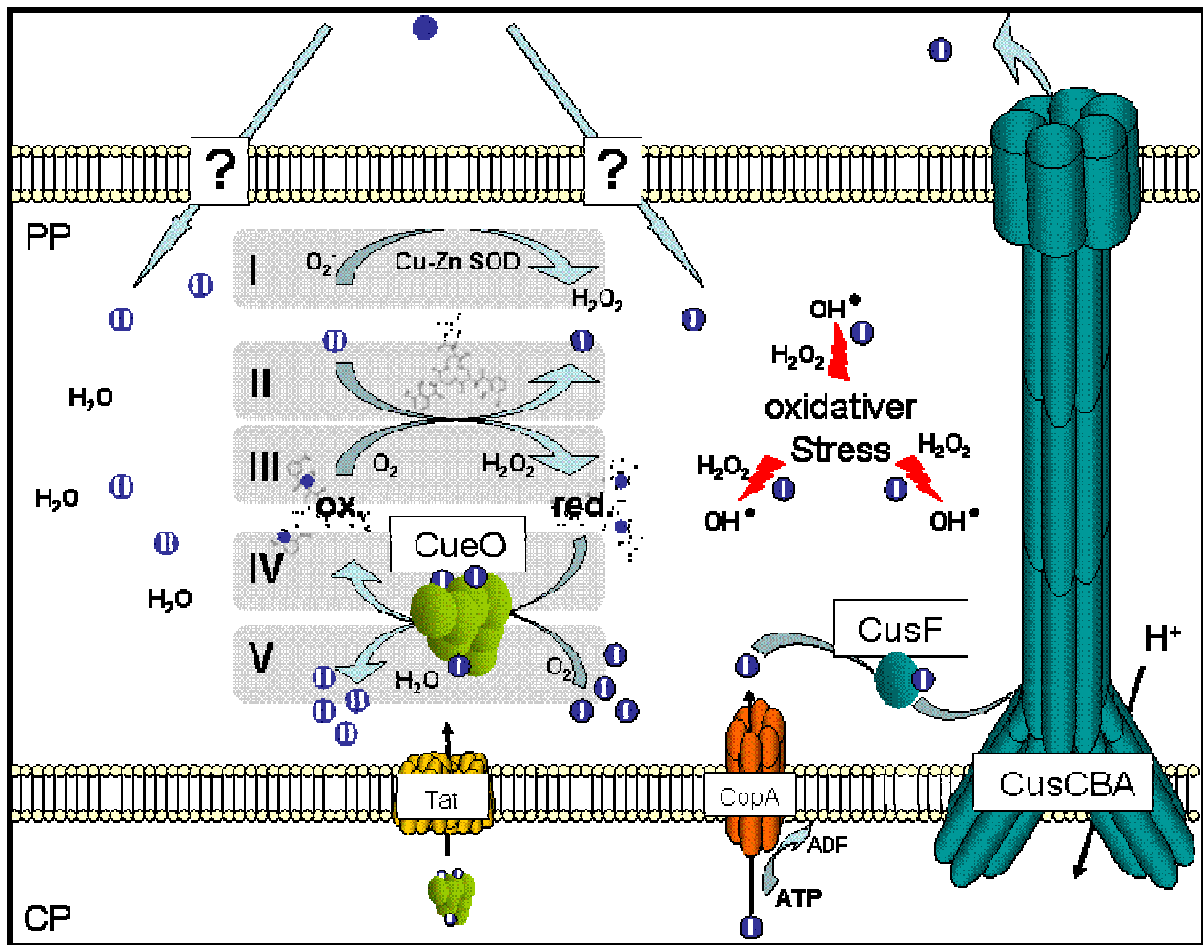
Im Periplasma laufen jedoch nicht nur die erwähnten biochemische Prozesse ab, es werden auch regulatorische Signale ausgelöst. Neben der CueR-abhängigen Regulation im Cytoplasma gibt es weitere periplasmatische Signaltransduktionsmechanismen im Kupferhaushalt von *E. coli*. Das CusRS System ist ein Zwei-Komponenten System, welches aus einer membranständigen Histidinkinase CusS und dem transkriptionellem Aktivator CusR besteht (55). Zwei-Komponenten Systeme sind weit unter Prokaryoten verbreitet und teilweise sind diese Regulationen




untereinander vernetzt. Das plasmidgebundene *pco* System in *E. coli* oder das *cop* Operon aus *Pseudomonas putida* sind weitere Beispiele (2).

Die durch CusRS regulierten Gene *cusCFBA* codieren dabei für einen dreiteiligen RND Transporter, welcher Kupfer vom Periplasma in den extrazellulären Raum transportiert (32). Das kleine Protein CusF stellt ein periplasmatisches Kupferbindeprotein dar, welches dem RND Komplex Kupferionen aus dem Periplasma vermittelt. Dabei gibt es Hinweise, dass eine direkte Interaktion von CusF mit CusB stattfindet (8). Damit würde CusF die Funktion eines Kupferchaperones im Periplasma übernehmen. Obwohl das Cus System den Protonengradienten der Cytoplasmamembran zur Energetisierung nutzt, scheint es nur den Transport aus dem Periplasma heraus zu bewerkstelligen. Dies deckt sich mit Erkenntnissen von anderen Vertretern der RND Familie, wie AcrB oder MexB, die organische Substrate transportieren (71).

Das Periplasma stellt einen bis dahin nur unzureichend verstandenes Kompartiment für gram-negative Organismen dar. Da alle Homöostasemechanismen mit Exportkomponenten letztendlich über diesen Raum ablaufen müssen, ergibt sich ein komplexes Netzwerk verschiedenster Reaktionen. Allein rund um die Multikupferoxidase CueO spannt sich ein Geflecht aus Reaktionen des Eisen-, Kupfer- und Redoxhaushaltes (Abb. 3). Diese Verbindungen zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen bergen den Schlüssel zum tieferen Verständnis der Flussgleichgewichte in biologischen Systemen.



-  Tat Translokator
-  ATPase
-  RND/Transporter
-  Catechol
-  Multikupferoxidase
-  Cu(II)ion
-  Cu(I)ion
-  peripl. Cu-Chaperon

### Abb. 3: kupferabhängige Reaktionen im Periplasma

In grau unterlegt sind die wichtigsten Reaktionen des kupferinduzierten, oxidativen Stresses im Periplasma von *E. coli*. Reaktion (I) zeigt den Umsatz von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid durch die kupfer-, zinkabhängige periplasmatische SOD (96). Reaktion (II) zeigt die catecholatabhängige Kupferreduktion von Cu(II) zum reaktiveren Cu(I). Reaktion (III) zeigt die chemische Reduktion von Catecholaten in deren Verlauf Wasserstoffperoxid entsteht (43). Die Reaktion (IV) und (V) zeigen die CueO vermittelte Oxidation von Catecholaten und Kupferionen (76). CueO ist das Schlüsselenzym der periplasmatischen Kupferentgiftung, da es sowohl Kupferionen wie auch Enterobaktin oxidieren kann. CueO verschiebt also das chemische Gleichgewicht von der toxischen Situation (rechts) hin zur weniger toxischen (links).

## **1.2. Riskante *ménage à trois* – Kupfer, Eisen und Sauerstoff**

Die Fähigkeit von Eisen und Kupfer, Elektronen sowohl aufzunehmen als auch abzugeben sind Schlüsselfunktionen in enzymatisch katalysierten Stoffwechselschritten. Eisen-katalysierte Redox-Systeme erfuhren mit der beginnenden Produktion von molekularem Sauerstoff einen radikalen Wandel. Zwar wurde der erste Saustoff durch chemische Prozesse in der Ökosphäre gebunden und war damit zunächst nicht frei verfügbar, jedoch wurde die fundamentale Änderung der Redoxchemie dadurch nur verzögert (23). Die zunehmende Sättigung der aquatischen Lebensräume mit Sauerstoff hatte mehrere umwälzende Effekte.

Durch die nun mögliche Oxidation mit dem vorhandenen Sauerstoff wurden den Lebensräumen essentielle Metallionen entzogen, da unlösliche Metalloxide entstanden. Gleichwohl wurden durch die gleichen Prozesse neue Komponenten für elektrochemische Prozesse verfügbar. Damit sorgte der Sauerstoff für eine Neuverteilung unter den redoxaktiven Metallionen in der Biosphäre. Zunehmend wurde Kupfer in Elektronenübertragungsprozessen eingesetzt (23). Das höhere Redoxpotential von Kupfer gegenüber dem des Eisens bot den Organismen eine erhöhte Energieausbeute und damit einen Selektionsvorteil, speziell unter den nun vorhandenen aeroben Bedingungen.

Unter den veränderten Voraussetzungen entstanden für die Organismen jedoch nicht nur neue Chancen. Das Vorhandensein von reaktiveren Verbindungen in der Ökosphäre zwang Lebewesen zu weit reichenden Anpassungen. Sauerstoff und seine Derivate sind zu vielseitigen chemischen Reaktionen fähig, welche auch negative Auswirkungen auf aeroben Organismen haben. Im Laufe der nun aerob geprägten Evolution entstanden mehrere Mechanismen, um dieser vielseitigen Toxizität zu begegnen.

### **1.2.1 Sauerstoff und seine Verbindungen**

Der molekulare Sauerstoff ist in der Lage eine Vielzahl von Verbindungen einzugehen. Die direkte Oxidation von Substraten spielt bei der Zusammensetzung der aquatischen Umwelt eine überragende Rolle. Metalle konnten nun vermehrt als Oxide vorliegen. Diese Oxide sind zumeist weniger löslich und damit kann die biologische Welt schwerer auf essentielle Metalle zugreifen. Neben diesen sekundären Reaktionsprodukten sind Sauerstoff und seine direkten chemischen Verwandten eine Bedrohung der Zellchemie. Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikale ( $OH\cdot$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) sind die meistgenannten Vertreter, wenn von *reactive oxygen species* (ROS) gesprochen wird. Nur bimolekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) liegt als recht stabile Verbindung vor. ROS sind von einem Überschuss an Elektronen gekennzeichnet. Diese Elektronen können unkontrolliert an Zellbestandteile abgegeben werden und erzeugen chemische Modifikationen in Membranlipiden, SH-Gruppen von Proteinen und in den Nukleinsäuren (38). Durch diese Schäden können zelluläre Schädigungen bis hin zum Zelltod entstehen.

Die Umwandlung von Sauerstoff in ROS wird in der Umwelt durch UV-Strahlung oder thermische Reaktionen ausgelöst. Mit der Verwendung von Sauerstoff in zellulären Prozessen, sei es die oxygene Photosynthese oder auch die aerobe Atmung, entstanden auch endogene Quellen für eben jene Verbindungen.

### **1.2.2 Umgang mit reaktiven Sauerstoffspezies**

Die Verwendung von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor hat sich in der Evolution trotz der Risiken durchgesetzt. Daran gekoppelt war eine parallele Entwicklung von Mechanismen, um mit den Nebenprodukten dieser Reaktionen umzugehen. Hierbei wird in einem ersten Schritt der Eintrag von Sauerstoff in die Zelle minimiert. Es gelang während der

Evolution eine elegante, wie effektive Lösung – die Komponenten der Atmungskette wurden in den Membranen lokalisiert. Damit wurde die Membran als Schutzhülle des empfindlichen Cytosols um eine chemische Funktionalität erweitert. Da die Entstehung von ROS somit grösstenteils an der Membran geschieht, sind die Nukleinsäuren und ribosomalen Proteine im Cytosol geschützt. Jedoch zeigt die Entstehung von antioxidativ wirkenden Proteinen, dass auch im Cytosol oxidative Prozesse stattfinden. Diese werden von Superoxidanionen ausgelöst, die z.B. aus der Atmungskette ins Cytosol diffundieren.

### **1.2.3 Proteine als Anti-Oxidantien**

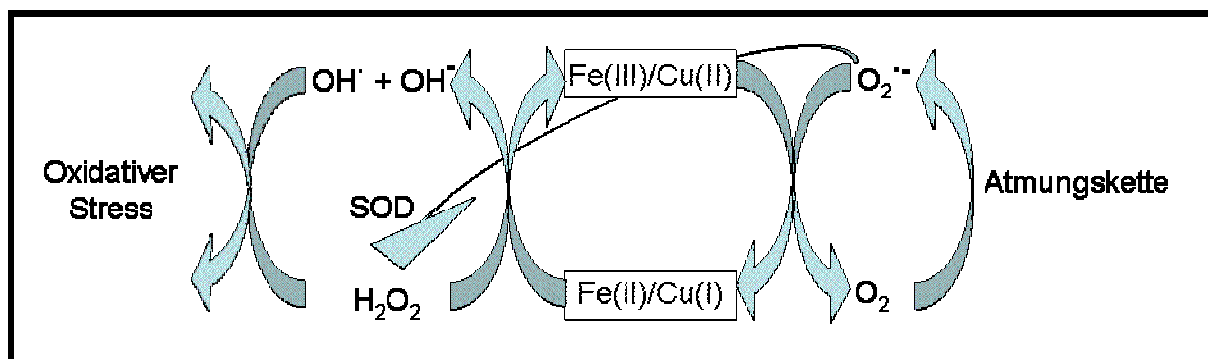
Antioxidativen Proteine sind unter Anderem Superoxiddismutasen, Katalasen und Peroxidasen. Alle diese Enzymklassen wechseln sich untereinander ab, die ROS über mehrere Schritte zu entgiften. Dabei sind Katalasen, Peroxidasen und Superoxiddismutasen in allen Reichen der Organismen vorhanden (95). Die Priorität dieser Schutzreaktion für alle Reaktionsräume in Organismen zeigt sich auch an der Tatsache, dass in gram-negativen Bakterien Superoxiddismutasen ins Periplasma sekretiert werden (86). Des Weiteren werden solche Entgiftungsreaktionen auch in anderen Prozessen der Zellhomöostase angewendet. Ein Beispiel dafür ist das ubiquitäre Schutzprotein Dps (*DNA binding protein from starved cells*).

Dps und seine Homologe sind in allen Bakterienklassen verbreitet und in fast allen Fällen ist das Vorhandensein dieses Proteintyps direkt mit dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress assoziiert (3). Die Grundlage dieser Schutzfunktion liegt in der Art der chemischen Reaktion, mit der das Dps Protein die Einlagerung von Eisen in seine Holosphäre katalysiert. Dabei oxidieren Eisen(II)-Ionen in einer Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu Eisen(III)oxid. Als Resultat der Eiseneinlagerung wird auch das oxidative Zellgift  $H_2O_2$  unschädlich gemacht (Abb. 5). Die Verwendung von  $H_2O_2$  als Elektronendonator für diese Reaktion ist nach jetzigem Kenntnisstand auf

das Dps Protein aus *E. coli* beschränkt. Andere Varianten nutzen Sauerstoff für diese Reaktion (97). Es existiert nicht nur für das Dps Protein ein direkter Zusammenhang zwischen dem Metallhaushalt der Zelle und dem Umgang mit oxidativem Stress. In den Meisten redoxaktiven Proteinen werden Übergangsmetalle als Cofaktoren genutzt.

### 1.2.4 Übergangsmetalle und ihr Einfluss auf die Redoxchemie

Die Bindung von Metallionen in Proteinkomplexen dient der Zelle in erster Linie der Kontrolle der Reaktivität dieser Ionen. Denn die Ionen von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer sind ebenso wie ROS hoch reaktiv. Des Weiteren können Metallionen wie Eisen(II) und Kupfer(I) direkt die Bildung von ROS bewirken.



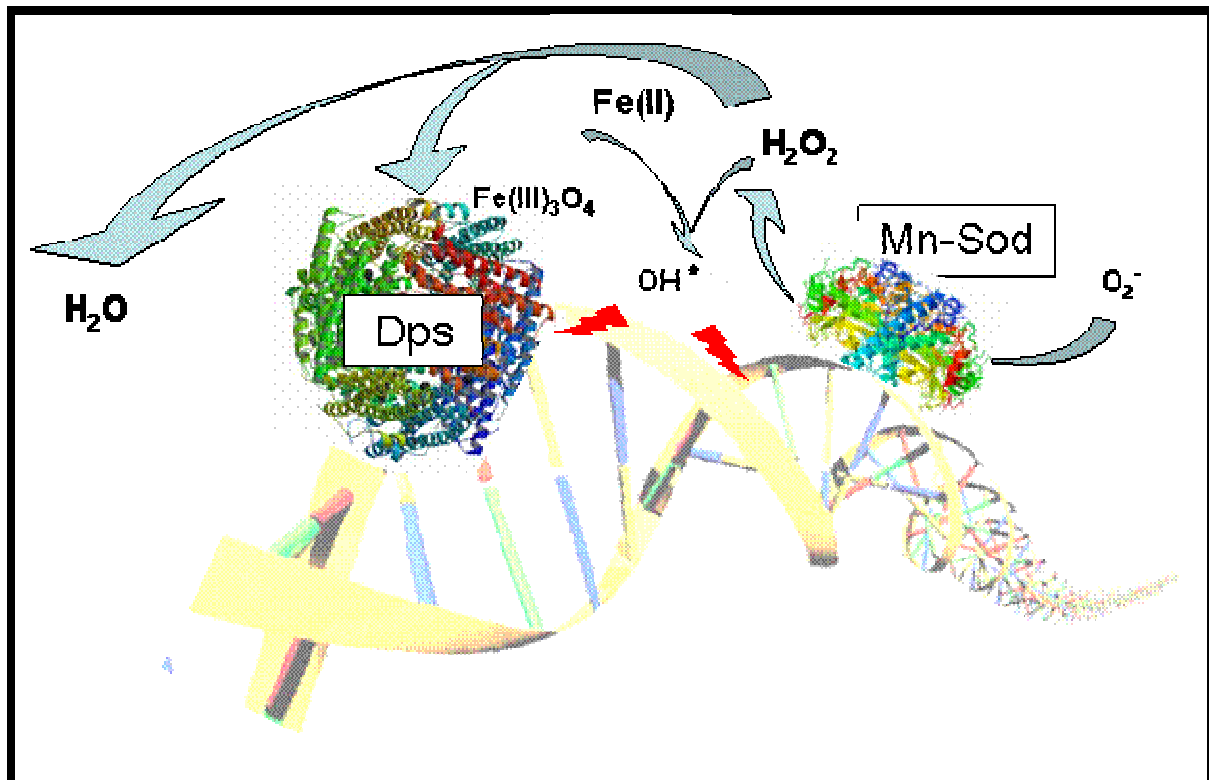
**Abb. 4: metallinduzierter oxidativer Stress der Fenton Reaktion**

Die Fenton Chemie beschreibt die Entstehung von Hydroxylradikalen aus den Beiprodukten der Atmungskette. Insbesondere die Übergangsmetalle Eisen und Kupfer sind in der Lage diese Reaktion zu katalysieren. Im Zusammenspiel mit Wasserstoffperoxid, welches das Reaktionsprodukt von Superoxiddismutasen ist, können derart reduzierte Metallionen zur unkontrollierten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies führen. Insbesondere Hydroxydionen und Hydroxylradikale gelten neben Wasserstoffperoxid als Auslöser von zellulären Schäden durch oxidativen Stress (42).

Diese als Fenton-Chemie bekannte Reaktionen können im Falle eines erhöhten Auftretens von Metallionen ablaufen. Dabei entstehen letztendlich Hydroxylradikale. Aufgrund ihrer guten Membrangängigkeit und ihrer hohen Reaktivität weisen sie das höchste Schadenspotential unter den ROS auf. Insbesondere Schaden an der DNA ist für diese ROS Spezies *in vitro* gut dokumentiert (42).

Derartige Veränderungen des Erbgutes sind extrem und daher haben sich speziell für diesen Fall Mechanismen zum Schutz entwickelt. Neben den Reparaturmechanismen hat die Prävention von oxidativen Schäden hohe Priorität. Diese vorbeugenden Schutzmassnahmen schließen den Bogen erneut zum Dps Protein. Eine weitere Eigenschaft von Dps ist die Fähigkeit DNA zu binden (3). Diese hat Dps mit SodA, der manganabhängigen Superoxiddismutase, gemein (80). Auf dieser Weise wird die DNA direkt "bedeckt" und die Fläche, welcher einer Schädigung ausgesetzt sein könnte, minimiert. Die Schutzproteine werden so direkt am Ziel der oxidativen Schädigung lokalisiert.

Ein weiterer Aspekt der gemeinsamen Lokalisation von Superoxiddismutase und dem Dps Protein ist die Kombination beider Reaktionen. Wasserstoffperoxid, welches von SodA gebildet wird, um Superoxidanionen zu entgiften, wird von Dps direkt weiter zu Wasser reduziert (Abb. 5). Parallel dazu wird das Fentonreagenz Fe(II) in der Dps Holosphäre inkorporiert und damit auch dessen Konzentration im Cytosol verringert (97).



### Abb. 5: oxidativer Schutz mittels Dps und SodA

Die Proteine Dps und SodA sind in der Lage unspezifisch an DNA zu binden (3, 80). Dabei katalysiert SodA den Umsatz von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid. Diese ROS Spezies kann mit Metallionen eine Fenton-Reaktion auslösen (Abb. 4), welche DNA schädigt. Das Dps Protein katalysiert nicht nur den Umsatz von  $H_2O_2$  zu Wasser, sondern es separiert in dieser Reaktion auch Eisenionen von der Zellbiochemie (97). Diese kombinierte Reaktion von SodA und Dps sorgt für einen optimalen Schutz der DNA vor eiseninduziertem oxidativen Stress und ist ein Beispiel für die Vernetzung von Homöostaseebenen zum Schutz der Zelle.

#### 1.2.5 Strategien gegen metallinduzierten, oxidativen Stress

Um metallinduzierten oxidativen Stress zu begrenzen, verfolgen Organismen verschiedene Strategien. Die passive Möglichkeit, die Zelloberfläche mit biologisch aktiven Gruppen zu modifizieren, welche Metalle binden können, gibt es nur in wenigen niederen Eukaryoten, wie Moosen. Auch einige Bakterien sind in der Lage ihre Zelloberfläche mit histidinreichen Proteinen zu diesem Zweck auszustatten (27). Jedoch werden so nicht nur toxische Metalle, wie Cadmium oder Quecksilber, an der Oberfläche der Zelle immobilisiert. Auch funktionelle Ionen werden so am Eintritt in die Zelle gehindert.



Derart unspezifische Systeme, wie auch die cytosolische Bindung an Puffersubstanzen, sind für den Umgang mit essentiellen Metallionen ungeeignet (44, 30). Daher wird der Umgang mit essentiellen Metallen, insbesondere dem Eisen, differenzierter gehandhabt.

Da Eisen in sehr vielen Prozessen benötigt wird, kommt es eher zu Mangelsituationen als zu eiseninduzierter Toxizität. Demzufolge haben die meisten Organismen Systeme zur Speicherung von Eisen entwickelt, während Mechanismen für direkten Efflux selten sind (4). Mehrzellige oder kompartmentierte Organismen haben die Möglichkeit, Eisen räumlich zu separieren, um Schäden zu vermeiden. Da Prokaryoten dies verwehrt bleibt, bedienen sie sich einer speziellen Proteinklasse – der Ferritine (1).

Ferritine und seine Verwandten, wie Dps, bilden sphärische Multimere. Im Inneren der Holoosphäre wird Eisen als biologisches Oxid eingelagert. Damit bevorraten sie Eisen für Mangelsituationen und separieren es gleichzeitig vom Cytoplasma. Ferritine werden bei erhöhten Eisenkonzentrationen verstärkt exprimiert, ebenso wie andere Enzyme, welche Eisen als Cofaktor einbauen. Dazu zählt unter anderen auch die eisenabhängige Superoxiddismutase SodB oder die Aconitase (52). Die Verknüpfung der Regulationsebenen erfolgt durch den DNA-bindenden Repressor, Fur, welcher selbst der Kontrolle durch regulatorische Komponenten des Redox-Haushaltes, namentlich OxyR und SoxS unterliegt (98). Die Ziele der Fur-abhängigen Regulation sind neben den Eisenhomöostasesystemen auch Proteine des Redoxhaushaltes, darunter die manganabhängige Superoxiddismutase SodA (29). Die Regulation mittels Fur sorgt also für verstärkten Eiseneinbau, der dem Cytosol Eisen entzieht, und die gleichzeitige Aktivierung der Superoxiddismutase SodB beugt dem oxidativen Stress zusätzlich vor.

Diese Strategie, mittels vermehrter Expression eisenbindender Enzyme, überschüssige Metallionen als Kofaktoren zum Zwecke der Entgiftung zu binden, findet man auch im Kupfer- und Redoxhaushalt. Wiederum wird

eine Superoxiddisumtase, die Cu-Zn SOD, und die Multikupferoxidase CueO durch Kupfer aktiviert (33). Diese Enzyme dienen jedoch nicht dem cytosolischen Redoxhaushalt. Beide werden ins Periplasma exportiert. Der spezifische Transport von Metallionen aus dem Cytosol heraus wird jedoch in den meisten Fällen mittels ATPasen bewerkstelligt. Dabei wird das Metall in eukaryotischen Systemen entweder in die Vakuolen, Mitochondrien oder Golgi Vesikel transportiert. Bei Prokaryoten hingegen in den extrazellulären Raum oder, bei gram-negativen Bakterien, ins Periplasma (51).

Die Bedeutung der Kompartimentierung in Eukaryoten kann anhand einer direkten Verbindung zwischen Kupfer- und Eisenstoffwechsel skizziert werden. In der Hefe *S. cerevisiae* sind die Reduktasen Fre1p/Fre2p, welche Eisen oder Kupfer für die Aufnahme reduzieren, kupferabhängig. Die Beladung dieser Reduktasen erfolgt in den intrazellulären Vesikeln. Diese Verbindung geht soweit, dass eine Versorgung der Zelle mit Eisen unter Kupfermangelbedingungen kritisch wird (84). Der verschiedenen Kompartimentierungen der Zelle spielen also eine herausragende Rolle in den Homöostasemechanismen.

Das Periplasma, der extracytosolische Raum der gram-negativen Bakterien, und die Vakuolen dienen dabei zwar in erster Linie als Zwischenlager, doch das Periplasma ist auch ein eigenständiger Reaktionsraum und muss daher, ebenso wie das Cytosol, vor metallinduziertem, oxidativem Stress geschützt werden.

Dies scheint im Besonderen auf Kupfer zuzutreffen. Das prominenteste Enzym der periplasmatischen Kupferentgiftung ist die Multikupferoxidase CueO. Mit der sauerstoffabhängigen Reaktion, in der CueO toxisches Cu(I) zu weniger toxischem Cu(II) umwandelt, stellt es, ebenso wie die eisenabhängige SodB im Cytosol einen Schnittpunkt verschiedener Homöostasesystem dar. Hinzu kommt, dass CueO auch Catecholate oxidieren kann. Inwiefern CueO damit auch Einfluss auf die

Eisenhomöostase nehmen kann, ist Gegenstand von weiteren Untersuchungen.

### **1.3. Transkriptionsstudien in der Umweltforschung**

Die grundlegenden Themen, die in den vorangegangenen Kapiteln angesprochen wurden, lassen sich auf folgende Frage reduzieren:

In welcher Weise regieren Organismen auf Änderungen ihrer Umwelt?

Enzyme und ihre Reaktionen bestimmten lange Zeit die Forschung, um Antworten von Organismen auf ihre Umwelt zu charakterisieren. Mit der Entdeckung der Erbinformation und der Entwicklung der Genetik wurde diese Grundlage erweitert. Durch Fortschritte von Analysetechniken offenbarte sich ein Netzwerk an regulatorischen Prozessen und Komponenten, die die Frage nach der Reaktion von Organismen auf ihrer Umwelt in immer detaillierteren Bereichen beantworten konnte.

Es entstanden komplexe Fragestellungen nach der Art und Weise, mit der ein Organismus auf seine Umwelt reagiert. Um eine umfassende und zufrieden stellende Antwort zu erlangen, ist die kombinierten Analysen von Transkriptom, Proteom und Metabolom nötig.

Die Forschung im Bereich der essentiellen Metalle nimmt dabei eine besondere Rolle ein. Die Ambivalenz in Toxizität und Nutzen, welche besonders den Metallionen von Eisen und Kupfer zueigen ist, macht es nötig, die Begriffe Toxizität und Bioaktivität, wie auch die Anpassung der Organismen exakter zu definieren, als bei rein toxischen Ionen wie Cadmium, Blei oder Quecksilber. Betrachtet man nur einfache Parameter, wie Wachstum oder Enzymaktivität, bleiben wichtige Fragen nach Zeitraum und Art und Weise der Anpassung unbeantwortet.

Gerade diese Anpassungsfähigkeit ist Gegenstand der Umweltforschung. Die Untersuchung von Reaktionen auf transkriptioneller Ebene rücken dabei verstärkt in den Focus der Forschung und das hat mehrere Gründe. Zum einen hat es auf diesem Gebiet in den letzten Jahren enorme Fortschritte gegeben, während Verbesserungen in den Bereichen der Protein- und Metabolitanalyse nur durch Kopplung bestehender Methoden

erreicht werden konnten (16). Weiterhin sind Analysen von Proteinen, Metaboliten oder Biomasse nur bedingt nutzbar, um die unmittelbare Reaktion von Organismen auf Umweltveränderungen zu messen. Diese Stoffwechselebenen werden durch Prozesse bestimmt, die der Transkription nachgeordnet sind. Die Multiplikation der Parameter, während die verschiedenen Ebenen der Protein- und Metabolitsynthese durchlaufen werden, macht eine Analyse der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sehr arbeitsintensiv oder in manchen Fällen unmöglich (Tab. 1).

|                     | beeinflussende Parameter  | Regulationsebene  |
|---------------------|---|---|
| <b>Transkriptom</b> |   |   |
|                     | DNA Sequenz<br>posttranskriptionelle Modifikationen   | Operonstruktur/ DNA<br>Transkriptionsfaktoren                                   |
| <b>Proteom</b>      |   |   |
|                     | primäre mRNA Sequenz<br>alternative RNA Sequenz (Spleissen/ Isoformen)<br>alternative Proteinsequenz (Spleissen)<br>posttranslationale Modifikationen | mRNA Struktur<br>Translationsfaktoren<br>microRNA<br>Endonucleasen<br>Chaperone |
| <b>Metabolom</b>    |   |   |
|                     | Proteinsequenz<br>Assemblierung (Monomer/Multimer/Heteromer)<br>Kofaktoren (endogen/exogen)<br>Vorstufensynthese                                      | <i>feed back</i> Regulation<br>allosterische Regulation<br>Proteinase / Abbau   |

**Tab. 1: Einflussfaktoren auf die Ergebnisauswertung**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Faktoren, welche in die Auswertung von Ergebnissen mit einfließen müssen. Die rechte Spalte gibt die Ebene der Messung wieder. Die mittlere Spalte zeigt die biologischen Einflussfaktoren auf das Ergebnis der Messung. Die linke Spalte zeigt die regulatorischen Faktoren, die das Ergebnis auf dieser Ebene beeinflussen. Zusätzlich wird jede Ebene von der vorangegangenen bestimmt. Es ist ersichtlich, dass die Analyse des Transkriptoms die geringste Anzahl von Einflussfaktoren aufweist. Bei der biologischen Auswertung dieser Analysen sind demnach die wenigsten Faktoren zu berücksichtigen. Will man dagegen die Reaktion eines Organismus anhand eines metabolomischen Parameters charakterisieren, sind extrem viele Faktoren zu berücksichtigen. Der Aufwand für entsprechende Kontrollen zur Validierung der Daten nimmt also von Ebene zu Ebene imens zu.

Die transkriptionelle Antwort eines Organismus ist dagegen die erste Reaktion auf veränderte Bedingungen. Sie gibt Aufschluss, sowohl über die Bioaktivität eines Stoffes, wie auch auf die direkte Reaktion des Organismus unter bestimmten Bedingungen.

Bei der Untersuchung von miteinander vernetzten Homöostasesystemen, wie dem Eisen/Kupfer- und Redoxhaushalt stellen sich weitere Herausforderungen. Aufgrund der Vernetzung haben Proteine und Metabolite in beiden Systemen eine oder mehrere verschiedene Funktionen. Die Metallionen sind in diesen Fällen sowohl Induktor, als auch Repressor. Sie sind das toxische Agens, aber auch funktionaler Kofaktor der Entgiftung (88).

Die Zahl der möglichen Interaktion steigt exponentiell an, betrachtet man die beteiligten Proteinen oder Metaboliten. Die Entdeckung von microRNAs als regulatorische und funktionale Komponenten der Zelle, hat die Erkenntnis gebracht, dass zelluläre Prozesse auch unabhängig von Proteinen und Metaboliten ablaufen können (49). Insbesondere das prominente Beispiel der regulatorischen RNA *ryhB* aus dem Eisenstoffwechsel von *E. coli* macht deutlich, dass die weit reichende Charakterisierung von sich überlappenden Regulationsnetzwerken nur mit der detaillierten Analyse des Transkriptoms zu erreichen ist (50).

Die Verwendung von Transkriptionsanalysen macht es möglich, einen grösstmöglichen Einblick in die Reaktionsprozesse zu erhalten, ohne dass bei der Auswertung eine Unmenge von beeinflussenden Faktoren einfließen müssen (Tab. 1). Als Grundlage für nachfolgende Proteom- und Metabolomanalysen ist dies unersetzlich. Dabei macht es die aktuelle Entwicklung möglich aus verschiedensten Methoden zu wählen, deren Vor- und Nachteile man je nach Anwendungsgebiet und Zielsetzung abwägen muss.

### **1.3.1. Reporterfusion**

Die momentan gebräuchlichsten Systeme der Transkriptionsanalysen lassen sich grob in die Genom-weiten und die Einzelgenanalysen einteilen. Eine weit verbreitete Methode ist die Reporterfusion, Hierbei wird beispielsweise Galactosidase oder GFP (*green fluorescent protein*) unter die Kontrolle des zu untersuchenden Zielgenpromoters gestellt (69, 75). Die Systeme der Reporterfusion sind leicht anzuwenden, schnell in der Auswertung und recht zuverlässig. Dennoch haben sie einige Nachteile, die sich insbesondere auf die Interpretation der Daten beziehen.

Die zellulären Systeme werden durch derartige Eingriffe mitunter modifiziert, wodurch die Dateninterpretation erschwert wird. Um diese Einflüsse zu begrenzen wird eine Verfeinerung der ursprünglichen Methode angewandt. Dazu wird das Reportergen unter Kontrolle des Zielpromotors in das Genom des Organismus re-integriert (24). Damit erhält man einen Phänotyp der dem des Wildgenotyps am ehesten entspricht. Abgesehen von einer möglichen Titration der Signalmoleküle als Störeffekt, ist diese Variante auch nur in Organismen durchführbar, die gentechnologisch zugänglich sind (82).

Die Einflüsse der genomischen Eingriffe können mit physiologischen Analysen untersucht und somit auch methodisch einbezogen werden. Dies erhöht natürlich den experimentellen Aufwand und sichert die die Daten auch nur für die gewählten Bedingungen ab. Dennoch sind Genfusionen durchaus nützlich, um grundlegende Fragen mit recht geringem Aufwand und Kosten Aufwand zu klären. Für weiterführende Analysen mit mehreren Genen und deren Auswertungen sind sie jedoch nur eingeschränkt nutzbar.

### **1.3.2. PCR basierte Techniken**

Neben den Systemen der Reporterengenfusion sind vor allem die PCR Techniken der semiquantitativen RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) und die *real-time* RT-PCR die momentanen Standards der Transkriptionsanalyse für einzelne Gene oder Gengruppen. Die zu untersuchenden Gene werden mittels PCR Reaktion aus der cDNA Bibliothek einer Probe heraus vervielfältigt und anhand der Menge an Amplifikat wird auf die Menge an Transkripten in der Probe geschlossen. Beim *real-time* Ansatz wird die Entstehung des Amplifikates während der PCR Reaktion online verfolgt. Interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe machen eine Quantifizierung der entstehenden DNA möglich (39). Die RT-PCR Reaktion wird semiquantitativ im Agarosegel anhand von Referenzgenen ermittelt. Dabei dominieren die PCR Techniken die Analyse von Gengruppen, während *Array* Technologien ganze Transkriptome untersuchen (64).

### **1.3.3. RNA Extraktion als methodische Grundlage**

Systeme zur Analyse von mRNA basieren nahezu ausnahmslos auf extrahierter RNA. Im Falle der PCR-basierten Techniken kann das nur die cDNA des Zielgenes und des Kontrollgenes einschliessen, aber bei genomweiten Untersuchungen mittels *Microarray* umfasst diese Bibliothek das komplette Genoms des Organismus (45). Schon dieser Vergleich beschreibt ein Hauptproblem der etablierten Techniken. Die RNA muss vollständig und DNA-frei extrahiert werden und die cDNA Synthese als nachfolgender Schritt muss eine hohe Effizienz aufweisen.

Die Prozedur der RNA Extraktion gilt als etabliert, dennoch gibt es Einflüsse, nicht nur aufgrund der Verschiedenartigkeit der untersuchten Organismen. Die verschiedenen kommerziellen Systeme, um RNA zu extrahieren, differieren enorm in Effizienz und Qualität.



Speziell für die quantitative Auswertung stellt die Effizienz der RNA-Extraktion sowie der mögliche unspezifische Abbau ein großes Problem dar. Dieses Problem wird umgangen, indem Referenzgene bestimmt werden, deren Transkription als konstitutiv und stabil unter den untersuchten Bedingungen vorausgesetzt wird. Eine vollständige quantitative Analyse der Transkriptzahlen wird damit nicht möglich, es können aber Änderung der Verhältnisse in den verschiedenen Proben als Maß für die Transkriptionsänderung eines Genes verwendet werden (21). Die Nachteile dieser Auswertung ergeben sich durch die Wahl des Referenzgenes. Für viele Organismen liegen relativ gesicherte Datensätze vor, Teile der Transkription sind zwar aufgeklärt, aber noch nicht in ihrem funktionalen Ablauf vollständig verstanden. Vor allem der Vergleich von Laborstämmen mit ihren jeweiligen Wildtypvarianten ist unsicher. An dieser Stelle soll beispielhaft das RpoS Gen in *E. coli* genannt werden. Spira et al. (2008) zeigt eindrucksvoll, dass sich ganze Bereiche der Transkriptionskontrolle von Laborstämmen im Vergleich zum „echten“ Wildtyp stark verändern können (79). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies auch für andere Referenzgene gilt. Dieses Beispiel für das extrem gut erforschte „Laborhaustier“ *E. coli* macht deutlich, dass sich für die Methode der vergleichenden Transkriptionsanalyse, sei es eine PCR Technik oder eine *Array*-Technologie, unbekannte Hürden auftun können.

#### **1.3.4. Grundlagen der Array-Technologien**

Ein weiterer wichtiger Punkt, vor allem bei *array*-Technologien, ist die Verfügbarkeit einer Genom-Datenbank des zu untersuchenden Organismus. Diese genomischen Informationen werden z.B. als DNA Sonden auf einen Chip gebracht und die Bindung der cDNA einer Probe an Sequenzen auf dem Chip wird mittels Fluoreszenzmarkierung ermittelt. Neuere experimentelle Ansätze, wie die *RNA-Seq* Methode, vergleichen ganze Transkriptome miteinander (93). Auch diese Technologie basiert auf extrahierter RNA. Während jedoch beim *microarray* das Bindeverhalten

von Sonden untersucht wird, wird bei diesen neuesten (*deep sequencing*) Methoden die komplette Sequenzinformation des Transkriptoms zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt (37). Beide Methoden sind auf bereits vorhandene genomische Daten des Organismus angewiesen.

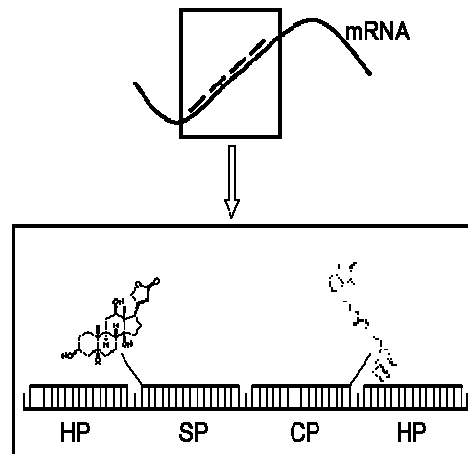
Zwar kann eine RNA-Seq Analyse theoretisch auch an Organismen vorgenommen werden, für die keine Genomdatenbank existiert. Jedoch ist man dann auf einen fehlerlosen *Reading*- und *Align*-Prozess angewiesen, welcher mit der momentanen Technologie noch nicht gewährleistet werden kann. Für die Zukunft kann diese Technologie also durchaus noch weitere Forschungsfelder erschliessen, denn die Vorteile von RNA-Seq gegenüber einem *microarray* liegen auf der Hand. Der Vergleich mit Kontrollgenen ist obsolet, da man globale Zustände vergleicht und somit kein einzelnes Gen als Basis der Auswertung dient. Des Weiteren wird das gesamte Transkriptom, also auch Isoformen und Spleissvarianten, ermittelt, während beim *Microarray* nur die Bindung an vorher definierten Sonden untersucht wird (73).

Ein weiterer kritischer Punkt trifft wiederum auf beide Techniken zu. Die Datenmenge, die eine vergleichende Globaltranskriptomanalyse produziert, lässt sich, genau wie die Normalisierung eines *Microarray*, nur noch mit mathematischen Methoden beherrschen. Somit ergibt sich aus der Verwendung von *array*-Daten immer das Problem, dass die Nachbereitung der Daten extrem zeitaufwändig ist. Weiterhin ist die Anschaffung von entsprechenden Geräten und Rechnerkapazitäten immens kostenaufwendig. Die Auswertung der Daten kann nur noch mit spezialisiertem Fachpersonal erfolgen. Es muss kritisch betrachtet werden, dass Forscher immer häufiger nicht mehr mit den verwendeten Methoden vertraut sind und sich gerade bei dem wichtigsten Punkt, der experimentellen Auswertung, auf externe Quellen verlassen müssen.

### **1.3.5. Sandwich hybridization assay**

Ein Weg verschiedene Methoden und ihre Ergebnisse vergleichbar zu machen, ist die Etablierung einer extern generierten Kontrolle. Damit wird eine, von Methodik und Material unabhängige Kontrollinstanz geschaffen, die mehrere Probleme löst. Eine feste Grösse als Vergleichsmassstab ist universell einsetzbar und nicht durch methodische Gegebenheiten verfälschbar. Ausserdem können so direkte Grössenordnungen von Transkriptzahlen bestimmt werden. Diese Grössen sind reale Zahlen, die einen besseren Einblick in die Geschehnisse der Transkriptionsvorgänge erlauben. Hinzu kommt, das ein externer Standard auch eine methodische Kontrolle der Technik darstellt (Signal-Rausch Verhältnis, Detektionsgrenzen, Sensitivität und Reproduzierbarkeit). Diese Möglichkeit der Standardisierung wird durch den Einsatz von *in vitro* generierter RNA möglich. Vor allem mit dem *sandwich hybridization assay* (SHA) wurde dieser Vergleich von Transkripten mit einem extern generierten Standard im biotechnologischen Prozess etabliert (65). Diese Methode der Transkriptionsanalyse wird zwar schon vermehrt eingesetzt, hat sich jedoch nicht als Standard etablieren können. Vor allem der Bezug auf biotechnologische Prozesse und die Fokussierung auf konstitutiv hoch exprimierte RNAs haben diese Methode bisher ein Nischendasein in den

Naturwissenschaften führen lassen (47). Wie der *Northern Blot* basiert der SHA auf der Hybridisierung von Nukleinsäuresonden an entsprechende, komplementäre Abschnitte von Ziel RNAs. Dabei ist eine Sonde mit Biotin (*capture probe*) und eine andere Sonde mit Digoxigenin (*signal probe*) markiert. Diese beiden Sonden werden von unmarkierten Sonden (*helper probes*) flankiert, was ein verbessertes Signal-Rausch Verhältnis bewirkt (13). Auf diese Weise wird direkt auf dem Zielmolekül ein doppelsträngiger Bereich geschaffen – der sogenannte Sandwich (Abb. 6)

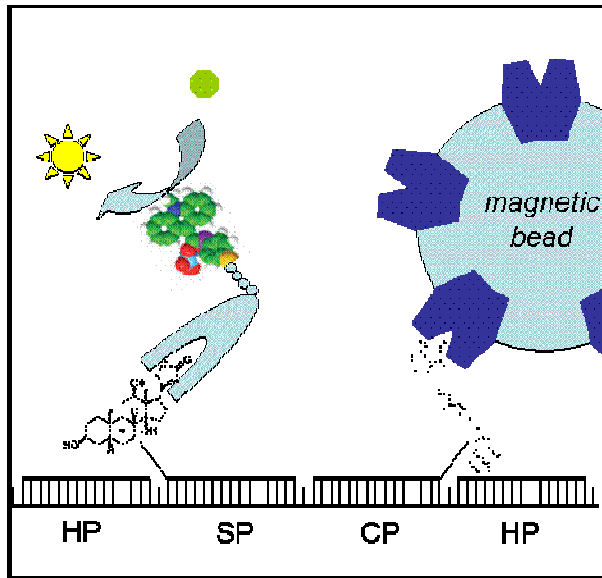


HP - *helper probe*  
 SP - *signal probe*  
 CP - *capture probe*

**Abb. 6: Aufbau des *sandwich***

Die Sonden binden direkt auf dem Zielmolekül und schaffen so einen ca. 80 bp langen doppelsträngigen Bereich. Die flankierenden *helper*-Sonden sorgen für eine bessere Bindung der funktionalen Sonden.

Am 5'-Bereich befindet sich das Biotin. Dieses kann an Streptavidin binden. In diesem Fall ist die Oberfläche eines magnetischen Partikel (*magnetic bead*) mit einer Schicht überzogen, auf welcher Streptavidin gebunden wurde. Bindet also das Biotin an dieser Oberfläche, wird dadurch die Ziel-RNA an den paramagnetischen Partikel (*magnetic bead*) gebunden und im magnetischen Feld, mit dem *bead*, immobilisiert.



 Antikörper mit alkalischer Phosphatase

 Fluoreszenzsubstrat  Streptavidin

**Abb. 6: vollständiger sandwich Aufbau**

Über die Bindung des Biotins der *capture*-Sonde an ein mit Streptavidin ummantelten magnetischen Partikel, wird die Ziel-RNA immobilisiert. Das Digoxigenin der *signal*-Sonde kann durch einen Antikörper mit einer Phosphatase gekoppelt werden. Der enzymatische Umsatz ist linear abhängig von vorhandener RNA.

Die so gebundenen mRNAs können mittels einer Waschprozedur vom Zelllysate getrennt werden. Das Digoxigenin der *signal probe* liegt nach wie vor am 3' Ende des doppelsträngigen Bereiches vor. Mittels eines Antikörpers kann dieses Molekül mit einer Phosphatase gekoppelt werden. Eine anschließende enzymatische Reaktion dieser Phosphatase dient dem Nachweis und der Quantifizierung der Ziel-RNA (Abb. 6).

Auf diese Weise ist genau ein Enzymmolekül mit jeder Ziel-RNA gekoppelt. Im Gegensatz zu Ansätzen mit cDNA binden beim SHA die Signale sonden direkt an die mRNA der Probe. Es gibt keine Zwischenreaktion, die den Gehalt an signalgebenden Molekülen verfälscht. Durch die direkte Proportionalität zwischen Ziel- und Signalmolekül bewirken lineare Verdünnungen des Zielmoleküls auch lineare Veränderungen des Signals. Dadurch lassen sich lineare Eichgeraden erstellen, mittels derer man den RNA Gehalt einer Probe direkt berechnen kann.

Dieses äquimolare Verhältnis, das stabile Bindungssystem von Biotin/Streptavidin und die Nutzung von *in vitro* generierter RNA als externer Standard zur Quantifizierung sorgen für eine hohe Reproduzierbarkeit und eine breite Anwendungsmöglichkeit dieses Systems. Die Verwendung des AttoPhos Systems (Promega, Madison (US)) gewährleistet eine hohe Sensitivität und ein niedriges Signal-Rausch

Verhältnis. Der modulare Aufbau der Arbeitsabläufe und die Entwicklung für 96er *well* Platten erleichtert die Automation dieser Methode. Für eine weit reichende Anwendung des SHA fehlt jedoch bis jetzt ein Alleinstellungsmerkmal, um sich gegen die etablierten Systeme durchzusetzen.

## **1.4. Zielstellung der Arbeit**

### **I. Identifizierung von Kupferimportprozessen, an denen der Eisenchelator Enterobactin beteiligt ist.**

Aus den vorangegangenen Ausführungen ergab sich die Hypothese, dass extrazelluläre Chelatoren, insbesondere Enterobactin von *E. coli*, am Kupferimport beteiligt sein könnten. Ausserdem war bekannt, dass Catechole mit Kupferionen interagieren können und es eine direkte Reaktion der Multikupferoxidase CueO mit Catecholen gibt. Im Rahmen der Arbeit galt es der Frage nachzugehen inwieweit Enterobactin am Kupferimport beteiligt ist und welche Rolle CueO in seiner Rolle als detoxifizierender Faktor bei dieser Reaktion hat.

### **II. Aufklärung der Rolle des Dps Proteins in der Kupferhomöostase von *E. coli*.**

Das Dps Protein ist ein ubiquitär verbreitetes Anti-Stress Protein, welches Eisenionen in seiner Holoosphäre inkorporieren kann. Wie im Fall des Enterobactins sollte hier der Frage nachgegangen werden, inwiefern ein Faktor der cytosolischen Eisen- und Redoxhomöostase mit dem Kupferhaushalt interagiert. Dabei stand die Hypothese im Zentrum, dass Dps möglicherweise Kupferionen ebenso wie Eisenionen inkorporieren kann, um so das Cytosol zu schützen.

### **III. Optimierung des *sandwich hybridization assay* für Messungen nativer Transkriptmengen direkt aus dem Rohextrakt um Echtzeitanalysen der Kupferhomöostasegenaktivierung durchzuführen.**

Zu Beginn der Arbeit war aus vorangegangenen Ergebnissen hervorgegangen, dass die Gene *copA*, *cueO* und *cusCFBA* die Schlüsselrollen in der Kupferhomöostase von *E. coli* spielen. Alle zu der Zeit etablierten Techniken liesen jedoch keine weitere Aufschlüsselung der Transkriptionsvorgänge mit realer Quantifizierung zu. Daher sollte der *sandwich hybridization assay* für Messungen ohne vorherige RNA Extraktion und Reinigung etabliert und optimiert werden. Anschliessend sollten mit der neuen Technik exakte in situ Transkriptionskinetiken der Kupferhomöostasegene erzeugt werden. Damit sollte der zeitliche Verlauf und die Quantität der Anpassungsvorgänge des Bakteriums erstmals dargestellt werden können. Zum anderen konnte zusätzlich der Frage nachgegangen werden, ob sich die Metallverteilung über die Kompartimente des Organismus mit den entsprechend regulierten Genen nachverfolgen lässt.

## **2. Ergebnisse**

### **2.1. Einfluss von Enterobaktin und CueO auf die Kupferaufnahme von *E. coli***

#### **2.1.1 Publikation 1**

Linkage between Catecholate Siderophores and the Multicopper Oxidase CueO in *Escherichia coli*.



## Linkage between Catecholate Siderophores and the Multicopper Oxidase CueO in *Escherichia coli*

Gregor Grass,<sup>1,2</sup> Keshari Thakali,<sup>1</sup> Phillip E. Klebba,<sup>3</sup> Daniel Thieme,<sup>2</sup> Axel Müller,<sup>4</sup> Günter F. Wildner,<sup>4</sup> and Christopher Rensing<sup>1\*</sup>

Department of Soil, Water, and Environmental Science, University of Arizona, Tucson, Arizona<sup>1</sup>;  
Institute for Microbiology, Martin Luther University, Halle,<sup>2</sup> and Department of Biology,  
Ruhr University, Bochum,<sup>4</sup> Germany; and Department of Chemistry  
and Biochemistry, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma<sup>3</sup>

Received 4 February 2004/Accepted 21 May 2004

**The multicopper oxidase CueO had previously been demonstrated to exhibit phenoloxidase activity and was implicated in intrinsic copper resistance in *Escherichia coli*. Catecholates can potentially reduce Cu(II) to the prooxidant Cu(I). In this report we provide evidence that CueO protects *E. coli* cells by oxidizing enterobactin, the catechol iron siderophore of *E. coli*, in the presence of copper. In vitro, a mixture of enterobactin and copper was toxic for *E. coli* cells, but the addition of purified CueO led to their survival. Deletion of *fur* resulted in copper hypersensitivity that was alleviated by additional deletion of *entC*, preventing synthesis of enterobactin. In addition, copper added together with 2,3-dihydroxybenzoic acid or enterobactin was able to induce a  $\Phi$ (*cueO-lacZ*) operon fusion more efficiently than copper alone. The reaction product of the 2,3-dihydroxybenzoic acid oxidation by CueO that can complex Cu(II) ions was determined by gas chromatography-mass spectroscopy and identified as 2-carboxymuconate.**

Recently, two copper efflux exporters were described in *Escherichia coli*, CopA, a copper/silver P-type ATPase (27), and CusCFBA, a protein complex encompassing both the cytoplasmic and outer membranes (10, 21). The multicopper oxidase CueO was identified as an additional component involved in copper homeostasis in *E. coli* (12, 13, 22), and the three-dimensional structure of this protein was solved at a resolution of 1.4 Å (29). It was shown that CueO is a laccase-like enzyme (EC 1.10.3.2), as proposed by Alexandre and Zhulin (2). CueO is a periplasmic protein and translocated into the periplasm via the TAT pathway (7). Four copper ions are bound in the CueO monomer, forming an active center typical of multicopper oxidases such as ascorbate oxidase, fungal laccases, *Saccharomyces cerevisiae* Fet3, and human ceruloplasmin (29). The enzyme is activated by binding of a labile Cu(II) at a novel copper-binding site (30).

The mechanism of protection from copper-mediated toxicity by CueO was postulated to be the oxidation of cuprous copper (12, 23). This hypothesis was recently strengthened by the demonstration that the related multicopper oxidases Fet3 and human ceruloplasmin are able to oxidize Cu(I) to Cu(II), maintaining the cuprous-cupric redox balance in aerobic organisms and preventing copper-mediated toxicity (33, 34).

CueO was responsible for the oxidation of cuprous copper and the potential Cu(II) reductant enterobactin. Enterobactin is the indigenous catecholate siderophore of *E. coli* secreted to sequester iron from the environment. Recently it was demonstrated that enterobactin is a substrate of CueO in vitro (16). Copper in combination with the catecholate siderophore is

much more toxic than copper alone because enterobactin and other catecholates can act as a Cu(II) reductants (15, 18). We showed that CueO oxidized the siderophore enterobactin and its precursor 2,3-dihydroxybenzoic acid and thus protected *E. coli* cells against copper-induced killing. The product of 2,3-dihydroxybenzoic acid oxidation was able to bind copper. In addition, the global iron-dependent repressor Fur was identified as an important determinant of copper tolerance, since a *fur* mutant overproduced enterobactin. Reduction of Cu(II) by enterobactin facilitated Cu(I) uptake into cells. These results give insight into the complex mode of CueO-mediated protection from copper toxicity.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth media.** The strains used in this work are listed in Table 1. *E. coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium or Tris-buffered mineral salts medium (19) containing 2 ml of glycerol and 1 g of yeast extract or 3 g of Casamino Acids per liter. Antibiotics [chloramphenicol (15 to 20 µg/ml) or kanamycin (25 µg/ml)] and CuCl<sub>2</sub> were added where appropriate.

**Gene disruptions, deletions, and operon fusions.** Genes were disrupted by the insertion of a chloramphenicol resistance cassettes with a protocol developed in the laboratory of B. Wanner which is based on the λ Red recombinase system as described previously (6).

**CAS liquid assay and plates.** *E. coli* strains GR1 ( $\Delta$ *cueO-cat*) and W3110 were grown overnight in Luria-Bertani medium with shaking at 37°C, diluted 1:500 into Tris-buffered minimal medium (19) supplemented with 0.2% glycerol and 0.3% Casamino Acids. Cultures were grown overnight, diluted 1:500 into fresh minimal medium without iron but with 0.3% deferrated Casamino Acids (25) and different concentrations of CuCl<sub>2</sub> and grown for 16 h to an optical density at 600 nm of 1.0. The cell density was adjusted, spent medium was centrifuged at 12,000 rpm for 2 min, and cleared spent medium was stored at 4°C.

The chrome azurol S (CAS) assay solution was prepared as described by Payne (25). In short, 0.0219 g of hexadecyltrimethylammonium bromide was dissolved in 50 ml of water; 1.5 ml of 1 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O in 10 mM HCl was mixed with 7.5 ml of 2 mM CAS solution. This Fe-CAS solution and also piperazine buffer (4.307 g of piperazine dissolved in 30 ml of water with 6.75 ml of concentrated HCl to bring the pH to 6.5) was added to the hexadecyltrimethylammonium bromide solution, and the volume was brought up to 100 ml. CAS agar plates

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Soil, Water, and Environmental Science, University of Arizona, Shantz Bldg. #38, Rm. 424, Tucson, AZ 85721. Phone: (520) 626-8482. Fax: (520) 621-1647. E-mail: rensingc@ag.arizona.edu.

TABLE 1. *E. coli* strains

| Strain   | Relevant genotype             | Source or reference    |
|----------|-------------------------------|------------------------|
| W3110    | Wild type                     |                        |
| GR1      | $\Delta cueO::cat$            | Grass and Rensing (12) |
| GR417    | $\Delta entC::cat$            | This study             |
| GG199    | $\Delta fur::cat$             | This study             |
| GG213    | $\Delta entC::cat \Delta fur$ | This study             |
| WOI1260B | $\Phi(cueO-lacZ)$             | Outten et al. (22)     |

were prepared as described by Schwyn and Neilands (33); 0.5 ml of cleared spent culture medium was added to 0.5 ml of CAS assay solution and mixed, and 10  $\mu$ l of shuttle solution (0.2 M 5-sulfosalicylic acid, stored in the dark) was added to facilitate transfer of iron from the CAS complex to enterobactin, and the sample was mixed. After 5 min, the absorbance at 655 nm was measured.

**Enterobactin concentration determination.** The reaction between the CAS solution, Fe(III), and enterobactin proceeds as Fe(III)-CAS + enterobactin  $\rightarrow$  Fe(III)-enterobactin + CAS. The decrease in absorbance at 655 nm can be used to calculate the concentration of enterobactin-bound iron with Fe(III)-CAS having a molar extinction coefficient of 105,000  $M^{-1} cm^{-1}$ . It is assumed that the Fe(III) and enterobactin form 1:1 complexes (14). Enterobactin concentrations were calculated from desferrioxamine units via a calibration curve.

**Ferric enterobactin oxidation by CueO.** Purified CueO was suspended at 1  $\mu$ g/ml in 0.05 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) buffer, pH 6.5, containing 0.5 mM  $CuCl_2$ . Enterobactin was purified from culture supernatants of *E. coli* K-12 (17), complexed with iron, and chromatographically purified (33). Various concentrations of ferric enterobactin were added to reaction mixtures at 25°C, and the oxidation of ferric enterobactin was monitored by the change in absorption at 393 nm. The data were plotted and analyzed to determine  $K_m$  with the enzyme kinetics algorithm of Grafit (version 4.013; Erithacus Ltd.). Visible spectra of the product were collected on a Beckman DU7 spectrophotometer.

**Copper-enterobactin toxicity measurement.** *E. coli* strains were grown overnight in LB medium with shaking at 37°C, diluted 1:400 into Tris-buffered minimal medium (19) with 0.2% glycerol and 0.3% Casamino Acids, grown overnight, and diluted 1:400 into fresh minimal medium without iron. Cultures were incubated for 16 h and centrifuged, and the spent medium was filter sterilized (20- $\mu$ m pore size; Nalgene). Cells to be challenged were also subsequently grown in LB medium and regular minimal medium. Copper challenge was carried out as follows: 5  $\mu$ l of stationary-phase culture was added to 1 ml of sterile spent medium containing 5 mM  $CuCl_2$ , mixed, and incubated at room temperature for 15 min. The mixture was diluted 1:200 into LB medium, and 25  $\mu$ l was plated onto LB agar plates.

**Precipitate preparation, UV-visible spectrum, and EDX analysis.** Purified CueO protein (5  $\mu$ g) was added to a solution of 100 mM sodium acetate (pH 6.5), 500  $\mu$ M  $CuCl_2$  and 2 mM 2,3-dihydroxybenzoic acid. The reaction was incubated at 50°C for 2 h. For UV-visible analysis, the reaction product was scanned on a Uvikon 922 (Kontron Instruments). For energy-dispersive X-ray (EDX) analysis, the colored oxidation product was harvested by centrifugation, and the resulting pellet was redissolved in water and recentrifuged to remove excess copper. The washed precipitate was subjected to analysis with an EM 912 OMEGA electron transmission microscope (Leo, Oberkochen, Germany) equipped with an EDX system (energy-dispersible X-ray analysis, LINK eXIII; Oxford Instruments, High Wycombe, United Kingdom) in the spot mode (100-nm spot size at 80 keV and 20  $\mu$ A emission current). For analysis, a computer program considering the net counts and excitation probability, determined with the in-column filter, was used.

**2,3-Dihydroxybenzoic acid oxidation by CueO.** Purified CueO was incubated with 1 mM 2,3-dihydroxybenzoic acid in the presence of 0.5 mM  $CuCl_2$  and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The reaction was stopped after 1 min by rapid chilling and acidification with HCl to pH 2, and the reaction mixture was extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and filtered, and the solvent was removed by evaporation in a SpeedVac concentrator (Eppendorf). The sample was redissolved in 20  $\mu$ l of methanol treated with 100  $\mu$ l of ethereal diazomethane which was prepared from *N*-nitrosomethyl urea and transferred to an autosampler vial (Chromacol 05-CTV[A]116; Fisher Scientific, Schwerte, Germany). Excessive diazomethane and solvent were removed in a gentle stream of nitrogen, and the methylated compounds were taken up in 20  $\mu$ l of chloroform.

An aliquot of 1  $\mu$ l was applied to the gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) system for mass fragment analysis of main signals. All spectra were

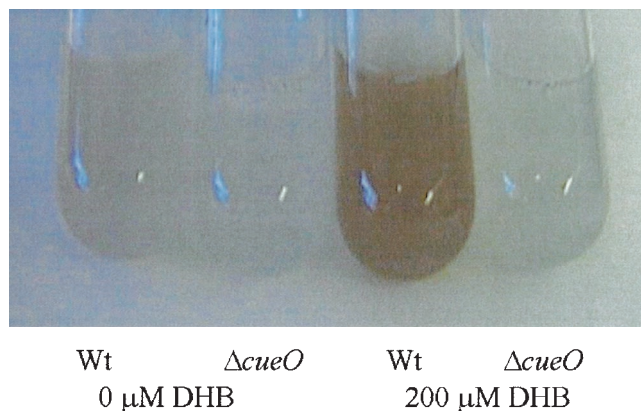


FIG. 1. Effect of 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHB) on different *E. coli* strains. Colored precipitate formation in *E. coli* by CueO,  $CuCl_2$  and 2,3-dihydroxybenzoic acid in strains GR1 ( $\Delta cueO::cat$ ) and wild-type (Wt) W3110. Overnight cultures grown in Luria-Bertani medium were diluted 1:500 into minimal medium, and grown overnight, diluted 1:500 into fresh minimal medium with 500  $\mu$ M  $CuCl_2$  added to all cultures, 2,3-dihydroxybenzoic acid was added where indicated, and growth at 37°C was continued for 16 h.

recorded with a Finnigan Magnum ion-trap mass spectrometer connected to a Varian GC 3400 gas chromatograph (Varian, Walnut Creek, Calif.). Injections were made with a CTC A200S autoinjector. The following conditions were chosen for GC: splitless injector temperature 260°C, transfer line temperature 260°C, capillary column Zebtron ZB-5 (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany), film thickness 30 m by 0.25 mm by 0.25  $\mu$ m, and helium as the carrier gas. The temperature program was constant for 1 min at 60°C and a linear increase was chosen (30°C per min) to 280°C. The mass spectrometer was operated in full scan mode ( $m/z$  50 to 400) with chemical ionization and methanol as the reactant gas.

**Miscellaneous.** Standard molecular genetic techniques were used (31). PCR was performed in the presence of *Pwo* or *Taq* DNA polymerase (Roche, Fermentas). CueO was purified as described previously (13). CueO was concentrated where applicable with Midi centrifuge filters (Nalgene). The protein concentration of purified CueO was determined at 280 nm ( $\epsilon_{CueO} = 63063 M^{-1} cm^{-1}$ ). The  $\beta$ -galactosidase activity in permeabilized cells was determined as published previously (11, 20).

## RESULTS

**Oxidation of catecholate siderophores by CueO and copper.** When *E. coli* strain W3110 was grown in mineral salt medium under iron-restricted conditions and in the presence of elevated copper concentrations, spent medium and cells turned brownish gray (data not shown). Neither *E. coli* strain GR1 ( $\Delta cueO::cat$ ) nor GR417 ( $\Delta entC::cat$ ) (defective in enterobactin synthesis) was able to produce this colored compound (data not shown). The necessity for the presence of both CueO and EntC clearly indicated that colored-compound formation is strictly dependent on both the oxidase activity of CueO and the presence of enterobactin.

A similar finding was obtained with the enterobactin precursor 2,3-dihydroxybenzoic acid. 2,3-Dihydroxybenzoic acid and copper added to wild-type cultures resulted in enhanced production of a colored precipitate (Fig. 1). No colored precipitate was formed when 2,3-dihydroxybenzoic acid was added to *E. coli* strain GR1 ( $\Delta cueO::cat$ ) (Fig. 1).

**Deletion of *cueO*, encoding the multicopper oxidase of *E. coli*, leads to elevated biosynthesis of enterobactin under conditions of iron scarcity when copper is present.** Determination of the enterobactin concentrations of spent medium from

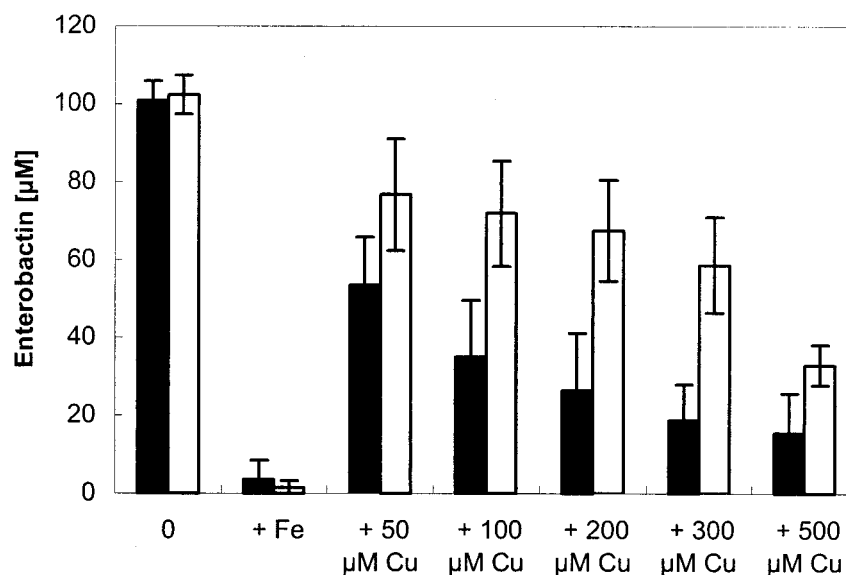


FIG. 2. Enterobactin production in *E. coli* strains in the presence of copper. Overnight cultures grown in Luria-Bertani medium were diluted 1:500 into minimal medium, grown overnight, and diluted 1:500 into fresh minimal medium, and after 2 h of growth at 37°C the cells were diluted 1:500 into fresh minimal medium with the indicated concentrations of  $\text{CuCl}_2$  and 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ . The strains were W3110 (solid bars) and GR1 ( $\Delta\text{cueO}::\text{cat}$ ) (open bars). Cell growth was continued for 16 h at 37°C with shaking before the enterobactin content was determined as described in Materials and Methods.

strain GR1 ( $\Delta\text{cueO}::\text{cat}$ ) and wild-type W3110 was performed in the presence of different concentrations of  $\text{CuCl}_2$  under iron deprivation (Fig. 2). We clearly demonstrated that in the absence of copper and thus no expression of *cueO*, both wild-type strain W3110 and GR1 ( $\Delta\text{cueO}::\text{cat}$ ) produced enterobactin at very similar concentrations. In contrast, under copper stress, i.e., when *cueO* is expressed in the wild-type strain, strain GR1 ( $\Delta\text{cueO}::\text{cat}$ ) exhibited a significant increase in enterobactin compared to the wild-type W3110 (Fig. 2). This difference is probably due to the oxidation of enterobactin by CueO (16) in the presence of copper rather than decreased enterobactin biosynthesis in the *cueO* deletion strain GR1 ( $\Delta\text{cueO}::\text{cat}$ ), since enterobactin levels were very much the same in the wild-type strain and the *cueO* mutant when copper was not present.

**Enterobactin oxidation prevents copper-induced killing of *E. coli*.** We started out with the hypothesis that enterobactin can act as a Cu(II) reductant, shifting the balance from Cu(II) to Cu(I), increasing both uptake of Cu(I) and generation of reactive oxygen species by the prooxidant Cu(I). CueO could prevent this in two ways, oxidation of Cu(I) and oxidation of enterobactin.

In order to validate this hypothesis, we investigated whether enterobactin oxidation by CueO reduces the toxicity of the interaction of enterobactin with copper. Therefore, *E. coli* strain W3110 was challenged with spent medium supplemented with copper from either a *cueO* deletion strain, which is rich in enterobactin, or from strain GR417 ( $\Delta\text{entC}::\text{cat}$ ), which is unable to produce enterobactin (Table 2). No cells survived with spent medium of strain GR1 ( $\Delta\text{cueO}::\text{cat}$ ) (Table 2). Conversely, spent medium of strain GR417 ( $\Delta\text{entC}::\text{cat}$ ), which contained no enterobactin at all, was not toxic for *E. coli* cells in the presence of copper. This indicated that copper alone was lethal only in combination with enterobactin under the conditions used. Moreover, addition of purified CueO protein to the

survival assay with spent medium rich in enterobactin resulted in survival of challenged cells (Table 2). This again demonstrated that oxidation of enterobactin by CueO rescued *E. coli* cells from copper- and enterobactin-induced killing. Conversely, when CueO was heat inactivated (10 min of boiling) prior to copper challenge, *E. coli* cells did not survive (data not shown). Thus, protection against copper toxicity could only be accomplished when CueO oxidized enterobactin.

**Oxidation of ferric enterobactin.** The ability of CueO to act on catechol compounds, especially its oxidation of the native *E. coli* siderophore enterobactin, led us to test its recognition and oxidation of the iron complex ferric enterobactin. When suspended with ferric enterobactin at slightly acidic pH in the presence of copper ions, CueO rapidly oxidized the ferric siderophore (16). We reevaluated these experiments with slightly different conditions that better mimicked the

TABLE 2. Enterobactin toxicity to *E. coli* in the presence of Cu and the protective activity of CueO

| Source of spent medium <sup>a</sup>            | CFU <sup>b</sup> | Enterobactin <sup>c</sup> (µM) |
|--|------------------|--------------------------------|
| $\Delta\text{entC}$ strain                     | $>10^3$          | 0                              |
| $\Delta\text{cueO}$ strain                     | 0                | 57.2                           |
| $\Delta\text{cueO}$ strain + CueO <sup>d</sup> | $>10^3$          | 57.2                           |

<sup>a</sup> Strains  $\Delta\text{entC}$ ,  $\Delta\text{cueO}$ , and W3110 (wild type) were grown to stationary phase in iron-depleted minimal medium with subtoxic concentrations of  $\text{CuCl}_2$ , and the supernatant filter was sterilized.

<sup>b</sup> Stationary-phase cultures of *E. coli* strain W3110 were diluted into fresh minimal medium and, after growth for 2 h, diluted into the respective spent medium, challenged with 5 mM  $\text{CuCl}_2$  for 15 min, diluted into LB medium, and plated on LB plates.

<sup>c</sup> Enterobactin content was determined from the spent supernatant as described in Materials and Methods.

<sup>d</sup> Before addition of cells, CueO was added (2  $\mu\text{M}$  final concentration) for 10 min at 37°C.

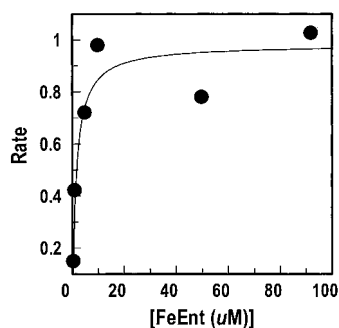


FIG. 3. Oxidation of ferric enterobactin by purified CueO. The initial rates of ferric enterobactin (FeEnt) oxidation by CueO (1  $\mu\text{g/ml}$ ) were spectrophotometrically monitored at 393 nm; the data were analyzed and plotted with the enzyme kinetics algorithm of Grafit 4.013 (Erithacus Ltd., Middlesex, United Kingdom). The apparent  $K_m$  of the plotted data for the enzymatic reaction was 1.5  $\mu\text{M}$ .

physiological, periplasmic environment of CueO. Under these conditions, we determined a  $K_m$  of 1.5  $\mu\text{M}$  for ferric enterobactin oxidation by CueO (Fig. 3) compared to the 40  $\mu\text{M}$  described by Kim et al. (16). This high affinity of ferric enterobactin indicates that it is a natural substrate of CueO in vivo.

**Oxidation-product of 2,3-dihydroxybenzoic acid and CueO sequesters copper.** Incubation of 2,3-dihydroxybenzoic acid with CueO in the presence of copper resulted in the formation of an insoluble colored precipitate. The precipitate was found predominantly in the growth medium, indicating that, after oxidation, 2,3-dihydroxybenzoic acid is translocated to the outside of the cell. This oxidation product might act as a metal-chelating compound, and therefore the precipitate was examined by EDX spectral analysis. It was demonstrated that copper was bound to this polymeric 2,3-dihydroxybenzoic acid oxidation product (Fig. 4). Since 2,3-dihydroxybenzoic acid is also an excellent iron chelator, iron was also detected in the analysis. This suggests that oxidized 2,3-dihydroxybenzoic acid did not lose its ability to bind iron but gained the ability to complex copper. This could create a sink for copper outside the cell, thereby decreasing the overall solubilized copper concentration.

Short-term incubation of CueO with 2,3-dihydroxybenzoic acid resulted in an oxidation product in which the aromatic ring was opened by oxidation and oxygen was added in a stoichiometry of 1 mol of  $\text{O}_2$  per mol of 2,3-dihydroxybenzoic acid, as determined by oxygraph analysis (30). The reaction product was identified as 2-carboxymuconate by GC-MS and was able to complex  $\text{Cu(II)}$  ions. The product has a molecular weight of 229, indicating that all three carboxylic groups are methylated. The molecular weight of 197 corresponds to a fragment of the reaction product which is expected when one molecule of methanol is lost, as shown in Fig. 5.

**Enterobactin may facilitate copper uptake.** Previously, Outten et al. (23) had shown that *cueO* expression is induced by the cytoplasmic regulator of transcription CueR in a copper-dependent fashion. Lysogen *E. coli* strain WOI1260B (22) expressing a  $\Phi(\text{cueO-lacZ})$  operon fusion was also used to elucidate induction of *cueO* in this study. Compared to copper alone, elevated *lacZ* expression in *E. coli*  $\Phi(\text{cueO-lacZ})$  was observed when 2,3-dihydroxybenzoic acid or enterobactin in

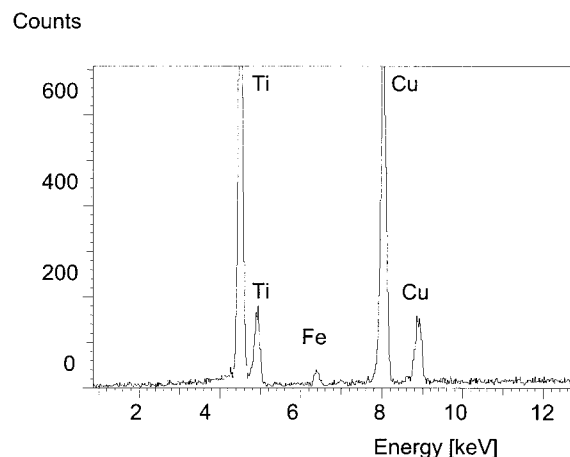


FIG. 4. Spectrum of CueO oxidation product. 2,3-Dihydroxybenzoic acid was oxidized by CueO, and the oxidation product was analyzed. For EDX analysis, the colored oxidation product was harvested by centrifugation, and the resulting pellet was redissolved in water and recentrifuged to remove excess copper. The washed precipitate was subjected to EDX analysis with an EM 912 Omega electron transmission microscope (Leo, Oberkochen, Germany) equipped with an EDX system (energy-dispersible X-ray analysis Link eXIII; Oxford Instruments, High Wycombe, United Kingdom) in the spot mode (100-nm spot size at 80 keV and 20  $\mu\text{A}$  emission current).

combination with copper was added (Fig. 6). This may be due to increased copper uptake as a result of  $\text{Cu(II)}$  reduction by enterobactin or 2,3-dihydroxybenzoic acid.

It is thought that copper imposes oxidative stress by catalyzing Fenton-like reactions (26). This raised the question of whether expression of *cueO* was also induced by oxidative stress independent of copper. However, compounds generating oxidative stress, such as hydrogen peroxide, t-butyl peroxide, and paraquat, did not induce the reporter, and neither did

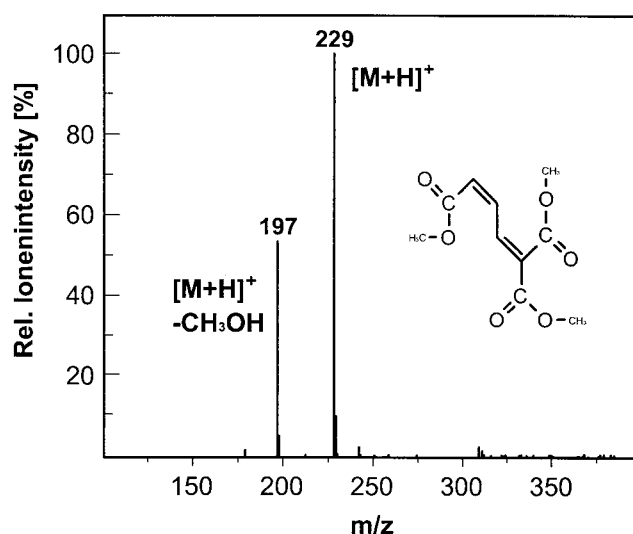


FIG. 5. Chemical ionization-MS spectrum of the 2,3-dihydroxybenzoate oxidation product catalyzed by CueO in the presence of 0.5 mM  $\text{CuCl}_2$ . The  $m/z$  of 229 represents the protonized trimethylated reaction product 2-carboxymuconate, and the  $m/z$  of 197 represents a fragment after the loss of one molecule of methanol.

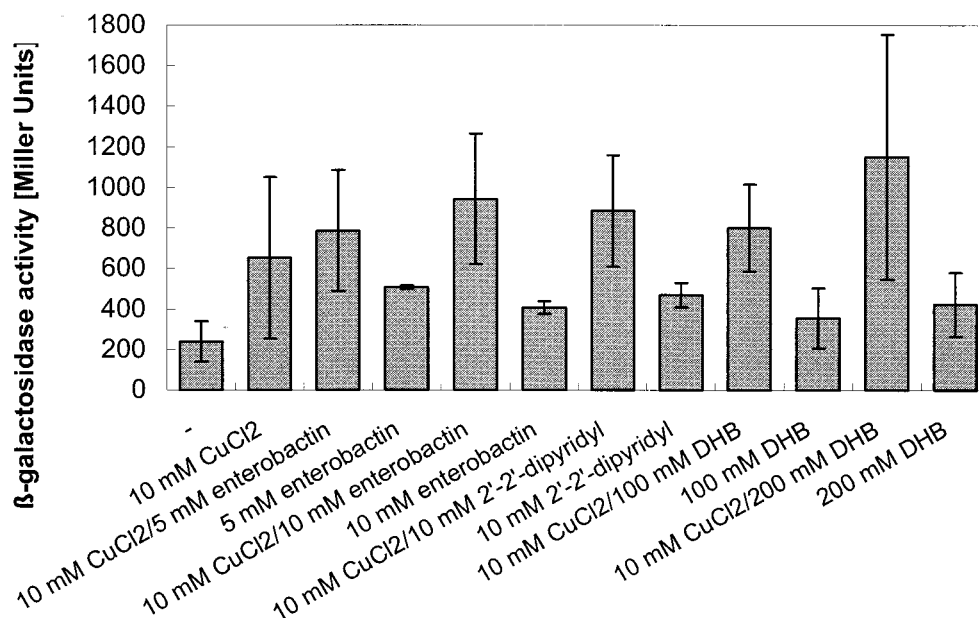


FIG. 6. Induction of *cueO* in *E. coli* strain W011260B  $\Phi(\text{cueO-lacZ})$  under copper stress. Cells of *E. coli* strain W011260B  $\Phi(\text{cueO-lacZ})$  containing a *cueO-lacZ* operon fusion on the bacterial chromosome grown in LB medium were diluted 15-fold into fresh minimal medium and induced after 2 h of growth. Incubation was continued with shaking at 37°C for 2 h, and the  $\beta$ -galactosidase activity was determined. Each experiment was performed in triplicate, and the average and standard deviation were calculated.

a radical-generating system comprising hematin and peroxide (data not shown). Menadione induced *cueO* only in the presence of copper (data not shown). However,  $\Phi(\text{cueO-lacZ})$  was induced in the presence of low added copper concentrations (10  $\mu\text{M}$ ) by 2',2'-dipyridyl, a strong chelator of iron and copper [Martell's critical stability constants  $\log K = 8.5$  for Cu(II),  $\log K = 16.3$  for Fe(III)] (Fig. 6). There was also a slight increase in  $\Phi(\text{cueO-lacZ})$  induction in medium without added copper, possibly due to residual copper in the medium. This could indicate that copper bound to 2',2'-dipyridyl is able to enter the cell and might increase the cytoplasmic copper concentration. This all suggested that expression of *cueO* is directly dependent on copper and not indirectly on copper-generated oxidative stress.

**Deletion of *fur* leads to copper hypersensitivity.** The Fur protein of *E. coli* is the global regulator for iron uptake systems, defense against oxidative stress, and iron storage (3). Thus, a strain deleted of *fur* is also derepressed for enterobactin biosynthesis. We demonstrated that deletion of the *fur* gene rendered *E. coli* hypersensitive to copper (Fig. 7). The presence of ascorbate at the initial setup of the experiment was essential for the copper-sensitive phenotype of the *fur* mutants, indicating that the production of the prooxidant Cu(I) is the first step in creating toxic oxygen intermediates.

Because the combination of enterobactin and copper was shown to be detrimental for *E. coli*, the *entC* gene was deleted in addition to *fur*, preventing biosynthesis of enterobactin. The resulting strain tolerated copper much better than the single *fur* mutant (Fig. 7). An *entC* single deletion mutant exhibited copper tolerance comparable to that of the wild type at 100  $\mu\text{M}$  (data not shown). These results support our hypothesis on the interaction of CueO with enterobactin that oxidation of enterobactin in the presence of copper is advantageous for *E.*

*coli*. Moreover, this clearly indicated that the deregulation of iron uptake might lead to enhanced copper uptake through transporters such as FeoB, MntH, and ZupT, but additional deletion of enterobactin production rendered *E. coli* more copper tolerant than a single *fur* deletion, making enterobactin the major contributor to cytotoxicity under copper stress. These results are consistent with the data obtained for enterobactin- and copper-dependent killing of *E. coli*. Previously, no involvement of the global iron repressor Fur in copper tolerance had been observed. This emphasizes the interrelationship

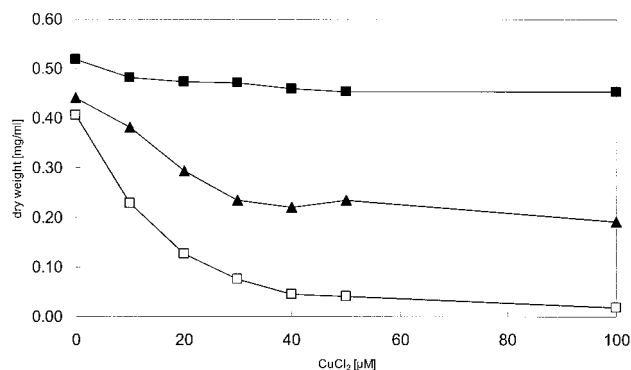


FIG. 7. Copper resistance of different *E. coli* strains. Growth in the presence of different  $\text{CuCl}_2$  concentrations is shown. Overnight cultures were diluted 1:400 into fresh LB broth and, after 2 h of growth, diluted into fresh LB broth with the indicated concentrations of  $\text{CuCl}_2$  and 1 mM ascorbate. Cell growth after 6 h of incubation at 37°C with shaking was monitored as the optical density at 600 nm and converted to dry weight. The *E. coli* strains used were W3110 (■), GG199 ( $\Delta\text{fur}::\text{cat}$ ) ( $\square$ ), and GG213 ( $\Delta\text{fur}::\text{cat} \Delta\text{entC}$ ) ( $\blacktriangle$ ). Experiments were performed at least in triplicate, and the average is shown.

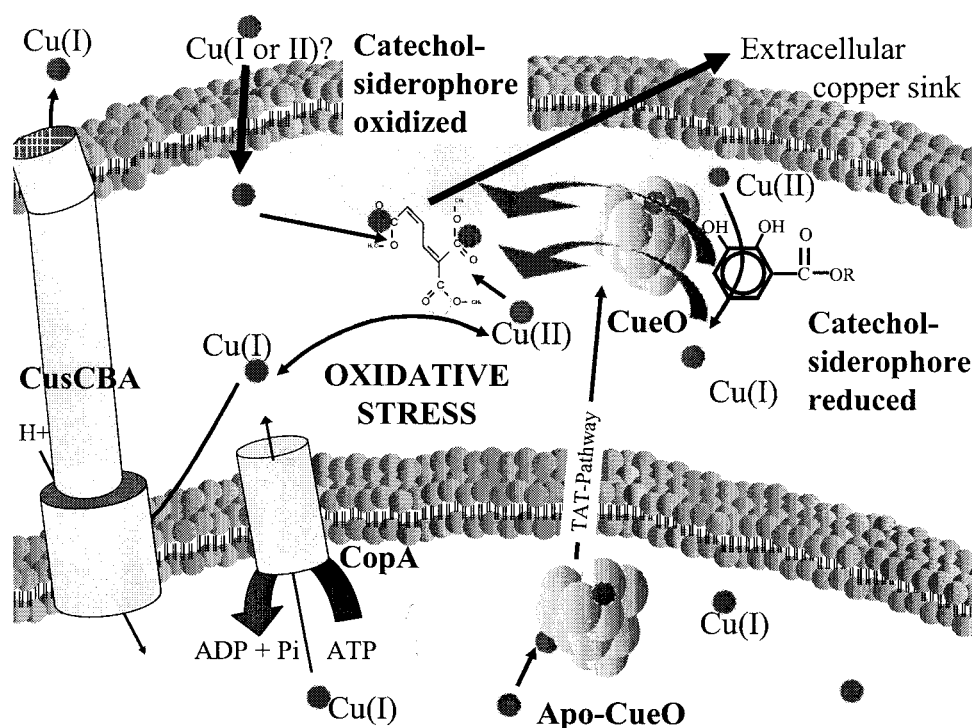


FIG. 8. Model of copper homeostasis in *E. coli* and the central role of CueO. Copper enters the bacterial cell by an unknown mechanism and exerts its toxicity by generating reactive oxygen species via copper-mediated redox cycling. Cytoplasmic detoxification of copper is accomplished by the P-type ATPase CopA, while periplasmic copper is effluxed by the CusCBA complex. The multicopper oxidase CueO probably converts Cu(I) to the less toxic Cu(II). Additionally, when copper is present, CueO oxidizes the catechol siderophore enterobactin, avoiding enterobactin-mediated reduction of Cu(II) to Cu(I). The resulting oxidation product of enterobactin, 2-carboxymuconate, sequesters copper and might constitute a copper sink after export to the outside.

of copper and iron homeostasis in *E. coli*. The point of contact is probably enterobactin and CueO.

## DISCUSSION

In our initial hypothesis (12), we and others proposed that CueO converts periplasmic Cu(I) to the less toxic Cu(II) (8, 13, 23, 28). This mode of copper protection was recently confirmed for the related multicopper oxidase Fet3 in *S. cerevisiae*. Fet3 was shown to possess cuprous oxidase activity (35). This activity was only necessary for protection from copper toxicity if a copper reductase was also present (34). We also believe that CueO-dependent cuprous oxidase activity may be important in conferring copper resistance in *E. coli* and recently demonstrated CueO-dependent Cu(I) oxidase activity (unpublished data). In addition to this activity, CueO appears to protect cells from the interaction of enterobactin with copper by oxidation of enterobactin. The current study suggests that CueO performs a catalytic reaction, oxidizing the iron chelator enterobactin under copper stress in *E. coli*. Figure 8 depicts known factors important for periplasmic copper homeostasis in *E. coli* and presents the most recent model of the central role of CueO as an interface between copper detoxification and iron homeostasis.

CueO is only active aerobically because multicopper oxidases use oxygen as a terminal electron acceptor. Furthermore, copper slowly oxidizes catechols in the presence and/or absence of multicopper oxidases. One electron is transferred to

molecular oxygen in copper-mediated oxidation of catechols, forming superoxide, which is subsequently reduced to hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. In other words, enterobactin and other catechols reduce Cu(II) to Cu(I) and thereby change the steady-state level of Cu(I) (15, 18, 32). Increased redox cycling of copper could lead to both increased production of reactive oxygen species and increased Cu(I) uptake. CueO can therefore perform several beneficial reactions. CueO can reduce the amount of Cu(I), reduce the presence of unoxidized enterobactin, and prevent the accumulation of free intermediate reactive oxygen species by coupling the oxidation of substrates with the complete reduction of oxygen to water.

Given the relatively small increase in *cueO* expression in the presence of copper plus siderophore compared to that in the presence of copper alone, the effect of siderophore-mediated reduction and subsequent uptake of copper into the cytoplasm and, thus, increased copper concentration cannot be considered a major stress factor within the cytoplasm. Probably, the critical compartment for copper-siderophore toxicity is the periplasmic space, where CueO exerts its protective oxidase activity.

This situation is reminiscent of mammalian systems, in which ceruloplasmin, in addition to its ferroxidase activity, is thought to oxidize catecholamines such as 6-hydroxydopamine and thereby prevent the formation of reactive oxygen species (9). For example, copper accelerated the autooxidation of 6-hydroxydopamine 61-fold (5). Copper neurotoxicity was also

found to be dependent on dopamine-dependent copper uptake and may contribute to the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Interestingly, copper was implicated in the increased incidence of parkinsonism in subjects exposed to copper in mining operations in Chile (24). Since ceruloplasmin was also shown to have Cu(I) oxidase activity, it might have a bigger role in protection from neurodegenerative diseases than previously anticipated.

CueO might modify enterobactin so that it accumulates with sequestered copper in the periplasm and the extracellular medium. EDX analysis clearly demonstrated that the water-insoluble 2,3-dihydroxybenzoic acid oxidation product was able to bind copper. It was pointed out before that catechol-metal complexes are highly stable and that compounds containing catecholic nuclei can sequester metals from other complexes. This would also result in the prevention of redox cycling of those metals (4, 32).

In order to prevent an unfavorable constitutive oxidation of enterobactin by CueO, expression of *cueO* occurs only in the presence of copper. This control mechanism would ensure that the deleterious interaction between copper and enterobactin is avoided. CueO is regulated at the genetic and enzymatic levels by copper. CueO possesses a methionine-rich region that is involved in copper-dependent enzyme regulation. Recently, we showed that this region is essential for CueO-mediated siderophore oxidation (30).

*E. coli* strains deleted of *fur* were described as having a higher free iron concentration (3, 36). However, it was determined that such bacteria contain considerably less total iron, presumably by downregulating iron storage (1). Our results demonstrated that deletion of *fur* resulted in a severe copper-sensitive phenotype. Growth of a *fur*-deleted strain was almost completely inhibited at a CuCl<sub>2</sub> concentration as low as 100 μM in the presence of ascorbate. The parental wild-type strain *E. coli* W3110 under the same growth conditions is only inhibited at much higher concentrations (12). About 5,000 copies of the Fur protein are usually present in an *E. coli* cell, but under redox stress this level is increased twofold (1). A *fur* mutant also produces an increased amount of enterobactin. That enterobactin with copper is toxic to cells is again supported by the ability of the  $\Delta fur \Delta entC$  double deletion strain, which is unable to synthesize enterobactin, to tolerate higher copper concentrations than the  $\Delta fur$  single-deletion strain.

The fact that the interaction of copper and the natural iron chelator enterobactin is toxic indicates that CueO and enterobactin constitute a connecting link between copper and iron homeostasis in *E. coli*. These links between iron and copper homeostasis in *E. coli* provide a launching pad from which to tackle the physiological mechanisms of trace metal homeostasis in prokaryotes. It also might initiate studies of CueO-mediated protection from catecholate siderophore-enhanced copper toxicity as a model for copper damage to dopaminergic neurons.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Hatch Project 136713 and NIEHS grant ESO4940 with funds from the EPA to C.R.

We thank Jennifer Crispin and Raina Maier for desferric enterobactin and Thomas V. O'Halloran for strain WOII260B. Thanks are due Jim Imlay and Dietrich H. Nies for suggestions and Dieter Neumann (Leipzig-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Germany) for EDX

analysis. We also thank Barry Rosen and Nigel Brown for carefully reading the manuscript and for suggestions.

#### REFERENCES

- 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.
- Alexandre, G., and I. B. Zhulin. 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* **18**:41–42.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:215–237.
- Avdeef, A., S. R. Sofen, T. L. Bregante, and K. N. Raymond. 1978. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **100**:5362–5370.
- Bandy, B., P. B. Walter, J. Moon, and A. J. Davison. 2001. Reaction of oxygen with 6-hydroxydopamine catalyzed by Cu, Fe, Mn and V complexes: identification of a thermodynamic window for effective metal catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **389**:22–30.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
- DeLisa, M. P., P. Lee, T. Palmer, and G. Georgiou. 2004. Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *J. Bacteriol.* **186**:366–373.
- Finney, L. A., and T. V. O'Halloran. 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**:931–936.
- Floris, G., R. Medda, A. Padiglia, and G. Musci. 2000. The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach. *Biochem. Pharmacol.* **60**:1735–1741.
- 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.
- 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.
- Grass, G., and C. Rensing. 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145–2147.
- Grass, G., and C. Rensing. 2001. CueO is a multicopper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**:902–908.
- Hasegawa, H., M. Matsui, M. Suzuki, K. Naito, K. Ueda, and Y. Sohrin. 2001. The possibility of regulating the species composition of marine phytoplankton using organically complexed iron. *Anal. Sci.* **17**:209–211.
- Kamau, P., and R. B. Jordan. 2002. Kinetic study of the oxidation of catechol by aqueous copper(II). *Inorg. Chem.* **41**:3076–3083.
- 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.
- Klebba, P. E., M. A. McIntosh, and J. B. Neilands. 1982. Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **149**:880–888.
- Li, Y., M. A. Trush, and J. D. Yager. 1994. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis* **15**:1421–1427.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, and F. van Gijsegem. 1985. *Alcaligenes eutrophus* is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**:328–334.
- Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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.
- Outten, F. W., C. E. Outten, J. Hale, and T. V. O'Halloran. 2000. Transcriptional activation of an *E. coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J. Biol. Chem.* **275**:31024–31029.
- 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.
- Paris, L., A. Dagnino-Subiabre, K. Marcelain, L. B. Bennett, P. Caviedes, R. Caviedes, C. O. Azar, and J. Segura-Aguilar. 2001. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J. Neurochem.* **77**:519–529.
- Payne, S. M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.* **235**:329–344.
- Pena, M. M. O., J. Lee, and D. J. Thiele. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* **129**:1251–1260.
- 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. USA **97**:652–656.
28. **Rensing, C., and G. Grass.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiol. Rev. **27**:197–213.
  29. **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. USA **99**:2766–2771.
  30. **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.
  31. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  32. **Schweigert, N., A. J. B. Zehnder, and R. I. L. Eggen.** 2001. Chemical properties of catechols and their molecular mode of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. Environ. Microbiol. **3**:81–91.
  33. **Schwyn, B., and J. B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. **160**:47–56.
  34. **Shi, X., C. Stoj, A. Romeo, D. J. Kosman, and Z. Zhu.** 2003. Fre1p Cu<sup>2+</sup> reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **278**:50309–50315.
  35. **Stoj, C., and D. J. Kosman.** 2003. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. FEBS Lett. **554**:422–426.
  36. **Touati, D., M. Jaques, B. Tardat, L. Bouchard, and S. Despied.** 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in  $\Delta fur$  mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. J. Bacteriol. **177**:2305–2314.



### 2.1.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Multikupferoxidase CueO auf die Kupfertoizität in *Escherichia coli* untersucht. Dabei stand der Einfluss der Oxidase auf das Catecholatsiderophor Enterobaktin im Zentrum der Untersuchungen.

Es konnte eine direkte Reaktion von CueO mit Enterobaktin bei erhöhten Kupferkonzentrationen im Medium nachgewiesen werden. Diese Reaktion war direkt von dem Vorhandensein von Kupfer, Enterobaktin und der Oxidaseaktivität von CueO abhängig. Die gleiche Reaktion konnte mit der Enterobaktinvorstufe 2,3-Dihydroxybenzoesäure gezeigt werden. Zusätzlich führte die Deletion der Multikupferoxidase zu einer erhöhten Biosynthese von Enterobaktin, wenn Kupfer unter Eisenmangelbedingungen zugesetzt wurde.

In Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, dass Enterobaktin in Kombination mit Kupfer eine erhöhte Toizität zeigt, als Kupfer allein. Diese Toizität konnte in die Anwesenheit von aktivem CueO nicht mehr nachgewiesen werden, was nahelegt, dass eine direkte Reaktion von CueO mit dem Enterobaktin die Toizität verringerte. Demzufolge konnte anschliessend die direkte Interaktion von CueO mit Enterobaktin gemessen werden. Die erhaltenen Daten liessen den Schluss zu, dass eisenhaltiges Enterobaktin ein natürliches Substrat von CueO ist. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass die Deletion von *fur*, dem globalen Eisenregulator in *E. coli*, zu einer erhöhten Sensitivität unter Kupferstress führt. Um zu beweisen, dass dies in der übermässigen Enterobaktinsynthese der *fur* Mutante begründet ist, wurde eine Doppelmutante *fur entC* konstruiert, in der kein Enterobaktin mehr gebildet werden kann. Diese Doppelmutante zeigte wiederum eine geringere Sensitivität unter Kupferstress als die *fur* Einzelmutante. Dies legte nahe, dass Enterobaktin zu einem erhöhten Kupferimport in die Zelle führt. Um dem nachzugehen, wurden Transkriptionsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass die cytosolische Transkriptionsaktivierung des CueO Operons in Anwesenheit von

Kupferchelatoren, wie Enterobaktin und 2,3-Dihydroxybenzolsäure, stärker ist, als in Anwesenheit von Kupferionen allein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kupferchelatoren eine erhöhte Toxizität von Kupfer bewirken. Dies legt nahe, dass Kupfer mittels Eisenchelatoren in die Zelle transportiert werden kann. Die Multikupferoxidase CueO kann nicht nur durch Oxidation von Cu(I) zu u(II) dem Kupferstress entgegen wirken, sondern scheinbar auch den Kupferimport mittels der Oxidation von Catecholaten, wie Enterobactin und seiner Vorläufer, unterbinden.

## **2.2. Aufklärung der Rolle des Dps Proteins in der Kupferhomöostase in *E. coli*.**

### **2.2.1 Publikation 2**

The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis.



## The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis

Daniel Thieme<sup>a</sup>, Gregor Grass<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute for Biology/Microbiology, Martin-Luther-University Halle, Germany

<sup>b</sup>School of Biological Sciences, University of Nebraska, Beadle Center, E141, Lincoln, NE 68588, USA

Received 29 September 2008; received in revised form 10 December 2008; accepted 15 December 2008

### KEYWORDS

DNA-binding protein of starved cells; Copper stress; *Escherichia coli*; Oxidative stress; DNA degradation

### Summary

The DNA-binding protein of starved cells (Dps) has two distinct cellular functions in *Escherichia coli*. The spherical Dps dodecamer can store iron and, predominantly in the stationary growth phase, high amounts of Dps protein protect the genome by binding non-specifically to DNA. In this study we investigated the role of Dps in copper homeostasis in growing cells of *E. coli*. Under reductive aerobic growth conditions that favor a redox shift from Cu(II) to Cu(I) or under anaerobiosis, cells deleted in *dps* were sensitive to low copper ion concentrations. Deletion of the DNA-binding N-terminus of Dps did not abrogate protection against copper toxicity indicating protection against copper stress is not directly related to DNA binding of Dps. The Dps protein is not a copper-storage protein *in vitro* or *in vivo*. In contrast, cells lacking Dps exhibited increased cellular copper concentrations compared to their wild-type parent. Furthermore, overproduction of Dps during growth phase resulted in decreased intracellular copper content under copper stress.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

The generation of metal-catalyzed reactive oxygen species (ROS) is a major hazard for various cellular target molecules such as DNA, proteins or lipids. Iron and copper have similar physico-chemical properties and both contribute to the generation of hydroxyl radicals through Fenton and

Fenton-like reactions. *Escherichia coli* and other bacteria have several means to fend off ROS for instance through the dismutation of superoxide or decomposition of peroxides (Storz and Imlay 1999). Other strategies comprise the decrease of the intracellular concentration of redox-active metals by active efflux (Rensing et al. 2000) or alternatively by storage within specialized proteins in case of iron (Andrews 1998). As a result, these measures warrant a low steady-state concentration of hydroxyl radicals, a ROS that cannot be detoxified.

\*Corresponding author.

E-mail address: [ggrass2@unl.edu](mailto:ggrass2@unl.edu) (G. Grass).

*E. coli* possesses three different iron storage proteins. The 24-mer ferritin constitutes a large hollow sphere that can accommodate at least 2000–3000 iron atoms. The second, bacterioferritin, is a haemoprotein that stores iron in somewhat smaller quantities. Twelve monomers of the DNA-binding protein of starved cells (Dps) form a much smaller cavity that provides room for only several hundreds of iron atoms (Andrews et al. 2003).

In addition to iron storage, the Dps protein also binds DNA non-specifically. Especially in stationary phase this contributes to the formation of stable and highly ordered nucleoprotein complexes termed biocrystals. These complexes cover the chromosomal DNA and contribute to stress protection (Wolf et al. 1999). The Dps protein is also suited to diminish iron-mediated oxidative stress. It ideally combines the ability to use hydrogen peroxide (rather than molecular oxygen) for ferrous iron oxidation and concomitant storage of iron as a mineralized core. Thus, two educts of Fenton chemistry are removed and cell damage is avoided (Zhao et al. 2002). So far it is not known, if copper is also a substrate of Dps for oxidation and subsequent storage. Previously it was shown, however, that copper, albeit at very high concentrations of 50 mM CuCl<sub>2</sub>, killed a *dps* deletion mutant more efficiently than the wild-type in stationary growth phase (Nair and Finkel 2004). Though, no copper-dependent phenotype was observed for cells being stressed during exponential growth phase (Nair and Finkel 2004).

In this study we demonstrate that Dps also contributes to defense against copper stress in growing cells of *E. coli*.

## Material and methods

### Bacterial strains, growth media

Strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *E. coli* was grown in Luria Bertani (LB) medium. For dose–response experiments, cultures

of *E. coli* were grown overnight in LB at 37 °C, diluted 1:400 in LB medium and grown overnight. Cultures were inoculated 1:400 in fresh LB medium and after 2 h early log-cultures were diluted 1:400 in fresh medium and challenged with additives. Anaerobe cultures were grown in Hungate tubes in LB medium supplemented with 0.5% glucose. Growth was monitored as OD<sub>600</sub> and the dry weight was determined from a calibration curve. CuCl<sub>2</sub>, ascorbate, hydrogen peroxide or antibiotics [chloramphenicol (15–20 µg/ml), kanamycin (25 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml)] were added where appropriate.

### Gene deletion and plasmid construction

The *dps* gene of *E. coli* K12(W3110) was deleted by the consecutive insertion of a Cam<sup>R</sup> cassette using the λ Red-recombinase system (Datsenko and Wanner 2000) and the primer pair 5'-CgC TAA ATT AgT TAA ATC AAA AgC gAC CAATCT gCT gCg ATT gTg TAg gCT ggA gCT-3' and 5'-gTA AAg TTC TgC ACC ATC AgC gAT ggA TTT ATT CCA Tgg TCC ATA TgA ATA TCC TCC-3'. Deletion of *dps* was confirmed by PCR using primers binding outside of the deleted sequence. The resistance cassette was removed using FLP recombinase (Datsenko and Wanner 2000).

Plasmid pECD920 was constructed as follows. The *dps* gene was amplified by PCR from chromosomal DNA of *E. coli* K12(W3110) using primers 5'-gAA gAA TTC AgT ACC gCT AAA TTA gTT AAA TCA AAA gCg-3' and 5'-ATg CTg CAg TTC gAT gTT AgA CTC gAT AAA CCA CAg-3' (with restriction endonuclease cleavage sites underlined) and cloned EcoRI and PstI into vector pASK-IBA7 (IBA, Göttingen, Germany) fusing it with an N-terminal StrepTagII for purification. 5'-truncated *dps* for Dps Δ1-13M14L was generated by amplification of the *dps* gene using primers gAATTC gCg ACC AAT ATg CTT TAT ACC CgC and ATg CTg CAg TTC gAT gTT AgA CTC gAT AAA CCA CAg and cloned EcoRI and PstI into vector pASK-IBA7 fusing it with an N-terminal StrepTagII for purification. All plasmids were checked by restriction and DNA sequence analysis.

**Table 1.** *E. coli* strains and plasmids used in this study.

| Strains | Plasmids   | Relevant genotype   | Source/reference           |
|---------|------------|---|----------------------------|
| W3110   |            | Wild type, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1  | (Bachmann 1972)            |
| BW25113 | pKD46      | <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>rrnB<sub>T14</sub></i> , Δ <i>lacZ</i> WJ16, <i>hsdR514</i> , Δ <i>araBA-D<sub>AH33</sub></i> , Δ <i>rhaBAD<sub>LD78</sub></i> | (Datsenko and Wanner 2000) |
| ECA 284 |            | Δ <i>dps::cat</i>   | This study                 |
|         | pASK-IBA 7 | Expression vector, Amp <sup>r</sup> , Strep-TagII epitope   | IBA (Göttingen, Germany)   |
|         | pECD920    | <i>dps</i> (Wt) cloned in pASK-IBA 7  | This study                 |
|         | pECD921    | 5'-truncated mutant <i>dps</i> (Dps ΔM1-13L14M) cloned in pASK-IBA 7  | This study                 |

## Overproduction and purification of Dps

Overproduction of Dps-StrepTagII and its variants was achieved in *E. coli* derivative ECA 284 ( $\Delta dps$ ) of strain K12(W3110) to avoid purification of heterooligomers of Dps encoded from the chromosome and from plasmids. A 1 L culture was inoculated 2% from a 16 h overnight culture in LB medium. After 3 h of growth, anhydrotetracycline (AHT) was added at a final concentration of 200  $\mu\text{g/L}$  to induce gene expression. After 2 h cells were harvested by centrifugation (15 min at 20,800g) and the pellet was resuspended in column buffer (100 mM Tris buffer (pH 8.0) with 150 mM sodium chloride). Cells were broken by French press (Sim Aminco, SLM instruments, Urbana, IL, USA) and supplemented with DNase, PMSF and Avidin (1 mM). The lysate was centrifuged twice for 15 min at 20,800g and 4 °C. A StrepTactin-sepharose (IBA, Göttingen, Germany) column (1 ml bed volume) was loaded with cleared supernatant and subsequently washed (5–7 column volumes) with column buffer. Dps protein was eluted with column buffer containing 2.5 mM desthiobiotin. All fractions were checked on a denaturing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for purity and via Western blot for Strep-tagged Dps protein. Dps protein fractions were pooled and concentrated via spin column centrifugation (Vivascience, Göttingen, Germany).

**Atomic absorption spectroscopy.** Cells were grown overnight in LB medium and diluted 1:400 into fresh LB medium with or without copper. After 16 h of growth at 37 °C with shaking, the optical density was measured at 600 nm and 0.2 ml aliquots were washed threefold with 0.5 ml ice-cold wash buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100  $\mu\text{M}$  EDTA). The pelleted cells were broken in 0.1 ml 10 M HNO<sub>3</sub> and mineralized by the addition of 0.05 ml 10 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The volume was filled with H<sub>2</sub>O up to 0.2 ml, and the metal content was measured by atomic absorption spectroscopy (ZEEnit<sup>®</sup> 600/650, Analytik Jena, Germany). Values were corrected by subtracting the metal content of the solutions used.

## Miscellaneous

Standard molecular genetic techniques were used (Sambrook et al. 1989). PCR was performed in the presence of *Tgo* or *Taq* DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany). DNA sequencing was performed at the Biology department core sequencing facility using the DYEnamic<sup>™</sup> ET terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare, Freiburg i. Br., Germany). Plasmid pASK-IBA7, StrepTactin-sepharose

and anhydrotetracycline (AHT) were purchased from IBA (Göttingen, Germany).

## Results

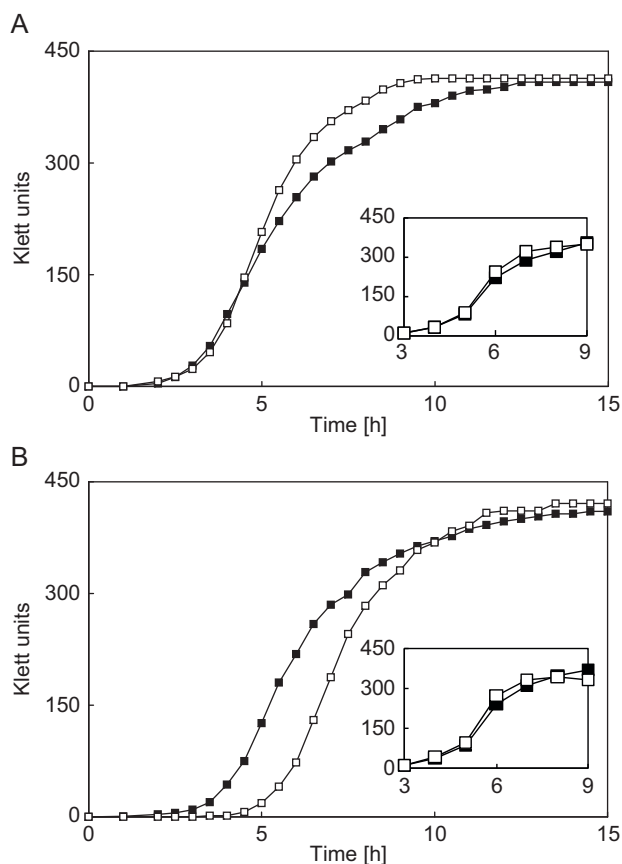
### Deletion of *dps* renders *E. coli* sensitive against copper stress

Previously, a role of Dps in protection against copper stress in stationary growth-phase cultures of *E. coli* was described. However, no significant increase in sensitivity to copper during exponential growth phase was observed (Nair and Finkel 2004). We reasoned if Dps utilizes copper in a similar way as iron and incorporates the metal for storage or detoxification then Dps should rather use cuprous copper, Cu(I), than cupric copper, Cu(II). To investigate this, the *dps* gene was deleted from wild-type *E. coli* strain W3110 and growth of the mutant was monitored in the absence or presence of Cu(I). Figure 1A shows that the  $\Delta dps$  mutant was almost unaffected in growth medium in the presence of the reducing agent ascorbate without copper. The mutant entered stationary growth phase somewhat earlier than the wild type. A similar growth pattern was observed in the absence of both the reducing agent ascorbate and copper (Figure 1 inset). In contrast, when low copper concentrations were added, the  $\Delta dps$  mutant exhibited a 2 h prolonged lag phase while the final growth yield was unaffected (Figure 1B).

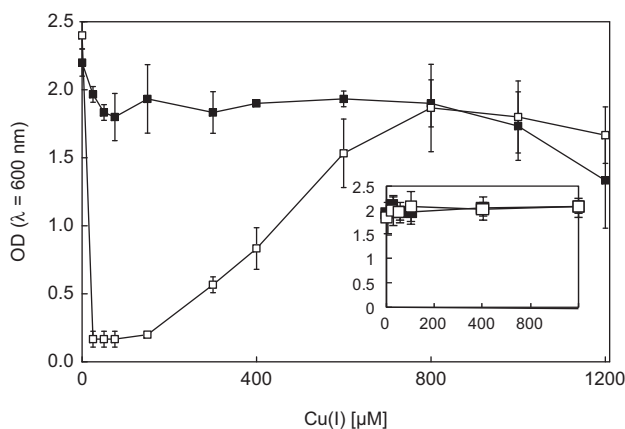
Also, dose-response growth experiments in the presence of Cu(I) (Figure 2) and Cu(II) (Figure 2, inset) demonstrated that the  $\Delta dps$  strain was severely affected by low concentrations of Cu(I) but not of Cu(II), whereas the wild-type control was almost unaffected under these conditions. At higher copper concentrations growth of both strains was similarly unaffected probably caused by the decomposition of ascorbate and concomitant shift of the redox balance from Cu(I) to Cu(II) which is less toxic for *E. coli* (Figure 2). These data suggested that at low copper concentrations under reducing conditions, Dps exerts an important protective role in growing *E. coli* cells. As a consequence, lack of Dps resulted in delayed growth in the presence of Cu(I).

### Dps protects DNA from copper-mediated degradation

The protective effect of the Dps protein on DNA degradation can be easily monitored in a gel-based assay. Binding of Dps to DNA results in high

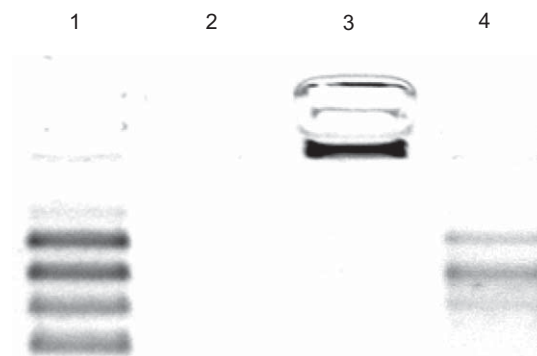


**Figure 1.** Copper-dependent growth retardation of a  $\Delta dps$  mutant. Shown is a time-course growth experiment of *E. coli* strain W3110 (■) or its derivative ECA 284  $\Delta dps$  (□) without (A) or with (B)  $5 \mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  in the presence or absence (insets) of  $1 \text{ mM}$  ascorbate. Each data point represents the average of at least three independent experiments.



**Figure 2.** Copper sensitivity of a  $\Delta dps$  mutant. Parallel cultures of *E. coli* strain W3110 (■) or its derivative ECA 284  $\Delta dps$  (□) were grown in medium containing or lacking (insets)  $1 \text{ mM}$  ascorbate supplemented with different  $\text{CuCl}_2$  concentrations. Growth yield as optical density (OD) at  $600 \text{ nm}$  was determined after  $6 \text{ h}$  of growth. Shown are averages with standard deviations (error bars) of at least three independent experiments.

molecular complexes, which hardly enter the gel matrix (Wolf et al. 1999). Figure 3 shows that the addition of  $\text{CuCl}_2$  to DNA did not result in oxidative degradation. However, when a Fenton-like reaction was initiated by the addition of  $\text{CuCl}_2$ , ascorbate and hydrogen peroxide, DNA was efficiently and completely degraded. Conversely, addition of purified Dps protein to DNA prior to oxidative challenge efficiently protected the DNA (Figure 3). Thus, *in vitro* Dps might not only protect DNA from



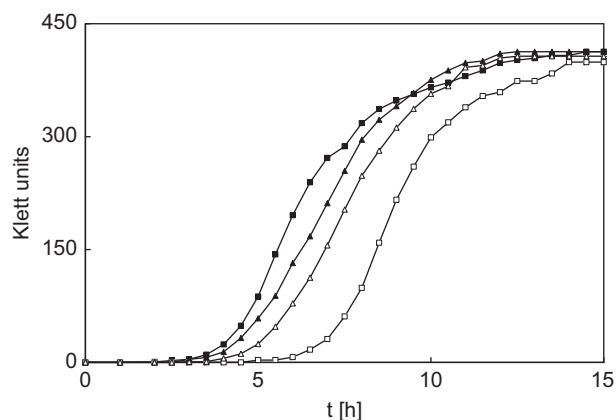
**Figure 3.** DNA gel retardation assays of Dps in the presence of copper. Approximately  $400 \text{ ng}$  plasmid DNA was incubated with  $100 \mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ ,  $1 \text{ mM}$  ascorbate and  $10 \text{ mM}$  hydrogen peroxide for  $10 \text{ min}$  in the absence (lanes 1 and 2) or presence of Dps protein (lanes 3–5) unless indicated otherwise. If Dps was added it was added first to the DNA. Samples were separated on  $1\%$  agarose gel and stained with ethidium bromide. 1: DNA without ascorbate,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and Dps ( $100 \mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  only); 2: degraded DNA; 3: DNA with  $5 \mu\text{M}$  wild-type Dps protein; and 4: DNA with  $5 \mu\text{M}$  of the Dps  $\Delta 1\text{-}13\text{L}14\text{M}$  variant. Shown is a representative result.

iron-catalyzed oxidative stress but also of stress caused by copper. This indicated that the observed copper-dependent growth retardation of the  $\Delta dps$  mutant (Figures 1B, 2) is probably caused by the lack of protection of DNA.

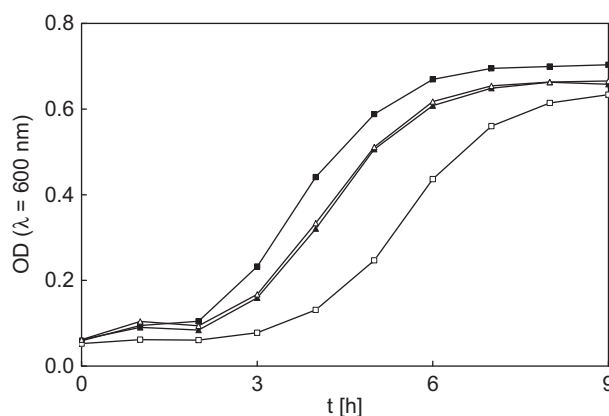
### DNA binding of Dps is not necessary for protection against copper

The protective role of the Dps protein is exerted both by accumulation of iron under iron-surplus conditions and by DNA protection through binding (Almiron et al. 1992). To investigate the role of DNA binding on copper-stress protection, a Dps variant protein was constructed. Dps  $\Delta 1-13L14M$  lacked its N-terminus that is implicated in DNA binding (Ceci et al. 2004). Purified Dps  $\Delta 1-13L14M$  did not bind DNA *in vitro* even at high Dps to DNA ratios (data not shown). Nevertheless, in gel-based protection assays this truncated derivative of Dps still protected DNA from oxidative degradation caused by copper redox cycling (Figure 3). However, protection was not complete and part of the DNA was degraded.

Expression of *dps* in *E. coli* strain ECA 284 ( $\Delta dps$ ) *in trans* conferred resistance against Cu(I) stress in log-phase cultures (Figure 4). Similar to the *in vitro* results, the variant Dps  $\Delta 1-13L14M$  did not reach the efficiency of wild-type Dps but cells were notably protected from copper stress when compared to a strain lacking Dps (Figure 4). A similar result was achieved under anaerobic conditions which favor Cu(I) (Figure 5). Cells deleted in *dps*



**Figure 4.** Complementation of *dps in trans* under aerobic growth conditions. Aerobic growth of *E. coli* strain W3110 (■), ECA 284  $\Delta dps$  (□), its *dps*-expressing derivative ECA 284  $\Delta dps$  pECD920 (▲) or its *dps*-expressing derivative ECA 284  $\Delta dps$  pECD921 (Dps  $\Delta 1-13L14M$ , △) was monitored in the presence of  $5\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ , 1mM ascorbate and  $200\mu\text{g/L}$  AHT. Shown are averages of at least three independent experiments.



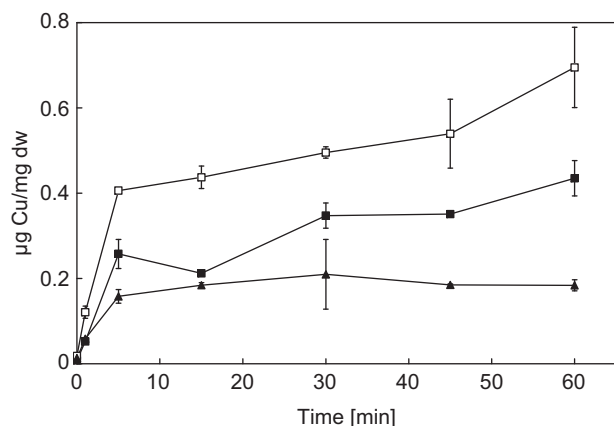
**Figure 5.** Complementation of *dps in trans* under anaerobic growth conditions. Anaerobic growth of *E. coli* strain W3110 (■), ECA 284  $\Delta dps$  (□), its *dps*-expressing derivative ECA 284  $\Delta dps$  pECD920 (▲) or its *dps*-expressing derivative ECA 284  $\Delta dps$  pECD921 (Dps  $\Delta 1-13L14M$ , △) was monitored in the presence of  $20\mu\text{g/L}$  AHT. Shown are time courses with  $5\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  with averages of at least three independent experiments.

exhibited retarded growth but complementation with wild-type or N-terminally truncated *dps* (Dps  $\Delta 1-13L14M$ ) partially restored this growth defect. This clearly ruled out DNA binding as the major reason for protection from copper stress. Conversely, these results suggest a role for Dps in defense against the toxicity mediated by Cu(I) ions, both under reducing aerobic conditions that convert Cu(II) to Cu(I) and under anaerobiosis that stabilizes Cu(I). These results also signify a lack of role of oxygen for the observed toxic Cu(I) effects in *dps* mutants.

### Cells of a $\Delta dps$ mutant strain accumulate more copper than wild-type cells

Growth retardation of the  $\Delta dps$  mutant indicated that these cells suffered intracellular copper stress probably by copper-mediated oxidative stress. Alternatively Dps might function as a copper storage protein. In the latter scenario, lack of Dps would result in diminished cellular copper load by the activity of copper efflux pumps. To test this hypothesis the cellular copper content was determined of copper-stressed *E. coli* wild-type and  $\Delta dps$  cells. Copper determination in a time course revealed that  $\Delta dps$  mutant cells accumulated considerably more copper than wild-type cells (Figure 6). Interestingly, expression of *dps in trans* in the  $\Delta dps$  mutant led to cellular copper concentrations lower than that of wild-type and were only about 25% of that of the  $\Delta dps$  strain. Likely, the observed growth defect of the  $\Delta dps$  mutant under



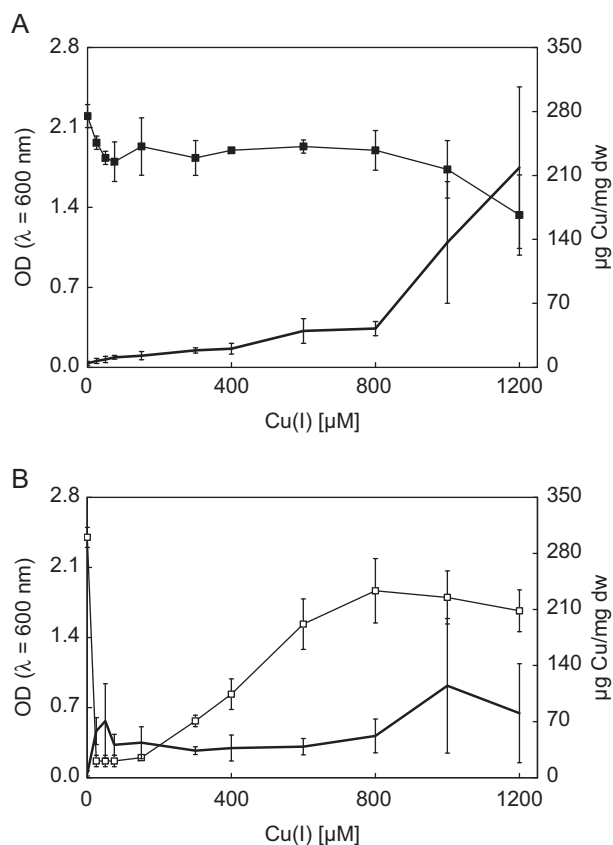


**Figure 6.** Time course of copper uptake into cells deleted in *dps*. Cultures of *E. coli* strain W3110 (■), ECA 284  $\Delta$ *dps* (□) or its *dps*-expressing derivative ECA 284  $\Delta$ *dps* pECD920 (▲) were supplemented with 5  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> and 1 mM ascorbate (and 200  $\mu$ g/L AHT, ▲) and grown for 6 h with shaking at 37 °C. Cells were harvested, washed, mineralized and subjected to atomic absorption spectroscopy. Shown is the average copper content (per mg dry weight [dw]) with standard deviations (error bars) from three independent cultures with triplicate copper determinations, each.

copper stress was caused by cellular copper overload. Also, dose–response studies in which cells were incubated for a prolonged period of time with different extracellular copper concentrations demonstrated that the  $\Delta$ *dps* mutant accumulated more copper than the wild type (Figure 7). This difference was pronounced at low extracellular copper concentrations and reached a maximum at 50  $\mu$ M copper. At higher outside copper concentrations, inside copper concentrations of both strains converged. Probably, at higher concentrations copper efflux pumps are expressed both in wild type and mutant that efficiently lower the intracellular copper concentration irrespective of the absence or presence of Dps.

### The Dps sphere does not incorporate copper

The analysis of the cellular copper content (Figure 6) indicated that Dps is not a copper storage protein in *E. coli*. To validate this, the copper-binding capacities of the Dps protein itself were investigated. Atomic absorption spectroscopy revealed that purified Dps protein, previously incubated in the presence of Cu(I), contained less than 1 mol copper per mol of Dps dodecamer (data not shown). Thus, the contribution of Dps to copper homeostasis is not through copper storage under copper stress.



**Figure 7.** Correlation of growth yield and cellular copper concentration of a *dps* mutant. A dose–response growth experiment (see Figure 2) for *E. coli* strain W3110 (■, panel A) or ECA 284  $\Delta$ *dps* (□, panel B) was followed by concomitant determination of cellular copper concentrations (solid black line) at different added CuCl<sub>2</sub> concentrations and 1 mM ascorbate to the growth media. Growth yield as optical density (OD) at 600 nm was determined after 6 h at which time cell aliquots were harvested for atomic absorption spectroscopy. Shown is the average copper content (per mg dry weight [dw]) or the cell density with standard deviations (error bars) from three independent cultures with triplicate copper-determinations, each.

### Discussion

Cells of *E. coli* are protected from copper overload through detoxification by active efflux. Copper extrusion is a two-step mechanism exerted by separate but consecutive transporters. The P-type ATPase CopA pumps Cu(I) from the cytoplasm to the periplasm (Rensing et al. 2000). Here, copper, probably in its cuprous form, is taken over by the Cus system. A periplasmic copper chaperone, CusF (Loftin et al. 2005) likely transfers the substrate to the tripartite protein complex CusCBA responsible for copper efflux (Outten et al. 2001; Franke et al. 2003). Another component of copper

homeostasis, CueO, a multi-copper oxidase, is also localized in the periplasm (Grass and Rensing 2001a). One relevant function of CueO *in vivo* is the oxidation of Cu(I) to the less toxic Cu(II) (Singh et al. 2004).

Thus, the periplasm is an important compartment for copper homeostasis and it is efficiently protected from copper toxicity. In contrast, we do not know much about cytoplasmic copper handling in *E. coli* except for the efflux pump CopA. No cytoplasmic copper chaperone such as CopZ (Cobine et al. 1999) is known from *E. coli*. Interestingly though, the closely related enterobacterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium encodes for a *copZ*-like gene (STM0355) as part of a tricistronic operon with *copA*- and *cueR*-like genes. Recently however, this locus was found to be implicated in gold but not in copper resistance (Checa et al. 2007).

Copper storage would be a convenient means for a cell to avoid copper overload temporally. Thus, in this study we investigated whether the Dps protein fulfils this function. Data presented here, however, clearly demonstrated that Dps is not a copper-storage protein. Nevertheless, Dps contributed to cytoplasmic copper-stress defense. Counter-intuitively there was no qualitative difference when experiments were repeated in strains additionally deleted in *copA*, *cus* and *cueO* (data not shown).

Because Dps is a cytoplasmic protein, copper toxicity in the  $\Delta$ *dps* mutant must occur also in this compartment. Recently, it was demonstrated that the majority of redox-active copper is located within the periplasm (Macomber et al. 2007). Also, copper was found not to contribute significantly to oxidative DNA damage (Macomber et al. 2007). Data presented here point in the direction that in a *dps* mutant cytoplasmic copper levels reach a toxic level. Interestingly, Macomber et al. (2007) and we independently constructed a  $\Delta$ *dps*  $\Delta$ *cus*  $\Delta$ *cueO*  $\Delta$ *copA* quadruple deletion mutant of *E. coli* and did not observe a further increase in copper sensitivity when compared to the  $\Delta$ *cus*  $\Delta$ *cueO*  $\Delta$ *copA* triple mutant (data not shown).

Thus, the interaction of Dps and copper homeostasis must be indirect. Previously, DNA binding was shown to be a major function of Dps (Almiron et al. 1992; Wolf et al. 1999). In our hands, however, a Dps variant ( $\Delta$ 1-13L14M) lacking its N-terminal DNA-binding domain still protected DNA from copper redox stress *in vitro* and expression of the respective truncated *dps* gene still conferred copper resistance *in vivo*. Other Dps orthologs, naturally lacking the DNA-binding domain were shown to be functional for reactive oxygen defense (Bozzi et al. 1997; Papinutto et al. 2002;

Zanotti et al. 2002). However, their ability to confer copper resistance was not investigated, yet.

What is the function of Dps in cellular copper homeostasis? Dps is one of the most abundant proteins in stationary cells of *E. coli* (Almiron et al. 1992). It is therefore unsurprising that Dps protects these cells from copper stress. However, the conditions applied (50 mM copper) in a viability experiment (Nair and Finkel 2004) by far exceeded what *E. coli* usually might encounter in its environment. Actually, 50 mM Cu(II) is about 15-fold higher than the minimal inhibitory concentration of Cu(II) for *E. coli* (Grass and Rensing 2001b). In growing cells we also did not observe a Cu(II)-dependent growth defect of  $\Delta$ *dps* cells (Figure 2, inset). Only when the redox balance was shifted towards Cu(I) by adding ascorbate or under anaerobic growth conditions a clear phenotype could be observed. Under these conditions only 5  $\mu$ M Cu(I), 1/50,000th of the concentration used for stationary cells (Nair and Finkel 2004) was sufficient to monitor the physiological effect of a *dps* deletion. This indicated two things. First, copper in its cuprous form might enter the cytoplasm more easily than cupric copper and is more toxic. This was already suggested earlier (Outten et al. 2001). Second, since ascorbate in solution is only stable for a short time and is readily consumed by Cu(II), Cu(I) has to enter the cells fast before the redox balance shifts back to Cu(II). And indeed, the accumulation of copper already occurred within the first few minutes after the addition of Cu(I) (Figures 6 and 7).

This study was motivated by the hypothesis that Dps was a storage protein not only for iron but for copper as well. This is not the case. In fact, cells lacking Dps accumulated more copper than the wild type (Figure 6). There are still at least two paradoxes left to be solved. First, why is the copper content of a  $\Delta$ *dps* mutant higher than that of the wild type, when cells are challenged with Cu(I)? Second, only at low outside Cu(I) concentrations the  $\Delta$ *dps* mutant accumulated more copper than the wild-type strain and its growth was retarded. Why do elevated cellular copper concentrations in  $\Delta$ *dps* cells not lead to activation of copper efflux?

## Acknowledgements

This work was supported by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* by Grant GR2061/1-2 to G.G. and *Graduierten-Kolleg "Stress"* to D.T. We thank Grit Schleuder for skilful technical assistance and Dietrich H. Nies for his continuing support.

## References

- Almiron M, Link AJ, Furlong D, Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1992;6(12B):2646–54.
- Andrews SC. Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* 1998;40:281–351.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27(2–3):215–37.
- Bachmann BJ. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 1972;36(4):525–57.
- Bozzi M, Mignogna G, Stefanini S, Barra D, Longhi C, Valenti P, et al. A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. *J Biol Chem* 1997;272(6):3259–65.
- Ceci P, Cellai S, Falvo E, Rivetti C, Rossi GL, Chiancone E. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus. *Nucleic Acids Res* 2004;32(19):5935–44.
- Checa SK, Espariz M, Audero ME, Botta PE, Spinelli SV, Soncini FC. Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Mol Microbiol* 2007;63(5):1307–18.
- Cobine P, Wickramasinghe WA, Harrison MD, Weber T, Solioz M, Dameron CT. The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett* 1999;445(1):27–30.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6640–5.
- Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003;185(13):3804–12.
- Grass G, Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001a;286(5):902–8.
- Grass G, Rensing C. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001b;183(6):2145–7.
- Loftin IR, Franke S, Roberts SA, Weichsel A, Heroux A, Montfort WR, et al. A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* 2005;44(31):10533–40.
- Macomber L, Rensing C, Imlay JA. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007;189(5):1616–26.
- Nair S, Finkel SE. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol* 2004;186(13):4192–8.
- Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2001;276(33):30670–7.
- Papinutto E, Dundon WG, Pitulis N, Battistutta R, Montecucco C, Zanotti G. Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem* 2002;277(17):15093–8.
- Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(2):652–6.
- Sambrook JEF, Fritsch A, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Singh SK, Grass G, Rensing C, Montfort WR. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004;186(22):7815–7.
- Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 1999;2(2):188–94.
- Wolf SG, Frenkiel D, Arad T, Finkel SE, Kolter R, Minsky A. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* 1999;400(6739):83–5.
- Zanotti G, Papinutto E, Dundon W, Battistutta R, Seveso M, Giudice G, et al. Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*. *J Mol Biol* 2002;323(1):125–30.
- Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E, et al. 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* 2002;277(31):27689–96.

### 2.2.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Publikation wurde die Bedeutung des Dps Proteins für die Kupferhomöostase in *E. coli* charakterisiert. In Wachstumsversuchen mit *dps* Deletionamutanten konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Dps Proteins zu einer stark erhöhten Sensitivität unter Kupferstress führt. Interessanterweise trat dieser Effekt speziell bei geringen Kupferkonzentrationen auf. Bei höheren Konzentrationen ging der Effekt wieder zurück. Da bekannt war, dass Dps DNA unspezifisch bindet, war ein regulatorischer Effekt unwahrscheinlich. Daher wurde die direkte Interaktion von Dps mit Kupfer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Dps den kupferinduzierten Abbau von DNA *in vitro* unterbindet. Mittels einer Mutante des Dps Proteins konnte nachgewiesen werden, dass die Bindefähigkeit des Proteins nicht essentiell für diese Schutzfunktion ist. Jedoch ist die Potenz des bindefähigen Proteins zum Schutz der DNA grösser.

Durch Analysen des Metallgehaltes der Zellen wurde ein höherer Kupfergehalt des *dps* Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. In nachfolgenden direkten Metallbindeversuchen mit gereinigtem Protein wurde dann bewiesen, dass das Dps Protein Kupfer nicht inkorporieren kann.

Dennoch konnte in *in trans* Komplementationsversuchen der Schutzeffekt des Dps Proteins und seiner nichtbindenden Variante unter Kupferstress untermauert werden.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Dps Protein einen bedeutenden Beitrag zum Schutz der Zellen vor kupferinduziertem Stress leistet, insbesondere bei physiologisch bedeutenden Kupferkonzentrationen. Diese Schutzfunktion beruht nicht auf der Inkorporation von Kupferionen. Der direkte Schutz der DNA ist ein bedeutender Faktor der Schutzfunktion, jedoch nicht der alleinige Grund. Der erhöhte Kupfergehalt in den *dps* Mutanten legt nahe, dass Import- oder Exportprozesse gestört sind.

## **2.3. Etablierung und Validierung des *sandwich hybridization assay* für Messungen aus dem Rohextrakt.**

### **2.3.1. Publikation 3**

Sandwich hybridization for mRNA quantification from crude extracts of *Escherichia coli*: sensitive detection of dynamic changes in transcript levels of the copper response.

# Sandwich Hybridization Assay for Sensitive Detection of Dynamic Changes in mRNA Transcript Levels in Crude *Escherichia coli* Cell Extracts in Response to Copper Ions<sup>∇</sup>

Daniel Thieme,<sup>1,2</sup> Peter Neubauer,<sup>2</sup> Dietrich H. Nies,<sup>1</sup> and Gregor Grass<sup>3\*</sup>

*Institut für Biologie/Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Germany*<sup>1</sup>; *Bioprocess Engineering Laboratory, Department of Process and Environmental Engineering and Biocenter Oulu, University of Oulu, P.O. Box 4300, FI-90014 Oulu, Finland*<sup>2</sup>; and *School of Biological Sciences, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska*<sup>3</sup>

Received 18 June 2008/Accepted 18 October 2008

**Transcript quantification techniques usually rely on purified mRNAs. We report here a solution-based sandwich hybridization assay for the quantification of mRNAs from *Escherichia coli* without the need of prior RNA isolation. This assay makes use of four DNA oligonucleotide probes adjacently hybridizing to target RNA in clarified cell extracts. Two helper probes facilitate the hybridization of a detection and a capture probe. The latter is biotin labeled, allowing binding to streptavidin-coated paramagnetic beads and the separation of the RNA-DNA hybrid from cellular constituents. Added antidigoxigenin Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase bind to the digoxigenin-labeled detection probe, completing the sandwich of the paramagnetic bead, mRNA, probes, and alkaline phosphatase. The target transcript can be quantified by assessing phosphatase activity on a substrate that is converted into a fluorescent product. The amount of target mRNA is calculated from the fluorescence output and from a calibration curve for a known concentration of in vitro-synthesized target mRNA. This technique was used in time course experiments to investigate the expression of three genes responsible for the copper resistance of *E. coli*. The induction of gene expression by copper cations was rapid, but under aerobic conditions, the levels of expression returned to low, prestress levels within minutes. In anaerobiosis, high-level expression continued for at least 1 h. When cultures were shifted from anaerobiosis to aerobiosis, expression levels were diminished within minutes to prestress levels. The improved technique presented here is relatively simple, has very high degrees of sensitivity and robustness, is less laborious than other RNA quantification methods, and is not negatively affected by genomic DNA. These characteristics make it a powerful complementary application to genetic reporter fusions and to reverse transcription-PCR.**

Several methods for the quantification of transcripts in different organisms are available. These techniques differ largely in the amounts of time and expense required for data acquisition. In general, these methods can be grouped into those that target single transcripts and those that target whole transcriptomes. Northern hybridization has the disadvantage of a rather low level of sensitivity, limited quantification potential, and a large time commitment but is comparatively inexpensive. On the other hand, global and quantitative assays like transcriptome microarray analysis call for major investments in equipment and disposables, aside from limitations in view of quantitative data evaluation/expression analysis. For the quantification of single transcripts, reverse transcription (RT)-PCR is currently the method of choice. RT-PCR can be performed as a quantitative or semiquantitative assay depending on whether absolute transcript numbers are required or whether relative expression levels are investigated.

A major drawback of RT-PCR is the necessity of purified high-quality RNA that is virtually free of contaminating DNA. The preparation of such mRNA is in general laborious and

time-consuming. Another negative aspect is that parts of the molecules are lost during the purification process, a problem for low-population mRNA species. All mRNAs together account for ~50% of the synthesized RNA but only 2 to 3% of the total RNA mass (9), whereas rRNA constitutes up to 80% of the total RNA in a cell. Especially challenging is the isolation of mRNA from prokaryotes, which usually lack polyadenylated mRNA, typically present in eukaryotes. While mRNAs in eukaryotes can be selectively separated from other RNA species by affinity chromatography, total RNA from bacteria is usually purified. The further purification of mRNAs requires additional steps and increases the overall costs, as well as the processing time. In addition to the preparation time needed, total-mRNA isolation procedures require the inactivation of ribonucleases and particular attention to rapid sample acquisition. Prokaryotic mRNAs have short half-lives, averaging 6.8 min in *Escherichia coli* (23), prohibiting extensive centrifugation steps for preparation, which may cause partial mRNA degradation and altered gene expression results.

RNA-targeting bead-based sandwich hybridization is becoming more of an established method for the analysis of bacterial rRNAs (8, 11, 14) or for the analysis of dynamic changes in mRNA levels (13, 17, 19, 22). Although sandwich hybridization can be applied for the quantitative detection of rRNAs in crude cell extracts (8, 11), so far the method has been inefficient in detecting mRNA transcripts in crude cell

\* Corresponding author. Mailing address: School of Biological Sciences, Beadle Center, University of Nebraska, Lincoln, 1901 Vine St., Lincoln, NE 68588. Phone: (402) 472-2849. Fax: (402) 472-8722. E-mail: ggrass2@unlnotes.unl.edu.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 24 October 2008.

lysates with good sensitivity and a high degree of robustness (19).

Here, we present an improved solution-based sandwich hybridization (SBSH) method for the rapid quantitative analysis of transcripts in bacteria. With this method, it is possible to measure absolute transcript levels in crude cell extracts without prior mRNA isolation. As proof of principle, we investigated the responses of three *E. coli* genes involved in copper homeostasis to copper ions. High (millimolar) concentrations of copper cations are lethal to *E. coli*. Consequently, specialized mechanisms in this bacterium and in others have evolved to counter the detrimental effects of copper toxicity. *E. coli* possesses three well-characterized copper detoxification systems. The P-type ATPase CopA transports Cu(I) from the cytoplasm to the periplasm at the expense of ATP hydrolysis (20). Periplasmic Cu(I) is detoxified by two independent systems. The proton motive force-driven CusCFBA complex spans the cytoplasmic and outer membranes. Cus-mediated Cu(I) ion efflux into the extracellular space probably originates from the periplasm, not from the cytoplasm (6). The Cus-independent periplasmic multicopper oxidase CueO oxidizes Cu(I) into the less toxic Cu(II) species (15, 24). This enzymatic reaction circumvents excessive Fenton-like reactions and, thus, diminishes oxidative stress.

The *copA* and *cueO* genes are regulated predominantly by CueR in response to rising cytoplasmic copper levels. Apo-CueR binds to nonoptimum  $-35$  and  $-10$  spacing operator structures upstream of *copA* and *cueO* and prevents transcription when copper is low (25). Upon Cu(I) binding, the CueR dimer is converted into an activator, which bends the DNA. Consequently, the spacing between the  $-35$  and  $-10$  sites is optimized and transcription can be initiated (25).

The transcription of *cusCFBA* is regulated by the two-component system CusRS, probably as a result of elevated periplasmic copper concentrations (5). The signal is transduced as a phosphate group by the histidine kinase CusS to the response regulator CusR, which binds to the *cus* operator and facilitates transcription initiation (5, 12).

In contrast to RT-PCR, the improved SBSH method presented here does not require extensive specialized equipment. Running costs are largely limited to standard plasticware, a set of four DNA oligonucleotides, streptavidin-labeled paramagnetic beads, and digoxigenin (DIG) labeling and detection chemicals.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** *E. coli* cells of wild-type strain W3110 or its derivatives were incubated overnight at 37°C on Luria-Bertani (LB) agar plates. For each experiment, a single colony of *E. coli* from an LB agar plate was inoculated into LB broth for 16 h at 37°C with shaking and cultured to stationary growth phase.

For aerobic growth, overnight cultures were diluted 1:20 in 20 ml of fresh LB broth and grown until the optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) reached 1. For anaerobic growth, overnight cultures were diluted 1:150 in 300 ml of fresh LB broth supplemented with 0.5% glucose in a serum bottle and grown at 37°C until the  $OD_{600}$  reached 0.3. Samples were taken and the exact cell density was determined before the addition of  $CuCl_2$  (at time zero) and, after that, at the time points indicated in the figures. Cultures were mixed with ice-cold stop solution (5% [vol/vol] phenol–95% [vol/vol] ethanol at a final concentration of 10%, precooled at  $-20^\circ C$ ) to inhibit all cellular functions, including RNA degradation. The mixtures were centrifuged for 5 min at  $20,800 \times g$  and  $4^\circ C$ , and the supernatant was discarded. Pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at

$-20^\circ C$ . RNase inhibitors such as RNALater (Ambion, Austin, TX) were not used since they did not significantly improve the overall performance of the assay.

**Generation of in vitro-synthesized mRNA for calibration curves.** For the quantification of cellular mRNAs, reference transcripts were generated in vitro using phage T7 RNA polymerase. An internal fragment of about 500 bp of the target gene was PCR amplified, and a T7 RNA promoter sequence was introduced at the 5' end of the truncated gene (Table 1). The PCR product was column purified by using a QIAquick kit (Qiagen, Hilden, Germany) and eluted with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. For mRNA synthesis, the PCR product was transcribed in vitro with T7 RNA polymerase by using a MAXiScript T7 kit according to the instructions of the manufacturer (Ambion, Austin, TX). The quality of in vitro-generated RNA transcripts was checked on a denaturing urea polyacrylamide gel, the concentration was determined using the Quant-IT RiboGreen RNA assay kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and aliquots (5  $\mu$ l) were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^\circ C$  until further use.

**Determination of RNA concentrations.** For the quantification of mRNAs in samples, in vitro-generated mRNA was always measured in parallel in triplicate (see below). In order to determine the concentration of the in vitro-generated mRNA, the Quant-IT RiboGreen RNA assay was performed according to the instructions of the assay kit manufacturer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The kit was originally developed for cuvette-sized samples. Therefore, volumes were recalculated for use with 96-well plates. A calibration curve from dilutions of *E. coli* rRNA (100 mg/ml) as part of the kit was used as a standard. Fluorescence was measured in a microplate reader (Infinite M200; Tecan, Crailsheim, Germany) at an excitation  $\lambda$  of 480 nm and an emission  $\lambda$  of 525 nm. As a basis to calculate the concentrations of specific mRNAs, the number of transcripts was calculated from the relation of the  $OD_{600}$  to the cell number, where an  $OD_{600}$  of 1 was equal to  $6 \times 10^8$  cells per ml (18). The molar concentrations of transcripts, based on the in vitro standards, could thus be directly calculated as the numbers of molecules per cell.

**Probe design and labeling of oligonucleotides.** Probes (Table 1) were designed using the CloneManager5 program (Scientific & Educational Software, Cary, NC) followed by an NCBI BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (1) against the *E. coli* genome to exclude alignments with any other gene within *E. coli*, as described in reference 13. Probes hybridized to a continuous stretch within the target transcript and had a melting temperature of approximately  $60^\circ C$ , with a 1-nucleotide gap between each probe. A melting temperature of  $60^\circ C$  for the probes enables a subsequent hybridization step at  $50^\circ C$ , a temperature at which chromosomal DNA in its double-stranded form will be inaccessible to the probes. Figure 1 indicates the overall architecture of the probes with their labels and the order in which they hybridized to a target transcript.

Helper probes remained unlabeled. The use of helper probes alongside capture and detection probes increases the hybridization efficiency in sandwich hybridization by 15- to 40-fold as demonstrated previously (2). Detection probes were generated by 3' end labeling of oligonucleotides by using a second-generation DIG oligonucleotide 3'-end-labeling kit according to the instructions of the manufacturer (Roche, Mannheim, Germany). Labeled detection probes were resuspended in DEPC-treated water. Lyophilized 5'-end-biotin-labeled capture probes were purchased from a commercial manufacturer (Metabion, Martinsried, Germany). Labeled capture probes were resuspended in DEPC-treated water.

**SBSH assay.** For transcript quantification, the original sandwich hybridization assay (13, 19) was modified and optimized for bacterial transcripts. The frozen cell pellet was resuspended in ice-cold TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0) containing 10% stop solution and sonicated for 3 s at 60 W and 20 kHz with a Desintegrator GM 60 HD device (Uni Equip, Martinsried, Germany). The lysate was centrifuged for 3 min at  $20,800 \times g$  and  $4^\circ C$ . For each replicate ( $n = 3$ ), 20  $\mu$ l of the cleared supernatant was used for subsequent steps.

For hybridization buffer II, a master mix was generated. The master mix contained (per 90- $\mu$ l sample) 86  $\mu$ l of hybridization buffer I (5 $\times$  SSC [1 $\times$  SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate], 20% [vol/vol] formamide, 3% [wt/vol] dextran sulfate, 0.2% [vol/vol] Tween 20, 0.02% [vol/vol] Ficoll 400, 0.02% [wt/vol] polyvinylpyrrolidone, and 1% [vol/vol] blocking reagent [Roche, Mannheim, Germany] in 100 mM maleic acid with 150 mM NaCl [pH 7.5], all mixed in DEPC-treated water), 1  $\mu$ l of a 1-pmol/ $\mu$ l concentration of each helper probe, 1  $\mu$ l of a 0.05-pmol/ $\mu$ l concentration of a DIG-labeled detection probe, and 1  $\mu$ l of a 5-pmol/ $\mu$ l concentration of a biotin-labeled capture probe. As a negative control, a preparation of hybridization buffer II containing a mismatched capture probe that would hybridize not to the target but to another transcript was set up.

A volume of 90  $\mu$ l of hybridization buffer II was aliquoted into transparent

TABLE 1. Oligonucleotides used in this study

| Oligonucleotide    | Target gene | Function                   | Sequence <sup>a</sup> (5'→3')                           |
|--------------------|-------------|----------------------------|---|
| <b>Probes</b>      |             |                            |   |
| 692 copA h1        | <i>copA</i> | Helper                     | ACCATCACTGCCAGGGTTATC                                   |
| 671 copA BIO       | <i>copA</i> | Capture                    | AGGCCGATAACCAACCACAGG                                   |
| 650 copA DIG       | <i>copA</i> | Detection                  | CTGCGGTTGTGTCAGCGGTGAC                                  |
| 630 copA h2        | <i>copA</i> | Helper                     | CATCATGTTATCGCCGATC                                     |
| 678 cueO h1        | <i>cueO</i> | Helper                     | GGCAGCGTGTTCGGGGTA                                      |
| 660 cueO BIO       | <i>cueO</i> | Capture                    | GATTGCACCGTTGGTCAGC                                     |
| 641 cueO DIG       | <i>cueO</i> | Detection                  | AACGTATCGCCAAACCAGC                                     |
| 622 cueO h2        | <i>cueO</i> | Helper                     | CCACGGCGCGGTCATC  |
| 266 cusA help1     | <i>cusA</i> | Helper                     | CCAAACTGTGAGAAACCGCG                                    |
| 246 cusA BIO       | <i>cusA</i> | Capture                    | CACAGTCTTCGCGCCAGGC                                     |
| 227 cusA DIG       | <i>cusA</i> | Detection                  | ACCGACAACATGGTGGTGG                                     |
| 208 cusA help2     | <i>cusA</i> | Helper                     | TTAGCGGATAAGTCACCTGAT                                   |
| 216 rpoZ H1        | <i>rpoZ</i> | Helper                     | CTGTTCTCGCGTTCGCG                                       |
| 195 rpoZ BIO       | <i>rpoZ</i> | Capture                    | GTCGAGGATCTGGTTGTTGA                                    |
| 174 rpoZ DIG       | <i>rpoZ</i> | Detection                  | CAGACCTTCTCGATTTCGC                                     |
| 153 rpoZ h2        | <i>rpoZ</i> | Helper                     | CAGCGGATTACAGTGGTTT                                     |
| <b>PCR primers</b> |             |                            |   |
| 165 copA T7 newD   | <i>copA</i> | T7 promoter forward primer | <u>CTAATACGACTCACTATAGGG</u> GAGATCACAGCCAGTCAAACCTGTC  |
| 852 copA U         | <i>copA</i> | Reverse primer             | AAGATGTCGCGCTCCCATCGG                                   |
| 106 cusA T7newD    | <i>cusA</i> | T7 promoter forward primer | <u>CTAATACGACTCACTATAGGG</u> GGCCTGTTCTCGATTGATTCC      |
| 449 cusA U         | <i>cusA</i> | Reverse primer             | TTACCGCTGCGATCCACCAGT                                   |
| 113 cueO T7newD    | <i>cueO</i> | T7 promoter forward primer | <u>CTAATACGACTCACTATAGGG</u> TGTGTCTGCGCTTGACCTTC       |
| 1352 cueO U        | <i>cueO</i> | Reverse primer             | TGCGTGCCTGGATATGGAAC                                    |
| 9 rpoZ T7 D        | <i>rpoZ</i> | T7 promoter forward primer | <u>GAAATTAATACGACTCACTATAGG</u> GAACGTAAGTGTTCAGGACGCTG |
| 270 rpoZ U         | <i>rpoZ</i> | Reverse primer             | ACGACGACCTTCAGCAATAG                                    |

<sup>a</sup> Underlining indicates the T7 polymerase promoter sequence.

96-well plates with round bottoms (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). The plates were incubated for 5 min at 50°C with shaking at 900 rpm by a DTS-2 shaker (Neolab, Heidelberg, Germany), and 20-µl aliquots of clarified supernatant (two parallels) or in vitro-generated RNA for a calibration curve (three parallels) were added. As a positive control, a known amount of in vitro-generated mRNA can be mixed with clarified supernatant from a strain with a deletion of the target gene and the mixture can be added to hybridization buffer II.

A calibration curve was established by diluting in vitro-generated RNA at

several concentrations in triplicate. The hybridization of the DNA probes with the mRNA was carried out for 30 min at 50°C with shaking (900 rpm).

The immobilization of RNA-DNA hybrids was accomplished by using streptavidin-coated magnetic beads (streptavidin MagnaSphere paramagnetic particles; Promega, Mannheim, Germany). Prior to use, the bead solution was transferred into a 1.5-ml plastic tube, the tube was fixed to a MagnaSphere magnetic separation stand, and the beads were washed three times with 5× SSC and resuspended in 5× SSC to the original bead volume. Aliquots of 15 µl of the washed-bead solution were added to the hybridization wells, and the RNA-DNA hybrids were immobilized for 30 min at 50°C with shaking (900 rpm). After the immobilization of the hybrids, the microwell plate was mounted onto a MagnaBot 96 magnetic separation device (Promega, Mannheim, Germany) and the magnetic beads were allowed to collect on the bottoms of the wells for 1 min. The supernatant was discarded by pipetting, and wash solution (1× SSC-0.01% sodium dodecyl sulfate in DEPC-treated water) was added. The beads were washed for 2 min at 50°C with shaking (900 rpm). Washing was repeated twice at 30°C, and the final supernatant was carefully removed.

For sandwich generation, 100 µl of a conjugate solution (1× SSC, 0.1% [vol/vol] Tween 20, 1:10,000 anti-DIG Fab fragment-alkaline phosphatase conjugate [Roche, Mannheim, Germany]) was added to each well and the plate was incubated for 30 min at 30°C with shaking (900 rpm). The samples were washed three times with 120 µl of wash buffer at 30°C each time by using the MagnaBot, and the final supernatants were carefully removed.

For signal detection, 100 µl of the substrate BBTP [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole phosphate; AttoPhos] from the AttoPhosAP fluorescent substrate system (Promega, Mannheim, Germany) was added to each well and the plate was incubated for 20 min at 37°C with shaking (900 rpm). For the complete resuspension of the magnetic beads, shaking was started at 1,300 rpm for about 5 s. For the separation of the magnetic beads, the well plate was mounted onto the MagnaBot device for 1 min. A volume of 90 µl of the reaction mixture was transferred into new black flat-bottom microwell plates (Nunc, Wiesbaden, Germany). Substrate turnover to inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) and the fluorescent product BBT [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole] (21) was measured as a fluorescence signal (excitation λ, 430 nm; emission λ, 560 nm) in a microplate reader (Infinite M200; Tecan, Crailsheim, Germany). The concentrations of specific transcripts were calculated from a calibration curve derived from in vitro-generated target mRNA as described above.

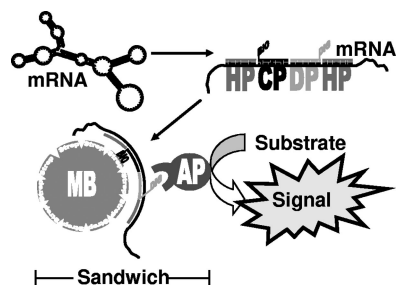


FIG. 1. Schematic representation of the SBSH assay. Four DNA oligonucleotide probes hybridizing to a target transcript are added to cleared cell lysate. The tertiary structure of the target mRNA is disrupted upon the binding of two helper probes (HP), a capture probe (CP), and a detection probe (DP). The capture probe is 5' end labeled with biotin (BIO), allowing specific binding to streptavidin (Strep)-coated paramagnetic beads. After the beads are washed, only the captured target mRNA remains bound to the beads. Added anti-DIG Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase (AP) bind to 3'-end-DIG-labeled detection probes, completing the sandwich of the paramagnetic bead (MB), mRNA, probes, and alkaline phosphatase. The amount of target mRNA can be calculated from the signal output generated by phosphatase activity and from a calibration curve for in vitro-synthesized target mRNA.



**RNA isolation and RT-PCR.** Total RNA from frozen cell pellets was extracted with the NucleoSpin RNA/protein kit by following the protocol of the manufacturer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for bacteria but omitting incubation with lysozyme to avoid RNA degradation. The synthesis of cDNA was performed with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and gene-specific primers 630 *copA* h2 and 153 *rpoZ* h2. The reaction mix contained the following: 1.5 µg of RNA, 2 pmol of primers, 2.5 mM (each) deoxynucleoside triphosphates, and 1 µl of polymerase in a 10-µl total volume. RT was carried out for 50 min at 42°C. PCR amplification of cDNAs was done with primers 165 *copA* T7 newD and 630 *copA* h2 for *copA* as well as with 9 *rpoZ* T7 D and 153 *rpoZ* h2 for *rpoZ* in a single reaction with 30 cycles. The PCR mix contained 1 µl of cDNA (diluted 1:10), 10 pmol of primers, 2.5 mM (each) deoxynucleoside triphosphates, and 1 µl of *Taq* polymerase (1 U/µl; Roche, Mannheim, Germany) in a total volume of 50 µl. PCR products were run on a 2% agarose gel and visualized using ethidium bromide. RNA isolation from independent cultures and RT were performed twice on different days, with similar results.

## RESULTS AND DISCUSSION

Sandwich hybridization methods have incorporated several major improvements within the last couple of years. The addition of helper probes facilitates the hybridization of capture and detection probes to target RNAs, resulting in greater sensitivity of the assay (2). This higher degree of sensitivity is probably owed to the helpers' assistance in opening up the secondary structure around the target where the probe is to bind. Additionally, there is an effect of base stacking between two adjacent terminal nucleotides from two oligonucleotides hybridizing next to each other (2). The shift away from bead-based sandwich hybridization toward SBSH has resulted in greater sensitivity of the assay and has facilitated liquid handling (17, 19). Here, we present a next level in the improvement of the SBSH method, demonstrating the usefulness of this approach in direct quantification of low-population mRNA transcripts in crude cell extract samples without prior RNA separation (Fig. 1). The rationale behind this strategy is the property of a single-stranded oligonucleotide of hybridizing to complementary single-stranded mRNA but not to the double-stranded DNA of the bacterial chromosome. This pattern makes direct measurements of mRNA transcripts possible even in the presence of double-stranded DNA and a large amount of other cell material.

The addition of a biotin-labeled capture probe, a DIG-labeled detection probe, and two helper probes results in extensive DNA-RNA heteroduplexes, in which all four probes hybridize to a continuous stretch of the target mRNA (Fig. 1). In the SBSH assay, the number of transcripts of a given specific mRNA species is proportional to an enzymatically generated output signal. Alkaline phosphatase and the substrate BBTP were used in this study. BBTP is cleaved into  $P_i$  and the fluorescent product BBT (21).

Previously, SBSH was used to quantify a single mRNA from *Saccharomyces cerevisiae*. However, this SUC2 mRNA is highly abundant in *S. cerevisiae*. The hybridization assay was not very sensitive and had only a low degree of robustness (8, 11, 14). Major challenges to address before the usefulness of SBSH could be extended to low-abundance transcripts were high background levels of fluorescence in the fluorescence substrate reaction and the aggregation of the beads. Several cell lysis methods (sonication, the use of a French press or bead mill, and chemical and enzymatic cell lysis) were compared. Sonication was found to be superior to the others, because of its ease and handling speed. A short sonication pulse was suffi-

cient to disrupt the cells. Disruption efficiency was high, as sonicated cell lysates failed to yield any CFU after plating (data not shown).

High concentrations of detergent as in the original assay (8, 11, 14) were found not only to hamper sonication but also to lead to clumping of the magnetic beads. Lower detergent concentrations in buffers prevented bead aggregation and also facilitated the resuspension of the beads and diminished sticking of the beads to plastic surfaces during the assay. By solving the aggregation problem, the low signal-to-background ratio was also successfully countered, enabling the detection of low-abundance transcript species. Finally, the addition of blocking reagent strongly reduced the background fluorescence levels to very low values. With a combination of these improvements, a detection limit of below 1 fmol of RNA per well for crude extracts was reached, corresponding to approximately 3 to 5 transcripts/cell.

Previously, it was demonstrated that the transcription of all three copper resistance systems of *E. coli* responds specifically to copper and silver ions. However, the majority of earlier studies investigated concentration-dependent responses only (4, 12, 16, 25). In a single study, S1 nuclease mapping with purified total RNA was used to monitor copper-dependent gene expression 0, 5, 10, and 30 min after copper exposure (26). However, with SBSH, a time course profile of *copA*, *cueO*, and *cusA* expression can be plotted. Thus, it is easily possible to follow changes in expression patterns mediated by copper stress dynamically (Fig. 2). The expression of *copA* and *cueO* responded very rapidly to the addition of 1 mM  $CuCl_2$ . Within 1 min, a 28- or 4-fold induction of *copA* or *cueO* expression, respectively, was observed, and after 2 to 3 min, already a maximum induction of 53- or 10-fold was obtained. The quantity of *copA* transcripts was calculated to be 334/cell, and that of *cueO* transcripts was calculated to be 180/cell. Soon after the maximum induction, the quantities of *copA* and *cueO* transcripts declined. After only 15 min, a transcription level approximately the same as that before induction was reached (Fig. 2 A and B). Additional RT-PCR analysis of *copA* expression from purified and reverse-transcribed RNA at 0, 3, and 20 min confirmed that a rapid increase in transcript numbers occurred before a preinduction level was reestablished (Fig. 2 A, inset). The expression of *cus* commenced somewhat more slowly than that of *cueO* or *copA*. After 3 min, only a mild induction was observed. Induction progressed rapidly from that point on before reaching the maximum (sixfold induction, yielding 8 transcript copies/cell) after 15 min. A stable low level of *cus* expression, approximately the same as that in the pre-stress situation, was established after 30 min (Fig. 2C).

The differences in the induction of the *cue* regulon (*copA* and *cueO*) and the *cus* operon are probably due to their different regulation modes. Apo-CueR is a repressor protein binding to the operator regions upstream of *cueO* and *copA* (25). As soon as copper is bound, CueR turns into an activator and gene expression can immediately commence. Therefore, the observed increase in transcripts equals the rate of biosynthesis. In contrast, *cus* is regulated by a two-component system (5, 12). Upon sensing periplasmic copper through its sensor domain, the histidine kinase CusS must first autophosphorylate and then the histidine-bound phosphoryl group from P-CusS must be passed to the conserved aspartate residue in the re-

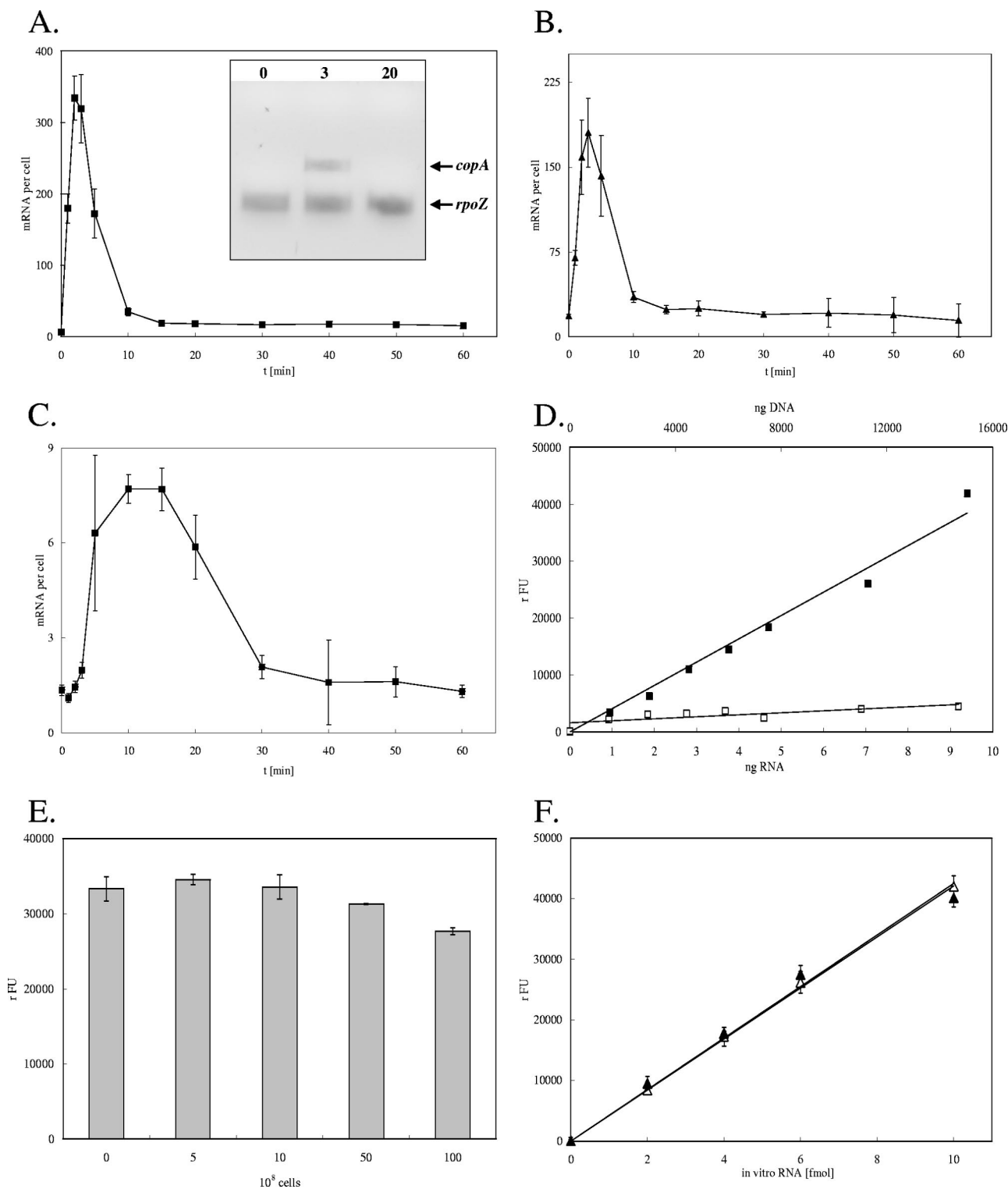


FIG. 2. Time-dependent profile of the induction of copper homeostasis genes of *E. coli* by copper. (A to C) *E. coli* strain W3110 grown aerobically to mid-log phase was challenged with 1 mM CuCl<sub>2</sub> (at time [t] zero), and the concentrations of mRNA transcripts of the genes *copA* (A), *cueO* (B), and *cusA* (C) (expressed as signal-giving units per cell) in samples at several time points were determined by SBSH. For comparison, a gel-based RT-PCR analysis of *copA* transcripts and those of the copper-independent housekeeping gene *rpoZ* at 0, 3, and 20 min after copper challenge is presented (inset in panel A). (D) As controls, calibration curves from in vitro-generated *copA* mRNA mixed with *copA* DNA (PCR product) (■) or DNA alone (□) were generated. The signal strength is indicated as relative fluorescence units (rFU). (E and F) As additional controls, crude extracts derived from increasing numbers of cells with the deletion of *cueO* as the target gene, all assayed with 8 fmol of in vitro-generated *cueO* mRNA and *cueO* probes (gray columns) (E), and crude extracts of cells with the deletion of *cueO* (▲) or buffer (△) spiked with increasing concentrations of in vitro-generated *cueO* transcripts (F) were also investigated. Shown are averages with standard deviations (error bars) of results for at least three independent cultures with three SBSH replicates each.

ceiver domain of the response regulator CusR. Only then, P-CusR diffuses and binds to a sequence upstream of the *cusCFBA* genes, allowing their expression. The slightly delayed response observed (Fig. 2C) most probably reflects the multiple steps of the sophisticated *cus* system. Alternatively, different copper concentrations within the compartments of the cell after the onset of copper stress reflect the different expression patterns. The cytoplasm may be the compartment that fills first with copper until a critical level is exceeded, leading to the expression of *copA* and *cueO*. Then the metal is relocated to the periplasm by CopA, and CueO oxidizes Cu(I). Finally, *cus* is expressed when the copper level in the periplasm has begun to exceed some critical periplasmic threshold.

Overall, the results suggested that the response to copper stress was fast and vigorous but that within minutes, further transcription initiation quickly diminished. Probably, a new stable balance of the cytoplasmic and periplasmic copper concentrations for which the number of copper detoxification systems was then sufficient was reached. Additionally, the rapid decline in transcript numbers after the initial copper shock suggested that mRNAs of copper detoxification systems are rather unstable. This observation strongly correlates with values reported in the literature for the average half-life of bacterial transcripts of about 6.8 min (23).

As a control, the SBSH assay was performed with increasing concentrations of a nontranscribed *copA* PCR product (Fig. 2D). This procedure demonstrated that no significant signal was generated with DNA but that a proportional signal increase was observed with in vitro-synthesized *copA* transcripts (Fig. 2D). Further control experiments using increasing numbers of cells with the deletion of an SBSH assay target gene, *copA*, *cueO*, or *cusA*, indicated that other cellular components interfered with the assay only when cell numbers above those for the standard assay were used (Fig. 2E; data for *cueO* are shown). Moreover, spiking crude cell extracts (from a strain with the deletion of a target gene) with target mRNA gave results very similar to those obtained when the same amount of target mRNA in a buffer was measured (Fig. 2F). The results presented in Fig. 2 are in good agreement with the results of S1 nuclease mapping with purified total RNA to monitor copper-dependent gene expression (26).

To investigate the response of previously preadapted cells to high-copper stress, the above-described experiment was repeated with an initial stress of only 0.1 mM CuCl<sub>2</sub> for 20 min to provide time for the expression of the copper resistance systems. As expected, the maximum transcription levels were lower than those at 1 mM CuCl<sub>2</sub> while the overall expression pattern was very similar (Fig. 3). At 20 min, a second, strong stress pulse was provided by the addition of 1 mM CuCl<sub>2</sub>. The preadapted cells responded with a much smaller increase in transcription than that in naïve cultures when 1 mM CuCl<sub>2</sub> was added (Fig. 2), probably because the copper defense proteins persisted and less de novo synthesis was required for the response to the second challenge. Under these conditions, however, cells needed a longer time to adapt to the copper stress and the transcript concentration decreased again. Vice versa, when cells were first shocked with 1 mM CuCl<sub>2</sub> and after 20 min with 0.1 mM CuCl<sub>2</sub>, no additional expression maximum was observed and expression patterns were very similar to those after a 1 mM CuCl<sub>2</sub> shock only (data not shown).

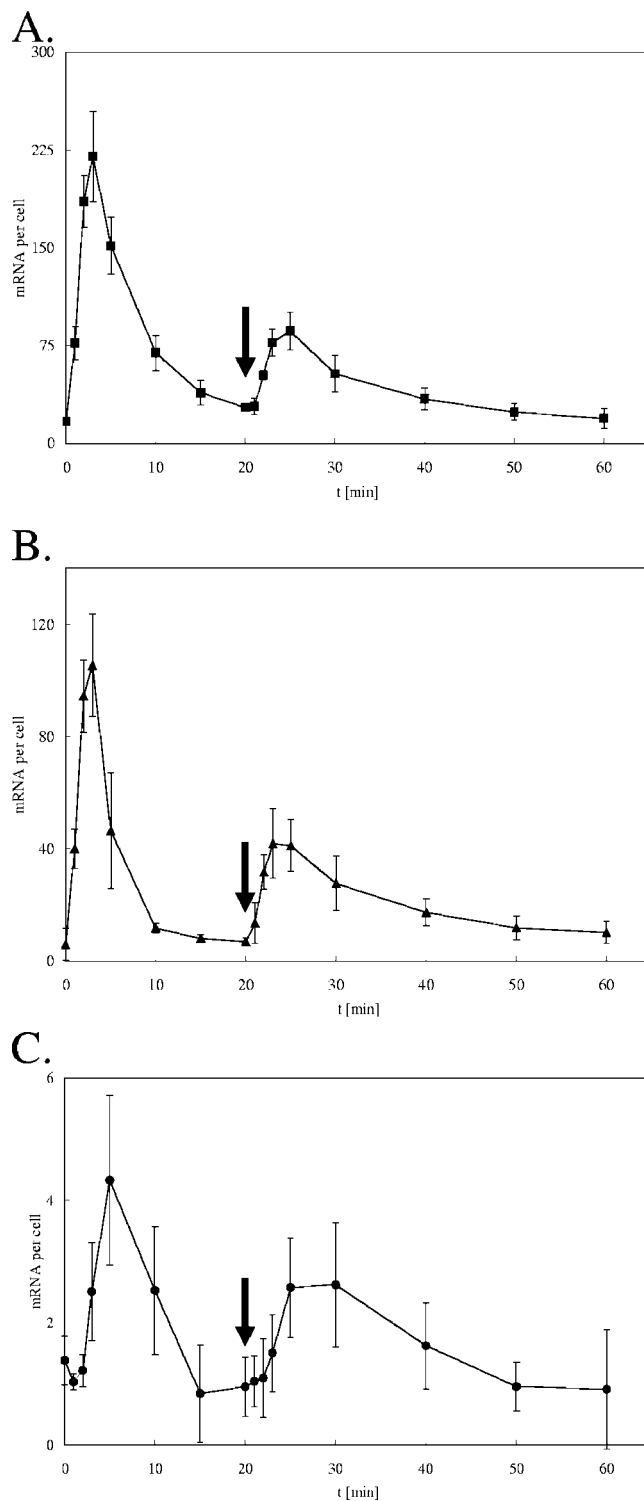


FIG. 3. Induction profile of copper homeostasis genes upon repeated copper challenge. *E. coli* strain W3110 grown aerobically to mid-log phase was challenged with 0.1 mM CuCl<sub>2</sub> (at time  $t$  zero) and again with 1 mM CuCl<sub>2</sub> (at 20 min; arrows). The concentrations of mRNA transcripts of the genes *copA* (A), *cueO* (B), and *cusA* (C) (expressed as signal-giving units per cell) in samples at several time points were determined by SBSH. Shown are averages with standard deviations (error bars) of results for at least three independent cultures with three SBSH replicates each.

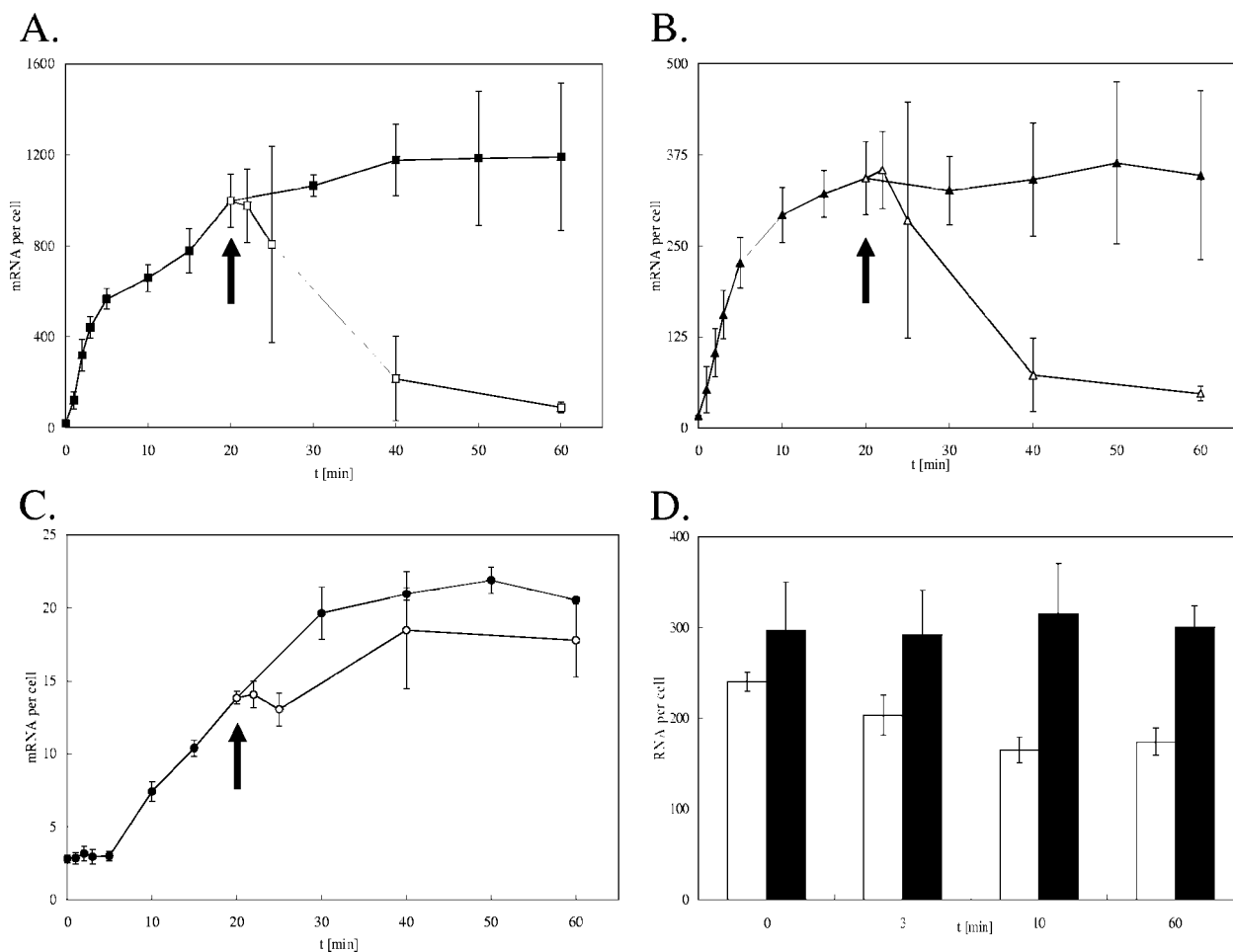


FIG. 4. Profile of the expression of copper homeostasis genes in response to copper under anaerobic growth conditions and upon reoxygenation. *E. coli* strain W3110 grown anaerobically to mid-log phase in Hungate tubes was challenged with 1 mM  $\text{CuCl}_2$  (at time  $[t]$  zero). Cultures were transferred into Erlenmeyer flasks (at 20 min; arrows) and shaken aerobically. (A, B, and C) The concentrations of mRNA transcripts of the genes *copA* (A), *cueO* (B), and *cusA* (C) (expressed as signal-giving units per cell) in samples at several time points before and after the aerobic shift (arrows) were determined by SBSH. (D) As a control, an analysis of the expression of a copper-independent housekeeping gene, *rpoZ*, under aerobic (black columns) and anaerobic (white columns) conditions was also performed. Shown are averages with standard deviations (error bars) of results for at least three independent cultures with three SBSH replicates each.

Previously, it was observed that during anaerobiosis cells contain more copper than they do when oxygen is present (15). Copper stress dose-response experiments yielded different expression patterns for *cus*, *cueO*, and *copA* under aerobic and anaerobic conditions (15). Under anaerobic conditions, Cu(I) is the predominant species of copper cation and Cu(I) is more toxic than Cu(II) (3, 15). Consequently, the expression of *cus*, *cueO*, and *copA* during anaerobiosis was different from that during aerobiosis. Under anaerobic conditions, maximum *cus* expression was reached at lower copper concentrations than those required under aerobic conditions and maximum *cueO* expression was reached at higher copper concentrations, while *copA* expression was largely unaltered (15).

Time course experiments for *cus*, *cueO*, and *copA* expression under anaerobic conditions resulted in expression patterns completely different from those observed when oxygen was present (Fig. 4). The expression of all three target genes increased continuously and reached a maximum after 40 min (*copA*) (Fig. 4A), 20 min (*cueO*) (Fig. 4B), or 50 min (*cus*) (Fig.

4C). The transcription of *copA* and *cueO* started immediately after copper addition, whereas that of *cus* was a few minutes delayed, similar to what was observed in the presence of oxygen (Fig. 2 and 3). In stark contrast to the results under aerobic conditions, no decline in the transcription of any copper homeostasis gene within the time course of 60 min was observed. This finding may reflect the different toxicities of Cu(I) and Cu(II) for the cell. It was suggested earlier that copper as Cu(I) enters the cytoplasm nonspecifically by way of sodium or potassium channels (15). Probably, this mechanism leads to an extension of the time compared to that for Cu(II) before a new stable copper concentration within the cell is established. This pattern also indicates that the steady-state cytoplasmic copper concentration during anaerobiosis is higher than that during aerobiosis.

To explore the possibility that Cu(I) cannot be successfully prevented from entering the cell, copper homeostasis gene expression following a shift from anaerobic to aerobic growth conditions was investigated. As expected, when cultures were

reoxygenated after 20 min of copper exposure under anaerobic conditions, the expression of *copA* and *cueO* decreased by 90 and 87%, respectively, within the next 40 min (Fig. 4A and B). In contrast, the expression of *cusA* continued at a level similar to that under anaerobic growth conditions and showed only a mild but fast 14% decrease (Fig. 4C). This result may be best explained if the mechanisms of the respective regulators of the independent *cue* and *cus* systems are considered. CueR regulates *copA* and *cueO* expression in response to changes in cytoplasmic copper concentrations (16, 25). The expression of *cus* is governed by a sensor within CusS that is most likely located on the periplasmic side of the cytoplasmic membrane (12). In our study, the transcription of *cueO* responded immediately to a shift to aerobiosis by downregulation. This finding suggests that the copper concentration within the cytoplasm had reached a nontoxic level through the action of CopA, making further expression of the *cue* operon dispensable.

As a control to monitor the degree to which copper stress altered general gene expression under the conditions tested, the expression of a constitutively expressed housekeeping gene, *rpoZ*, was also investigated. Figure 4D clearly shows that the expression of *rpoZ* remained relatively constant upon aerobic copper stress. Under anaerobic conditions, a slight decrease in *rpoZ* transcript abundance during the first 10 min after copper shock was observed. This result may reflect the higher toxicity of copper during anaerobiosis than during aerobiosis, which is also corroborated by the overall increase in the expression of all copper detoxification systems. Both *copA* and *cueO*, as well as *cus* to a lower degree, were well-expressed after the first 10 min post-copper stress.

For a deeper understanding of copper toxicity in *E. coli*, the differences in the gene induction patterns in aerobiosis and anaerobiosis should be further addressed in future studies. It would be especially interesting to investigate the molecular background of the downregulation of *copA* and *cueO* in the presence of oxygen but not under anaerobic copper stress conditions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the DFG graduate college "Stress" program and European Union structural funds within the "Bloworld I" project.

#### REFERENCES

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
- Barken, K. B., M. Gabig-Ciminska, A. Holmgren, and S. Molin. 2004. Effect of unlabeled helper probes on detection of an RNA target by bead-based sandwich hybridization. *BioTechniques* **36**:124–132.
- Beswick, P. H., G. H. Hall, A. J. Hook, K. Little, D. C. McBrien, and K. A. Lott. 1976. Copper toxicity: evidence for the conversion of cupric to cuprous copper in vivo under anaerobic conditions. *Chem.-Biol. Interact.* **14**:347–356.
- 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.
- 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.
- Grass, G., and C. Rensing. 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145–2147.
- Reference deleted.
- Huhtamella, S., M. Leinonen, T. Nieminen, B. Fahnert, L. Myllykoski, A. Breitenstein, and P. Neubauer. 2007. RNA-based sandwich hybridisation method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. *J. Microbiol. Methods* **68**:543–553.
- Kennell, D. 1968. Titration of the gene sites on DNA by DNA-RNA hybridization. II. The *Escherichia coli* chromosome. *J. Mol. Biol.* **34**:85–103.
- Reference deleted.
- Leskelä, T., A. Tilsala-Timisjärvi, J. Kusnetsov, P. Neubauer, and A. Breitenstein. 2005. Sensitive genus-specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay. *J. Microbiol. Methods* **62**:167–179.
- 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.
- Neubauer, A., J. Soini, M. Bollok, M. Zenker, J. Sandqvist, J. Myllyharju, and P. Neubauer. 2007. Fermentation process for tetrameric human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*: improvement by gene optimisation of the PDI/beta subunit and repeated addition of the inducer anhydrotetracycline. *J. Biotechnol.* **128**:308–321.
- Nieminen, T., J. Pakarinen, I. Tsitko, M. Salkinoja-Salonen, A. Breitenstein, T. Ali-Vehmas, and P. Neubauer. 2006. 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *J. Microbiol. Methods* **67**:44–55.
- 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.
- Outten, F. W., C. E. Outten, J. Hale, and T. V. O'Halloran. 2000. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. *J. Biol. Chem.* **275**:31024–31029.
- Pioch, D., B. Jürgen, S. Evers, K. H. Maurer, M. Hecker, and T. Schweder. 2008. Improved sandwich-hybridization assay for an electrical DNA-chip-based monitoring of bioprocess-relevant marker genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**:719–728.
- Piovan, M., and C. Lazdunski. 1975. Different cyclic adenosine 3',5'-monophosphate requirements for induction of beta-galactosidase and tryptophanase. Effect of osmotic pressure on intracellular cyclic adenosine 3,5-monophosphate concentrations. *Biochemistry* **14**:1821–1825.
- Rautio, J., K. B. Barken, J. Lahdenperä, A. Breitenstein, S. Molin, and P. Neubauer. 2003. Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates. *Microb. Cell Fact.* **2**:4.
- 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. USA* **97**:652–656.
- Resina, D., M. Bollok, N. K. Khatri, F. Valero, P. Neubauer, and P. Ferrer. 2007. Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction. *Microb. Cell Fact.* **6**:21.
- Ruottinen, M., M. Bollok, M. Kögler, A. Neubauer, M. Krause, E. R. Hämmäläinen, J. Myllyharju, A. Vasala, and P. Neubauer. 2008. Improved production of human type II procollagen in the yeast *Pichia pastoris* in shake flasks by a wireless-controlled fed-batch system. *BMC Biotechnol.* **8**:33.
- Selinger, D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church, and C. Rosenow. 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* **13**:216–223.
- 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.
- Stoyanov, J. V., J. L. Hobman, and N. L. Brown. 2001. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol. Microbiol.* **39**:502–511.
- Yamamoto, K., and A. Ishihama. 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* **56**:215–227.

### 2.3.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Publikation wurde eine neue Variante des *sandwich hybridization assay* entwickelt und validiert. Im Gegensatz zu den etablierten Methoden der Transkriptionsanalyse sollte hier eine Messung von Transkripten ohne vorherige RNA Extraktion und Reinigung ermöglicht werden. Dies gelang mittels verschiedener Modifikationen des ursprünglichen Protokolls.

Mit der derart veränderten Methodik war es möglich eine Kinetik der Transkriptionsereignisse der Kupferhomöostasegene von *copA*, *cueO* und *cusA* zu erstellen. Die Gene *copA* und *cueO* wurden nahezu sofort mit der Zugabe von Kupfer zum Medium verstärkt expremiert und erreichten nach 3 min ein Maximum. Dabei zeigte *copA* einer über 50fache und *cueO* eine 10fache Steigerung, verglichen zum Zustand vor der Zugabe von Kupfer. Nach 15-20 Minuten erreichten beide Transkriptionslevel wieder Vorinduktionsniveau. Im Gegensatz dazu ist die Induktionskinetik von *cusA* verzögert. Nach einer 2-3 minütigen lag-Phase erreicht das Transkriptionsniveau erst nach 10 min sein Maximum und das lag auch nur beim 4-5 fachen des Ausgangsniveaus. Auch die *cusA* Transkription geht nach dem Maximum auf Ausgangsniveau zurück, jedoch ist der Abfall der Transkriptmenge verzögert und erreicht erst nach 30-40 Minuten wieder Vorinduktionsniveau.

Zur Validierung der erhaltenen Daten wurden Messungen durchgeführt, welche zeigten, dass selbst grosse Mengen DNA des Zieltranskriptes kein falsch-positives Signal generierte und dass das Rohextrakt die Messung nicht beeinflusst.

In weiteren Versuchen wurde die Reaktion von preadaptierten Zellen untersucht. Zwanzig Minuten nach der Zugabe von 0,1 mMol  $\text{CuCl}_2$  wurde ein weiteres Mal Kupfer zugegeben, diesmal 1 mMol. Der zweite Induktionspeak war im Vergleich zum ersten geringer und zeitlich verzögert. Insgesamt war das sekundäre Transkriptionsereignis geringer als die primäre Reaktion.

Weitere Versuche sollten den Einfluss von Sauerstoff auf die Transkriptionsaktivität zeigen. Auch unter anaeroben Bedingungen erfolgte eine rasche Transkriptionsaktivierung der Gene von *copA* und *cueO*, während *cusA* wiederum verzögert reagierte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter aeroben Bedingungen kam es jedoch nicht zu einer Verringerung der Transkriptmenge. Alle Transkriptmengen erreichten nach ca. 30 min das Maximum und verblieben auf diesem Niveau bis zum Ende der Messreihe nach 1 h. Wurden diese Kulturen reoxygeniert traten bei den Genen *copA* und *cueO* sofort wieder die bekannte Verminderung der Transkriptzahlen ein. Nach 20 Minuten unter wieder aeroben Bedingungen erreichten diese Transkriptmengen wieder Vorinduktionsniveau. Dies war im Fall von *cusA* nicht der Fall. Nach der Reoxygenierung kam es zu einer kurzen Stagnation in der Transkriptmenge und anschliessend zu einer Stabilisierung auf hohem Niveau.

Mit der neuen Modifikation des *sandwich hybridization assay* ist es möglich zeitlich hoch aufgelöste Transkriptionskinetiken zu erstellen. Dabei ist eine vorherige RNA Extraktion und Reinigung nicht mehr nötig. Mit dieser Technik konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich *E. coli* extrem schnell an Veränderungen im Kupferhaushalt anpassen und die Transkription dynamisch an den jeweiligen Umweltbedingungen ausrichten kann. Weiterhin konnte die Bedeutung des Sauerstoffs für die Kupferhomöostase in *E. coli* deutlich gemacht werden, da ein direkter Einfluss von Sauerstoff auf die Transkription gezeigt werden konnte.

## **2.4. Eigentanteil an den Publikationen**

### **Publikation 1**

**Grass G, Thakali K, Klebba PE, Thieme D, Muller A, Wildner GF, Rensing C.** 2004. Linkage between Catecholate Siderophores and the Multicopper Oxidase CueO in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. (**17**):5826-5833.

**doi: 10.1128/JB.186.17.5826-5833.2004**

**Eigentanteil: Konstruktion der Deletionsmutanten sowie Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, welche der Abbildung 7 zugrundeliegen.**

### **Publikation 2**

**Thieme D, Grass G.** 2009. The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis. MicrobiolRes 2006; (2009),

**doi: 10.1016/j.micres.2008.12.003**

**Eigenanteil: Methodenetablierung für die Atomabsorbtionsspektrometrie (AAS). Konstruktion der Plasmide und Mutantenstämme. Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.**



### **Publikation 3**

**Thieme D, Neubauer P, Nies DH, Grass G.** 2008. Sandwich hybridization for mRNA quantification from crude extracts of *Escherichia coli*: sensitive detection of dynamic changes in transcript levels of the copper response. Appl. Environ. Microbiol. 2008 Okt 24;AEM.01370-08.

**doi: 10.1128/AEM.01370-08**

**Eigenanteil: Methodenetablierung für den *sandwich hybridization assay* (SHA). Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.**

### 3. Diskussion und Ausblick

#### 3.1. Catecholate als Substrat von CueO

Die Rolle der Multikupferoxidase (MCO) CueO in der Kupferhomöostase von *E. coli* war in bisherigen Arbeiten auf die direkte Oxidation der Cu(I) Spezies im Periplasma beschränkt (76). Diese These konnte durch Arbeiten mit dem analogen Enzym Fet3p in *S. cerevisiae* bestätigt werden (81).

Aktuelle Arbeiten belegen jedoch weitere Aktivitäten von CueO, die über die direkte Reaktion mit Kupferionen hinaus gehen. So ist das Catecholat Enterobaktin *in vitro* ebenso ein Substrat für die CueO-vermittelte Oxidation, wie auch seine Vorstufe 2,3 Dihydroxybenzoat (Publikation 1). Das Fehlen von CueO führte unter Kupferstress zu erhöhter Expression von Genen, welche für die Synthese von Enterobaktin essentiell sind. Ohne die Oxidation des Siderophores kommt es unter Kupferstress möglicherweise zu einer falschen Beladung mit Kupferionen und damit zu einer Kupferaufnahme durch die Enterobaktin-Aufnahmesysteme in die Zelle. Der dadurch anhaltende Eisenmangel könnte ausserdem eine vermehrte Biosynthese des Siderophores bewirken (5) (Publikation 1).

Die Deletion von *fur*, welche zu einer Überexpression von Enterobaktin, führt, bewirkt einer erhöhten Sensitivität gegenüber Kupferstress (Publikation 1). Des Weiteren nahm die kupferinduzierte Expression von *cueO* zu, wenn Chelatoren und Kupfer kombiniert eingesetzt wurden. Die Regulation von CueO erfolgt durch den cytoplasmatischen Regulator CueR, welcher durch eine erhöhte cytoplasmatische Kupferkonzentration aktiviert wird (83).

Wurde zusätzlich zum Gen *fur* noch *entC* deletiert, konnte die Kupfersensitivität des *fur* Deletionsstammes wieder verringert werden (Publikation 1). Die Tatsache, dass das Enterobaktin die Toxizität von Kupfer erhöht und die cytoplasmatische Kupferkonzentration erhöht, bestätigt die These, dass Enterobaktin direkt am Kupferimport beteiligt ist.

Bisherige Daten zeigen, dass Enterobaktin das Redoxgleichgewicht zwischen Cu(II) und Cu(I) zugunsten der toxischeren Cu(I) Spezies verschiebt. Zudem oxidiert Kupfer in seiner Cu(I)-Form wiederum Catechole, wodurch ROS entstehen können (43). Der Einfluss von Enterobaktin auf die Kupfertoxizität erfolgt also auch indirekt. Diese Interaktionen werden durch die Oxidationsreaktionen von CueO verhindert (Abb. 3).

Die Oxidation der Enterobaktinvorstufe durch CueO führt darüber hinaus zu einem Produkt, welches Cu(II) Ionen binden kann (Publikation 1). Da das Reaktionsprodukt, 2-Carboxymuconat, wasserunlöslich ist, könnte es als Kupferchelator im extracytosolischem Raum dienen. Eine derartige Immobilisierung ist ein bekannter Mechanismus (*avoidance*) der Metallhomöostase sowohl in Pilzen und Algen (31, 90), als auch in einigen Bakterienspezies (27, 89, 87). Die bisher identifizierten Moleküle sind jedoch ausnahmslos membran- bzw. zellwandgebunden. Speziell die chemische Struktur von Carboxysäuren wie 2-Carboxymuconat, hat sich als die effizienteste Variante der Metallbindung im extracytosolischem Raum erwiesen (61).

Die Vermutung, dass die Multikupferoxidase CueO durch die Bildung von 2-Carboxymuconat zur Immobilisierung des Kupfers ausserhalb des Cytosols beiträgt, liegt nahe.

### 3.2. Dps als cytoplasmatischer Faktor der Kupferhomöostase

Während über den periplasmatischen Kupferhaushalt viel bekannt ist, konnten bisher nur wenige Proteine der Kupferhomöostase in *E. coli* identifiziert werden, welche Kupfer im Cytoplasma binden können. Das regulatorische Protein CueR und der membrangebundene Kupferexporter CopA sind die beiden einzigen bekannten Vertreter (67). Nur in wenigen Prokaryoten, wie z.B. *Enterococcus hirae* sind Proteine bekannt, deren Funktion über die eines Regulators oder Transporters hinausgeht (19).

Das Tripeptid Glutathion wird vor diesem Hintergrund als cytosolischer Zwischenpuffer für Metallionen allgemein und Kupferionen im Speziellen diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Glutathion zu einer Verringerung der Kupfertoleranz in einer CopA Mutante führt. Jedoch hat die Deletion der beiden Schlüsselgene der Glutathionsynthese, *gshA* und *gshB*, im Wildtyp von *E. coli* keinen Effekt auf die Kupferresistenz (40). Der Einfluss von Glutathion auf die native Kupferhomöostase in *E. coli* ist demnach marginal.

Die ist beim Dps Protein anders. Es ist bekannt, dass das Fehlen dieses Faktors des Redoxhaushaltes auch im Wildtyp einen Einfluss auf die Kupfertoleranz hat (56). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten aus Wachstumsversuchen mit *dps* Deletionsstämmen zeigten ebenfalls klar einen Einfluss von Dps auf die Sensitivität gegenüber Kupferstress im *E. coli* Wildtyp. Bemerkenswert daran war, dass der schützende Effekt auf geringe Kupferkonzentrationen beschränkt blieb, während sich das Wachstum bei höheren Kupferkonzentrationen dem des Wildtyps wieder annähert (Publikation 2). Bisherige Publikationen beschränken sich in ihrer Betrachtung auf extrem hohe Kupferkonzentrationen und die stationäre Phase des Wachstums (56). In der vorliegenden Arbeit konnte der schützende Effekt von Dps in den frühen Wachstumsphasen und unter physiologisch relevanten Bedingungen gezeigt werden (Publikation 2).

Die These, nach der die aktive Bindung von Kupferionen im Dps Protein die Schutzfunktion begründet, muss nach den vorliegenden Daten jedoch verworfen werden (Publikation 2).

Der Bindung an DNA scheint damit überragende Bedeutung zu zukommen. Mit Hinblick auf die Tatsache, dass Dps eines der am meisten vorkommenden Proteine in der stationären Phase ist, erlangt diese These grössere Bedeutung (3). Obwohl sich die Schutzfunktion von Dps auch ohne diese DNA Bindung *in vivo* wie auch *in vitro* zeigen liess, war die Binefähigkeit nötig, um das volle Potential des Proteins zu entfalten (Publikation 2). Da sich Dps erst in der späten stationären Phase akkumuliert, aber dennoch einen Effekt in den frühen Wachstumsphasen zeigt, stellt sich die Frage nach der Rolle dieses Proteins in der Entwicklung einer *Escherichia coli* Kultur neu.

Wird das Schutzprotein Dps von stationären Zellen bei der Zellteilung an die Tochterzellen "vererbt"?

Fehlt das Dps Protein in der kritischen Phase des neu beginnenden Wachstums, können auch die anderen Kupferhomöostasesysteme die Zellen nicht vor den toxischen Effekten von Kupfer bewahren (Publikation 2). Dps kann demnach als generelle Starthilfe bei Besiedeln eines neuen Habitats diskutiert werden. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass das Dps Protein gegen vielfältige Arten des Stresses wirkt und in vielen Bakteriengruppen verbreitet ist. Ausserdem wird auch das Dps Protein als Teil des bakteriellen Chromatins diskutiert (56).

Einen weiteren Effekt der Dps Deletionsmutante kann auf diese Weise jedoch nicht erklärt werden: Zellen, denen Dps fehlt, akkumulierten mehr Kupfer als Wildtypzellen, wohingegen Dps überexpressierende Zellen, weniger Kupfer als Wildtypzellen aufwiesen (Publikation 2). Aufgrund der Tatsache, dass das Protein selbst ist kein Transporter ist, könnte ein indirekter, vielleicht globaler Effekt auf die Homöostasesysteme vorliegen. Eine direkte regulatorische Funktion von Dps konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden Da sich aber gerade in der Regulation und Reaktion des Dps Proteins selbst einige Homöostasesysteme überschneiden, bleibt dies ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Um das Paradoxon der Dps-abhängigen Kupferakkumulierung aufzuklären, bedurfte es umfangreicher Analysen der Transkriptionsaktivierung der Gene der Kupferhomöostase.

Nur so lässt sich auf die Frage eingehen, warum es in einem *dps* Deletionsstamm trotz erhöhter Kupferkonzentration nicht zu verstärktem Kupferexport aus der Zelle kommt.

### **3.3. Die dynamische Adaption von *E. coli* an Kupferstress**

Dynamische Anpassungen an veränderte Umweltbedingungen sind unerlässlich für das Überleben von Organismen. Die passiven Mechanismen zum Schutz der Zelle (z.B. das Dps Protein) können nur eine temporäre Schutzfunktion leisten. Für detaillierte Untersuchungen dieser Dynamik stellen die Metallhomöostasesysteme gute Modellmechanismen dar. So wird auch in *E. coli* immer noch untersucht, wie Kupferionen die zellulären Membranen zum Cytosol überwinden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kupferaufnahme schnell erfolgt (Publikation 2). Demzufolge muss die Reaktion des Organismus ebenfalls sehr schnell erfolgen, um der Toxizität zu begegnen. Schon für die Hefe *Candida albicans* wurde eine transkriptionelle Reaktionszeit von unter einer Minute ermittelt (99). Inzwischen liegen auch Daten für *E. coli* vor, die sowohl mit der Technik des Northern Blot als auch mit den modernen Methoden der array-Technologie ermittelt wurden. Im Gegensatz zu den Daten aus *Candida albicans* konnte hier auch erstmals gesehen werden, dass die Transkription der Gene der Kupferhomöostase nicht auf hohem Niveau, wie bei der Hefe, verbleibt, sondern wieder auf das Ausgangsniveau absinkt (94). Jedoch muss man anmerken, dass die Beschränkung auf wenige Messpunkte keine Rückschlüsse auf eine detaillierte Kinetik der Transkriptionsreaktion zulässt.

Durch Optimierung der Protokolle für den *sandwich hybridization assay* liessen sich direkte *in situ* Kinetiken der Transkriptionsereignisse der Kupferhomöostase in *E. coli* erstellen. Wie erwartet, konnte die schnelle Aktivierung der Transkription gezeigt werden. Jedoch wird im Detail der Unterschied zu bisherigen Ergebnissen deutlich. Die kupferabhängige

Initiation der Transkription erfolgt schon Sekunden nach der Zugabe von Kupfer (Publikation 3). Eine derartige Auflösung ist mit der begrenzten Zahl an Messpunkten der *array*-Methoden nicht zu leisten. Die schnelle Reaktion spricht ebenso für eine schnelle, vielleicht ungehinderte Aufnahme des Kupfers ins Cytosol, wie auch für einen vorbereiteten Organismus. Eine derart schnelle Induktion der CueR regulierten Gene, kann nur stattfinden, wenn der cytosolische Regulator bereits vorliegt, auch wenn kein Kupferstress appliziert ist. Daten der Literatur bestätigen dies, auch wenn die Menge an CueR durch Kupferstress leicht zunehmen kann (94).

Die Verzögerung in der Induktion des *cus* Systems kann mit den nötigen enzymatischen Zwischenschritten der Signalkaskade erklärt werden (55). Auch hier konnte die milde Induktion des *cusCFBA* Operons unter aeroben Bedingungen bestätigt werden (Publikation 3). Dennoch bleibt festzuhalten, dass das Gen *cusA*, ebenfalls Teil dieses Operons, in den Betrachtungen der Literatur keine Beachtung fand. Offensichtlich konnte die geringe Induktion dieses Gens nicht als signifikant erhöht ermittelt werden, da die dreifache Transkriptmenge als Schwelle gesetzt wurde, ab der Gene in die Betrachtungen aufgenommen wurden (94). Im Gegensatz dazu zeigen eigene Daten dieser Arbeit eine bis zu 6fache Induktion von *cusA* unter aeroben Bedingungen (Publikation 3). Es ist durchaus möglich, dass durch die zeitraubende und verlustreiche Prozedur der RNA Extraktion und cDNA Synthese die mRNA von *cusCFBA* schon derart degradiert war, dass keine signifikante Erhöhung von *cusA* im *microarray* mehr festgestellt werden konnte. Des Weiteren unterliegen bei *microarray* Analysen gering expremierte Gene generellen Einschränkungen hinsichtlich der Auswertbarkeit (64).

Das darauf folgende Absinken des Transkriptionsniveaus konnte ebenfalls sehr viel detaillierter als bisher dargestellt werden (Publikation 3). Demnach hat die Transkription des bedeutendsten Faktors der Kupferhomöostase, *copA*, bereits nach 10 Minuten wieder ihr Ausgangsniveau erreicht. Hinsichtlich der vorliegenden Literatur ergibt

sich eine gewisse Diskrepanz. Bei Untersuchungen von Transkriptionsänderungen unter Schwermetallstress stützte man sich auf Proben, die erst nach 10 Minuten oder gar Stunden nach der Induktion genommen wurden (41, 58). Insbesondere unter aeroben Bedingungen muss nach aktueller Datenlage davon ausgegangen werden, dass die wichtigsten Transkriptionsereignisse durch einen derartigen Versuchsaufbau nicht mehr zu detektieren sind.

Der schnelle Transkriptionsabfall lässt sich jedoch sehr gut mit den durchschnittlichen Halbwertszeiten von bakterieller mRNA von 6,8 min erklären (72). Des Weiteren zeigte ein anderes Transkript unter Kontrolle des *copA* Promotors eine ähnliche Kinetik. Zumindest für dieses CueR-regulierte Transkript kann ein aktiver Abbau folglich ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis ist dennoch überraschend, beachtet man, dass sich Metallionen nicht wie Metabolite umsetzen und damit aus dem regulatorischen System entfernen lassen. Die Homöostasesysteme des Kupferhaushaltes in *E. coli* müssen also für eine Anpassung des Flussgleichgewichtes der Kupferionen sorgen. Weiterhin scheinen die entsprechenden Transportproteine derart lange aktiv zu bleiben, dass eine dauerhaft höhere Expression unnötig scheint. Diese Dynamik der Anpassung konnte in weiteren Experimenten mit adaptierten Zellen bestätigt werden (Publikation 3). Die unter allen Bedingungen gezeigte geringe *cusA* Expression scheint auf den ersten Blick zu bestätigen, dass dieses System nur unter anaeroben Bedingungen wichtig sein könnte.

Der Hauptunterschied zwischen anaeroben und aeroben Verhältnissen war nicht die Initiation der Transkription, sondern das Verbleiben der Transkriptmenge auf hohem Niveau. Trotz der anhaltenden Expression der Kupferhomöostasegene schien unter diesen Bedingungen sehr viel mehr Kupfer in der Zelle zu gelangen, da die Gesamtmenge an Transkripten 4-5 mal höher war als unter aeroben Bedingungen (Publikation 3). Es gelang dem Organismus also nicht, eine Balance zwischen Metalleinstrom und Export herzustellen, die das Kupferniveau im Cytosol genügend abgesenkt



hätte, um die Transkription wieder zu stoppen. Dies ist umso erstaunlicher, da nicht nur der hocheffiziente Kupferexporter CopA anhaltend und in hohem Masse expremiert wird, sondern auch das CusCFBA System. In anderen Arbeiten wurde dem *cus* System unter anaeroben Bedingungen eine übergeordnete Rolle zugesprochen (59). Im Gegensatz dazu steht jedoch die Tatsache, dass *Salmonella typhimurium*, ebenfalls ein endogenes, gram-negatives Bakterium, kein System besitzt, das dem von CusCFBA analog ist (28). Auch nach den hier vorliegenden Daten kann dem *cus* System keine übergeordnete Rolle unter anaeroben Bedingungen zugeordnet werden. Alle untersuchten Gene der Kupferhomöostase werden unter anaeroben Bedingungen sehr viel stärker expremiert, wenn Kupfer zugesetzt wird. Dennoch fiel auch hier die Induktion des *cus* Systems am geringsten aus (Publikation 3). In einer anderen Studie konnte unter Sauerstoffmangel ein ähnlicher Effekt beobachtet werden, jedoch ohne zusätzliche Kupferzugabe (60). Unter anaeroben Bedingungen ist das Detoxifizierungspotential der Exportsysteme also begrenzt. In *Salmonella typhi* wie auch in *Rhodobacter capsulatus* wird, in Ermangelung eines periplasmatischen Exportsystems, ein weiterer Mechanismus vorgeschlagen. In beiden Spezies hat die jeweilige Multikupferoxidase auch unter anaeroben Bedingungen grossen Einfluss auf die Kupfertoleranz. Beide Publikationen diskutieren die Kupferbindung in den MCOs und den anschliessenden Export dieser in das Periplasma als zusätzlichen Mechanismus der cytosolischen Kupferentgiftung (28, 91). In *E. coli* wird die Multikupferoxidase CueO auch im anaeroben System sehr stark expremiert, obwohl die Aktivität sauerstoffabhängig ist (Publikation 3). Dies kann auch in *E. coli* der Bindung von Kupferionen im Cytoplasma dienen. Die Vermutung liegt nahe, dass der anschliessende Transport ins Periplasma via Tat-System der aktiven Detoxifizierung des Cytosols dient (70).

### 3.4. Vom Cytoplasma ins Periplasma - und zurück ?

Die fortlaufenden Arbeiten zur Aufklärung der genauen chemischen Reaktionen zwischen Kupferionen, Multikupferoxidase, Enterobaktin und Sauerstoff im Periplasma sind insbesondere mit Blick auf den Kupfer(re)import ins Cytosol entscheidend. Die unter anaeroben Bedingungen andauernde Transkription der cytoplasmatisch regulierten Gene wird durch die Zugabe von Sauerstoff wieder auf Vorinduktionsniveau gesenkt (Publikation 3). Sauerstoff ist demnach ein essentieller Faktor bei der Entgiftung des Cytosols. Bisher ist nur ein Faktor der Kupferhomöostase in *E. coli* bekannt, der direkt mit Sauerstoff assoziiert ist - die Multikupferoxidase CueO. Allerdings ist CueO nur im Periplasma aktiv und da das periplasmatisch regulierte *cus* System weiterhin aktiv expremiert wird, muss von einer periplasmatischen Lokalisation des Kupfers ausgegangen werden (55). Des Weiteren scheint eine Entgiftung des Periplasmas durch die Homöostasesystemen möglich zu sein, wie es unter rein aeroben Bedingungen der Fall wäre. Wie also kann sich Kupfer in der kurzen anaeroben Phase im Periplasma akkumulieren?

Dass eine Multikupferoxidase auch unter anaeroben Bedingungen an der Kupfertoleranz beteiligt ist, ist für einige Fälle dokumentiert, jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen nicht bekannt (28, 91). Legt man die hohe Expressionsrate von CueO in Anaerobiosis zugrunde, so hat sich das im Enzym gebundene Kupfer im Periplasma angereichert. Es ist nicht bekannt, ob das so gebundene Kupfer das CusRS System aktivieren kann. Durch den Abbau des Proteins könnten aber nach und nach Kupferionen frei werden, was die andauernde Aktivierung des *cus* Systems erklären würde. Es kann noch ein weiterer Mechanismus diskutiert werden: Durch die Reoxygenierung kann die Oxidation von 2,3 Dihydrobenzoat durch CueO zu 2-Carboxymuconat einen periplasmatischen Kupferspeicher schaffen (Publikation 1). Das dort gespeicherte Kupfer könnte ebenso für die fortlaufende Aktivierung des CusRS Systems verantwortlich sein. Das

Protein CueO wäre dann indirekt für die periplasmatische Akkumulierung von Kupfer verantwortlich. Ob es selbst diesen Speicher darstellt oder ihn mittels seiner enzymatischen Aktivität bereitstellt, kann mit den vorliegenden Daten nicht abschliessend geklärt werden. Das Bereitstellen eines externen Kupferspeichers würde darüber hinaus auch erklären, warum der Kupfereinstrom ins Cytosol unter aeroben Bedingungen derart schnell auf ein Niveau fällt, welches nicht mehr zu Aktivierung des CueR Systems führt. Dass allein der Export durch die ATPase CopA für diesen Effekt sorgt, ist unwahrscheinlich. Unter anaeroben Bedingungen wird weit mehr CopA zu Verfügung gestellt und dennoch kann das Cytosol bei gleich bleibender Kupferkonzentration nicht entgiftet werden (Publikation 3).

### **3.8. Die Transkriptionsanalyse in der Systembiologie**

Ein weiterer wichtiger Punkt für zukünftige Arbeiten bezieht sich auf die Möglichkeiten des *sandwich hybridization assay* in der biochemischen Forschung. Es liegt auf der Hand, dass diese Technik prädestiniert ist, dort zum Einsatz zu kommen, wo eine RNA Extraktion nicht angewendet werden kann oder zumindest mit vielen Einschränkungen belastet ist. Insbesondere der Einsatz als Voruntersuchung zu *Array* Experimenten sollte hervorgehoben werden. Mittels einer Kinetik der Induktion von ausgesuchten Genen lässt sich der optimale Zeitpunkt der Probennahme für die *Array*-Analyse bestimmen. Dies reduziert die Kosten und sorgt für eine bessere Basis für die anschliessende Dateninterpretation.

Zum Abschluss der Betrachtungen sollen die Möglichkeiten des *sandwich hybridization assay* im Bereich der Systembiologie angesprochen werden. Erst mit richtigen Induktionskinetiken der Gene lassen sich systembiologische Ansätze vertiefen und die zellulären Vorgänge mittels mathematischer Modelle mit einer höheren Detailliertheit und Präzision abbilden. Zwar sind nach wie vor globale Transkriptionsanalysen immens wichtig, um die Reaktionen des Organismus als Ganzes modellieren zu

können, jedoch sind Kinetiken mittels *array*-Technologie mit extremem finanziellem und apparativem Aufwand verbunden. Für Fallbetrachtungen bestimmter Stoffwechselwege könnte der *sandwich hybridization assay* die Methode der Wahl darstellen, da er bei geringem Aufwand, die Vielzahl an Datenpunkten bereitstellen kann, die für Kinetiken benötigt werden. Mittels dieser Daten könnten in Zukunft die Fließgleichgewichte in biologischen Systemen, zu denen nicht nur die Homöostasemechanismen der Übergangsmetalle gehören, erstmals in zeitlicher Abhängigkeit modelliert werden. Dies würde den ersten Schritt hin zum virtuellen Organismus darstellen, anhand dessen sich Einflüsse von externen Faktoren auf reale Organismen modellieren und in naher Zukunft vielleicht vorhersagen lassen.

## 4. Literaturverzeichnis

1. **Abdul-Tehrani H., A. J. Hudson, Y. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest, und S. C. Andrews.** 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**:1415-1428.
2. **Adaikkalam V., und S. Swarup.** 2005. Characterization of *copABCD* operon from a copper-sensitive *Pseudomonas putida* strain. *Can. J. Microbiol.* **51**:209-216.
3. **Almirón M., A. J. Link, D. Furlong, und R. Kolter.** 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**:2646-54.
4. **Andrews S. C.** 1998. Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **40**:281-351.
5. **Andrews S. C., A. K. Robinson, und F. Rodríguez-Quñones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:215-237.
6. **Arnesano F., L. Banci, I. Bertini, und M. Martinelli.** 2005. Ortholog search of proteins involved in copper delivery to cytochrome C oxidase and functional analysis of paralogs and gene neighbors by genomic context. *J. Proteome Res.* **4**:63-70.
7. **Arosio P., und S. Levi.** 2002. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage, *Free Radical Biology and Medicine* **33**:457-463.
8. **Bagai I., C. Rensing, N. J. Blackburn, und M. M. McEvoy.** 2008. Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone. *Biochemistry.* **47**:11408–11414.
9. **Balamurugan K., D. Egli, H. Hua, R. Rajaram, G. Seisenbacher, O. Georgiev, und W. Schaffner.** 2007. Copper homeostasis in *Drosophila* by complex interplay of import, storage and behavioral avoidance. *EMBO J.* **26**:1035-1044.
10. **Balamurugan K., und W. Schaffner.** 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**:737-746.
11. **Balasubramanian R., und A. C. Rosenzweig.** 2008. Copper methanobactin: a molecule whose time has come. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**:245-249.
12. **Balasubramanian R., und A. C. Rosenzweig.** 2007. Structural and mechanistic insights into methane oxidation by particulate methane monooxygenase. *Acc. Chem. Res.* **40**:573-580.
13. **Barken K. B., M. Gabig-Ciminska, A. Holmgren, und S. Molin.**

2004. Effect of unlabeled helper probes on detection of an RNA target by bead-based sandwich hybridization. *Biotechniques* **36**:124-32.
14. **Beratan D. N., und I. A. Balabin.** 2008. Heme-copper oxidases use tunneling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:403-404.
  15. **Beswick P. H., G. H. Hall, A. J. Hook, K. Little, D. C. McBrien, und K. A. Lott.** 1976. Copper toxicity: evidence for the conversion of cupric to cuprous copper in vivo under anaerobic conditions. *Chem. Biol. Interact.* **14**:347-356.
  16. **Bringmann G., K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, und M. Ruckert.** 1999. HPLC-CD on-line coupling in combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts. *Analytical Chemistry* **71**:2678-2686.
  17. **Brown N. L., J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, und J. L. Hobman.** 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:145-163.
  18. **Cavet J. S., G. P. M. Borrelly, und N. J. Robinson.** 2003. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:165-181.
  19. **Cervantes C., und F. Gutierrez-Corona.** 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **14**:121-137.
  20. **Cha J. S., und 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.
  21. **Chee M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, und S. P. A. Fodor.** 1996. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* **274**:610-614.
  22. **Cobine P. A., F. Pierrel, M. L. Bestwick, und D. R. Winge.** 2006. Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **281**:36552-36559.
  23. **Crichton R. R., und J. L. Pierre.** 2001. Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* **14**:99-112.
  24. **Datsenko K. A., und B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:6640-6645.

25. **Dumay Q. C., A. J. Debut, N. M. Mansour, und M. H. Saier.** 2006. The copper transporter (Ctr) family of Cu<sup>+</sup> uptake systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11**:10-19.
26. **Durand F.** 2007. Wilson's disease: an old disease keeps its old secrets. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**:97-99.
27. **El-Helow E. R., S. A. Sabry, und R. M. Amer.** 2000. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. *Biometals* **13**:273-280.
28. **Espariz M., S. K. Checa, M. E. P. Audero, L. B. Pontel, und F. C. Soncini.** 2007. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology (Reading, Engl.)* **153**:2989-2997.
29. **Fee J. A.** 1991. Regulation of sod genes in *Escherichia coli*: relevance to superoxide dismutase function. *Mol. Microbiol.* **5**:2599-2610.
30. **Field L. S., E. Luk, und V. C. Culotta.** 2002. Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**:373-379.
31. **Fourest E., A. Serre, und J. Roux.** 1996. Contribution of carboxyl groups to heavy metal binding sites in fungal wall. *Toxicological & Environmental Chemistry* **54**:1.
32. **Franke S., G. Grass, C. Rensing, und D. H. Nies.** 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:3804-3812.
33. **Gort A. S., D. M. Ferber, und J. A. Imlay.** 1999. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **32**:179-191.
34. **Gralla E. B., D. J. Thiele, P. Silar, und J. S. Valentine.** 1991. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:8558-8562.
35. **Grass G., und C. Rensing.** 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**:902-908.
36. **Grass G., und C. Rensing.** 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145-2147.
37. **Graveley B. R.** 2008. Molecular biology: Power sequencing. *Nature* **453**:1197-1198.
38. **Halliwell B.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant. Physiol.* **141**:312-322.
39. **Heid C. A., J. Stevens, K. J. Livak, und P. M. Williams.** 1996. Real

time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-94.

40. **Helbig K., C. Bleuel, G. J. Krauss, und D. H. Nies.** 2008. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **190**:5431-5438.
41. **Helbig K., C. Grosse, und D. H. Nies.** 2008. Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:5439-5454.
42. **Imlay J. A., und S. Linn.** 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**:1302-1309.
43. **Kamau P., und R. B. Jordan.** 2002. Kinetic study of the oxidation of catechol by aqueous copper(II). *Inorganic Chemistry* **41**:3076-3083.
44. **Kang Y. J.** 2006. Metallothionein redox cycle and function. *Experimental Biology and Medicine* **231**:1459-1467.
45. **Keyer K., und J. Imlay.** 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:13635-13640.
46. **Kim C., W. W. Lorenz, J. T. Hoopes, und J. F. D. Dean.** 2001. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli yack* gene. *J. Bacteriol.* **183**:4866-4875.
47. **Leskelä T., A. Tilsala-Timisjärvi, J. Kusnetsov, P. Neubauer, und A. Breitenstein.** 2005. Sensitive genus-specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay. *Journal of Microbiological Methods* **62**:167-179.
48. **Li Y., M. A. Trush, und J. D. Yager.** 1994. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis* **15**:1421-1427.
49. **Ma C., Y. Liu, und L. He.** 2009. microRNAs - powerful repression comes from small RNAs. *Sci. China, C, Life Sci.* **52**:323-330.
50. **Massé E., und S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:4620-4625.
51. **Massé E., und M. Arguin.** 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends in Biochemical Sciences* **30**:462-468.
52. **McHugh J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper, und S. C. Andrews.** 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*:



- A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**:29478-29486.
53. **Miller D. M., G. R. Buettner, und S. D. Aust.** 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **8**:95-108.
  54. **Multhaup G., D. Strausak, K. Bissig, und M. Solioz.** 2001. Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**:172-177.
  55. **Munson G. P., D. L. Lam, F. W. Outten, und 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.
  56. **Nair S., und S. E. Finkel.** 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J. Bacteriol.* **186**:4192-4198.
  57. **Odermatt A., H. Suter, R. Krapf, und M. Solioz.** 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **268**:12775-12779.
  58. **Oshima T., H. Aiba, Y. Masuda, S. Kanaya, M. Sugiura, B. L. Wanner, H. Mori, und T. Mizuno.** 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **46**:281-291.
  59. **Outten F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale, und T. V. O'Halloran.** 2001. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**:30670-30677.
  60. **Partridge J. D., G. Sanguinetti, D. P. Dibden, R. E. Roberts, R. K. Poole, und J. Green.** 2007. Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components. *J. Biol. Chem.* **282**:11230-11237.
  61. **Parvathi K., R. Nareshkumar, und R. Nagendran.** 2007. Manganese biosorption sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Technol.* **28**:779-784.
  62. **Puig S., und D. J. Thiele.** 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**:171-180.
  63. **Rae T. D., P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, und T. V. O'Halloran.** 1999. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**:805-808.
  64. **Rajeevan M. S., S. D. Vernon, N. Taysavang, und E. R. Unger.**

2001. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (Kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.* **3**:26-31.
65. **Rautio J., K. Barken, J. Lahdenpera, A. Breitenstein, S. Molin, und P. Neubauer.** 2003. Sandwich hybridization assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates. *Microbial Cell Factories* **2**:4.
  66. **Rensing C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, und B. P. Rosen.** 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:652-656.
  67. **Rensing C., und G. Grass.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:197-213.
  68. **Ridge P. G., Y. Zhang, und V. N. Gladyshev.** 2008. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS ONE* **3**:e1378.
  69. **Rosochacki S. J., und M. Matejczyk.** 2002. Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology. *Acta. Microbiol. Pol.* **51**:205-216.
  70. **Sargent F.** 2007. The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:835-847.
  71. **Seeger M. A., K. Diederichs, T. Eicher, L. Brandstätter, A. Schiefner, F. Verrey, und K. M. Pos.** 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. *Curr. Drug Targets* **9**:729-749.
  72. **Selinger D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church, und C. Rosenow.** 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* **13**:216-23.
  73. **Shendure J.** 2008. The beginning of the end for microarrays? *Nat. Meth.* **5**:585-587.
  74. **Shi X., C. Stoj, A. Romeo, D. J. Kosman, und Z. Zhu.** 2003. Fre1p Cu<sup>2+</sup> reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**:50309-50315.
  75. **Silhavy T. J., und J. R. Beckwith.** 1985. Uses of lac fusions for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.* **49**:398-418.
  76. **Singh S. K., G. Grass, C. Rensing, und W. R. Montfort.** 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**:7815-7817.
  77. **Singleton C., und N. E. Le Brun.** 2007. Atx1-like chaperones and

their cognate P-type ATPases: copper-binding and transfer. *Biometals* **20**:275-289.

78. **Solioz M., and J. V. Stoyanov.** 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:183-195.
79. **Spira B., X. Hu, and T. Ferenci.** 2008. Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**:2887-2895.
80. **Steinman H., L. Weinstein, and M. Brenowitz.** 1994. The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA. *J. Biol. Chem.* **269**:28629-28634.
81. **Stoj C., and D. J. Kosman.** 2003. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Letters* **554**:422-426.
82. **Stojiljkovic I., A. J. Bäuml, and K. Hantke.** 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria : Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *Journal of Molecular Biology* **236**:531-545.
83. **Stoyanov J. V., J. L. Hobman, and N. L. Brown.** 2001. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular Microbiology* **39**:502-512.
84. **Taylor A. B., C. S. Stoj, L. Ziegler, D. J. Kosman, and P. J. Hart.** 2005. The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:15459-15464.
85. **Totey S., D. R. Harvie, and N. J. Robinson.** 2005. Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc. Chem. Res.* **38**:775-783.
86. **Touati D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**:1-6.
87. **Tripathi V. N., and S. Srivastava.** 2006. Extracytoplasmic storage as the nickel resistance mechanism in a natural isolate of *Pseudomonas putida* S4. *Can. J. Microbiol.* **52**:287-292.
88. **Valko M., H. Morris, and M. T. D. Cronin.** 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**:1161-208.
89. **Vijayaraghavan K., and Y. Yun.** 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* **26**:266-291.
90. **Volesky B., and Z. R. Holan.** 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11**:235-250.
91. **Wiethaus J., G. F. Wildner, and B. Masepohl.** 2006. The multicopper oxidase CutO confers copper tolerance to

*Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiol. Lett. **256**:67-74.

92. **Wijmenga C., and L. W. J. Klomp.** 2004. Molecular regulation of copper excretion in the liver. Proc. Nutr. Soc. **63**:31-39.
93. **Wold B., and R. M. Myers.** 2008. Sequence census methods for functional genomics. Nat. Meth. **5**:19-21.
94. **Yamamoto K., and A. Ishihama.** 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. Mol. Microbiol. **56**:215-227.
95. **Zamocky M., P. G. Furtmüller, and C. Obinger.** 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. Antioxid. Redox Signal **10**:1527-1548.
96. **Zelko I. N., T. J. Mariani, and R. J. Folz.** 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (*SOD1*), Mn-SOD (*SOD2*), and EC-SOD (*SOD3*) gene structures, evolution, and expression. Free Radic. Biol. Med. **33**:337-349.
97. **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. J. Biol. Chem. **277**:27689-27696.
98. **Zheng M., B. Doan, T. D. Schneider, and G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of fur. J. Bacteriol. **181**:4639-4643.
99. **Zhou P., and D. J. Thiele.** 1993. Rapid transcriptional autoregulation of a yeast metalloregulatory transcription factor is essential for high-level copper detoxification. Genes Dev. **7**:1824-1835.

## **5. Anhang**

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Thieme, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Passagen wurden als solche kenntlich gemacht.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung der Doktorwürde.

Halle/Saale,

2009

Daniel Thieme

# Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung "Molekulare Mikrobiologie" an der Martin-Luther Universität angefertigt. Daher gilt mein Dank dem Kopf dieser Abteilung, Prof. Dr. D. H. Nies, für die Projektbetreuung und die Möglichkeit an diesem Themenkomplex zu forschen. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Prof. Dr. Gregor Grass, dem die Betreuung der aktiven Laborarbeit oblag. Seine Begeisterung und das ständige Engagement für dieses Thema waren ein wichtiger Quell der Motivation für mich.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das ausnehmend gute Arbeitsklima bedanken. Die Urgesteine Nadine, Judith und Grit sollen da ebenso Erwähnung finden, wie das Jungvolk Doreen, Andreas und Martin und die Ausgeschiedenen Markus und Andre. Die fachlichen Diskussionen, wie auch die entspannte Atmosphäre haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt dabei noch zwei weiteren Arbeitsgruppen. Zum einen den "BPEL" aus Oulu um Prof. Dr. Peter Neubauer. In den 6 Monaten in Finnland habe ich mich in wissenschaftlicher, wie auch persönlicher Hinsicht weiterentwickelt. Dafür möchte ich den Wissenschaftlern Marco, Christian, Timo und Jaacko genauso danken, wie den anderen Leuten aus dem "Oulu Bunch": Rafal, Sanna, Ulf, Steven, Mirja, Minette und Piet, denen ich immernoch in Freundschaft verbunden bin.

Nach meiner Rückkehr aus Finnland wurde ich in den Labors der Arbeitsgruppe "Ökologische und analytische Biochemie" freundschaftlich aufgenommen. Die Arbeiten an der FPLC, der AAS und am "Sandwich" wären ohne die Unterstützung der Anjas (grosse und kleine), der Corinnas (NRW und Thüringen), der Diana (nur eine) und dem Dirk nicht so erfolgreich gewesen.

Eine Promotionsarbeit ist ohne die Unterstützung von Familie und Freunden unmöglich. Ich bin dankbar für die andauernde Unterstützung meines Weges durch meine Eltern und meine Schwester.

Mein persönlichster Dank gilt meiner Freundin Petra. Ohne ihre Gedult, ihr Vertrauen und ihre Liebe wäre diese Arbeit eine sehr einsame Zeit gewesen. Sie ist einer der Hauptgründe, weshalb ich immer optimistisch in die Zukunft blicken kann.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

*Name, Vorname:* Daniel, Thieme  
*Straße:* Schwetschkestrasse 6  
*PLZ / Wohnort:* 06110 / Halle  
*Geburtsdatum / - ort:* 08.07.1978 in Leipzig  
*Familienstand:* ledig  
*Staatsangehörigkeit:* deutsch  
*Telefon:* 0177 6066182  
*e-mail:* daniel.thieme@mikrobiologie.uni-halle.de

## Schulbildung

*von / bis*

1985 – 1993 Houari Boumediene POS in Leipzig  
1993 – 1997 Friedrich-Ratzel Gymnasium in Leipzig

Grundwehrdienst vom September 1997 bis Mai 1998.



Berufsausbildung / Studium  
von / bis

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Okt. 1998 – Jan. 2005 | Studium der Biochemie (Dipl. Biochemiker)   |
| Jan. 2005             | Abschluss der Diplmarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe "Molekulare Mikrobiologie" von Herrn Prof. Dr. D. H. Nies, betreut durch Prof. Dr. Gregor Grass.<br><br>Thema: "Die Bedeutung von Fur und Dps für die Kupferhomöostase in <i>Escherichia coli</i> ."<br><br>Abschluss: Diplom-Biochemiker |
| Feb. 2005             | Beginn der Promotionsarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät in der Gruppe "Molekulare Mikrobiologie" im Rahmen des DFG Graduiertenkolleg Stress.  |
| Sep. 2005 - Feb. 2006 | 6 monatiger Aufenthalt an der Universität Oulu (Finnland) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Neubauer zur Erlernung des <i>sandwich hybridization assays</i>  |
| März 2006 –Juni 2009  | Vollendung der Promotionsarbeit mit dem Thema: "Alte Faktoren mit neuen Funktionen - Kupferentgiftung in <i>Escherichia coli</i> "  |