

**Die Rolle des Zink-Transporters ZupT in der
Zinkhomöostase von *Cupriavidus metallidurans***

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Martin Herzberg

geb. am 04.10.1982 in Leinefelde

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

öffentlich verteidigt am 15.12.2015, Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Zink - biologische Bedeutung und Verfügbarkeit.....	1
Das Metallom und die Metallomik / Metalloproteomik	6
Das Zinkproteom und die Zinkhomöostase	11
Kumulativer Abschnitt	21
Übersicht der Publikationen und Manuskripte	21
<i>Cupriavidus metallidurans</i> als Modellorganismus der Metallhomöostase	23
Kapitel 1 - Der ZIP Transporter ZupT von <i>Cupriavidus metallidurans</i>	26
Deletion of the <i>zupT</i> gene for a zinc importer influences zinc pools in <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	26
Synthesis of nickel-iron hydrogenase in <i>Cupriavidus metallidurans</i> is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Kapitel 2 - Das Zinkproteom von <i>Cupriavidus metallidurans</i>	65
The zinc repository of <i>Cupriavidus metallidurans</i>	65
Kapitel 3 – Metall-Aufnahmesysteme in <i>Cupriavidus metallidurans</i>	76
Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	76
<u>Manuskript:</u> “Strategic deletion of seven secondary metal uptake systems in <i>Cupriavidus metallidurans</i> reveals plasticity of the metal uptake transportome”	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<u>Manuskript:</u> “The metal transportome of <i>Cupriavidus metallidurans</i> contains more members than the previously known seven secondary metal uptake systems”	126
Zusammenfassende Diskussion	155
Einfluss der sekundären und primären Aufnahmesysteme auf die Metallhomöostase von <i>C. metallidurans</i>	155
Der ZIP Transporter ZupT und seine Einflüsse auf die Zinkhomöostase von <i>C. metallidurans</i>	161
Zink und die Hydrogenasen in <i>C. metallidurans</i>	172
Abbildungsverzeichnis	I
Literaturverzeichnis	II
Lebenslauf und Publikationsliste	XXV
Danksagung	XXIX
Eidesstattliche Erklärung	XXX

Einleitung

Zink - biologische Bedeutung und Verfügbarkeit

Zink ist eines der wichtigsten Übergangsmetalle und Spurenelemente im zellulären Stoffwechsel und wird für eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen benötigt. Zinkionen (Zn^{2+}) sind, im Gegensatz zu Eisen- ($\text{Fe}^{2+/3+}$) und Kupferionen ($\text{Cu}^{1+/2+}$), redox-inaktiv. Dennoch erlauben sie Katalysen als Lewis-Säure. In Proteinen sind Zinkionen nicht nur katalytische sondern auch strukturelle und regulatorische Kofaktoren (Maret, 2011; Maret, 2013). Als strukturelle Kofaktoren fixieren Zinkionen flexible Polypeptidketten in der steiferen Konformation eines tetrahedralen Komplexes (Dudev und Lim, 2000; Roe und Pang, 1999; Laitaoja *et al.*, 2013). Nach Eisen ist Zink das zweitwichtigste Übergangsmetall in Prokaryoten und seine relative Abundanz steigert sich in Eukaryoten (Andreini, 2006a/b; Dupont, 2006; Outten und O'Halloran, 2001). Die zelluläre Biochemie benötigt neben Zink eine Vielzahl von Metallkofaktoren. Dabei besitzen die biologisch wichtigsten Übergangsmetalle der vierten Periode der Nebengruppenelemente jeweils die gleiche Konfiguration ihrer Valenzelektronen im *s* Orbital, unterscheiden sich aber in der Verteilung der Elektronen im *d* Orbital. Dieses unvollständig gefüllte *d* Orbital erlaubt ihnen, komplexe Verbindungen zu bilden, zusammengesetzt aus einem zentralen Metallkation und (meist) vier oder sechs Liganden mit freien Elektronenpaaren (Nies, 2007a). Diese Liganden sind in lebenden Zellen meist Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel. Die daraus gebildeten Verbindungen sowie deren katalysierten Reaktionen machen die Übergangsmetalle essentiell und ohne sie wäre eine komplexe Biochemie nicht möglich (Nies, 2007a).

Etwa die Hälfte aller Enzyme heutiger Proteome sind Metalloproteine. Die Metall-Kofaktoren werden mit folgendem prozentualen Anteil gefunden: Mg (16 %) > Zn (9 %) > Fe (8 %) > Mn (6 %) > Ca (2 %) > Co/Cu (1 %), gefolgt von K, Na, Ni, Mo, W, V (Waldron *et al.*, 2009) und mit einer bekannten Ausnahme für Cadmium (Lane *et al.*, 2005). Die Abundanz der Übergangsmetalle als Proteinkofaktoren ist direkt von ihrer Bioverfügbarkeit abhängig, welche dramatischen Änderungen im Laufe der Evolution unterlag. Eine Theorie geht davon aus, dass der Redox-Zustand der Ozeane und die Bioverfügbarkeit der Übergangsmetalle in direktem Zusammenhang stehen. So kann die Elementzusammensetzung des Meeres als standardisiertes Ökosystem für die Verfügbarkeit chemischer Elemente einer lebenden Zelle gesehen werden (Nies, 2008). Das Auftreten und der damit verbundene Beginn der Anreicherung des Sauerstoffes in den Ozeanen und der Atmosphäre vor ca. 2,4 Mrd. Jahren veränderte dies grundlegend. Die Idee, dass der Anstieg des Sauerstoffes die Verwendung von Spurenelementen in biologischen Systemen beeinflusst, wurde ursprünglich von Williams und Fraústo da Silva vorgeschlagen (Williams und Fraústo da Silva, 2006). So soll sich die Veränderung der Metall-Bioverfügbarkeit durch das

Auftreten des Sauerstoffes noch heute in den Proteomen der Prokaryoten und Eukaryoten widerspiegeln (Dupont *et al.*, 2006). Spuren für die Koevolution mariner bio-geochemischer Zyklen und mariner bio-inorganischer Chemie findet man z.B. in der Physiologie und den Genomen der heutigen Nachfahren der frühen Cyanobakterien (Saito *et al.*, 2003).

Das *Great Oxidation Event* bzw. die „Große Sauerstoffkatastrophe“ vor etwa 2,4 Mrd. Jahren beschreibt den Übergang zur heutigen sauerstoffreichen (oxygenen) Atmosphäre und gab den Startschuss der Eukaryotenevolution (Anbar und Knoll, 2002; Donoghue und Antcliffe, 2010). Es scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Sauerstoffgehaltes der Atmosphäre und der Ozeane mit dem Ursprung bzw. der Entstehung der Eukaryoten (Anbar und Knoll, 2002) und der Multizellularität zu bestehen (Bengtson *et al.*, 2007). Das Leben an sich, oder genauer gesagt das prokaryotische Leben, ist bereits etwa eine Mrd. Jahre älter, wie die Funde der ersten Stromatolithen (fossile Mikroorganismenteppiche, die aus Schichten filamentöser Prokaryoten und Sediment bestehen) vor etwa 3,5 - 3,4 Mrd. Jahren zeigen. Im Vergleich zu modernen Stromatolithen aus flachen Meeresbecken und heißen Quellen bildeten sich fossile Stromatolithen aus filamentösen anoxygenen phototrophen Bakterien (Byerly *et al.*, 1986; Mojzsis *et al.*, 1996). Es wird davon ausgegangen, dass das erste Leben (selbstreplizierende Einheit) zu einer Zeit auftrat, als die Erde viel heißer als heutzutage war. Wie schnell sich die Erde nach der Mondbildung durch Kollision mit einem Proto-Planeten vor 4,47 Mrd. Jahren abkühlte, ist unbekannt (Bottke *et al.*, 2015). Jedoch müsste das erste Leben relativ hitzetolerant gewesen sein und heutigen hyperthermophilen Prokaryoten geähnelt haben (Abbildung 1).

Mit der Evolution Sauerstoff-produzierender oxygen-phototropher Mikroorganismen, Vorfahren der heutigen Cyanobakterien, vor etwa 2,7 Mrd. Jahren begann der Prozess der Sauerstoffanreicherung auf der Erde (Brocks *et al.*, 1999). Bis zu diesem Punkt war aus heutiger Sicht die Erdatmosphäre ein reduzierendes, toxisches Gemisch aus Treibhausgasen (N_2 , CO_2 , CH_4 und NH_3 , mit Spuren CO und H_2) und die Ozeane als „Wiege des Lebens“ ebenso anoxisch (Kasting 1993; Wolf und Toon, 2010). Das Leben war den chemoorganotrophen, chemolithautotrophen und anoxygenen phototrophen Bakterien und Archaeen vorbehalten. Im größten Klimawandel der Erdgeschichte stieg der Sauerstoffanteil während der Kohlendioxidgehalt sank. Die Erde wurde langsam transformiert in ihre heutige Erscheinungsform. Mit dieser „Katastrophe“ änderte sich gleichzeitig die Chemie der Ozeane (Anbar, 2008).

Obwohl Ozeane heute über die Hälfte unserer Planetenoberfläche bedecken, ist das Leben in ihnen dünn gesät. Zwar herrscht in diesen Ökosystemen weder Mangel am Lösungsmittel Wasser oder an Energie in Form energiereicher Strahlung der Sonne noch an den biologisch wichtigen Makroelementen wie Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff doch sind sie limitiert an mehreren essenziellen Biomikroelementen. Diese kaum verfügbaren Übergangsmetalle sind jedoch kritische

Komponenten für Biomoleküle wie DNA, RNA und eine Vielzahl von Enzyme und damit essentiell für jede lebende Zelle.

Welches Metall von Zellen verwendet wird, unterliegt scheinbar drei einfachen Regeln: biologische Verfügbarkeit, Größe und Ladung. Die Verteilung und Verfügbarkeit dieser essentiellen Elemente in den Ozeanen der Vergangenheit und die daraus resultierende Verfügbarkeit im Laufe der Evolution lässt sich nicht direkt messen, sondern nur über Rückschlüsse aus den Analysen von geologischen Gesteinsschichten und Sedimenten bestimmen.

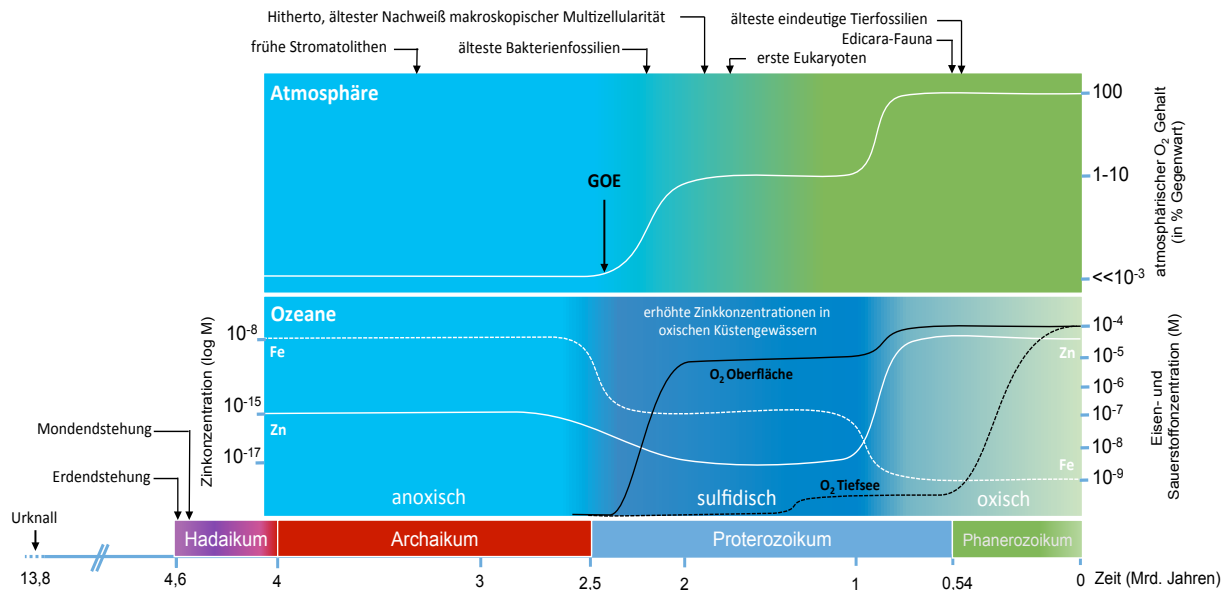


Abbildung 1: Chemischer Zustand der Atmosphäre und der Ozeane sowie zeitliche Veränderungen in der Elementabundanz.

Diese Historie beruht auf ungefähren und einfachen geochemischen Modellen sowie Interferenzen aus alten Sedimenten dieser Äonen. Der Farbgradient deutet den Verlauf von den anoxischen schwefelarmen Ozeanen vor 2,4 Mrd. Jahren (hellblau) über die H₂S reichen zw. 1,8-0,8 Mrd. Jahren (dunkelblau) bis zu den heutigen oxischen Ozeanen an (hellgrün). Die Sauerstoffzunahme der Atmosphäre beginnend mit der „Großen Sauerstoffkatastrophe“ (*Great Oxidation Event*, GOE) ist im oberen Bereich anhand der durchgehenden weißen Linie in Prozent der heutigen atmosphärischen Konzentration zu verfolgen. Der zeitlich abhängige Verlauf der Zinkkonzentration ist im unteren Teil als weiße durchgängige Linie und für Eisen als gestrichelte in Molaritäten gezeigt. Weiterhin ist die im Ozean gelöste Sauerstoffkonzentration des Oberflächenwassers als schwarze durchgängige Linie und der Tiefsee als gestrichelte gezeigt. Konzentrations- und prozentuale Einteilungen sind an den X-Achsen vermerkt. Auf der Zeitskala ist der Urknall, die Erd-, die Mondentstehung und Hinweise sowie Nachweise auf die Entstehung des Lebens abgebildet. Die ersten Stromatolithen sind etwa auf die Zeit vor 3,4 Mrd. Jahren datiert und erste Hinweise auf Multizellularität und die Entwicklung der Eukaryoten finden sich erst nach dem GOE. Der Zeitstrahl ist in Milliarden Jahren angegeben und in die Äonotheme gegliedert (Hadaikum, Archaikum, Proterozoikum und Phanerozoikum). Verändert nach Saito, 2003; Anbar, 2008; Glass *et al.*, 2009 sowie Donoghue und Antcliffe, 2010.

Das beste Beispiel hierfür sind die geologischen Aufzeichnungen der massiven Ablagerungen von sedimentären Eisenmineralien, die älter als 1,8 Mrd. Jahre sind (Bjerrum und Canfield, 2002; Isley und Abbott, 1999). Diese Bändererze (*Banded Iron Formation*, abgekürzt BIF) entstanden im Archaikum (vor 3,8 bis 2,5 Mrd. Jahren) und im Proterozoikum (vor 2,5 bis 1,8 Mrd. Jahren) (Slack und Cannon, 2009). Das im Zuge von Vulkanismus und durch Exhalation an den Mittelozeanischen Rücken sowie entlang von Tiefseegräben in den Ozeanen abgegebene Eisen blieb vor der „Großen Sauerstoffkatastrophe“ in Form zweiwertiger Ionen (Fe²⁺) im Meer gelöst. Durch das Auftreten von

Sauerstoff als Abfallprodukt der sich entwickelnden phototrophen Mikroorganismen wurde das zweiwertige Eisen zu dreiwertigem oxidiert und in Form von Hydroxiden und Oxiden (u.a. Eisen(III)hydroxid und Eisen(III)oxihydrate) gefällt, die in Schichten (durch Diagenese gebildeten Bändererze, u.a. Magnetit und Hämatit) abgelagert wurden. Dieser Prozess verzehrte den größten Teil des gebildeten Sauerstoffs und verlief zyklisch in einem Zeitraum von über 2 Mrd. Jahren.

Erst als das zweiwertige Eisen im Meer erschöpft war, konnte der Sauerstoffgehalt in den Ozeanen und der Atmosphäre ansteigen. Damit änderte sich die biologische Eisenverfügbarkeit dramatisch, vom mittleren mikromolaren in den unteren nanomolaren Bereich (Canfield, 2005; Holland, 2006). Einst eisenreiche Ozeane in der ersten Hälfte der Erdgeschichte wichen späterem Eisenmangel (Abbildung 1).

Der Redoxzustand der Ozeane entwickelte bzw. änderte sich in drei Stufen mit der Sauerstoffanreicherung im Zeitraum von 2,45-1,85 und 0,85-0,5 Mrd. Jahren und unterteilt die Erdgeschichte in fünf Abschnitte (Holland, 2006) (Abbildung 1). Die Ozeanchemie zwischen den zwei großen Zeiträumen der Sauerstoffanreicherung ist bis heute unklar. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Ozeane im Zeitraum von 1,85-0,85 Mrd. Jahre einen moderaten Sauerstoffanteil hatten und reich an Schwefelwasserstoff (H_2S , sulfidisch) waren (Canfield, 1998; Lyons, 2008). In diesem Zeitraum ging der Eisenanteil im Ozean immer weiter zurück, jedoch bildeten sich keine weiteren Bändererze (BIF's). Im Zuge dieser Theorie wird davon ausgegangen, dass unlösliche Fe(II)-Sulfide entstanden (Canfield, 2005) (Abbildung 1).

Diese Änderungen der globalen Redox-Situation beeinflusste auch andere bioessentielle Elemente insbesondere die Übergangsmetalle Mn, Co, Ni, Mo, Cu und **Zn**, was durch einen zweifachen Shift in der Verfügbarkeit dieser Elemente bereits in einfachen geochemischen Konzepten gestützt wird (Saito *et al.*, 2003).

Trotz etwaiger Kontroversen und Modellunschärfen sollten Veränderungen in der Bioverfügbarkeit bioessentieller Elemente die Entwicklung des Lebens geprägt haben (Williams und Fraústo da Silva, 2003). Fossile Funde belegen, dass die Diversität der Eukaryoten mit steigendem Redoxpotential der Meere vor etwa 800 Mill. Jahren anstieg. Gleichzeitig nahm die Verfügbarkeit von **Zink**, Molybdän und anderen Elementen zu - und die von Eisen, Mangan und Kobalt ab (Knoll *et al.*, 2006) (Abbildung 1).

Bioinformatische Vergleiche zu kodierenden Protein-Metall-Bindemotiven zwischen Eu- und Prokaryoten zeigen, dass Eukaryoten mehr Zink aber weniger Eisen, Mangan und Kobalt benötigen (Dupont *et al.*, 2006). Dupont und Mitarbeiter erweitern die Aussage um die These, dass die Sauerstoff-induzierte Änderung der Bioverfügbarkeit von Spurenelementen der Eukaryotenvielfalt voranging. Dies impliziert, dass **Zink** ein relevantes Metall der Eukaryotenentwicklung darstellt. Die späte evolutionäre Entwicklung von Zink-bindenden Proteinen wäre von grundlegender

Bedeutung für die eukaryotische Zellbiologie. Gleichzeitig stellt die Bioverfügbarkeit von Zink einen möglichen limitierenden Faktor in der Evolution der Eukaryoten dar (Dupont *et al.*, 2010). Andererseits sind Zink-bindende Proteine bzw. Domänen weit verbreitet und evolutionär alt (Mulkiđjanian und Galperin, 2010). Dies würde der geringen Zinkverfügbarkeit ($<10^{-12}$ M) in den alten anoxischen Ozeanen (Williams und Fraústo da Silva, 2006) jedoch widersprechen und die Theorie nahelegen, dass sich die ersten Zellen in Zink-reicher Umgebung entwickelten (Abbildung 1). Dieses Zink soll in kontinentaler Umwelt, aus hydrothermalen Ablagerungen von Zinksulfiden (ZnS) mittels abiotischer Katalyse bzw. Photolyse freigesetzt worden sein (Mulkiđjanian, 2009; Mulkiđjanian und Galperin, 2009). Dieser Argumentation begegnen Dupont und Mitarbeiter, indem sie argumentieren, dass die Zink-bindenden Proteine zwar alt und allgegenwärtig sind, die ältesten jedoch weder weitverbreitet noch spezifisch Zink-bindend sind. Der größte Teil der Zink-Metalloenzyme hat sich erst nach dem Aufkommen der Eukaryoten entwickelt (Dupont und Caetano-Anollés, 2010). Ebenso soll das Fehlen von hochaffinen Zinkaufnahmesystemen in vielen marinen Cyanobakterien ein Hinweis auf die geringe Verfügbarkeit und Verwendung von Zink im Achaikum und den gesteigerten Mangel im Proterozoikum sein (Saito *et al.*, 2003) (Abbildung 1). Alte Zinkbindedomänen werden weiterhin durch die Cambalismus-Hypothese begründet. Diese beinhaltet die Nutzung unterschiedlicher Metallkofaktoren zum selben Zweck, entweder durch die Verwendung funktional gleicher Enzyme mit unterschiedlichen Metall-Bindestellen oder das direkte Ersetzen des Metallkofaktors in einem Protein. Superoxiddismutasen (MnSOD / FeSOD / CuZnSOD / NiSOD) sind ein Beispiel für die Verwendung funktional gleicher Proteine (Dupont *et al.*, 2008) und der Ersatz von Zink gegen Kobalt ist eine weitverbreitete Strategie von eukaryotischen Meeresphytoplanktons (Morel, 2008). Ein weiteres Beispiel wäre die Verwendung evolutionär alter Zink-unabhängiger ribosomaler Proteine statt Zink-abhängiger Isoformen bei Zink-Mangelbedingungen in *Escherichia coli* (Graham *et al.*, 2009). Doch kann die Entwicklung der eukaryotischen Zink-reichen Proteome mit weiteren evolutionären Faktoren verknüpft werden. So kann der erhöhte Zinkbedarf der Eukaryoten ebenso als Funktion der zunehmenden Genomregulation von Zink-bindenden Transkriptionsfaktoren beschrieben werden (Robbins *et al.*, 2013).

Alle diese Ereignisse in ihrer Gesamtheit spiegeln sich in der Verwendung von Übergangsmetallen in den heutigen Proteomen der sich entwickelten biologischen Vielfalt des Lebens wieder und zeigen Zink als essentielles Spurenelement in biologischen Systemen auf.

Das Metallom und die Metallomik / Metalloproteomik

In den letzten Dekaden ist in den Biowissenschaften der Trend zu *omiks* zu verzeichnen. Hierbei bezeichnet der Neologismus *omiks* Studien, die eine Gesamtheit betrachten, bspw. Genomik, Proteomik und Metallomik bzw. Metabolomik. Mit den Genomsequenzierungsprojekten begann die Ära der Genomik, welche den Zugang zu den kompletten Genomen von Organismen lieferte (Fleischmann *et al.*, 1995). Mit Zugang zu Genomsequenzdaten kamen die Biowissenschaften von den Genen zu Genomen und durch die Entwicklung bzw. Weiterentwicklung der Massenspektrometrie von den Proteinen zu den Proteomen (Aebersold und Mann, 2003; Bantscheff *et al.*, 2012). Die Röntgenkristallstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie generieren hochauflösende, dreidimensionale Strukturdaten von Proteinen sowie Makromolekülen. Hinterlegt werden diese Daten in der ständig wachsenden Proteindatenbank (Protein Data Bank, PDB) (Berman *et al.*, 2007; Berman *et al.*, 2013; Manjasetty *et al.*, 2007; Manjasetty *et al.*, 2008). So liefert die Proteomik Informationen über Lokalisation, Struktur und Funktion sowie Interaktion von und mit Proteinen auf der Ebene der Systembiologie (Bensimon *et al.*, 2012; Sabido *et al.*, 2012).

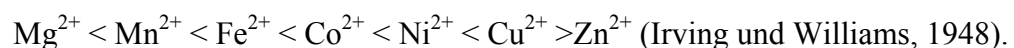
Ca. 30 % aller Proteine (Shi und Chance 2008) und ca. 50 % aller Enzyme (Waldron *et al.*, 2009) benötigen ein oder mehrere Metallkofaktoren. Somit führte der Weg von den Metalloproteinen weiter zu den Metallomen (Haraguchi, 2004; Williams, 2001). Metallomik und Metalloproteomik sind stetig wachsende Felder, die sich mit der Aufnahme, dem Transport, der Zuordnung und der Speicherung von Metallen in Zellen und Organismen beschäftigen. Dabei ist Metallomik definiert als die Analyse der Gesamtheit von Metallen und Metalloidspezies in der Zelle oder eines Gewebes, während Metalloproteomik auf die Erforschung der Funktionen von Proteinen, die mit Metallen assoziiert sind, fokussiert ist (Bertini und Cavallaro, 2008; Shi und Chance, 2008; Szpunar 2005). Zwar sind Metallomik und Metalloproteomik im Gegensatz zur Genomik und Proteomik relativ neue Fachgebiete. Jedoch können große Teile der bereits vorhandenen Datenmengen aus der Genomik und Proteomik, auch hier genutzt werden. So wurden unterschiedliche Ansätze aus der Proteomik zur Untersuchung in der Metallomik und Metalloproteomik entwickelt bzw. adaptiert (Abbildung 2).

Bioinformatische Analysen und Voraussagen der zahlreich vorhandenen Daten (-banken) sind ein weiterer Ansatz. Hierbei können aus (Sequenz-) Datenbanken mittels spezifischer Programme Metalloproteine vorhergesagt und identifiziert werden (Andreini *et al.*, 2013a, Dechen *et al.*, 2015). Aus der Kombination dieser Forschungsansätze sind Metallom-Analysen basierend auf generierten Datenbanken wie der *MetalPDB* (Andreini *et al.*, 2004a; Andreini *et al.*, 2004b; Andreini *et al.*, 2013b; Passerini *et al.*, 2011) oder der *MACiE* (Andreini *et al.*, 2009a; Klug, 2010) hervorgegangen (Andreini *et al.*, 2007; Andreini *et al.*, 2006c; Andreini *et al.*, 2008a) (Abbildung 2).

Resultierend aus diesen Arbeiten, zeigen die Metallome der Organismen eine vielseitige Verwendung von Metallen als Kofaktoren in den Metallo-Proteinen. Welche Metalle von der Zelle verwendet werden, hängt, wie bereits erläutert, in erster Linie von der Bioverfügbarkeit ab (Bannister, 1992).

Welches Metall jedoch spezifisch in das jeweilige Zielprotein inseriert, ist von einer Vielzahl von Bedingungen und Präferenzen in der Zelle abhängig. So wird die Metallierung (*metallation*) von schätzungsweise 30 % der Metalloenzyme durch unterschiedliche Belieferungsmaschinerien unterstützt und davon sind 25 % als Kofaktor vorassembliert. Bei den übrigen ca. 70 % wird davon ausgegangen, dass sie um die Metalle im zellulären „Metallpool“ konkurrieren (Andreini *et al.*, 2008b; Foster *et al.*, 2014).

Wenn jedoch keine zelluläre Unterstützung bzw. selektive Inserierung stattfindet, würden Proteine divalente Metallkationen nach ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften einbauen. In einem vereinfachten Zellmodell würde dieser Einbau nach Präferenz der Irving-Williams-Serie erfolgen:



Das heißt, wenn alle Metalle in gleicher Konzentration in der Zelle vorliegen, würden alle Metalloproteine Kupfer-Kofaktoren besitzen. Es ist natürlich eine grob naive Annahme, dass Proteine ihre Kofaktoren aus einer freien Lösung in der Zelle aufnehmen (Tottey *et al.*, 2007). Doch liegt die Zinkkonzentration in den meisten Zellen oft hundert- bis tausendfach niedrigerer als die Magnesiumkonzentration. So ermöglicht dies, das magnesiumhaltige Enzyme welche Zink präferieren, doch die Metalloenzyme dominieren (Foster *et al.*, 2014). Doch werden stärker bindende Metall-Kofaktoren beim konkurrieren um Bindestellen schwächer bindender nicht ferngehalten, kommt es zum Prozess der „Falschmetallierung“ (*mismetallation*). Dieser Prozess

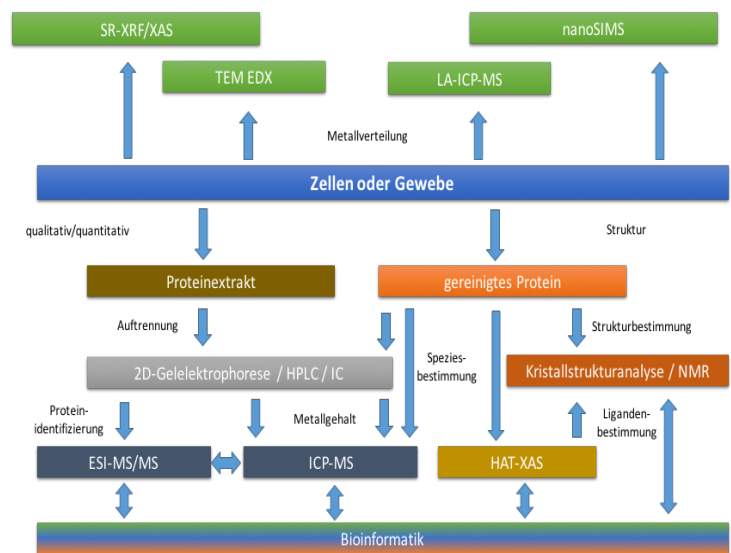


Abbildung 2: Übersicht der methodischen Ansätze der Metalloproteomik und Metallomik

LA-ICP-MS, nanoSIMS, TEM EDX und SR-XRF/XAS sind als bildgebende Verfahren der Spektroskopie und Spektrometrie geeignet zur Bestimmung der Metallverteilung in Zellen, Geweben und Organen (Becker *et al.*, 2007; Behrens *et al.*, 2012; Lobinski *et al.*, 2006a; Reith *et al.*, 2009). Proteinextrakte können durch verschiedene Techniken aufgetrennt bzw. separiert, mit beispielsweise ESI-MS/MS identifiziert und der Metallgehalt mittels ICP-MS bestimmt werden (Lobinski *et al.*, 2006b; Schaumloffel, 2007). Gereinigte Proteine können durch sich komplementierende Methoden wie der Kristallstrukturanalyse, NMR Spektroskopie und HAT-XAS in ihrer Struktur und Funktion analysiert und als Metalloprotein identifiziert werden (Chen *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2011; Hasnain and Strange, 2003; Latimer *et al.*, 2005). Durch diese identifizierten Metalloproteine können mittels bioinformatischer Analysen Metall-Bindestellen durch Strukturhomologien (Aminosäureebene) auf Proteomlevel bestimmt werden. Verändert nach Chi und Chance, 2008.

beschreibt den Einbau eines falschen Metallkofaktors in eine Proteinbindestelle, was zum Funktionsverlust bzw. zur Inaktivierung der Enzymaktivität führt (Waldron und Robinson, 2009). So ist für Kobalt, wie auch für Kupfer, bekannt, dass sie in der Lage sind den Zusammenbau von Eisen-Schwefel-Clustern am Gerüstprotein (*scaffold protein*) zu destabilisieren (Chillappagari *et al.*, 2010; Macomber und Imlay, 2009; Thorgersen und Downs, 2007). Dieses entstehende Mixcluster kann in das Apo-Zielprotein eingebaut werden und die Enzymaktivität inaktivieren (Ranquet *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel für die Falschmetallierung von Proteinen ist die Glyoxylase von *Clostridium acetobutylicum* (GlxI), die durch Kobalt- oder Nickelbindung in einer oktahedralen Geometrie aktiviert wird. Zink ist jedoch in der Lage in einer festeren trigonalen bipyramidalen Geometrie zu binden und die Isoform dieses Enzyms zu inaktivieren (Suttisansanee *et al.*, 2011). Doch ist die humane Glyoxylase I ein Zink- und die in *E. coli* vorkommende wiederum ein Nickel-abhängiges Metalloenzym (Clugston *et al.*, 1998; Thornalley, 1993). Ebenso führt die Verdrängung von Magnesium durch Zink zur Inaktivierung der β -Galaktosidase, Tyrosinkinase oder der Magnesium-abhängigen alkalischen Phosphatase (Ciancaglini *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 2002; Hung und Chang 2001; Sun und Budde 1999). So zeigt auch die Berechnung der notwendigen freien Energie für das Verdrängen von Magnesium durch Zink in festen und flexiblen Bindestellen, dass Zink immer bevorzugt wird (Hung und Chang, 2001). Die Gründe und das Ausmaß für diese Falschmetallierungen *in vivo* sind jedoch bis auf ein paar Ausnahmen unbekannt (Huang, M. *et al.*, 2014; Imlay, 2014).

Interessant ist die Steuerung der Enzymaktivität bei multipler Metallverwendung in cambalistischen bzw. promiskuitiven Proteinen (Foster und Robinson, 2011). Die Acireducton-Dioxygenase (ARD) von *Klebsiella oxytoca* ist ein Beispiel von Enzymen, die abhängig vom inseriertem Metallkofaktor ($\text{Fe}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$) zwei unterschiedliche Reaktionen katalysieren können (Dai *et al.*, 1999; Ju *et al.*, 2006; Wray und Abeles, 1995). Ein weiteres cambalistisches Enzym ist die Carboanhydrase (CA) der marinen Diatome *Thalassiosira weissflogii*. Diese CA (CDCA1) verwendet das eigentlich toxische Cadmium (Cd^{2+}) bei Zinklimitation (Zn^{2+}) im katalytischen Zentrum zur reversiblen Hydratisierung von CO_2 (Alterio *et al.*, 2015; Alterio *et al.*, 2012; Lane und Morel, 2000; Lane *et al.*, 2005; Price und Morel, 1990). Die Superoxiddismutasen (SOD's) von *Streptococcus mutans* und *Thermus filiformis* können ohne Verlust der Enzymaktivität Fe^{2+} wie Mn^{2+} verwenden (Mandelli *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 1986). Inseriert jedoch Eisen in die Mangan-abhängige SOD (MnSOD) von *E. coli* oder in die eukaryotische MnSOD der mitochondrialen Matrix, werden diese katalytisch inaktiviert (Culotta *et al.*, 2006). Diese falsch metallierten Proteine werden oft selektiv abgebaut, recycelt oder partiell entfälltet in ihrer Struktur. Dagegen kann der in korrekter Geometrie eingebaute Metallkofaktor die Faltung stabilisieren und vor Abbau schützen. Es ist unklar, ob

Proteinfaltungshelfer, wie das Hsp70 Chaperon, seine Co-Chaperone oder Nukleotidaustauschfaktoren, einen Einfluss auf die Metall-Bindepräferenzen haben.

Welche physikalischen und chemischen Eigenschaften der Metalle und Proteine die Metallpräferenz beeinflussen, wurde von Dudev und Lim bewertet. Sie beinhalten Valenz (Wertigkeit), Ionenradius, Koordinationsgeometrie, Anzahl der Liganden, Liganden der zweiten Schale, Effekte der Proteinmatrix und Ligandencharakteristik (Nettoladung, Dipolmoment, Polarisierung, Ladungsabgabe- und Aufnahmevermögen sowie Zähigkeit) (Dudev und Lim, 2014). Trotz dieser vielen unterschiedlichen Charakteristika, die zur Insertion bzw. Bindung eines Kofaktors abgestimmt werden können, weichen diese oft ab, wenn zwei Metalle bei der *in vitro* Metallierung konkurrieren (Tottey *et al.*, 2008).

Eine besondere Herausforderung für die korrekte Insertion sind Eisen und Mangan, da sie sich stark in ihrer Ligandenaffinität, Koordinationspräferenzen und ihrer freien Solvationsenergie ähneln (Dudev und Lim, 2014). Eisen und Mangan sind mit einem prozentualen Aufkommen von 8 % bzw. 6 % die dritt- und vierthäufigsten Metallkofaktoren von Enzymen. Außerdem stellen sie 18 % der 30 % von Metalloenzymen dar, die über bekannte Belieferungsmaschinerien verfügen. Weiterhin findet man Eisen häufig als Kofaktor in vorassemblierten Eisen-Schwefel-Clustern, Hämen und Sirohämen (San Francisco und Kranz, 2014). Die Unterscheidung zwischen diesen komplexen molekularen Strukturen der vorassemblierten Kofaktoren ist im Gegensatz zu einzelnen Metallionen weniger anspruchsvoll, wird aber oft durch Belieferungsproteine unterstützt. Eine wichtige Rolle in der Lieferung und Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern nimmt Monothiol-Glutaredoxin (Grxs), das Isc (*iron sulfur cluster*) und das Suf (*sulfur assimilation*) System ein (Mapolelo *et al.*, 2013).

Proteine die beitragen, ein spezifisches Metall bei der Assemblierung dieser komplexen Kofaktoren zu selektieren, werden Metallochaperone genannt. Der Begriff „Metallochaperon“ beschreibt eine Sammlung von Proteinen für eine Vielzahl von Metallen, die sich in ihren biochemischen Mechanismen unterscheiden (Foster *et al.*, 2014). Sie sind eine Gruppe von löslichen Metall-Rezeptorproteinen, die am intra- und extrazellulären Transport von Metallionen beteiligt sind. Diese Metallrezeptoren sind in ihrer Funktion weniger Detoxifizierungsproteine, sondern agieren eher in einer „Chaperon“-artigen Weise (O'Halloran und Culotta, 2000). Zu diesen zählen unter anderem auch Chelatasen für Häme, Kobalamin, Chlorophyll und Molybdopterin (Sandu und Brandsch, 2002; Schubert *et al.*, 1999; Tanaka und Tanaka, 2007). Beispiele sind Ferrochelatasen zur Insertion von Eisen in Häme und Sirohäme (Funk und Vermaas, 1999), Magnesiumchelatasen von Magnesium in Chlorophyll (Jensen *et al.*, 1996), CbiX für Kobalt in Kobalamin (Leech *et al.*, 2003), MoeA für Molybdän in Molybdopterin, CyaY für Eisen in Eisen-Schwefel-Clustern und möglicherweise PrtA für Magnesium im Chlorophyll des Photosystem II (Stengel *et al.*, 2012).

Das Konkurrieren bei der Metallierung von zwei Metallen wie Nickel und Kupfer wird oft durch Metallochaperone gelöst, die das jeweilige Metallion direkt auf das Zielprotein (Transporter oder Metalloenzym) übertragen. Die am besten untersuchten Kupferbelieferungswege sind die der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dort nehmen die Metallochaperone Atx1, CCS, Cox17 und Sco1 eine zentrale Rolle in der Kupferbelieferung der Zielproteine ein (Rosenzweig, 2002; Ohrvik und Thiele, 2014; Robinson und Winge, 2010).

Im Vergleich zur Eisen- oder Kupferbelieferung sind die Nickelwege relativ einfach, da Bakterien Nickel meist nur für eine geringe Anzahl an Zielenzymen verwenden (Higgins *et al.*, 2012; Martinez-Finley *et al.*, 2012). Zu diesen Enzymen zählen die Ureasen, NiFe-Hydrogenasen, Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen (Anaerobier), Acetyl-CoA-Synthetase, Methyl-Coenzym-M Reduktasen, manche Glyoxylasen und eine Superoxiddismutase (SOD) (Kim *et al.*, 2014; Mulrooney und Hausinger, 2003; Ragsdale, 2009). So besitzen alle Organismen die eine NiFe-Hydrogenase synthetisieren ein HypA Metallochaperon zur Nickelbelieferung der großen Untereinheit der Apo-Hydrogenase. In *E. coli* ist HypA bzw. das Homolog HybF in einem Komplex mit HypB und SlyD für die Belieferung und Insertion der Hydrogenasen mit Nickel verantwortlich (Watanabe *et al.*, 2012; Kaluarachchi *et al.*, 2012). Die Aktivierung des Apo-Urease Enzymes erfolgt durch einen Komplex, bestehend aus UreD, UreE, UreF und UreG, wobei UreE als Nickelchaperon die Urease mit Nickel beliefert (Zambelli *et al.*, 2011).

Durch die Vorassemblierung und die Belieferung durch Metallochaperone könnte das Konkurrieren von unterschiedlichen Metallkofaktoren an einer Metallbindestelle für 30 % der Metalloenzyme gelöst sein (Foster *et al.*, 2014). Es wird davon ausgegangen, dass die Affinität des Metallochaperons zum korrekten Metallkofaktor, mit dessen freier intrazellulären Konzentration korreliert, um Falschmetallierung zu verhindern (Foster und Robinson, 2011). Meist ist jedoch unklar aus welcher Quelle die Kofaktoren der Metallochaperone stammen sowie ihre Affinitäten und der Metallbedarf aus den Belieferungswegen. Möglicherweise bekommen sie diese direkt von den Aufnahmesystemen (Transportern/Importern) durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen. Diese Idee ist weitverbreitet, aber kaum belegt (Foster *et al.*, 2014).

Obwohl Zink (Zn^{2+}) nach Magnesium (Mg^{2+}) der zweit meistverwendete Kofaktor in Metalloenzymen ist, mit einem Anteil von 9 % aller Enzyme, sind bis heute keine Belieferungsmaschinen bekannt (Waldron und Robinson, 2009; Waldron *et al.*, 2009). Daher ist das Forschungsfeld der Metallierung, Funktion und Regulierung von Zink-abhängigen Enzymen und Proteinen der jeweiligen Proteome bzw. Metallome eine der nächsten Jahrzehnte andauernde Herausforderung der Biowissenschaften.

Das Zinkproteom und die Zinkhomöostase

Die **Zinkproteome** der Prokaryoten und Eukaryoten zeigen viele evolutionäre Homologien der Metalloproteine, aber unterscheiden sich vor allem im relativen Verhältnis von Zink zu Eisen in der Anzahl ihrer Metalloproteine (Andreini *et al.*, 2006b). Gründe dafür liegen in der globalen und/oder lokalen evolutionären Anpassung der Zellsysteme. Verschiedene heutige Theorien sehen unterschiedliche, aber oft verknüpfte Ursachen und kausale Zusammenhänge dafür verantwortlich. Diese reichen von frühen evolutionären Anpassungen an die Veränderungen der Bioverfügbarkeit von Eisen und Zink durch das Auftreten des Sauerstoffes im Achaikum und Proterozoikum der Erdgeschichte, die Entwicklung der aeroben Atmung über die Entstehung der Multizellularität bis zur Diversität und Anzahl der Zinkfinger-Regulatoren der heutigen Eukaryoten, von den Protisten bis zu den Mammalia (Anbar, 2008; Dupont *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2012; Madigan, 2013; Robbins *et al.*, 2013).

Durch das Voranschreiten der Genomsequenzierungen von einer wachsenden Anzahl von Organismen sind die theoretischen Proteome zugänglich geworden. Mit Hilfe von experimentellen und bioinformatischen Annotationen Metall-bindender Proteindomänen wurde die strukturelle Charakterisierung aller Proteine der Proteome begonnen (Andreini *et al.*, 2004a; Sousa *et al.*, 2009). Dies ist jedoch ein dynamisch verändernder Prozess, abhängig vom wachsenden Wissen der korrekten Annotation homologer Metalloproteine und der jeweiligen verwendeten Kofaktoren in unterschiedlichen Organismen (Andreini *et al.*, 2006b).

Erste Untersuchungen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. So wurden einmal die Proteome von 57 repräsentativen Organismen aller drei Reiche des Lebens (40 Bakterien, 12 Archaeen und 5 Eukaryoten) nach ihrer Anzahl von Zink-bindenden Proteinen aufgrund der in der PDB (*protein data base*) hinterlegten Strukturen, der Zink-bindenden Domänen der Pfam Domänenbibliothek, unabhängiger PHI-BLAST/BLAST-Analysen und der daraus resultierenden Zink-Bindemustern zugeordnet (Andreini *et al.*, 2006c). Gleichzeitig wurden von einer anderen Arbeitsgruppe etwa 300 Organismen (233 Bakterien, 23 Archaeen und 57 Eukaryoten) nach ihrer Anzahl an Zinkproteinen, ebenfalls basierend auf den in der PDB hinterlegten Strukturen und mittels der SCOP-Datenbank (*structural classification of proteins*) analysiert (Dupont *et al.*, 2006). Mit diesen dort ermittelten Daten konnte einmal gezeigt werden, dass die Anzahl der vorhergesagten Zink-bindenden Proteine direkt linear mit zunehmender Proteomgröße der Organismen korreliert. Und zum anderen korreliert linear die Anzahl der Zinkdomänen mit zunehmender Gesamtanzahl der Domänen eines Proteoms. Dieser Anstieg zeigt sich bei den Archaea, Bakteria und Eukarya, wobei der lineare Anstieg der Eukaryoten im Gegensatz zu den Prokaryoten größer ist. Dies beschreibt eine erhöhte Zunahme der Zink-bindenden Domänen bei steigender Anzahl von Strukturdomänen der eukaryotischen Proteome. Vergleicht man die

Gesamtdomänenanzahl mit der gesamten Anzahl der Metall-bindenden Domänen der Proteome, führt dies zu einer unabhängigen linearen Korrelation mit gleichem Anstieg in allen drei Superreichen. Damit kommt es zur Annahme, dass die variierenden Metallbindedomänen der unterschiedlichen Kofaktoren in ihrer Gesamtheit eine grundlegende und konstante Rate in allem Leben zeigt (Dupont *et al.*, 2010). Die prozentuale Größe des durchschnittlichen Zinkproteomes gemessen am Gesamtproteom ist bei Prokaryoten (Archaea 4,9 % ± 0,2 % und Bakteria 6,0 % ± 0,2 %) geringer als bei Eukaryoten (8,8 % ± 0,4 %) (Andreini *et al.*, 2006b). Für das humane Zinkproteom ergaben diese Auswertungen einen prozentualen Anteil von 9,2 %, was mit einer früheren Studie mit 10 % ± 1 % übereinstimmt (Andreini *et al.*, 2006a). Bei der Verteilung von Zink-abhängigen Proteinen des Zinkproteomes der Prokaryoten sind Enzyme mit 83 % der abundanteste Anteil, gefolgt von Proteinen beteiligt an der Transkription (8 %), Signaltransduktion (1 %) sowie Speicherungs- und Transportproteine (5 %). Dagegen kommen die Eukaryoten auf 47 % Enzyme und einem fast gleichen Anteil von 44 % Proteine der Transkription, mit 1 % Proteinen beteiligt an der Signaltransduktion und 5 % Speicherungs- und Transportproteinen. Von ca. $\frac{2}{3}$ der prokaryotischen Zinkproteine existieren Homologe in den Eukaryoten, die restlichen $\frac{1}{3}$ sind ausschließlich Bestandteil der prokaryotischen Proteome. Aber $\frac{3}{4}$ der eukaryotischen Zinkproteine sind ausschließlich in Eukaryoten vorhanden, was darauf hinweist, dass diese erst später in der Evolution entstanden sind. Die an der Transkription beteiligten Proteine stellen den größten Teil dieser Gruppe dar und von den heute bekannten sind etwa 80 % auf die Eukaryoten beschränkt. Dabei sind über 75 % der Zink-abhängigen Enzyme ubiquitär verbreitet und geben damit den Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung (Andreini *et al.*, 2009b). 2009 konnten in der PDB 954 Zinkproteine identifiziert werden, von denen 508 (53 %) Enzyme sind. Hier zeigt sich eine weitere Besonderheit in der Verwendung und der Bedeutung der zellulären Biochemie von Zink, da es in allen sechs EC-Enzymklassen (EC 1 = Oxidoreduktasen, EC 2 = Transferasen, EC 3 = Hydrolasen, EC 4 = Lyasen, EC 5 = Isomerasen und EC 6 = Ligases) als Kofaktor zu finden ist. Somit ist Zink ein essentieller Faktor in fast allen metabolischen Prozessen (Barrett, 1997; Sousa *et al.*, 2009).

Dabei legt jedoch die Proteomstöchiometrie der Metall-bindenden Proteine nicht den physiologischen Metallbedarf eines spezifischen Organismus fest, denn einzelne Metalloproteine können einen großen Anteil am Gesamtproteom einzelner Organismen ausmachen und damit den Metallbedarf einseitig verschieben (Dupont *et al.*, 2006; Quigg *et al.*, 2003; Quigg *et al.*, 2011).

Die Aufrechterhaltung des Zinkbedarfs (Zn^{2+}) eines Organismus umfasst alle Proteine, die an der **Zinkhomöostase** beteiligt sind. Dabei bezeichnet die Homöostase (griechisch „Gleichstand“) die Aufrechterhaltung eines offenen, dynamischen und stabilen Zustandes durch intern regelnde und rückkoppelnde Prozesse als selbstregulierendes System. So sind Zellen dynamische Systeme, die

durch Influx (Aufnahme) und Efflux (Ausstrom) Zink im höheren μM Bereich akkumulieren (Colvin *et al.*, 2010; Krezel und Maret, 2006; Outten und O'Halloran, 2001). Dieser Transport ist abhängig von der Zinkverfügbarkeit und der Abundanz der Transportsysteme (Nies, 2007b). Unterschiedliche Studien haben jedoch gezeigt, dass freies intrazelluläres Zink im pM – fM in einer *E. coli* oder im nM - pM Bereich einer eukaryotischen Zelle vorliegt (Krezel und Maret 2006, Outten und O'Halloran, 2001; Wang *et al.*, 2012). Übereinstimmend liegt die Dissoziationskonstante von vielen Zink-bindenden Proteinen im Bereich der freien Verfügbarkeit von Zink (Foster und Robinson, 2011; Tottey *et al.*, 2008; Zimmermann *et al.*, 2009).

Die Transportsysteme können auf Transkriptionsebene durch Zinksensorproteine (Regulatoren) reguliert werden. In Eukaryoten ist auch posttranskriptionale und posttranslationale Regulation bekannt (Dufner-Beattie *et al.*, 2004; Weaver *et al.*, 2007). Ebenso existiert eine allosterische und Metall-modulierte Protein-Turnover-Regulation (Chivers, 2007; Pruteanu *et al.*, 2007). Weiterhin verfügen Zellen über eine Pufferkapazität um Schwankungen im Zinklevel ausgleichen zu können (Colvin *et al.*, 2010). Die Stärke dieses Puffervermögens und die Regulation des freiverfügbaren-intrazellulären Zinks wird unter anderem durch niedermolekulare Substanzen wie Glutathion (GSH), Bacillithiol oder in vielen Eukaryoten und manchen Prokaryoten durch die Synthese von Metallothioneinen (MTs, kleine Cystein reiche Proteine) gewährleistet (Ma *et al.*, 2014). MTs waren die ersten entdeckten Proteine der Metallhomöostase. Seit den ersten identifizierten Vertretern aus Pferdenieren wurden MTs aus einer Vielzahl von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien isoliert (Blindauer 2011; Isani und Carpene, 2014; Kagi und Vallee, 1961; Leszczyszyn *et al.*, 2013). Bakterielle MTs wie SmtA wurden in den Cyanobakterien *Synechococcus* PCC 7942 und BmtA in *Anabaena* PCC 7120 sowie in Pseudomonaden und anderen α - und γ -Proteobakterien beschrieben (Blindauer *et al.*, 2002).

Eine neue Familie von Proteinen, die an der intrazellulären Zinkpufferung beteiligt sein könnte, ist COG0523 (Haas *et al.*, 2009). Die Vertreter dieser Proteinfamilie gehören wie HypB und UreG zu den G3E GTPasen und wären die ersten identifizierten Zinkchaperone (Blaby-Haas *et al.*, 2012; Sydor *et al.*, 2013). Jedoch sind noch weitere Untersuchungen nötig, um ihre biologische und molekulare Funktion in der Zinkhomöostase zu klären.

Freies Zink wird nicht nur im Zytoplasma, sondern auch in den Kompartimenten (Zellkern, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Lysosomen, etc.) aufgrund dort lokalisierter Zink-abhängiger Proteine strikt reguliert (Ellis *et al.*, 2004). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass das Periplasma der gramnegativen Bakterien ebenso ein Zink-kontrolliertes Kompartiment ist. Reguliert wird dieses Kompartiment durch Sensorproteine und (Metallo-) Chaperone, um möglicherweise die korrekte Metallierung von Zink-abhängigen Proteinen wie der alkalischen Phosphatase sicherzustellen (Appia-Ayme *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2009; Wang und

Fierke, 2013). Ein Beispiel wäre das Zwei-Komponenten-System (ZraSR) kontrollierte Zink-bindende, periplasmatische Protein ZraP aus *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (Appia-Ayme *et al.*, 2012). Dies wird bei einströmenden Zinkionen induziert und kann große Mengen dieser überschüssigen Ionen binden (Sevcenco *et al.*, 2011). Ein weiteres Beispiel ist das Zur-kontrollierte periplasmatische ZinT Protein aus *E. coli* (Graham *et al.*, 2009; Ilari *et al.*, 2014; Petrarca *et al.*, 2010).

Die Thermodynamik von Metallbindungen steht im Mittelpunkt der Metallhomöostase und wird oft durch die Affinitäts- und Dissoziationskonstanten beschrieben. So sind die Dissoziationskonstanten von zytoplasmatischen Zink-abhängigen Proteinen oft im nM und die von Membrantransportern und extrazytoplasmatischen Proteinen im μM - nM Bereich (Waldron *et al.*, 2009; Xiao und Wedd, 2010; Zawisza *et al.*, 2012). Viele Homöostaseproteine zeichnen sich durch eine schnelle Kinetik von Metallbindung und Freisetzung aus, im Gegensatz zu Zink-abhängigen Enzymen und Strukturproteinen. Ein Beispiel dafür ist der Vergleich der Halbwertszeit von Zink in seiner Bindestelle, die bei Carboanhydrasen im Bereich von Jahren und bei Metallothioneinen von Sekunden liegt (Maret, 2005). So ist es nicht überraschend, dass die Struktur und Eigenschaften der Metall-Bindestellen von Zinksensoren und Zinktransportern oft unterschiedlich im Vergleich zu Zink-abhängigen Enzymen sind (Argüello *et al.*, 2012; Finney und O'Halloran, 2003).

Die an der Zinkhomöostase beteiligten Proteine können in Zinksensoren, in membrangebundene Transporter und in die schon genannten intrazellulären (extrazellulären) Bindeproteine eingeteilt werden (Abbildung 3). Kombinierte Studien über die *in vivo* Funktion von Metalloproteinen und detaillierte biophysikalische Untersuchungen von gereinigten Proteinen haben maßgeblich zum Verständnis von Metalloregulation beigetragen (Blindauer, 2015). Man kann grundsätzlich zwei Arten von **Zink Sensorproteinen** unterscheiden, zum einen die Sensoren/Regulatoren, die auf Zinkmangel und zum anderem welche auf Zinküberschuss reagieren. Bei Zinkmangel unterliegen vor allem ABC- und ZIP-Transporter sowie mögliche Zinkchaperone und andere Zink-bindende Proteine dieser Regulation.

Dagegen werden bei Zinküberschuss vorwiegend ATPasen, CDF- und RND-Transporter sowie Metallothioneine und periplasmatische Bindeproteine (ZraP) angeschaltet. Die verantwortlichen Regulatoren sind meist zytoplasmatisch lokalisiert, kommen aber auch als periplasmatisch sensierende Zwei-Komponenten-Systeme vor (Foster *et al.*, 2014; Guerra und Giedroc, 2012).

Die bakteriellen Regulatoren sind die am besten untersuchten und agieren mit zwei unterschiedlichen Mechanismen als Aktivator und/oder Repressor (Choi und Bird, 2014). Beispiele sind der Repressor Zur (*zinc uptake regulator*) und der Aktivator ZntR (Brocklehurst *et al.*, 1999; Hantke 2005). Diese bakteriellen Regulatoren binden an spezifischen Erkennungssequenzen (*inverted repeats*) im Promoterbereich ihrer Zielgene (Osman und Cavet 2010). In Säuger- und

Insektenzellen werden MREs (*metal response element*) und ZTREs (*zinc transcription response element*) von Zinkfingerproteinen wie MTF-1 erkannt (Coneyworth *et al.*, 2012; Gunther *et al.*, 2012). In Hefen sind es bei Zinkmangel ZREs (*zinc response element*) sowie in Pflanzen die ZDREs (*zinc deficiency response element*) welche durch bZIPs (*basic leucine zipper*) erkannt werden (Assuncao *et al.*, 2013; Eide 2009).

Die Transkriptionsregulation beruht zum großen Teil auf der Allosterie der Regulatoren. Durch die Zinkbindung kommt es zur Konformationsänderung, Stabilisierung der Proteinkonformation, Änderung der Quartärstruktur (Dimerisierung) und Steigerung oder Schwächung der Affinität zum DNA Bindemotiv (Erkennungssequenz/Palindrom/*inverted repeat*) (Guerra und Giedroc, 2012; Reyes-Caballero *et al.*, 2011). Dabei resultiert die korrekte Metallbindung des Sensors/Regulators aus einer Korrelation von freier, intrazellulärer Metallkonzentration und Dissoziationskonstante der Metall-Protein-Kombination (Foster *et al.*, 2014; Foster und Robinson, 2011).

In den letzten Dekaden konnten verschiedene Proteine, die am **Transport von Zn²⁺** und anderen Ionen beteiligt sind und diesen vermitteln, identifiziert werden (Argüello *et al.*, 2012). All diese Membrantransporter können nach der TCDB (*Transporter Classification Database*) ähnlich dem EC-System für Enzyme in drei Klassen eingeteilt werden (Barrett, 1997; Saier *et al.*, 2006). Klasse 1 umfasst die Kanäle und Poren, Klasse 2 die durch ein elektrochemisches Potenzial energetisierten Transporter (sekundäre) und die Klasse 3 die primären Transporter. Für eine endgültige Klassifizierung vieler Transporter existieren oft nur wenige Informationen. Und doch unterscheiden sich die Zinktransporter bzw. Transporter für Metallionen der 3d Reihe von denen für Alkali und Erdalkalimetalle. Zink neigt außerdem zu starken Komplexbindungen, reduziert damit Mobilität und die hohe Affinität führt zu einem langsamen Transport im Vergleich zu den Alkali- und Erdalkalimetallen (Argüello *et al.*, 2012). Davon abgesehen kann der Zinktransport aktiv oder passiv, mit oder gegen einen Zinkgradienten erfolgen, die meisten identifizierten Transporter sind jedoch aktive (Abbildung 3).

Die **ABC-Transporter** (***ATP binding cassette, TC3.A.1***) gehören zu den primären Transportern und sind generell aus drei Untereinheiten aufgebaut, einer zytosolischen dimeren ATPase Einheit, einer dimeren Membranpermease und dem periplasmatischen SBP (*substrat binding protein*) (Davidson und Chen, 2004; Schneider und Hunke, 1998). Die bekanntesten Mitglieder sind das hochaffine Zinkaufnahmesystems ZnuABC der gramnegativen Bakterien und das AdcABC sowie ZitSPQ der grampositiven Bakterien (TC3.A.1.15) (Bayle *et al.*, 2011; Patzer und Hantke, 1998; Weston *et al.*, 2009). Da für Zink ABC-Transporter keine Strukturinformation vorliegen, wird beispielsweise vom Kobalamin Transporter BtuCD-F geschlossen, dass das SBP einen Komplex mit der Permease bildet, diese mit dem Substrat beliefert und dieses durch den Kanal der Permease

aufgenommen wird (Korkhov *et al.*, 2012). Andere ABC-Transporter sind an der Aufnahme von organischen und inorganischen Substraten sowie Metallchelaten (Siderophoren / Porphyrine) beteiligt (Klein und Lewinson, 2011).

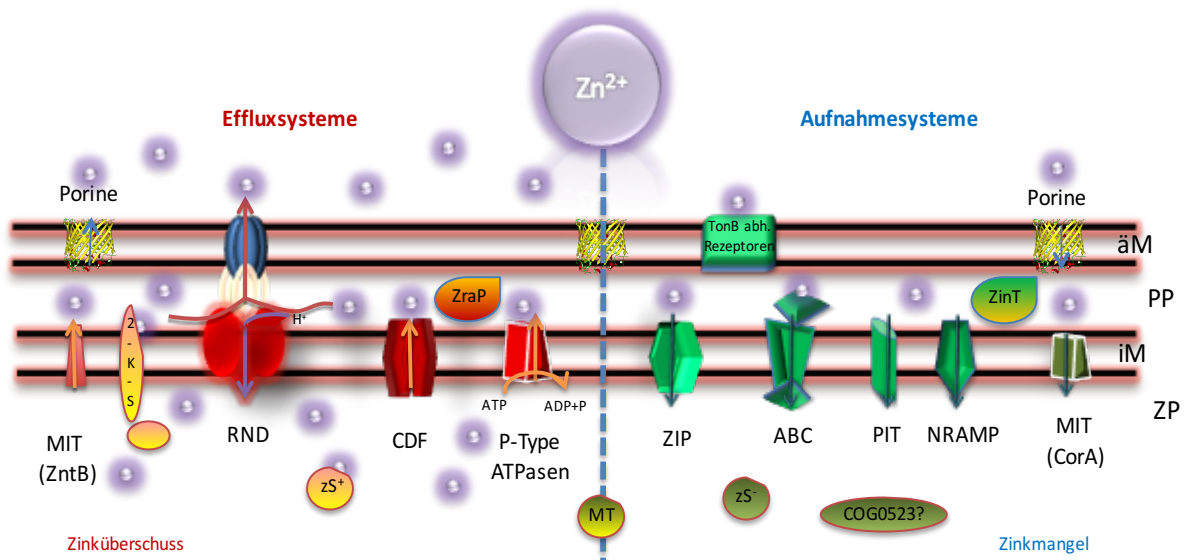


Abbildung 3: Dargestellt sind die an der Zinkhomöostase beteiligten Proteine der gramnegativen Bakterien.

Rot dargestellt sind Proteine, die am Efflux bei Zinküberschuss und grün die an der Zinkaufnahme bei Zinkmangel beteiligt sind. Periplasmatische Zinkchaperone sind als ZraP und ZinT, sowie mögliche zytoplasmatische als COG0523 Familie gekennzeichnet. Die HME-RND (Bsp. CzcCBA) oder ZraP-regulierenden Zwei-Komponenten-Systeme mit Membrandurchspannender Sensorkinase und zytosolischen DNA-Bindeprotein sind gelb als 2-K-S dargestellt. Die ubiquitär verbreiteten ZIP und CDF Proteine sind ebenso in den Eukaryoten an der Zinkaufnahme und dem Zinkefflux beteiligt. Die Zink-transportierenden P-Type-ATPasen sind ebenfalls in Pflanzen, aber nicht in den Säugetieren bekannt. ABC-Transporter wie ZnuABC, HME-RND Systeme, Porine der äusseren Membran und ExxB/ExxD (nicht dargestellt) energetisierte TonB-abhängige Rezeptoren sind nur in Bakterien bekannt. Zytosolische Regulatoren wie ZntR, welche als Aktivatoren bei Zinküberschuss fungieren und die Transkription der Gene für P-Typ-ATPasen wie ZntA stimulieren, sind als zS^+ gekennzeichnet und Repressoren wie Zur als zS^- . Metallthioneine (MTs) sind an der intrazellulären Zinkbindung bei Überschuss und Mangel in Bakterien und Eukaryoten beteiligt. Weiterhin ist ZntB als Effluxsystem der MIT Proteinfamilie dargestellt sowie die PIT Familie (Bsp. PitA), die NRAMP Familie (Bsp. MntH) und CorA der MIT Familie als unspezifische Zink-Aufnahmesysteme. Die Abkürzungen äM stehen für äussere Membran, PP – Periplasma, iM – innere Membran und ZP – Zytoplasma. Die Abbildung wurde nach Blindauer, 2015 verändert.

Die Mitglieder der **P-Typ-ATPasen Familie (TC3.A.3)** sind am Transport aller biologisch relevanten Metalle beteiligt. Sie sind aus 6-10 Transmembranhelices (TMHs) mit mehreren zytosolischen Domänen (Nukleotidbindedomäne (N), Phosphorylierungsdomäne (P) und Aktuatordomäne (A)) aufgebaut (Argüello *et al.*, 2007). Viele dieser am Metalltransport beteiligten ATPasen besitzen eine N-terminale Metallbindedomäne (MBD oder HMA für *heavy-metal associated domain* (Gourdon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Die Zink (Zn^{2+}) transportierenden P_{IB2} -Typ-ATPasen sind in allen Reichen des Lebens verbreitet, mit Ausnahme der Mammalia. Gut untersuchte Vertreter der Pflanzen sowie Bakterien sind am zytosolischen Zinkefflux in den extrazellulären Raum, in Kompartimente oder Organellen beteiligt. Sie weisen in THM 6 ein CPC-Motiv (Cystein-Prolin-Cystein) auf, unterscheiden sich aber im MBD (DCxxC-ZntA oder CCxxE-HMA4). Beispiele sind ZntA aus *E. coli*, ZiaA aus *Synechocystis* oder HMA4 aus *Arabidopsis thaliana* (Banci *et al.*, 2002; Banci *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2009). Auch unter den P_{IB4} -

Type ATPasen sind Zink transportierende Vertreter bekannt, die Anstelle eines CPC- ein SPC-Motiv (Serin-Prolin-Cystein) in TMH 6 besitzen (Scherer und Nies, 2009).

Dagegen sind die Proteine der **CDF (cation diffusion facilitator) Familie (TC2.A.4)** sekundäre aktive Transporter, die durch ein elektrochemisches Potential, die *pmf* (*proton motive force*), als Metall/Protonen-Antiporter angetrieben werden (Chao und Fu, 2004; Ohana *et al.*, 2009). Sie vermitteln den Efflux aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum oder in Kompartimente (Vakuole-Pflanzen / Hefen, Mitochondrien, ER, Golgi, Lysosomen, Endosomen, synaptische Vesikel oder sekretorische Granulas der Mammalia) (Kambe, 2011; Schweigel-Rontgen, 2014). Die Mitglieder der CDF Familie sind ubiquitär verbreitet und transportieren Zink, Cadmium, Kobalt, Eisen und Mangan. Aufgrund ihrer Substratspezifität werden sie in drei Gruppen eingeteilt, Mn-CDF, Fe/Zn-CDF und Zn-CDF plus andere Metallionen (Montanini *et al.*, 2007). Die 10 CDF Transporter der Mammalia der SLC30 Proteinfamilie, auch ZnTs genannt, sind meist aus sechs TMHs (Ausnahme Znt5) mit zytoplasmatischen N- und C-Termini aufgebaut (Cragg *et al.*, 2002). Diese sind hauptsächlich am Zinktransport beteiligt und in diverse Krankheitsbilder involviert, dort stehen sie in Verbindung mit Typ 1 & 2 Diabetis, dem *lethal milk syndrom*, neonatalem Zinkmangel und kognitiven Disfunktionen (Huang und Gitschier, 1997; Myers *et al.*, 2012). YiiP (FieF, TC2.A.4.7.1) aus *E. coli* ist ein Fe/Zn-CDF Protein, aufgebaut aus sechs TMHs pro Monomer eines Homodimers mit einer zytosolischen MBD (Blindauer und Schmid, 2010). Im Dimer sind die MBDs der Monomere über zwei tetrahedral koordinierte Zinkionen verknüpft und diese MBD ist konserviert in vielen Fe/Zn-CDFs. Eine zweite zytosolische MBD ist zwischen THM 2 und 3 lokalisiert sowie eine dritte zwischen THM 5 und 6 (Lu und Fu, 2007; Wei und Fu, 2006). Mutationen in der zytosolischen MBD der CDF-Proteine CzcD (*Cupriavidus metallidurans*) und ZitB (*E. coli*) zeigen noch einen Transport *in vivo*. Diese MBD ist möglicherweise ein regulatorischer Sensor bei Zinküberschuss im Zytoplasma (Blindauer, 2015). Jedoch ist die C-terminale MBD benötigt für die volle Funktion des Transporters (Anton *et al.*, 2004).

Die Familie der **ZIP-Transporter (TC2.A.5)** findet man in allen Reichen des Lebens von den Archaeen und (Eu-)Bakterien über Pflanzen und Pilze bis zu den Säugetieren. Sie sind strukturell charakterisiert durch konservierte Sequenzmotive und die meisten werden mit ähnlicher Topologie von acht TMHs vorausgesagt. Sequenzmotive befinden sich in der „variablen Region“ des zytoplasmatischen Loops ((HX)_n) zwischen TMH 3 und 4 sowie in TMH 4 und 5 (Histidine) (Eide, 2005). Der N- und C-Terminus ist extrazytoplasmatisch lokalisiert (Guerinot, 2000). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Versorgung von Metalloproteinen durch Aufnahme von Zink in das Zytosol aus dem extrazellulären Raum oder in Kompartimente und Organellen (Eide, 2005). Jedoch reicht das Substratspektrum der ZIP Transporten von Zink über Eisen bis Kobalt, Mangan, Cadmium und Nickel (Grass *et al.*, 2005a; Kramer *et al.*, 2007, Taudte und Grass, 2010; Vert *et al.*,

2002). Die ersten entdeckten Vertreter waren IRT (*iron regulated like protein*) und ZRT (*zinc regulated like protein*) aus *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae* (Eide, 1998; Grotz *et al.*, 1998). Sie werden in vier Unterfamilien ZIP I, ZIP II, GufA und LIV-1 (LZT) eingeteilt. Die 14 identifizierten humanen ZIP Transporter (SLC39) werden in die Unterfamilie ZIP II (hZIP1-3) und LIV-1 (hZIP4-14) eingruppiert und sind wie die humanen CDF Proteine an einer Vielzahl von Krankheitsbildern involviert (Myers *et al.*, 2012). In Pflanzen wie *A. thaliana* sind 18 ZRT/IRT Transporter bekannt, der Unterfamilie ZIP I (Blindauer und Schmid, 2010). Die Regulation der Expression ist sehr divers. Manche scheinen konstitutiv exprimiert, während andere induzierbar sind. So wird ZRT1 und ZRT2 in *S. cerevisiae* durch den Transkriptionsfaktor ZAP1 bei Zinkmangel induziert (Choi und Bird, 2014). In tierischen Zellen ist kein Regulator im Vergleich zum bZIP-Protein der Pflanzen bekannt. Jedoch existieren dort vielfältige posttranskriptionale und posttranslationale regulierte Prozesse sowie die Kontrolle der Transport- und Abbaurate (Dufner-Beattie *et al.*, 2004; Jeong und Eide 2013; Weaver *et al.*, 2007). Der erste identifizierte bakterielle ZIP Transporter der Unterfamilie GufA (*gene of unknown funktion A*) war ZupT (*zinc uptake transporter*, ursprünglich als YgiE annotiert) aus *E. coli* (Grass *et al.*, 2002). Auch bei den bakteriellen ZIP Transportern zeigt sich eine hohe Diversität in der Regulation. Im Vergleich zu den induzierbaren ZIP Transportern des Frischwasser Cyanobakteriums *Nostoc punctiforme* wird *zupT* aus *E. coli* wie auch aus *Salmonella* konstitutiv exprimiert (Cerasi *et al.*, 2014; Grass *et al.*, 2005a; Hudek *et al.*, 2013). Die Diversität der Regulation der ZIP Transporter scheint nur noch durch die möglichen Arten ihrer Energetisierung gesteigert zu werden. So konnte gezeigt werden, dass der ZRT1 bzw. ZRT2 vermittelte Zinktransport in *S. cerevisiae* energieabhängig erfolgt (Zhao und Eide, 1996a; Zhao und Eide, 1996b), wohingegen der vermittelte Transport durch die humanen ZIP Transporter hZIP1, 2, 8 und 14 mittels Hydrogencarbonat *in vivo* stimuliert wird. Daher wurde hier ein $\text{HCO}_3^-/\text{Me}^{2+}$ Symport postuliert (Cerasi *et al.*, 2014; Girijashanker *et al.*, 2008; Jeong und Eide, 2013; Liu *et al.*, 2008). Dagegen konnte für den in Proteoliposomen rekonstituierten ZIP Transporter ZIPB aus *Burdetella bronchiseptica* ein passiver Transport durch Elektrodifusion gezeigt werden. Dieser vermittelte Transport ist pH, aber nicht *pmf* oder HCO_3^- abhängig beschrieben (Lin *et al.*, 2010). Es sind jedoch insgesamt wenig biophysikalische Daten und keine Strukturinformationen in den Datenbanken vorhanden. Gründe dafür sind eine schwierige Synthese der ZIP Transporter sowie sie in funktioneller Form zu reinigen und zu rekonstituieren (Blindauer, 2015; Zhao und Eide, 1996a; Zhao und Eide, 1996b).

Weitere Zinktransporter finden sich in der Proteinsuperfamilie der triparenten **RND-Systeme** (*resistence-nodulation-cell-division*, TC2.A.6). Mitglieder dieser Superfamilie sind in allen Reichen des Lebens vertreten und unterteilen sich in die HME (*heavy metal efflux*), HAE1/2/3 (*hydrophobe / amphiphile efflux-1/2/3*), die NFE (*nodulation factor exporter*), die SecDF (*SecDF protein-*

secretation accessory protein) und die ESH (*eucaryotic sterol homeostasis*) Familie (Tseng *et al.*, 1999). Die HME Familie mit seinen Vertretern der gramnegativen Bakterien unterteilt sich weiter in monovalente (Bsp. Cus-System aus *E. coli* als Cu^+/Ag^+ -Transporter) und divalente Kationentransporter (Long *et al.*, 2012). Zu den Zink (Zn^{2+}) transportierenden divalenten Kationentransportern zählt das CzcCBA aus *Caulobacter crescentus*, das ZneCBA und CzcCBA aus *C. metallidurans* sowie aus *Pseudomonas aeruginosa* (De Angelis *et al.*, 2010; Dieppois *et al.*, 2012; Nies, 1995; Pak *et al.*, 2013; Valencia *et al.*, 2013). Aufgebaut sind diese Systeme aus einer trimeren RND-Permease der inneren Membran, einem hexameren periplasmatischen Adapter bzw. Membranfusionsprotein (*membrane fusion protein*, MFP) und einen trimeren Protein der äußeren Membran (*outer membrane factor*, OMF). Dabei setzen sich die RND-Permeasen aus drei Domänen, den 3 x 12 TMHs, der periplasmatischen Pore und der Trägerdomäne (*porter domain*) zusammen (Hinchliffe *et al.*, 2013). Es herrscht eine andauernde Debatte, ob der Transport aus dem Zytoplasma (*transenvelope*) oder aus dem Periplasma stattfindet (Kim *et al.*, 2011). Viele Fakten wie die Regulation durch Zwei-Komponenten-Systeme sprechen für letzteres, denn die innere Membran-durchspannende Sensor kinase sensiert Metallkonzentrationen im Peri- und nicht im Zytoplasma (Dieppois *et al.*, 2012; Nies, 2013).

Andere Transporter, die an der Zinkhomöostase beteiligt sein könnten sind ZntB, CorA, PitA und MntH. ZntB wurde in den γ -Proteobakterien *Salmonella thyphimurium*, *Vibrio cholera* und *Yersinia pestis* gefunden und als Effluxsystem identifiziert, ist aber ein Mitglied der CorA bzw. der MIT (*metal ion transporter*) Proteinfamilie (Caldwell und Smith, 2003; Worlock und Smith, 2002). Die CorA Transporter (TC1.A.35) sind vorrangig Magnesium-Aufnahmesysteme. Sie sind als Kanal klassifiziert und ihre Energetisierung ist nicht bekannt (Snavely *et al.*, 1989). Sie nehmen unspezifisch neben Magnesium auch Nickel, Kobalt, Zink sowie Mangan auf und wurden im Zusammenhang mit Kobaltresistenzen entdeckt (Niegowski und Eshaghi, 2007). Ihre Struktur wurde anhand von Vertretern aus *Vibrio parahaemolyticus* und *S. thyphimurium* als Homopentamer aufgeklärt (Tan *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2011; Warren *et al.*, 2004). PitA ist ein Metall-Phosphat-Komplex / Protonen-Symporter, dessen Regulation konstitutiv wie auch Zink-induziert kontrovers diskutiert wird (Beard *et al.*, 2000, Gebhard *et al.*, 2009, Jackson *et al.*, 2008). NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*, TC2.A.55) Transporter wie MntH aus *E. coli* sind ebenfalls als Protonen-Symporter beschrieben und an der Manganaufnahme beteiligt. MntH transportiert jedoch neben Mangan mit abnehmender Präferenz auch Eisen, Kobalt, Zink und Cadmium (Agranoff *et al.*, 2005; Courville *et al.*, 2004; Makui *et al.*, 2000).

Über die Zinkaufnahme durch **Kanäle der äußeren Membran** ist im Gegensatz zu Eisen wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass Zink (Zn^{2+}) durch Porine in das Periplasma diffundiert und von dort passiv oder aktiv durch die angesprochenen Aufnahmesysteme der inneren Membran

in das Zytoplasma gelangt. Dieser Aufnahmeweg könnte sich bei geringen Zinkkonzentrationen des extrazellulären Raumes als problematisch erweisen und zu zellulärem Zinkmangel führen. Eine Rezeptor-vermittelte-Aufnahme von Metallkomplexen ist für Eisen jedoch nicht für Zink beschrieben. So kann Eisen über TonB-ExbB-ExbD-abhängige Rezeptoren (meist β -barrell Proteine) aktiv als Eisen-Citrat-Komplex oder gebunden von Siderophoren durch Transporter der inneren Membran wie Fec, Fep, Cir oder Fiu aufgenommen werden (Braun und Endriss, 2007; Enz *et al.*, 2003; Neilands, 1995). Auch wenn dieser Aufnahmeweg für Zink nicht bekannt ist, konnten für das Cyanobakterium *Anabaena* PCC 7120, das γ -Proteobakterium *Pseudomonas protegens*, die pathogenen *Acinetobacter baumannii* und *Neisseria meningitidis* Zink-regulierte TonB-abhängige Rezeptoren identifiziert werden (Hood *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013; Napolitano *et al.*, 2012; Stork *et al.*, 2010). Weiterhin konnte eine Zink-abhängige Regulation von Porinen in *P. protegens* und *P. aeruginosa* sowie für *Synechococcus* WH8102 gezeigt werden (Barnett *et al.*, 2014; Conejo *et al.*, 2003). So wird vermutet, dass es eine mögliche Aufnahme von „Zinkophoren“ analog zu Siderophoren existiert.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss annotierter aber nicht charakterisierter Aufnahmesysteme auf die Metall- bzw. Zinkhomöostase des Modellorganismus *C. metallidurans* untersucht.

Im **ersten Kapitel** wird der ZIP Transporter ZupT und seine Einflüsse auf die Metall- und Zinkhomöostase von *C. metallidurans* näher betrachtet.

Das **zweite Kapitel** umfasst eine Proteomanalyse und eine vergleichende Bestimmung der Zink-abhängigen Metalloproteine des Wildtypstammes *C. metallidurans* AE104 und der *zupT* Deletionsmutante.

Das **dritte Kapitel** befasst sich mit dem Einfluss der Aufnahmesysteme ZupT, PitA, CorA₁₋₃, ZntB, HoxN, MgtA und MgtB.

Der **Eigenanteil der Publikationen** ist für die jeweiligen Kapitel des kumulativen Abschnittes in einem blau hinterlegten Informationsfeld aufgeführt. Weiterhin ist in den einzelnen Kapiteln notiert, in welchem Bezug die Co-Autoren zu den Veröffentlichungen stehen.

Kumulativer Abschnitt

Allgemeine Informationen zu den Fachzeitschriften

<i>Journal</i>	Journal of Bacteriology	Metallomics	Molecular Microbiology	Extremophiles	Journal of Biological Chemistry
Impact Factor (2014)	2,808	3,585	4,419	2,306	4,573
5 Year Impact Factor	3,110	3,980	4,764	2,578	4,693
Cited Half-Life	> 10 years	2,9 years	9,8 years	6,9 years	> 10 years
Herausgeber	AMER SOC MICROBIOLOGY	ROYAL SOC CHEMISTRY	WILEY-BLACKWELL	SPRINGER JAPAN KK	AMER SOC BIOCHEMISTRY MOLECULAR BIOLOGY INC
Ausgaben / Jahr	24	12	24	6	52
ISSN	0021-9193	1756-5901	0950-382X	1431-0651	0021-9258

<i>Journal</i>	Biochemical Journal	FEBS Letters	Biochemistry	Journal of Environmental Science-China	BioMed Research International
Impact Factor (2014)	4,396	3,169	3,015	2,002	1,579
5 Year Impact Factor	4,660	3,372	3,019	2,533	1,593
Cited Half-Life	> 10 years	> 10 years	> 10 years	5,2 years	1,3 years
Herausgeber	PORTLAND PRESS LTD	ELSEVIER SCIENCE BV	AMER CHEMICAL SOC	SCIENCE PRESS	HINDAWI Publishing Corporation
Ausgaben / Jahr	24	24	51	12	0
ISSN	0264-6021	0014-5793	0006-2960	1001-0742	2314-6133

Quelle: ISI Web of KnowledgeSM – Journal Citation Reports® - 2014 JCR Science Edition

Übersicht der Publikationen und Manuskripte sowie Darlegung des Eigenanteils der für die kumulative Dissertation verwendeten Veröffentlichungen

Herzberg, M., L. Bauer and D.H. Nies (2014). Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. Metallomics **6**: 421-436.

Eigenanteil: E = ca. 90 % M = ca. 40 %

Herzberg, M., M. Schütttau, M. Reimers, C. Grosse, H.G. Schlegel and D.H. Nies (2015). Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands. Metallomics **7**: 632-649.

Eigenanteil: E = ca. 80 % M = ca. 40 %

Herzberg, M., D. Dobritzsch, S. Helm, S. Baginsky and D.H. Nies (2014). The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*. Metallomics **6**: 2157-2165.

Eigenanteil: E = ca. 70 % M = ca. 30 %

Kirsten, A., M. Herzberg, A. Voigt, J. Seravalli, G. Grass, J. Scherer and D.H. Nies (2011). Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. Journal of bacteriology **193**: 4652-4663.

Eigenanteil: E = ca. 70 % M = ca. 20 %

Manuskript

Herzberg, M., L. Bauer, A. Kirsten and D.H. Nies (unpublished) “Strategic deletion of seven secondary metal uptake systems in *Cupriavidus metallidurans* reveals plasticity of metal uptake transportome”

Eigenanteil: E = ca. 90 % M = ca. 50 %

Manuskript

Große, C^{*}, M. Herzberg^{*}, M. Schütttau and D.H. Nies (unpublished) “The metal transportome of *Cupriavidus metallidurans* contains more member than the previously known seven secondary metal uptake systems”

Eigenanteil: E = ca. 80 % M = ca. 50 % * gleichberechtigte Erstauthorenschaft

E – experimenteller Eigenanteil M – Eigenanteil Manuskript

Bestätigung durch einen Koautor:

Martin Herzberg

Dietrich H. Nies

Übersicht der Publikationen die nicht für die kumulative Dissertation verwendet wurden

1. **Nies, D.H. and M. Herzberg** (2013) A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria. *Molecular Microbiology*, **87**:447-454.
2. **Riemschneider, S., M.Herzberg and J. Lehmann** (2015). Subtoxic doses of Cadmium modulate inflammatory properties of murine RAW 264.7 macrophages. *Biomed Research International*
3. **Salzer, R., M. Herzberg, D. H. Nies, G. Biukovic, G. Gruber, V. Müller and B. Averhoff** (2013). The DNA uptake ATPase PilF of *Thermus thermophilus*: a reexamination of the zinc content. *Extremophiles* **17**: 697-698.
4. **Salzer, R., M. Herzberg, D.H. Nies, F. Joos, B. Rathmann, Y. Thielmann and B. Averhoff** (2014) Zinc and ATP binding of the hexameric AAA-ATPase PilF from *Thermus thermophilus*: role in complex stability, piliation, adhesion, twitching motility, and natural transformation. *The Journal of biological chemistry* **289**: 30343-30354.
5. **Soboh, B., U. Lindenstrauss, C. Granich, M. Javed, M. Herzberg, C. Thomas and S.T. Stripp** (2014). [NiFe]-hydrogenase maturation in vitro: analysis of the roles of the HybG and HypD accessory proteins. *Biochemical Journal* **464**: 169-177.
6. **Soboh, B., Stripp S. T., Bielak C., Lindenstrauss U., Braussemann M., Javaid M., Hallensleben M., Granich C., M. Herzberg, J. Heberle and R.G. Sawers** (2013). The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Letters* **587**(16): 2512-2516.
7. **Soboh, B., S.T. Stripp, E. Muhr, C. Granich, M. Braussemann, M. Herzberg, J. Heberle and R.G. Sawers** (2012). [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands." *FEBS Letters* **586**: 3882-3887.
8. **Stripp, S.T., B. Soboh, U. Lindenstrauss, M. Braussemann, M. Herzberg, D.H. Nies, R.G. Sawers and J. Heberle** (2013). HypD is the scaffold protein for Fe-(CN)₂CO cofactor assembly in [NiFe]-hydrogenase maturation." *Biochemistry* **52**: 3289-3296.
9. **Wiesemann, N., J. Mohr, C. Grosse, M.Herzberg, G. Hause, F. Reith and D.H. Nies** (2013). Influence of Copper Resistance Determinants on Gold Transformation by *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34. *Journal of Bacteriology* **195**: 2298-2308.
10. **Xie, P., X. Hao, M.Herzberg, Y. Luo, D.H. Nies and G. Wei** (2015). Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China. *Journal of Environmental Sciences (China)* **27**:179-187.

***Cupriavidus metallidurans* als Modellorganismus der Metallhomöostase**

In der natürlichen Umgebung sind Bakterien mit unterschiedlichen Metallkonzentrationen im Bereich von pM bis mM konfrontiert (Nies, 2012). Manche dieser Metalle sind nur toxisch für die Zelle, andere wiederum auch essentiell und werden daher als Biometalle bezeichnet. So haben Bakterien sich im Laufe der Evolution unter Selektionsdruck geringer Verfügbarkeit essentieller Metalle und der Gefahr toxischer Konzentrationen durch die Ausbildung von Multimetall-Homöostasesystemen angepasst.

Eines dieser Modellorganismen zur Untersuchung der Metallhomöostase ist das gramnegative β -Proteobakterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 (früher *Ralstonia*, *Wautersia*, *Alcaligenes*) (Janssen *et al.*, 2010; Mergeay *et al.*, 2003; Monchy *et al.*, 2007; Vandamme und Coenye, 2004; Vaneechoutte *et al.*, 2004). Es ist ein weltweit in mesophilen und oft Metall-kontaminierten Umgebungen verbreitetes Bakterium (Diels und Mergeay, 1990; Goris *et al.*, 2001; Reith *et al.*, 2006). Dieser Organismus ist in der Lage heterotroph wie auch autotroph als H₂ oxidierendes Bakterium in aerober Umgebung zu wachsen und aktive NiFe-Hydrogenasen zu synthetisieren (Mergeay *et al.*, 1985). Ebenso ist es ihm möglich, unter variierenden Umwelteinflüssen in einen weitem Konzentrationsbereich seine Metallhomöostase aufrechtzuerhalten. Durch identifizierte Efflux- und Importsysteme stellt er ein Gleichgewicht der zellulär benötigten individuellen Metallkofaktoren seines Metalloms sicher. Auf den nativen Plasmiden (pMOL28 & pMOL30) und den zwei Chromosomen sind eine große Anzahl von Genen, kodieren für Effluxsysteme, lokalisiert. Diese aufeinander abgestimmten Systeme führen zu einer Adaption gegenüber hohen Metallkonzentrationen (Janssen *et al.*, 2010; Scherer und Nies, 2009; von Rozycki und Nies, 2009). Die Metallresistenz gegenüber relevanten, divalenten Kationen der Übergangsmetalle wie Zn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ und Ni²⁺ (mit Ausnahme von Fe²⁺) von *C. metallidurans* beruht vorrangig auf einem zweistufigem Metallefflux (Abbildung 4) (Nies und Silver, 1989). Zur ersten Stufe gehören die Mitglieder der CDF-Proteinfamilie (TC2.A.4) und die P-Typ-ATPasen (TC3.A.3), welche überschüssige Zink-, Kobalt- und Cadmiumionen aus dem Zytoplasma über die innere Membran ins Periplasma transportieren. Zu den drei CDF-Proteinen in *C. metallidurans*, die zu verschiedenen Protein-Unterfamilien gehören, zählt das Zink-, Kobalt- und Cadmium-transportierende CzcD, das Eisen- oder Zink-transportierende FieF und DmeF als Kobaltexporter mit einem weiten Substratspektrum. Dabei sind die Gene für FieF sowie DmeF chromosomal und für CzcD auf dem Plasmid pMOL30 kodiert (Anton *et al.*, 2004; Munkelt *et al.*, 2004; Nies, 2003; von Rozycki *et al.*, 2005). Neben den Mitgliedern der CDF-Familie sind die drei P_{IB2}-Typ-ATPasen ZntA, CadA und PbrA sowie die P_{IB4}-Typ-ATPase CzcP bekannt und charakterisiert worden. Am Zink- und Cadmiumtransport sind vorwiegend die Produkte der chromosomal kodierten Gene *zntA*, *cadA* und

das plasmidkodierte *czcP* (pMOL30) beteiligt (Legatzki *et al.*, 2003a; Legatzki *et al.*, 2003b). Die zweite Stufe stellen die vorrangig aus dem Periplasma über die äußere Membran transportierende HME-RND-Systeme (TC2.A.6) CzcCBA (pMOL30) und CnrCBA (pMOL28) dar. Das Czc-System ist als Kobalt-, Zink- und Cadmiumresistenzdeterminante beschrieben wohingegen das Cnr-System eine hohe Kobalt- und Nickelresistenz vermittelt (Grass *et al.*, 2005b; Grass *et al.*, 2000; Grosse *et al.*, 2004; Nies *et al.*, 1987).

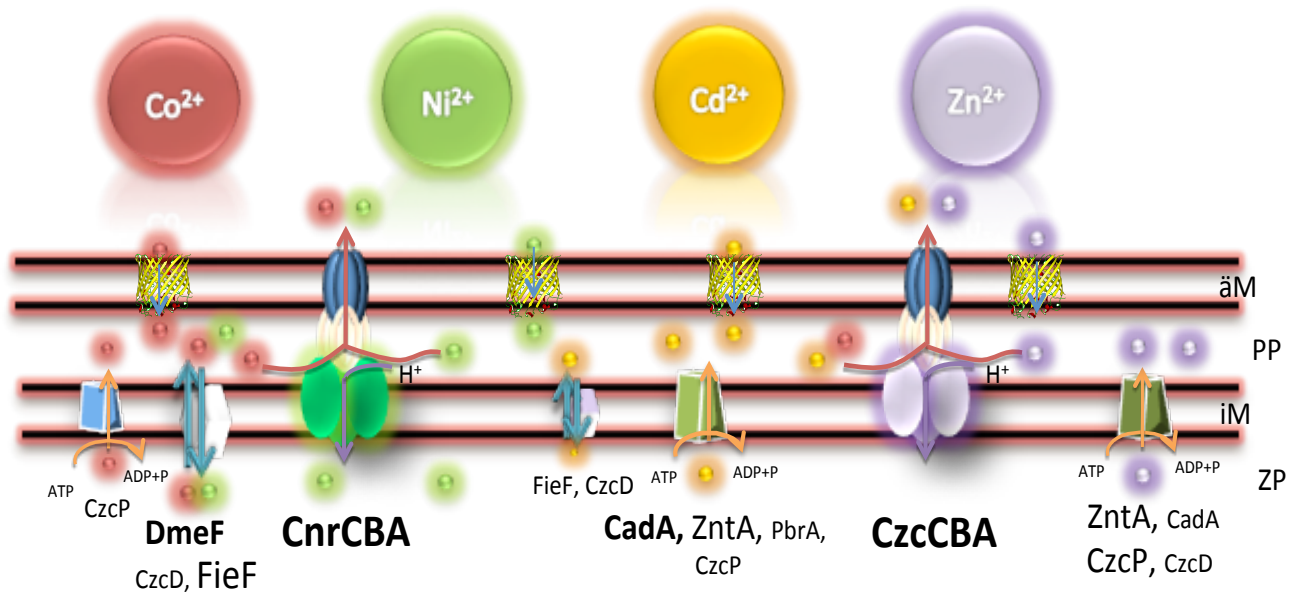


Abbildung 4: Dargestellt sind die an dem zweistufigen Metallefflux beteiligten Proteine bzw. Transporter in *C. metallidurans* CH34.

Die Mitglieder der CDF-Proteinfamilie DmeF (Rmet_0198), FieF (Rmet_3406) und CzcD (Rmet_5979) sind am Cobalt- und Nickefflux vorrangig beteiligt, aber auch am Zink- und Cadmiumtransport über die innere Membran (Anton *et al.*, 2004, Munkelt *et al.*, 2004, Scherer und Nies 2009). Zusammen mit den P-Typ-ATPasen ZntA (Rmet_4594), CadA (Rmet_2303), CzcP (Rmet_5970) und PbrA (Rmet_5947) stellen sie die erste Stufe der Metallresistenz durch den Transport toxischer Metalle vom Zytoplasma über die innere Membran ins Periplasma. Dabei spielen ZntA und CzcP die Hauptrolle im Zink- und CadA im Cadmiumexport (Legatzki *et al.*, 2003, Scherer und Nies 2009). Die zweite Stufe stellen die HME-RND Systeme CnrCBA (Rmet_6208-10) und CzcCBA (Rmet_5982-80) dar. Wobei CzcCBA die stärkste Resistenzvermittlung gegenüber Kobalt, Zink und Cadmium zeigt und CnrCBA gegen Kobalt und Nickel (Nies *et al.*, 1987; Grass *et al.*, 2000; Scherer und Nies, 2009). Abkürzungen stehen für äM - äußere Membran, PP - Periplasma, iM - innere Membran und ZP - Zytoplasma.

Im Gegensatz zu den an der Metallhomöostase beteiligten und gut charakterisierten Effluxsystemen ist über die Aufnahmesysteme von divalenten Kationen in *C. metallidurans* nur wenig bekannt. Dieser Modellorganismus besitzt weder ein ZnuABC Zinkaufnahmesystem (TC3.A.1), ein MgtE (TC9A.19) noch einen NRAMP (MntH) Mangantransporter (TC2.A.55), verfügt jedoch über ein Repertoire von sekundären und primären nicht näher charakterisierten Aufnahmesystemen (Abbildung 5). Zu diesen zählt das mögliche Zink-Aufnahmesystem ZupT (ZIP Transporter, TC2.A.5), vier Mitglieder der MIT Transporterfamilie (TC1.A.35), ein Transporter der PIT Familie (PitA, TC2.A.20), ein Mitglied der NiCoT Familie (HoxN, TC2.A.52) und zwei primäre Magnesiumaufnahme P-Typ-ATPasen (MgtA & B, TC3.A.3). ZntB ist als mögliches Zink-

Effluxsystem neben den drei CorA₁₋₃ Proteinen das vierte Mitglied der MIT Familie. Als Aufnahmesystem für Phosphatmetallkomplexe ist PitA möglicherweise an der Zinkaufnahme beteiligt. Dagegen ist HoxN als Nickelaufnahmesystem annotiert und möglicherweise an der Nickelversorgung der NiFe-Hydrogenasen beteiligt (Eitinger und Mandrand-Berthelot, 2000). Um die zyttoplasmatische Metall- bzw. Zinkkonzentration dem Bedürfnis der zellulären Biochemie anzupassen, ist neben Speicherung und Zuordnung von Metallionen ein Gleichgewicht von Aufnahme- und Exportvorgängen notwendig. In *C. metallidurans* ist unklar, ob die Aufnahmesysteme ähnlich den Effluxsystemen durch ein zentrales Substrat kontrolliert werden oder durch diese unspezifisch aufgenommenen und überschüssigen Metallionen durch die Effluxsysteme exportiert werden. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der Funktion und Regulation der Aufnahmesysteme grundlegend für das Verständnis der Metall- bzw. Zinkhomöostase in *C. metallidurans*.

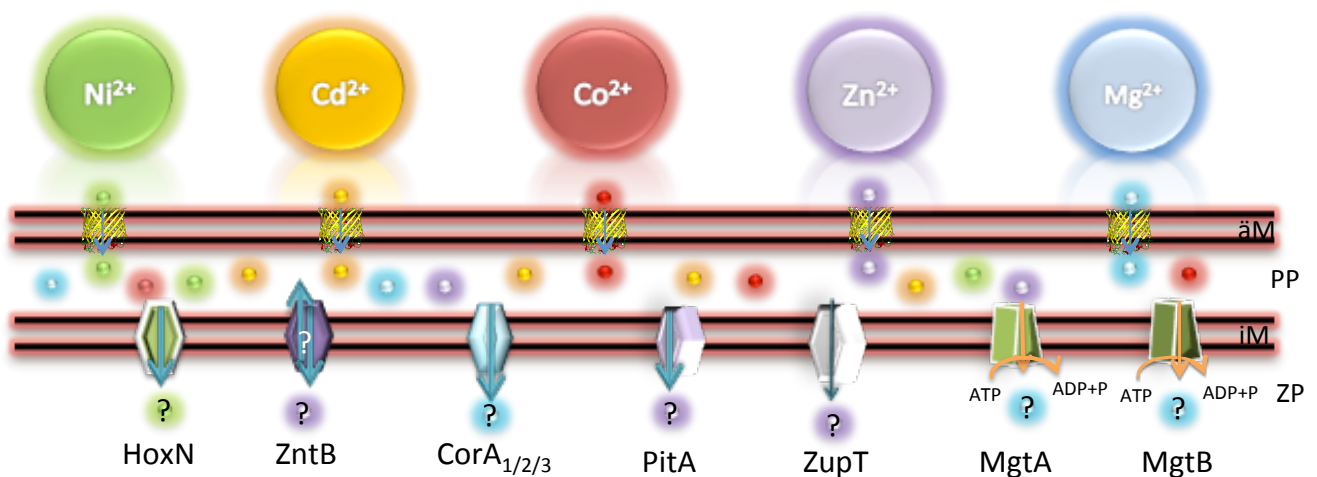


Abbildung 5: Dargestellt sind die annotierten, aber nicht näher charakterisierten Aufnahmesysteme relevanter divalenter Kationen mit Ausnahme von Eisen und Kupfer in *C. metallidurans* CH34.

Der NiCoT Transporter HoxN (Rmet_1533) ist als Nickelaufnahmesystem annotiert und beteiligt an der Metallversorgung in der Hydrogenasenbiosynthese. CorA₁₋₃ (Rmet_3052_0036_3287) sind Mitglieder der MIT Proteinfamilie und sind als Importer für divalente Metallkationen wie Magnesium beschrieben. Das vierte Mitglied dieser Familie ZntB (Rmet_0549) könnte ein mögliches Zink-Effluxsystem statt ein Importer sein. PitA (Rmet_1973) kann als Metall-Phosphat-Komplex Protonen/-Symporter an der Metall- und Zinkaufnahme beteiligt sein. ZIP Transporter wie ZupT (Rmet_2621) sind als Zink-Aufnahmesysteme beschrieben, können aber auch Eisen sowie Mangan aufgrund eines oft weiten Substratspektrums aufnehmen. Als primäre Magnesium-Aufnahmesysteme sind MgtA & MgtB (Rmet_5396/2211) beschrieben. Abkürzungen stehen für äM - äußere Membran, PP - Periplasma, iM - innere Membran und ZP - Zytosol.

Kapitel 1 - Der ZIP Transporter ZupT von *Cupriavidus metallidurans*

Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34

Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung

Cupriavidus metallidurans CH34 erreicht durch eine Kombination an unspezifischen Aufnahme- und strikt kontrollierten Effluxsystemen ein hohes Resistenzlevel gegenüber toxischer Konzentrationen an Übergangsmetallen. Der Zink-regulierte ZIP (ZRT/IRT) Transporter ZupT spielt dabei eine zentrale Rolle in der Zinkhomöostase und führte zur Identifizierung von unterschiedlichen zellulären „Zinkpools“. Zur Untersuchung und Bestimmung des zellulären Metall- bzw. Zinkgehaltes und der Transportvorgänge wurde der Plasmid-freie Stamm AE104 verwendet, der nur noch vier bekannte Effluxsysteme der inneren Membran für divalente Kationen besitzt.

Bei einer niedrigen Zinkkonzentration von ca. 200 nM im TrisMM (Mineralsalzmedium) kommt es im Stamm AE104 in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase zu einer Aufnahme bzw. Akkumulation von ca. 70.000 Zinkatomen pro Zelle. Dagegen zeigt eine *zupT* Deletionsmutante durch das Fehlen des ZIP Transporters den möglichen minimalen-zellulären Zinkgehalt von ca. 20.000 Atomen pro Zelle. Hohe externe Zinkkonzentrationen von 100 µM unterhalb der toxischen Grenzen führen im Wildtyp wie in der Mutante zur Akkumulation von ca. 125.000 Zinkatomen pro Zelle. Dies weist auf ein mögliches Optimum des zellulären Zinkgehaltes und auf ein weiteres unbekanntes Zink-Aufnahmesystem hin. Eine Deletionsmutante ohne bekannte Zink-Effluxsysteme ($\Delta e4, \Delta zntA \Delta cadA \Delta dmeF \Delta fieF$) zeigt ein mögliches Maximum im höheren externen Toleranzlevel (10 µM) durch Akkumulation von etwa 250.000 Zinkatomen pro Zelle. Kobalt und Cadmium scheinen Teile dieses Zinkpools, geringer Substratspezifität, mit 120.000 Atomen pro Zelle auffüllen zu können.

Auch bei extern erhöhten Zinkkonzentrationen, welche zu einem Auffüllen des Zinkgehaltes der Zelle führen zeigt sich, dass ZupT für unterschiedliche zelluläre Prozesse benötigt wird und gibt den Hinweis auf einen Zinkpool von festgebundenen Zinkionen.

Der Verlust von ZupT führt zur Bildung von *inclusion bodies* der Zink-abhängigen RpoC DNA-abhängigen RNA-Polymerase Untereinheit. Durch Zugabe von Zink kann die Akkumulation von RpoC reduziert, aber der beginnende Belieferungsweg von ZupT nicht vollständig komplementieren werden.

Die $\Delta zupT$ Mutante weist einen sensitiven Phänotypen gegenüber H_2O_2 und Paraquat induzierten oxidativen Stress auf. Da die Eisenhomöostase nicht gestört und die Aktivität der FeSOD nicht verändert zu sein scheint, ist hier der Hinweis auf die Bedeutung von ZupT für die CuZnSOD gegeben.

Die konstitutiv, plasmidgebundene Expression des triparenten Haupt-Zink-Effluxsystemes *czcCBA* von *C. metallidurans* CH34 im Stamm AE104 führt zu einer erhöhten Zinkmangelsituation und infolge zu einer Inkompatibilität in der $\Delta zupT$ Mutante. Nach mehreren Transferten auf Festmedium dieser Mutante kommt es zum Verlust der Czc-vermittelten Resistenz und die zentrale Untereinheit CzcA ist immunologisch nicht mehr nachweisbar. Jedoch kann durch semi-quantitative RT-PCR die spezifische *czcA*-RNA im Wildtyp wie in der Mutante nachgewiesen werden, was auf eine Translationshemmung oder einen Abbau (Degradation) hinweist. Der Verlust von CzcA unter Zink-Mangelbedingungen kann durch Zugabe von hohen externen Zinkkonzentrationen unterdrückt werden. Die molekularen Hintergründe sind jedoch unklar.

So scheinen in *C. metallidurans* mindestens zwei unterschiedliche Zinkpools zu existieren. Ein Pool von festgebundenem Zink (ca. 20.000 Atomen pro Zelle) in essentiellen strukturellen oder katalytischen Zink-abhängigen Proteinen, wie der DNA-abhängigen RNA-Polymerase oder der CuZnSOD. Und ein weiterer Pool von 50.000-100.000 losegebundenen Zinkatomen pro Zelle. Bei steigender externer Zinkkonzentration halten die Effluxsysteme diesen Pool konstant bei ca. 125.000 Atomen. Bei Verlust der Effluxsysteme verdoppelt sich die Akkumulation des zellulären Zinkgehaltes verbunden mit einem drastischen Resistenzverlust.

Co-Autoren der Publikation

Lucy Bauer (Master-Studentin) fertigte im selben Labor ihre Masterarbeit unter meiner Betreuung an: „Metall-Chaperone in *Cupriavidus metallidurans*“
Prof. Dr. D.H. Nies ist der *Corresponding Author* und Arbeits-/Projektgruppenleiter

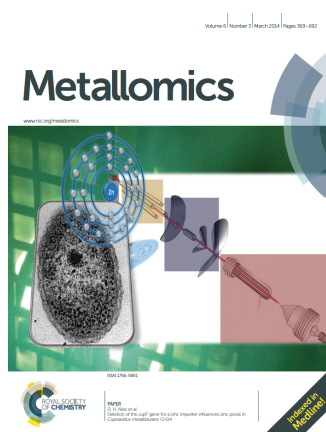
- Publikation -**Metallomics**

PAPER

View Article Online
View Journal**Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34**

Cite this: DOI: 10.1039/c3mt00267e

M. Herzberg, L. Bauer and D. H. Nies*



Cupriavidus metallidurans strain CH34 accomplishes a high level of transition metal resistance by a combination of rather unspecific transition metal import and controlled efflux of surplus metals. Using the plasmid-free mutant strain AE104 that possesses only a limited number of metal efflux systems, cellular metal pools were identified as counterparts of these transport reactions. At low zinc concentrations strain AE104 took up Zn(II) until the zinc content reached an optimum level of 70 000 Zn(II) per cell in the exponential phase of growth, whereas a $\Delta zupT$ mutant lacking the zinc importer ZupT contained only 20 000 Zn(II)/cell, possibly the minimum zinc content. Mutant and parent cells accumulated up to 125 000 Zn(II) per cell at high (100 μ M) external zinc concentrations (optimum zinc content). When the mutant strain $\Delta e4$, which has all the known genes for zinc efflux systems deleted, was cultivated in the presence of zinc concentrations close to its upper tolerance level (10 μ M), these cells contained 250 000 Zn(II) per cell, probably the maximum zinc content. Instead of zinc, 120 000 cobalt or cadmium ions could also fill-up parts of this zinc pool, showing that it is in fact an undefined pool of divalent transition metal cations bound with low substrate specificity. Even when the cells contained sufficient numbers of total zinc, the zinc importer ZupT was required for important cellular processes, indicating the presence of a pool of tightly bound zinc ions, which depends on ZupT for efficient replenishment. The absence of ZupT led to the formation of inclusion bodies, perturbed oxidative stress resistance and decreased efficiency in the synthesis of the zinc-dependent subunit RpoC of the RNA polymerase, leading to RpoC accumulation. Moreover, when a *czc* allele for a zinc-exporting transenvelope efflux system CzcCBA was constitutively expressed in a $\Delta zupT$ mutant, this led to the disappearance of the CzcA protein and the central subunit of the protein complex, and to the loss of metal resistance. This phenomenon occurred only if the $\Delta zupT$ cells had been cultivated for several transfers in solid culture medium, which generated severe zinc starvation. Thus, two zinc pools appear to exist in *C. metallidurans*: one pool of at least 20 000 tightly bound Zn(II) ions, in addition to a second pool of up to 200 000 cations bound loosely and with low substrate specificity.

Received 27th September 2013,
Accepted 11th December 2013

DOI: 10.1039/c3mt00267e

www.rsc.org/metallomics

Copyright © 2014, Royal Society of Chemistry. All Rights Reserved.

Volltext veröffentlicht in:

Metallomics, Received 2013 Sep 27; Accepted 2013 Dec 11, first published 12 Dec 2013

Verfügbar unter folgender URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24407051><http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2014/mt/c3mt00267e>

Synthesis of nickel–iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands

Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung

Das β -Proteobakterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 ist in der Lage heterotroph wie auch autotroph als H₂ oxidierendes Bakterium in aerober Umgebung zu wachsen und aktive NiFe-Hydrogenasen unter beiden Bedingungen zu synthetisieren. Durch den Verlust der zwei nativen Plasmide (pMOL28 & pMOL30) ist der resultierende Stamm AE104 in Phosphat-armen TrisMM (Mineralsalzmedium) nicht mehr in der Lage autotroph zu wachsen und Genom-kodierte Hydrogenasen zu synthetisieren. Proteomanalysen zeigen, dass die Deletion des Gens für das Zink-Aufnahmesystem ZupT (ZIP, IRT/ZRT) im Stamm AE104 zur erneuten Synthese der löslichen Hydrogenase (SH) und der am Calvinzyklus beteiligten Proteine führt (Herzberg *et al.*, 2014b).

In dieser Studie durchgeführten Transkriptomanalysen der *zupT* Deletionsmutante und dem Ausgangsstamm AE104 bestätigen eine Zink-unabhängige Induktion des SH- und Calvinzyklus-Genclusters. Die Gene für die lösliche (CMGI-3, *aut*-Region 1) und membrangebundene Hydrogenase (CMGI-2, *aut*-Region 2) liegen auf zwei von elf kürzlich identifizierten katabolisch-genomischen Inseln (CMGIs) auf dem Chromosom 1 von *C. metallidurans* (Van Houdt *et al.*, 2009). Die CMGIs sind ein Produkt horizontalen Gentransfers und / oder Rekombination. Die verlorene Fähigkeit zur Synthese beider Hydrogenasen im Stamm AE104 im Vergleich zum CH34 liegt in der fehlenden bzw. unterdrückten Expression der Gene beider CMGIs (*aut*-Region 1&2). Die veränderte Regulation dieser Regionen beruht möglicherweise auf einer gestörten Metallhomöostase der Stämme und beteiligten Histon-ähnlichen Proteinen und Sigma-Faktoren. Die Ergebnisse des Wachstums unter „Knallgas“ Atmosphäre, des Aktivitätsnachweises der membrangebundenen Hydrogenase und die Aktivität der löslichen, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase bestätigen ebenfalls die Resultate der Transkriptom- und Proteomanalysen aller drei Stämme.

Insgesamt wurden elf Gene im Stamm AE104 im Vergleich zum CH34 verstärkt exprimiert, darunter die P_{1B2}-Typ-ATPase ZntA und verschiedene Transposons. Die Induktion von *zntA* weist auf eine veränderte Zinkhomöostase im AE104 hin. 250 Gene in sechs Genregionen, die zu CMGI-2 und CMGI-3 zählen, sind herunter-reguliert.

Externe steigende Zinkkonzentration hatten im Stamm AE104 kaum Einfluss auf die Expression der CMGI lokalisierten Gene (insgesamt 5560 von 5860 Genen nicht beeinflusst). Unter den 153

verstärkt Exprimierten befinden sich Gene von Operonregionen der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese, der Phosphatmangelantwort, Zink-Effluxsysteme (ZntA/CadA) und Zink-abhängige Proteine (bspw. Fruktose-Bisphosphat Aldolase, Alkoholdehydrogenasen und alkalische Phosphatasen). Zu den 137 herunter-Regulierten zählen Gene von TonB-abhängigen Rezeptoren der äußeren Membran, ABC-Transportern, periplasmatische Bindeproteine und zwei Zink-haltige aber B₁₂-unabhängige Methioninsynthetasen.

Im Transkriptomvergleich zwischen dem Stamm AE104 und der *zupT* Deletionsmutante unter EDTA induziertem Zinkmangel zeigten sich acht verstärkt expremierte Gene. Sieben dieser Gene sind gleich orientiert in einer möglichen Operonstruktur (Rmet_1098-1103) und kodierten für Zink-abhängige Genprodukte. Das erste Gen des Operon kodiert für ein Genprodukt (CobW₁) der GE3 GTPase Familie und ist möglicherweise an der Zinkhomöostase beteiligt (Blaby-Haas *et al.*, 2012). Die Ergebnisse der chromosomalen Reporterfusionen (*lacZ*) und Plasmid-abhängigen Promotorfusion (GFP) des *cobW₁* Genes bestätigen eine Zinkmangel induzierte, ZupT-abhängige und Zur (*zinc uptake regulator*) kontrollierte Expression.

Weiterhin weist die Promotoregion von *cobW₁* ein *zupT* homologes Zur-Bindemotiv (Konsensussequenz) auf. Die Disruption des *cobW₁* Genes führt zu einem der *zupT* Deletion vergleichbaren sensitiven Phänotyp unter Kobalt- und Cadmiumstress.

Co-Autoren der Publikation

Marcel Schüttau (Diplomand)	fertigte im selben Labor seine Diplomarbeit unter meiner Betreuung an: „Screening von Disruptionsmutanten nach unbekanntem Zinktransportern in <i>Cupriavidus metallidurans</i> “
Matthias Reimer (Bachelor)	fertigte im selben Labor seine Bachelorarbeit unter meiner Betreuung an: „Autotrophes Wachstum von <i>Cupriavidus metallidurans</i> “
Dr. Cornelia Große	wissenschaftl. Mitarbeiterin, AG Nies
Prof. Dr. H.G. Schlegel	Doktorvater von Prof. Dr. D.H. Nies, 1924-2013
Prof. Dr. D.H. Nies	ist der <i>Corresponding Author</i> und Arbeits-/Projektgruppenleiter

- Publikation -**Metallomics****PAPER**View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/c4mt00297k

Synthesis of nickel–iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands†

Martin Herzberg, Marcel Schütttau, Matthias Reimers, Cornelia Große, Hans-Günther-Schlegel‡ and Dietrich H. Nies*

Cupriavidus metallidurans CH34 is able to grow autotrophically as a hydrogen-oxidizing bacterium and produces nickel-dependent hydrogenases, even under heterotrophic conditions. Loss of its two native plasmids resulted in inability of the resulting strain AE104 to synthesize the hydrogenases and to grow autotrophically in phosphate-poor, Tris-buffered mineral salts medium (TMM). Three of eleven previously identified catabolic genomic islands (CMGIs; Van Houdt *et al.*, 2009), two of which harbor the genes for the membrane-bound (CMGI-2) and the soluble hydrogenase (CMGI-3), were silenced in strain AE104 when cultivated in phosphate-poor TMM, explaining its inability to produce hydrogenases. Production of the soluble hydrogenase from the *aut* region 1 of CMGI-3, and concomitant autotrophic growth, was recovered when the gene for the zinc importer ZupT was deleted in strain AE104. The transcriptome of the $\Delta zupT$ mutant exhibited two up-regulated gene regions compared to its parent strain AE104. Expression of the genes in the *aut* region 1 increased independently of the presence of added zinc. A second gene region was expressed only under metal starvation conditions. This region encoded a TonB-dependent outer membrane protein, a putative metal chaperone plus paralogs of essential zinc-dependent proteins, indicating the presence of a zinc allocation pathway in *C. metallidurans*. Thus, expression of the genes for the soluble hydrogenase and the Calvin cycle enzymes on *aut* region 1 of CMGI-3 of *C. metallidurans* is under global control and needs efficient ZupT-dependent zinc allocation for a regulatory role, which might be discrimination of nickel.

Received 14th November 2014,
Accepted 19th February 2015

DOI: 10.1039/c4mt00297k

www.rsc.org/metallomics

Copyright © 2014, Royal Society of Chemistry. All Rights Reserved.

Volltext veröffentlicht in:

Metallomics, Received 2014 Nov 14; Accepted 2015 Feb 19, first published online 19 Feb 2015

Verfügbar unter folgender URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25720835>

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2015/mt/c4mt00297k>

Supplement verfügbar unter folgender URL:

<http://www.rsc.org/suppdata/mt/c4/c4mt00297k/c4mt00297k1.pdf>

Kapitel 2 - Das Zinkproteom von *Cupriavidus metallidurans*

The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*

Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung

Zink ist in fast allen lebenden Organismen essentiell als struktureller oder enzymatischer Kofaktor von Proteinen und ein zentraler Bestandteil der Metallome. In den meisten Prokaryoten ist Zink nach Eisen das häufigste Übergangsmetall und seine Abundanz steigert sich in den Eukaryoten. In dieser Studie wurde ein quantitativer *bottom-up* Proteomikansatz genutzt, um das Repository des Zinkpools von *Cupriavidus metallidurans* zu bestimmen und Zink-Mangeldefekte einer *zupT* Deletionsmutante mit dem Ausgangsstamm AE104 zu vergleichen. Dabei konnten ca. 60 % (3469 von 5804 Proteinen) des theoretischen Proteoms identifiziert und quantifiziert werden.

Zur Evaluierung der Proteinanzahlen pro Zelle wurden die gewonnenen Quantitäten von drei Proteinkomplexen (der F_1F_0 ATPase, der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und des Ribosoms) mit bekannten Zellanzahlen und Stöchiometrie herangezogen. Die quantitative Analyse ergab eine Anzahl von ca. 3000 zytoplasmatischen F_1 Komplexen ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) der F_1F_0 ATPase was bei Einbeziehung vergleichbarer Wachstumsraten mit der bekannten Anzahl von 3200 einer *E. coli* Zelle korreliert (von Meyenburg *et al.*, 1984). Ebenfalls führten die sich ergebenden Stöchiometrien der Untereinheiten ($2.0 \pm 0.5 : 3.0 \pm 0.8 : 0.9 \pm 0.2 : 0.7 \pm 0.3 : 1$, normalisiert auf die ϵ -Untereinheit zu einem gut quantifizierbaren Ergebnis für lösliche Proteine. Jedoch sind Membranproteine wie des F_0 Komplexes unter-repräsentiert. Ähnlich gut mit der Literatur vergleichende Ergebnisse ergaben die Auswertungen der RNA-Polymerase- und Ribosomenanzahlen sowie Stöchiometrien.

Die vergleichende Proteomanalyse des $\Delta zupT$ Deletions- und seines Ausgangsstammes AE104 erfolgte mittels Zuordnung und quantitativer Verteilung im KEGG Orthologiesystem (KO), nach der Veränderung der Proteinabundanz und dem Verhältnis der Proteinanzahlen der beiden Stämme. Der $\Delta zupT$ Stamm weist eine geringere Proteinabundanz im Glycerophospholipid- und Glycerolipidmetabolismus, im Bereich der Chemotaxis (Bsp. Flagellumsynthese), von Zwei-Komponenten-Regulationssystemen und unterschiedlichen Transportproteinen auf sowie in der Proteinanzahl der Kupfer- und Zink-abhängigen Superoxiddismutase SodC (Rmet_2757) ($\Delta zupT$ (164 ± 43) im Vergleich zum Stamm AE104 (98 ± 12)). Dies könnte eine Erklärung für den

sensitiven Phänotyp gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies des Deletionsstammes liefern (Herzberg *et al.*, 2014a).

Dem entgegen synthetisiert der $\Delta zupT$ Stamm eine Anzahl von 40651 Proteinen mehr, die dem Cluster der löslichen Hydrogenase und dem Calvinzyklus zugeordnet werden können. Der Ausgangsstamm AE104 synthetisiert lediglich 1282 Proteine dieser Cluster, wobei davon ca. 50 % das Regulationsprotein HoxA des NtrC-Typs sind. So zeigt der Deletionsstamm auf Proteomebene eine Deregulation der Gene des autotrophen Metabolismus.

Zur Analyse des Zinkproteoms wurden die Zink-bindenden Proteine anhand von *E. coli* Orthologer und annotierter Proteine der NCBI Datenbank ermittelt. Ausgehend von einer Zink-Bindestelle pro Monomer ergab die Auswertung eine Anzahl von 109.000 ± 11.000 für den AE104 und 123.000 ± 14.000 für den Deletionsstamm. Im Vergleich zur Anzahl von 70.000 Zinkatomen pro Zelle im AE104, wird eine größere Anzahl von Zink-Bindestellen als zelluläre Zinkionen vorgehalten. Diese ungesättigten-Bindestellen werden durch steigende Zinkkonzentrationen von 200 nM auf 100 μ M aufgefüllt und der zelluläre Zinkgehalt steigt auf ca. 125.000 Atome pro Zelle. Ab dieser Konzentration ist eine Sättigung des Zinkpools erreicht welche durch die Transportsysteme auch bei weiter steigenden Zinkkonzentrationen auf 150 μ M im Gleichgewicht gehalten wird. Die Zunahme der gesättigten Bindestellen führt zur Verringerung der Aufnahme und einer Steigerung des Effluxes.

Denn durch das Fehlen der Zink-Effluxsysteme im $\Delta e4$ ($\Delta zntA\Delta cadA\Delta dmeF\Delta fieF$) kommt es erst bei 250.000 Zinkatomen pro Zelle und 10fach niedrigeren externen Zinkkonzentrationen zur Sättigung.

Somit zeigt sich, dass die Transportsysteme und das Zink-Repository Hauptkomponenten der Zinkhomöostase in *C. metallidurans* und möglicherweise anderen Organismen sind.

Co-Autoren der Publikation

Dr. Dirk Dobritzsch	AG Baginsky, wissenschaftl. Mitarbeiter, Pflanzenproteinbiochemie-MLU
Stefan Helm (Doktorand)	Proteomanalysen, Synapt G2-S
Prof. Dr. S. Baginsky	Arbeits-/Projektgruppenleiter, Pflanzenproteinbiochemie-MLU
Prof. Dr. D.H. Nies	ist der <i>Corresponding Author</i> und Arbeits-/Projektgruppenleiter

- Publikation -**Metallomics****PAPER**[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)**The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*†**Cite this: *Metallomics*, 2014,
6, 2157Martin Herzberg,^a Dirk Dobritzsch,^b Stefan Helm,^b Sacha Baginsky^b and
Dietrich H. Nies^{*a}Received 27th June 2014,
Accepted 23rd September 2014

DOI: 10.1039/c4mt00171k

www.rsc.org/metallomics

Zinc is a central player in the metalloproteomes of prokaryotes and eukaryotes. We used a bottom-up quantitative proteomic approach to reveal the repository of the zinc pools in the proteobacterium *Cupriavidus metallidurans*. About 60% of the theoretical proteome of *C. metallidurans* was identified, quantified, and the defect in zinc allocation was compared between a $\Delta zupT$ mutant and its parent strain. In both strains, the number of zinc-binding proteins and their binding sites exceeded that of the zinc ions per cell, indicating that the totality of the zinc proteome provides empty binding sites for the incoming zinc ions. This zinc repository plays a central role in zinc homeostasis in *C. metallidurans* and probably also in other organisms.

Copyright © 2014, Royal Society of Chemistry. All Rights Reserved.

Volltext veröffentlicht in:

Metallomics, Received 2014 Jun 27; Accepted 2014 Sep 23, first published
online 24 Sep 2014

Verfügbar unter folgender URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315396><http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2014/mt/c4mt00171k>

Supplement verfügbar unter folgender URL:

<http://www.rsc.org/suppdata/mt/c4/c4mt00171k/c4mt00171k1.pdf><http://www.rsc.org/suppdata/mt/c4/c4mt00171k/c4mt00171k2.xlsx>

Kapitel 3 – Metall-Aufnahmesysteme in *Cupriavidus metallidurans*

Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34

Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung

Das β -Proteobakterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 ist mit einer großen Anzahl spezifischer Effluxsysteme mit teilweise überlappender Substratspezifität an hohe Übergangsmetallkonzentrationen angepasst und ein Modelorganismus für Untersuchungen zur Metallhomöostase. Neben den Effluxsystemen sind die hier untersuchten Metall-Aufnahmesysteme von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Metallhomöostase. So besitzt dieses Bakterium ein ganzes Repertoire an sekundären und primären Aufnahmesystemen für divalente Übergangsmetallkationen. Um die Übersicht in dieser Studie zu wahren und die Verflechtungen der Export- und Aufnahmesysteme zu reduzieren wurde auf das Plasmid-freie Derivat AE104 des CH34 Stammes zurückgegriffen. Weiterhin fokussiert sich diese Arbeit auf die Charakterisierung der Einflüsse der fünf sekundären Aufnahmesysteme ZupT (ZIP, ZRT/IRT), PitA (PIT) und CorA₁₋₃ (MIT) auf die Metallhomöostase von *C. metallidurans* AE104.

Durch die Bestimmung des Elementgehaltes von *C. metallidurans* in TrisMM (in Mineralsalzmedium kultiviert) konnte folgende relative Zusammensetzung gezeigt werden:

$$\text{Mg} \gg \text{Ca} > \text{Fe} \gg \text{Zn} > \text{Cu} \gg \text{Ni} > \text{Co} \gg \text{Mn}$$

Die Effluxdeletionsmutante ($\Delta zntA \Delta cadA$) kann auch bei Verlust der Exportsysteme für Zink und Cadmium seine Metallhomöostase unter den Kultivierungsbedingungen im TrisMM aufrecht erhalten. Der Wildtypstamm CH34 und das Plasmid-freie Derivat AE104 sind in der Lage auch bei Metallinkubation und steigender Akkumulation die Metallhomöostase zu kontrollieren.

Die Untersuchungen zur Regulation der Aufnahmesysteme mittels chromosomaler Reporter-genfusion (*lacZ*) zeigten, dass die Expression aller 5 Gene (*zupT*, *pitA*, *corA*₁₋₃) bei hohen Zinkkonzentrationen herunter-reguliert wird. Inkubationen mit Nickel, Kobalt, Kupfer und Cadmium zeigten keinen derartigen Effekt. Unter den drei Mitgliedern der MIT Proteinfamilie wurde nur das Gen *corA*₁ unter Magnesiummangel verstärkt exprimiert. Die Magnesium-abhängige Regulation von *corA*₁ weist auf ein mögliches sekundäres Magnesium-Aufnahmesystem hin. Dabei könnten die Genprodukte der schwach konstitutiv exprimierten Gene für *corA*₂ und *corA*₃ als „Backup“-Systeme fungieren. Unter Metall komplexierenden Bedingungen hoher Phosphatkonzentrationen konnte eine gesteigerte Expression von *pitA* gezeigt werden. PitA ist ein

mögliches Metallphosphatkomplex-Aufnahmesystem in Bakterien. Ausschließlich *zupT* zeigte eine Regulation unter EDTA-, TPEN-, DPTA- und Phosphat-hervorgerufener Metall-Mangelsituation.

Dieser Effekt konnte durch Zugabe einzelner Metalle mit folgender Präferenz komplementiert werde: $Zn > Co > Mn$ (TPEN) und $Zn > Mn > Co > Ni$ (EDTA)

Die $^{65}Zn^{2+}$ Untersuchungen ergaben eine um ca. Faktor 10 gesteigerte Zinkaufnahme bei Magnesiummangel (10 μ M) im Vergleich zu 1 mM im TrisMM. Die *pitA* Deletionsmutante zeigte als einziger Deletionsstamm unter Magnesiummangel eine zweifach erhöhte Zinkaufnahme und verstärkte die *zupT* Expression unter hohen Phosphatkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp AE104. Weiterhin kam es durch die Einzel- und Doppeldeletion von *pitA* im Stamm AE104 und $\Delta zupT$ zu einer Verdreifachung des zellulären Magnesium- und einer Verdopplung des Phosphatgehaltes.

Keine Deletion der Einzelsysteme ($\Delta zupT$, $\Delta pitA$, $\Delta corA_1$, $\Delta corA_2$, $\Delta corA_3$) führte zu einem signifikant veränderten Phänotyp bei der Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) gegenüber Zink, Kobalt, Nickel, Cadmium und Kupfer auf Festmedium. Jedoch hatte ein durch EDTA hervorgerufener Metallmangel einen sensitiven Phänotypus der Deletionsstämme *zupT* und *corA*₁ zur Folge. Durch die zusätzliche Zugabe von Zink und Kobalt konnte dieser wachstumshemmende Effekt vollständig sowie durch Kupfer, Nickel und Cadmium teilweise komplementiert werden.

Die Anpassung von *C. metallidurans* an Metall-reiche Umgebungen scheint zu einer genetischen Ausstattung von Aufnahmesystemen mit breitem Substratspektrum geführt zu haben. Diese nehmen Metall-Phosphat-Komplexe (PitA), Magnesium (CorA₁) und Zink (ZupT) oder unspezifisch andere Metallionen in die Zelle auf, welche durch die Effluxsysteme bei Überschuss aus der Zelle transportiert werden.

Co-Autoren der Publikation

Andreas Kirsten (Doktorand)

Alexander Voigt (Diplomand)

Dr. Javier Seravalli

Prof. Dr. Gregor Grass

Judith Scherer (Doktorandin)

Prof. Dr. D.H. Nies

arbeitete zur selben Zeit am Thema Aufnahmesysteme, Erstautor

fertigte seine Diplomarbeit unter der Betreuung von Judith Scherer an:
„Untersuchungen der Metallaufnahme *Cupriavidus metallidurans* AE104“

AG Grass, wissenschaftl. Mitarbeiter

Assistant Prof. in Lincoln Nebraska in der Zeit von 2008 bis 2011

arbeitete in der AG Nies am Thema Effluxsysteme in *C. metallidurans*

ist der *Corresponding Author* und Arbeits-/Projektgruppenleiter

- Publikation -

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Sept. 2011, p. 4652–4663
0021-9193/11/\$12.00 doi:10.1128/JB.05293-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 193, No. 18

Contributions of Five Secondary Metal Uptake Systems to Metal Homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34^{∇†}

Andreas Kirsten,¹ Martin Herzberg,¹ Alexander Voigt,¹ Javier Seravalli,² Gregor Grass,³ Judith Scherer,¹ and Dietrich H. Nies^{1*}

*Molecular Microbiology, Institute for Biology/Microbiology, Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Germany*¹;
*Department of Biochemistry, University of Nebraska—Lincoln, Lincoln, Nebraska*²;
*and Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany*³

Received 13 May 2011/Accepted 29 June 2011

Cupriavidus metallidurans is adapted to high concentrations of transition metal cations and is a model system for studying metal homeostasis in difficult environments. The elemental composition of *C. metallidurans* cells cultivated under various conditions was determined, revealing the ability of the bacterium to shield homeostasis of one essential metal from the toxic action of another. The contribution of metal uptake systems to this ability was studied. *C. metallidurans* contains three CorA members of the metal inorganic transport (MIT) protein family of putative magnesium uptake systems, ZupT of the ZRT/IRT protein, or ZIP, family, and PitA, which imports metal phosphate complexes. Expression of the genes for all these transporters was regulated by zinc availability, as shown by reporter gene fusions. While expression of *zupT* was upregulated under conditions of zinc starvation, expression of the other genes was downregulated at high zinc concentrations. Only *corA*₁ expression was influenced by magnesium starvation. Deletion mutants were constructed to characterize the contribution of each system to transition metal import. This identified ZupT as the main zinc uptake system under conditions of low zinc availability, CorA₁ as the main secondary magnesium uptake system, and CorA₂ and CorA₃ as backup systems for metal cation import. PitA may function as a cation-phosphate uptake system, the main supplier of divalent metal cations and phosphate in phosphate-rich environments. Thus, metal homeostasis in *C. metallidurans* is achieved by highly redundant metal uptake systems, which have only minimal cation selectivity and are in combination with efflux systems that “worry later” about surplus cations.

Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Volltext veröffentlicht in:

Journal of Bacteriology, Received 2011 May 13; Accepted 2011 Jun 29, printed 8
Juli 2011

Verfügbar unter folgender URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742896>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3165648/pdf/zjb4652.pdf>

Supplement verfügbar unter folgender URL:

<http://jb.asm.org/content/193/18/4652/suppl/DC1>

Manuskript: “Strategic deletion of seven secondary metal uptake systems in *Cupriavidus metallidurans* reveals plasticity of the metal uptake transportome”

Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung

Die Metall- bzw. Zinkhomöostase von *Cupriavidus metallidurans* beruht auf einem dynamischen Gleichgewicht von Aufnahme- und Effluxvorgängen verbunden über das Zinkrepositorium (Herzberg *et al.*, 2014b). Der Efflux überschüssiger Metallkationen erfolgt über die gut charakterisierten P_{IB}-Typ-ATPasen und CDF Transporter vom Zytoplasma ins Periplasma und von dort durch die RND-Systeme über die äußere Membran (Nies, 2003; Nies, 2007b; Scherer und Nies, 2009). Die Aufnahme kann über Diffusion durch Porine der äußeren Membran ins Periplasma und von dort durch ein Repertoire an redundanten Transportsystemen mit geringer Substratspezifität ins Zytoplasma erfolgen. Der ZIP Transporter ZupT konnte als essentielles Zink-Aufnahmesystem unter Mangelbedingungen mit einer zentralen Bedeutung in der Zinkhomöostase identifiziert werden (Herzberg *et al.*, 2014a). PitA, ein Metall-Phosphat-Komplex-Aufnahmesystem, nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der Magnesiumhomöostase ein (Kirsten *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde eine systematische und strategische Deletion aller sekundären Metall-Aufnahmesysteme durchgeführt um ihren Einfluss auf die Metallhomöostase von *Cupriavidus metallidurans* AE104 näher zu untersuchen. Zu diesem Repertoire an sekundären Aufnahmesystemen zählen neben ZupT (TC3.A.5) und PitA (TC2.A.20), die Mitglieder der MIT Proteinfamilie (CorA₁₋₃ und ZntB) (TC1.A.35) und der NiCoT Proteinfamilie (HoxN) (TC2.A.52) (Saier *et al.*, 2006).

Eine systematische Erstellung von doppel- und dreifach über multiple Kombinationen bis zur siebenfach Deletionsmutante ($\Delta 7$, $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN$) erfolgte in dieser Arbeit.

Die Bestimmung des zellulären Metallgehaltes bestätigt ZupT als Haupt-Zink-Aufnahmesystem unter Mangelbedingungen. Bei Deletion aller untersuchten Aufnahmesysteme in der $\Delta 7$ Deletionsmutante kommt es zu keinem weiteren Absinken des zellulären Zinkgehaltes unter den scheinbar minimalen Gehalt von ca. 20.000 Atomen pro Zelle. Durch den Verlust des ZIP Transporters kommt es durch EDTA hervorgerufener Zink-Mangelbedingung zu einer Wachstumsinhibierung auf Festmedium (MIC, *minimum inhibitor concentration*) welche unbeeinflusst durch die Deletion der verbleibenden sechs Systeme im resultierenden $\Delta 7$ Stamm bleibt. Ein weiteres unbekanntes Zink-Aufnahmesystem scheint in der Lage zu sein die Zellen mit dem benötigten minimalen Zinkgehalt zu versorgen.

Der im $\Delta pitA$ Stamm hervorgerufene dreifache Anstieg des zellulären Magnesiumgehaltes von $11,5 \pm 1,2 \times 10^6$ auf $36,8 \pm 4,4 \times 10^6$ Atomen pro Zelle wird durch die systematische Deletion aller untersuchten paraloger Magnesium-Aufnahmesysteme ($CorA_{1-3}$) nicht kompensiert. Was auf mindestens ein weiteres, in regulatorischer-Abhängigkeit von *pitA* stehendes, aber unbekanntes Magnesium-Aufnahmesystem schließen lässt.

Ein Anstieg der Nickelresistenz auf Festmedium (MIC) durch die Deletion von $CorA_1$ und $CorA_2$ lässt auf ein Nickel beinhaltendes Substratspektrum dieser sekundären Transporter schließen. Weiterhin zeigen $CorA_1$ und $CorA_3$ einen Einfluss auf die Kobaltresistenz.

Eine ausschließlich durch die Deletion von *zupT* hervorgerufene Inkompatibilität mit dem CzcCBA Systems (RND, TC2.A.6) konnte in allen multiplen Mutanten bestätigt werden. Weiterhin konnte für eine Efflux-Deletionsmutante ($\Delta e4, \Delta zntA \Delta cadA \Delta dmeF \Delta fieF$) mit zusätzlicher Deletion von *zupT* der Verlust der Czc-vermittelten Zinkresistenz und des CzcA RND-Proteins gezeigt werden. Dies deutet einen *crossstalk* zwischen ZIP Transporter, RND-System und zellulären Zinkspiegel auf unbekannter Ebene und molekularen Hintergründen an.

Neben *ZupT* ist auch *PitA* und $CorA_{1-3}$ an der Zinkverteilung und der korrekten Faltung von *RpoC* beteiligt.

Die systematische Deletion der sekundären Aufnahmesysteme, bis zur siebenfach Deletionsmutante, führt zu einem Absinken der Fitness und Störung zellulärer Funktionen, was sich in einer Zunahme der Latenzphase (*lag phase*) und einer Abnahme der spezifischen Wachstumsrate (μ) im AE104 Hintergrund zeigt. Jedoch kann die Deletion der einzelnen Systeme durch Verbleibende in weiten Bereichen des benötigten, zellulären Metallgehaltes durch die Plastizität des Transportoms kompensiert werden. Gleichzeitig führt diese Plastizität zur Abnahme der Kobalt- und Cadmiumresistenz und vermittelt ein Bild der Interaktion von Aufnahme- und Effluxsystemen.

Co-Autoren der Publikation

Lucy Bauer (Master-Studentin)	fertigte im selben Labor ihre Masterarbeit unter meiner Betreuung an: „Metall-Chaperone in <i>Cupriavidus metallidurans</i> “
Andreas Kirsten (Doktorand)	arbeitete zur selben Zeit am Thema Aufnahmesysteme in <i>Cupriavidus metallidurans</i>
Prof. Dr. D.H. Nies	ist der <i>Corresponding Author</i> und Arbeits-/Projektgruppenleiter

1
2 **- Manuskript -**
3

4 **Strategic deletion of seven secondary metal transport systems in**
5 ***Cupriavidus metallidurans* reveals plasticity of the**
6 **metal uptake transportome**

7
8 Martin Herzberg, Lucy Bauer, Andreas Kirsten,
9 and Dietrich H. Nies*

10
11 Molecular Microbiology, Institute for Biology/Microbiology,
12 Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,

13
14 *Corresponding author: Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle/Saale, Germany.

15 Phone +49/0-345-5526352, Fax +49/0-345-5527010,

16 Email: d.nies@mikrobiologie.uni-halle.de

17
18 Running title: Secondary metal uptake systems in *C. metallidurans*.

19
20 Key words: *Cupriavidus*, *Ralstonia*, zinc, cadmium,
21
22

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

The beta-proteobacterium *Cupriavidus metallidurans* is able to grow in metal-contaminated environments due to its possession of a sophisticated metal homeostasis system. The interplay and role of seven secondary metal uptake systems for this process is characterized here. The sevenfold deletion mutant $\Delta 7$ of the plasmid-free *C. metallidurans* derivative AE104 suffered from retarded growth and increased sensitivity to cobalt and cadmium ions. Functions were assigned to the individual import systems: (i) PitA imported metal:phosphate complexes with low metal specificity, highlighting the worth of metal:phosphate complexes for metal supply in bacteria. (ii) ZupT (ZIP or ZRT/IRT protein family) provided Zn(II) ions to the cells and proper allocation of the metal to zinc-dependent client proteins. (iii) The three MIT (Metal Ion Transporter or CorA protein family) proteins CorA₁, CorA₂ and CorA₃ seemed to cooperate. CorA₁ and CorA₂ were involved in nickel, CorA₁ and CorA₃ in cobalt import. All three could also supply zinc to the cells in a $\Delta zupT$ $\Delta pitA$ double deletion strain and allow efficient allocation of the metal to the zinc-containing RpoC subunit of the RNA polymerase. (iv) The MIT protein ZntB was an additional zinc uptake system. (v) When all these proteins had been deleted in the $\Delta 6$ mutant, the gene for the NiCoT (nickel cobalt transport protein family) HoxN was up-regulated and could sustain the cells of the $\Delta 6$ mutant on the fitness level of the $\Delta zupT$ single deletion, indicating that HoxN was also capable to supply transition metal cations to the *C. metallidurans* cells.

Importance

Metal uptake systems provide essential nutrients to bacterial cells and are usually bacterial virulence factors. Here, we demonstrate the sophisticated interplay of seven importers that belong to different protein families. Together, they are responsible for a controlled supply of phosphate, magnesium, zinc, cobalt and nickel to the cells of *C. metallidurans* and thus important contributors to the outstanding metal resistance of this bacterium. The overall emergent system shows much plasticity. Deletion of one system after the other can be compensated by the remaining transporters. The cellular metal content can be maintained to a large degree, however, this plasticity is at the cost of a decreased cobalt and cadmium resistance, showing also interaction of uptake and efflux systems.

Introduction

Cupriavidus metallidurans is able to maintain its transition metal homeostasis at high concentrations of single individual transition metal cations or even at mixtures of cations (1), thus

61 being able to thrive in metal-contaminated environments such as serpentine soils, zinc deserts or
62 on biofilms around gold nuggets (2-5). This ability results from a multitude of metal efflux systems
63 (6, 7), the most advanced systems encoded by the two megaplasmids of *C. metallidurans* strain
64 CH34, pMOL28 and pMOL30 (8, 9), in combination with a battery of redundant, secondary metal
65 uptake systems with low substrate selectivity (1). Members of this battery are: (i) the ZIP protein
66 ZupT {(TC#2.A.5) Transporter classification (10, 11)}; (ii) the metal-phosphate importer PitA
67 (TC#2.A.20); (iii) three members of the MIT family CorA₁ to CorA₃ (TC#1.A.35) and (iv) ZntB, a
68 possible metal-exporting MIT protein. An additional candidate for metal uptake systems is the
69 NiCoT protein HoxN (TC#2.A.52) that may import additional Ni²⁺ cations into the cell for
70 hydrogenase synthesis. Export from the cytoplasm to the periplasm is mediated by P_{IB}-type
71 ATPases (TC#3.A.3), CDF proteins (TC#2.A.4) (12)} and efflux systems of other protein families
72 such as the nickel exporter CnrT. From here, RND-driven (TC# 2.A.6) transenvelope efflux
73 systems such as CzcCBA, CnrCBA and CusCBA expel surplus metals back across the outer
74 membrane to the outside (7, 13, 14).

75
76 Expression of *zupT*, *corA*₁₋₃ and *pitA* is down-regulated by zinc excess, only that of *zupT* is
77 up-regulated by zinc starvation via the Fur-type zinc uptake regulator Zur (previously FurC) (15).
78 Only *corA*₁ expression was influenced by magnesium starvation (1). Expression of *pitA* was up-
79 regulated with increasing phosphate concentrations up to 5 mM phosphate, which complexes zinc
80 ions and lowers its availability. At higher phosphate concentrations, *pitA* is down-regulated again
81 but remains on a high expression level in a $\Delta zupT$ mutant (1), indicating a central function of zinc in
82 control of expression of *pitA*, however, Zur is not involved in this process (15).

83
84 Mutants carrying single deletions in the genes *zupT*, *pitA*, *corA*₁, *corA*₂ or *corA*₃ are not
85 compromised in net zinc uptake when sufficient zinc was provided to the cells, indicating that none
86 of these genes alone is essential for zinc import (1). Deletion of *zupT*, however, yields a number of
87 defects: (i) EDTA sensitivity on solid medium, which could be compensated by addition of zinc ions
88 but not with other ions; (ii) decreased ability to acquire zinc even at low EDTA concentrations, e.g.
89 100 μ M; (iii) a lower number of zinc atoms per cell, 20,000 instead of 70,000 but more cobalt
90 atoms; (iv) inefficient synthesis of the zinc-dependent RpoC subunit of the RNA polymerase,
91 resulting in excretion of RpoC into inclusion bodies; (v) inability to harbor the RND-driven
92 transenvelope zinc efflux complex CzcCBA; (vi) decreased tolerance to oxidative stress due to a
93 lower number of the periplasmic Zn/Cu-containing superoxide dismutase SodC; (vii) un-silencing of
94 the *aut1* gene region in the genomic island CMGI-3, which results in the production of nickel-
95 containing hydrogenase, Calvin cycle enzymes and the ability to shift rapidly to growth as a
96 chemolithoautotrophic “*Knallgas*” bacterium; (viii) and finally under conditions of metal starvation to

97 the up-regulation of the *cobW₁* gene cluster that encodes a possible zinc chaperone and zinc-
98 containing paralogs of essential zinc-independent proteins (1, 16-18).

99
100 ZupT seems to supply zinc to the cytoplasm of *C. metallidurans* in a way that allows efficient
101 allocation to zinc-dependent client proteins such as RpoC. In a strategic deletion approach, we
102 tested the influence of all the other known possible secondary zinc uptake system on zinc import
103 and allocation, we used inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to measure the
104 metal bouquet of the mutant cells, tested metal resistance, and the ability to harbor CzcA and to
105 efficiently produce RpoC as a measure of zinc allocation and global zinc-dependent regulatory
106 processes. This was done with the plasmid-free *C. metallidurans* strain AE104 as parent since
107 presence of the *czc*-containing plasmid pMOL30 and deletion of *zupT* are incompatible conditions
108 (16). Multiple deletions strains were constructed up to $\Delta 7$ or $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$
109 $\Delta zntB \Delta hoxN$. This highlighted the importance of the “battery” of secondary metal cation importers,
110 their interplay and the overall metal uptake transportome for full metal resistance in *C.*
111 *metallidurans*.

112 113 114 **Material and Methods**

115
116 Bacterial strains and growth conditions, genetic techniques including construction of in-frame
117 deletion without polar effects and interruption of genes by insertion of a kanamycin resistance
118 cassette, measurement of cellular metal content by ICP-MS (inductively coupled plasma mass
119 spectrometry), determination of the MIC (minimal inhibitory concentration) on solid Tris-buffered
120 mineral salts medium (TMM), dose response curves in 96 well plates and the calculation of the
121 IC₅₀ value, β -galactosidase assay and *lacZ*-reporter constructions were done as described many
122 times, e.g in (19). A detailed Material and Methods section is given in the Supplementary Material,
123 including the sequences of the primers and strains used (Suppl. Tables S1 and S2). All
124 experiments and data points mean values from a least 3 biological reproductions.

125 126 127 **Results**

128
129 Systematic deletion analysis up to $\Delta 5$. All five genes for secondary metal cation uptake systems
130 were deleted from the genome of the plasmid-free *C. metallidurans* strain AE104 up to the deletion
131 mutant $\Delta 5$, which was $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$. All 10 combinations of double mutants
132 were constructed and four of the five possible quadruple mutants but only two triple mutants.
133 Correct deletions were always verified by Southern-type DNA/DNA hybridization (data not shown).
134 During construction of the mutants, it was only once possible to obtain a “clean” (meaning antibiotic

135 marker free deletion using the *cre-lox* system) $\Delta corA_1$ deletion, in this case from the $\Delta zupT \Delta corA_2$
136 $\Delta corA_3$ triple deletion strain leading to the $\Delta zupT \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$ quadruple mutant
137 designated $\Delta 4$. This “clean” quadruple deletion strain $\Delta 4$ was the parent of $\Delta 5$ ($=\Delta 4 \Delta pitA$) and all
138 subsequent strains. In all other cases, the *corA₁* gene had to be interrupted by insertion of a
139 kanamycin resistance cassette. This did not exclude polar effects, although *corA₁* seemed not to
140 be located as upstream gene in an operon. It is located as the second gene in the dicistronic
141 operon region Op0859f (all genes located in an un-interrupted series in the same direction of
142 transcription had been previously numbered and designated as “operon regions” (18) to facilitate
143 analysis of the *C. metallidurans* genome and its transcription, “f” forward direction, “r” reverse),
144 downstream of the gene for the putative uncharacterized protein Rmet_3051 that was never found
145 in the proteome of *C. metallidurans* (17). Op0859f is followed by the tricistronic Op0860r on the
146 other DNA strand.

147
148 On solid Tris-buffered mineral salts medium (TMM) EDTA resistance of all mutants carrying a
149 $\Delta zupT$ deletion was lower than resistance of the parent AE104 and on a similar level as that of the
150 $\Delta zupT$ single deletion strain (1). EDTA resistance of all mutants with intact *zupT* was on the AE104
151 level. The decreased EDTA resistance of all mutants with a $\Delta zupT$ deletion could be increased
152 again by addition of zinc but not by other metals (Suppl. Table S3). Inability of $\Delta zupT$ deletion
153 strains to recover zinc at low zinc availability was neither mollified nor aggravated when additional
154 genes for import systems were deleted. Only ZupT could supply zinc to the cytoplasm under
155 conditions of low external availability. No protein was produced in the various deletion mutants able
156 to substitute ZupT with respect to this function, highlighting again importance and unique function
157 of ZupT in zinc homeostasis.

158
159 Metal resistance on solid medium up to $\Delta 5$. On solid TMM there was no significant effect in any of
160 the studied multiple deletion strains on zinc, cadmium or copper resistance (Table 1). The mutant
161 strains up to $\Delta 5$ differed slightly in their cobalt and nickel resistance levels. Nickel ions are removed
162 from *C. metallidurans* cells by the RND-driven transenvelope efflux system CnrCBA and the inner
163 membrane exporter CnrT encoded by the *cnrYXHCBAT* determinant on plasmid pMOL28 (20, 21),
164 cobalt by CnrCBA, CzcCBA encoded by plasmid pMOL30, and the CDF protein DmeF. Only DmeF
165 is present in the plasmid-free strain AE104 used in this study as parent (9, 22). Since DmeF is an
166 important inner membrane efflux system for cobalt ions but not of comparable importance for nickel
167 ions (7, 23), the increase in nickel resistance of the deletion mutants indicated decreased nickel
168 import, assigning a function in nickel uptake to the respectively deleted transporter.

169
170 Nickel resistance of all $\Delta corA_1$ -containing multiple mutant strains was enhanced, indicating that
171 CorA₁ was involved in nickel uptake (Table 1). In addition, the $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_2 \Delta corA_3$ mutant,

172 which still possessed a functional *corA*₁ gene, was also more resistant to nickel than the parent
173 strain AE104, while its direct parent, the triple mutant $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_3$, was not (Table 1):
174 CorA₁ needs presence of CorA₂ for full function and both paralogs seem to cooperate with respect
175 to nickel import.

176
177 A few mutants displayed decreased cobalt resistance, indicating either increased cobalt import by
178 the remaining import systems, which could not be fully compensated by DmeF-mediated cobalt
179 efflux, a decreased efflux capability, or a stronger disturbance of the homeostasis of other
180 transition metals by the cobalt cations. Two double mutants, $\Delta corA_1 \Delta corA_2$ and $\Delta corA_2 \Delta corA_3$,
181 were more sensitive to cobalt than strain AE104 but not the $\Delta corA_1 \Delta corA_3$ and not the $\Delta corA_1$
182 $\Delta corA_2 \Delta corA_3$ triple mutant (Table 1). Deletion of *zupT* {which leads to increased accumulation of
183 cobalt (1, 16) and a zinc starvation response} in the $\Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$ triple mutant yielded
184 the $\Delta 4$ quadruple mutant, which was only slightly less resistant to cobalt than the parent AE104 (1,
185 16). Further deletion of *pitA* (leading to $\Delta 5$) did not change this. Cobalt resistance was also low in
186 the $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_3$ mutant. This indicated the presence of two factors responsible for
187 decreased cobalt resistance or cobalt-mediated disturbance of metal homeostasis: CorA₁ in the
188 $\Delta corA_2 \Delta corA_3$ and the $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_3$ mutant, and CorA₃ in the $\Delta corA_1 \Delta corA_2$ mutant.

189
190 This indicated an interplay between the three CorAs involved in control of nickel and cobalt import
191 into *C. metallidurans*. CorA₂ was required for nickel, CorA₃ for cobalt homeostasis, and CorA₁ for
192 both. In the absence of these CorAs and of ZupT, PitA was also an important importer for cobalt
193 ions, probably in the form of Co(II):phosphate complexes.

194
195 Metal content of $\Delta 5$. As published (1), deletion of *pitA* led to a 3-fold increased magnesium (and
196 phosphor) content in the $\Delta zupT \Delta pitA$ double deletion strain of AE104. An increased magnesium
197 content was also a feature of all investigated $\Delta pitA$ -containing multiple deletion strains such as
198 $\Delta zupT \Delta pitA$ or $\Delta 5$. Similarly, deletion of *zupT* resulted in a decreased zinc content also visible in
199 all $\Delta zupT$ -containing multiple deletion strains such as $\Delta 4$ or $\Delta 5$. Deletion of *pitA* from strain AE104
200 or from the $\Delta zupT$ mutant decreased the cellular cobalt content, deletion from AE104 the cellular
201 nickel content, and deletion from $\Delta 4$ the cellular iron and copper content (Table 2). This indicates
202 that metal cation import as phosphate complexes by PitA was an important contributor for the
203 cellular metal supply. Nevertheless, even in $\Delta 5$, net metal uptake was still possible despite deletion
204 of 5 secondary import systems, namely ZupT, PitA and CorA₁₂₃.

205
206 Presence of CzcA and efficient synthesis of RpoC. Single gene deletion of *zupT* had two drastic
207 effects in AE104 (16). First, the $\Delta zupT$ mutant was unable to harbor the CzcA protein, the central
208 RND protein of the transenvelope CzcCBA (zinc, cobalt and cadmium) efflux complex, as result of

209 a prevented translation or increased protein degradation. Secondly, although the $\Delta zupT$ mutant
210 had only a slightly longer lag phase of growth when compared to its parent and had a similar
211 number of RNA polymerases per cell, zinc-dependent RpoC subunits accumulated in inclusion
212 bodies, which was clearly visible when crude extracts of the cells were analyzed on a
213 polyacrylamide gel (16, 17). Accumulation of RpoC could be mollified by addition of zinc to the
214 growth medium but not prevented, indicating that the essential zinc ions were not efficiently
215 allocated to the folding RpoC subunit in the $\Delta zupT$ mutants.

216
217 These effects were used as sensors of the internal zinc status in the mutant cells. Up to $\Delta 5$, none
218 of the single, double or multiple deletion mutant strains carrying a $\Delta zupT$ deletion was able to
219 harbor CzcA (Fig. 1). The inability of the $\Delta zupT$ single mutant to carry the CzcCBA transenvelope
220 efflux system for zinc, cobalt and cadmium was thus not influenced by deletion of more import
221 systems.

222
223 With respect to the accumulation of the RpoC subunit of the RNA polymerase as indicator of an
224 efficient zinc allocation, the situation was more complicated. As published (16), the RpoC band
225 was clearly visible in Coomassie-stained crude extracts coming from the $\Delta zupT$ mutant but not
226 from AE104 crude extracts (Fig. 1A). Although the $\Delta pitA$ mutant was able to accommodate CzcA
227 (Fig. 1B lane 3), this mutant also accumulated unfolded RpoC (Fig. 1A lane 3), indicating a
228 separation of the zinc allocation pathway that provides the metal to its client protein RpoC and the
229 mechanism preventing the presence of CzcA under extended zinc starvation conditions by loss of
230 ZupT. The $\Delta zupT \Delta pitA$ double (Lane 4) and the $\Delta 4$ quadruple mutant (Lane 5) did not accumulate
231 RpoC. The $\Delta 5$ mutant was again similar to $\Delta zupT$ and accumulated RpoC.

232
233 While deletion of $\Delta zupT$ always resulted in the inability to harbor CzcA, efficient production of the
234 important zinc-dependent protein RpoC was allowed again either by additional $pitA$ or by additional
235 $corA_{123}$ deletion, indicating a role of PitA and CorA₁₂₃ in zinc import but also some counteraction
236 of the PitA- and CorA₁₂₃-function in the absence of ZupT. This agreed with the result that PitA
237 was also an central net importer for cobalt ions but only in the absence of the CorAs and of ZupT.

238
239 The zinc content of all mutants carrying a $\Delta zupT$ deletion ($\Delta zupT$, $\Delta zupT \Delta pitA$, $\Delta 4$, $\Delta 5$) including
240 $\Delta zupT \Delta pitA$ and $\Delta 4$, which could produce RpoC efficiently, was between 20,000 and 39,000 Zn
241 per cell and thus significantly lower than that of strain AE104 (73,000; Table 2). The ability to
242 produce RpoC correctly did not correlate with the absolute cellular zinc content but with the import
243 pathways. Zn(II) had to be imported by ZupT, PitA in the $\Delta zupT \Delta corA_{123}$ ($\Delta 4$) or CorA₁₂₃ in the
244 $\Delta zupT \Delta pitA$ mutant. If both, PitA and the CorAs, were present in the $\Delta zupT$ mutant or if all five
245 uptake systems were deleted, zinc could not be delivered efficiently to RpoC.

246

247 $\Delta 6$ is $\Delta 5 \Delta zntB$. The $\Delta 5$ mutant still accumulated magnesium and transition metals, although five
248 possible zinc uptake systems already had been deleted. *C. metallidurans* contains another CorA-
249 related MIT protein discussed to be a zinc efflux system (24, 25), ZntB. During the construction of
250 the strategic deletion series, the *lacZ* gene was inserted downstream of all seven transporter
251 genes mentioned in this study, always leaving the open reading frame of the transporter gene
252 intact. These fusions were constructed in strain AE104 and several mutant strains, and regulation
253 of expression of the reporter gene by divalent transition metal cations and EDTA was measured
254 (data not shown). With three exceptions, this did not yield any insights. Exception 1 was the
255 already known global down-regulation of most genes by increasing zinc concentrations as
256 published (1). Exception 2 concerned *zntB-lacZ*, which was constructed in AE104, $\Delta zupT$, $\Delta 5$ (Fig.
257 2) and $\Delta pitA$ (data not shown). In all mutants, addition of zinc chloride decreased expression of the
258 reporter construct by half up to 1 mM Zn(II). Addition of cadmium decreased *zntB-lacZ* expression
259 down to 25 % of the value without added metals at 0.5 mM Cd(II). No difference between the
260 strains was visible (Fig. 2). EDTA, Co(II), or Mn(II) had no effect and Cu(II) also resulted in a down-
261 regulation of *zntB-lacZ* activity (data not shown). ZntB was regulated as should be expected for an
262 uptake system, and was down-regulated when high concentrations of thiol-binding metals such as
263 cadmium and copper are threatening the cells. Regulation was independent of ZupT, PitA or
264 CorA₁₂₃.

265
266 The *zntB* gene was deleted in the $\Delta 5$ strain leading to the $\Delta 6$ strain. Net uptake of zinc was
267 decreased compared to $\Delta 5$ but not significantly (Fig. 3). The overall metal content of $\Delta 6$ was not
268 different from that of $\Delta 5$ (Table 2). Reminiscent to $\Delta 5$, $\Delta 6$ was unable to harbor CzcA but
269 accumulated RpoC (Fig. 1). The $\Delta zntB$ deletion neither decreased nor increased zinc resistance on
270 solid TMM and did not abolish net zinc uptake. This demonstrated much plasticity of the metal
271 uptake transportome of *C. metallidurans*, which was not much disturbed by removal of five
272 secondary import systems (CorA₁₋₃, PitA, ZntB) in addition to ZupT.

273
274 $\Delta 7$ is $\Delta 6 \Delta hoxN$ and contains no known secondary zinc import system. The last remaining known
275 secondary importer for divalent transition metal cations except iron was HoxN, which is encoded by
276 the *aut1* region for chemolithoautotrophic growth silenced in strain AE104 when the cells were
277 cultivated in low-phosphate TMM growth medium (18). HoxN-like NiCoT transporters supply nickel
278 to hydrogenase and cobalt to some cobalt-specific enzymes and are no known secondary
279 importers for zinc (26).

280
281 The *hoxN-lacZ* fusion displayed an interesting expression pattern (exception 3 of the beta
282 galactosidase results): the gene was not regulated by EDTA, nickel or cobalt in all tested strains
283 (data not shown), and not regulated by zinc in strain AE104 (Fig. 2B), staying at a low specific
284 activity of 9.4 ± 2.7 U/mg dry mass. In $\Delta zupT$ and $\Delta 5$, *hoxN-lacZ* was 2-fold up-regulated with

285 increasing zinc concentrations up to 1 mM. Surprisingly, the fusion operon was strongly expressed
286 in $\Delta 6$ at 81 ± 5 U/mg and now down-regulated 1.6-fold with increasing zinc concentrations (Fig. 2B),
287 possibly recruiting it for zinc import.

288
289 Consequently, the $\Delta 7$ strain was constructed by deletion of *hoxN* from the chromosome of the $\Delta 6$
290 mutant strain. Deletion of *hoxN* did not prevent RpoC accumulation, neither in the $\Delta 7$ strain nor in
291 $\Delta 5 \Delta hoxN$ nor in $\Delta zupT \Delta hoxN$ (data not shown). The metal content of $\Delta 7$ was not changed
292 compared to $\Delta 4$ (Table 2). Again, other transport systems were able to substitute for missing ZntB
293 and HoxN systems. Compared to $\Delta 6$, the cellular iron and copper content, which was decreased as
294 a consequence of the *pitA* deletion in $\Delta 4$ leading to $\Delta 5$, was on the $\Delta 4$ level again (Table 2). PitA
295 seemed to be involved in uptake of iron and copper, its deletion did not lead to up-regulation of
296 other import routes, which were up-regulated, however, when subsequently *hoxN* was deleted.

297
298 Comparison of the metal content of multiple import and efflux deletion mutants. The metal content
299 of $\Delta 7$ with all known secondary zinc import systems removed, was remarkable similar to that of
300 $\Delta e4 \Delta zupT$ ($\Delta e4 = \Delta zntA \Delta cadA \Delta dmeF \Delta fieF$; (7)), including the high Mg(II) content that was a
301 feature of the $\Delta pitA$ deletion. The quadruple efflux deletion strain $\Delta e4$ was very sensitive to zinc
302 and accumulated high numbers of zinc (200,000 per cell) even at low (10 μ M) zinc concentrations
303 (17). When cultivated without added zinc, its zinc content was similar to that of its parent strain
304 AE104, 70,000 per cell, and deletion of *zupT* from $\Delta e4$ lowered this number only to 52,000 but not
305 to 20,000 as in case of the AE104 $\Delta zupT$ mutant (16), in the reproduction shown here to 32,000
306 zinc per cell (Table 2).

307
308 The $\Delta e4$ mutant and its $\Delta e4 \Delta zupT$ derivative did not accumulate RpoC (Fig. 1, lanes 8 and 9) and
309 seemed to be able to accommodate CzcA. However, inability of a $\Delta zupT$ mutant to harbor CzcA
310 was not evident just after conjugational transfer of the *czcCBAD*'-containing plasmid pDNA130 into
311 the respective mutant strain but the strain had to be transferred several times to fresh TMM agar
312 plates, and stored at 4°C between the transfers (16). When the respective experiment was
313 performed with $\Delta e4$ and $\Delta e4 \Delta zupT$, metal resistance and CzcA-content was lost in the $\Delta e4 \Delta zupT$
314 mutant but not its parent $\Delta e4$ after five transfers on strain collection plates (Supplementary Fig. S1).

315
316 This indicated that not the cellular zinc content and not the inability to allocate zinc to client
317 proteins such as RpoC were responsible for the inability to harbor the Czc efflux complex. This
318 inability was also not the result of an acute process but rather from a slow adaption of the $\Delta zupT$
319 cells to a disturbed acquisition of Zn(II) in the presence of CzcCBA. On the other hand, removal of
320 these four possible zinc efflux systems fully permitted efficient folding of RpoC again, illustrating
321 the importance of the kinetical transport flow equilibrium of the cytoplasmic zinc concentration in
322 combination with the cytoplasmic zinc pools: the efflux systems remove Zn(II) from a pool that was
323 required for RpoC folding, and only ZupT was able to fill-up this particular pool.

324
325 Growth of the mutant strains in liquid TMM in the presence and absence of transition metal cations.
326 With the exception of an increased magnesium and decreased zinc and nickel content, the inability
327 to harbor CzcA and to fold RpoC efficiently, the mutant strains were not different from their parent
328 AE104. The fitness of the mutant strains was analyzed in growth experiments in liquid culture to
329 measure the consequences of this – on the first glance - only slightly disturbed metal
330 homoeostasis. As published (17), the $\Delta zupT$ strain showed an extended lag phase compared to
331 strain AE104 but a similar growth rate (Figure 4A). The $\Delta 7$ mutant strain showed an even more
332 extended lag phase, while $\Delta 5$ and $\Delta 6$ were not different from $\Delta zupT$. Without added metals, the
333 extended lag phase caused by the $\Delta zupT$ deletion did not extend further until all other six
334 secondary metal import systems had been deleted.

335
336 Addition of a very low cobalt concentration (10 μM) increased the growth difficulties of the $\Delta 7$
337 mutant strain while addition of the same concentration of zinc decreased the problems (Fig. 4BC).
338 Again, the $\Delta 5$ and $\Delta 6$ mutant strains grew identical to $\Delta zupT$. Addition of only 2.5 μM cadmium
339 chloride (Fig. 4D) retarded growth of the $\Delta 7$ mutant even more, and the strain grew with lower
340 reproducibility as indicated by the large deviation bars in Fig. 4D. In this case, $\Delta 5$ and $\Delta 6$ even
341 performed better than $\Delta zupT$. Growth of the $\Delta 5$ and $\Delta 6$ was also similar to that of the $\Delta zupT$ strain
342 in the presence of 250 μM Cu(II) or 50 μM EDTA (data not shown).

343
344 This indicated that metal homoeostasis and overall fitness of the $\Delta 7$ deletion strain was
345 compromised. Up to $\Delta 6$, homoeostasis in the presence of low concentrations of Co(II), Cd(II) and
346 Cu(II) could be maintained at the level of the $\Delta zupT$ mutant and cadmium resistance even seemed
347 to improve. Deletion of *hoxN*, highly expressed in the $\Delta 6$ mutant, abolished this ability, except in
348 the presence of 10 μM Zn(II).

349
350 To verify and differentiate these findings, metal resistance of the mutant strains in liquid culture
351 was determined in dose response curves (data not shown), and the respective IC₅₀ values of the
352 inhibiting substance were calculated (Table 3 and 4). A decrease of metal resistance due to
353 deletion of the gene for a predicted import system may indicate (i) that the cell compensates loss of
354 function by up-regulation of other import systems; (ii) that the transporter may be an exporter rather
355 than an importer; or (iii) toxic effects resulting from an imbalanced cellular metal cation mélange.

356
357 In liquid medium, deletion of *zupT* in AE104 and the quadruple efflux mutant $\Delta e4$ ($\Delta zntA$ $\Delta cadA$
358 $\Delta dmeF$ $\Delta fieF$) effected resistance to all tested metals (except to Co(II) in $\Delta e4$), including Au(III)
359 complexes, again demonstrating importance of ZupT for overall transition metal homoeostasis and
360 a possible partial compensation of the *zupT* deletion by other importers (Table 3 and 4). Deletion of
361 *pitA* decreased zinc resistance in strain AE104 but not in the $\Delta zupT$ strain: ZupT was responsible

362 for decreased zinc resistance in $\Delta pitA$ agreeing with its function as zinc importer. Deletion of
363 $\Delta corA_{123}$ in $\Delta zupT$ (= strain $\Delta 4$) increased zinc resistance nearly to the AE104 level: CorA₁₂₃ was
364 responsible for decreased zinc resistance in $\Delta zupT$ while PitA was not. Subsequent deletion of *pitA*
365 in $\Delta 4$ leading to $\Delta 5$ decreased zinc resistance again to the $\Delta pitA$ level.

366
367 While deletion of *hoxN* did not change zinc resistance of $\Delta 5$, agreeing with the low expression level
368 of a *hoxN-lacZ* fusion in $\Delta 5$, deletion of *zntB* doubled zinc resistance. In agreement with the
369 increased expression of *hoxN-lacZ* in $\Delta 6$, deletion of *hoxN* in $\Delta 6$ led to decreased zinc resistance in
370 $\Delta 7$, which was one of the two strains with the lowest zinc resistance among the import mutants.

371
372 These results indicated that *C. metallidurans*, although suffering from pleiotropic effects as the
373 result of the $\Delta zupT$ deletion, could maintain a minimum zinc content and its overall transition metal
374 homoeostasis by activating one metal import system after the other in a kind of “pecking order”:
375 ZupT in $\Delta pitA$, CorA₁₂₃ in $\Delta zupT$, ZntB in $\Delta 5$, and finally HoxN in $\Delta 6$. With the exception of *hoxN* in
376 $\Delta 6$, a parallel up-regulation could not be demonstrated by using *lacZ* fusions of the respective
377 importers (data not shown), so this activation was not on the level of gene expression. This
378 included also regulation of a *zupT-lacZ* fusion in the $\Delta pitA$ strain compared to AE104 parent, which
379 was not different (data not shown)

380
381 The resistance pattern of the mutants to cobalt showed some differences compared to zinc
382 resistance (Table 3). Deletion of *zupT* and of *pitA* decreased cobalt resistance to the same extend,
383 and that of a double deletion even more, while resistance of $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 5 \Delta hoxN$ and $\Delta 6$ again was
384 on the level of the $\Delta zupT$ and $\Delta pitA$ single deletion mutants. Activation of CorA₁₂₃ was at least
385 responsible for decreased cobalt resistance of the $\Delta zupT \Delta pitA$ double mutant. Deletion of *hoxN* in
386 $\Delta 6$ leading to $\Delta 7$ but not in $\Delta 5$ sharply decreased cobalt resistance. Deletion of the importer genes
387 decreased cadmium resistance in every step, with exception of $\Delta pitA$ in $\Delta 4$, indicating that PitA was
388 a cadmium:phosphate importer.

389
390 A second set of deletion mutants were constructed to examine the contribution of the secondary
391 transporters in more detail. This deletion series was *hoxN* -> *zupT* -> *zntB* -> *pitA*. When these
392 genes were subsequently deleted, the IC₅₀ value for cobalt decreased from 90 μ M in AE104
393 stepwise down to 30 μ M, 20 μ M, 9.6 μ M and 4.1 μ M, respectively (Table 3). Since CorA₁₂₃ were
394 still present in all of these mutants, deletion of the respective system seems to have activated
395 CorA₁₂₃. Indeed, deletion of *corA*₁₂₃ in AE104 doubled cobalt resistance, indicating that CorA₁₂₃
396 was an important cobalt importer.

397

398 Similarly to the first set of deletion mutants, cadmium resistance also decreased in every step
399 when successively *hoxN*, *zupT*, *zntB* and *pitA* were deleted. In contrast, the $\Delta corA_{123}$ mutant was
400 similar in its cadmium resistance to the parent strain AE104 (Table 3). The subsequent activation
401 of import systems in the deletion mutants yielded increased cadmium toxicity.

402
403 Resistance to other metal cations (Table 4) followed the pattern of zinc resistance, with $\Delta 7$ being
404 the most sensitive strain. EDTA resistance in liquid culture was similar for most strains, strongly
405 increased in the $\Delta e4$ efflux mutant, and decreased again in its $\Delta e4 \Delta zupT$ deletion strain. The
406 $\Delta zupT$ mutant showed decreased resistance to oxidative stress, in agreement with a lower content
407 of periplasmic Cu-Zn-containing superoxide dismutase in the mutant strains (17). When oxidative
408 stress resistance of the mutant strains was examined (Table 5), $\Delta 7$ was as resistant to H_2O_2 and
409 paraquat as the $\Delta zupT$ mutant. Only the $\Delta pitA$ and $\Delta e4$ strain results in a higher paraquat but not
410 H_2O_2 resistance and is reduced by additional deletion of *zupT* (17) in all analyzed mutants.

411
412 Thus, the secondary metal cation importers all contributed to zinc import and the uptake of other
413 metals. PitA as importer of metal:phosphate complexes was most important, required for import of
414 a wide range of metals. Second, ZupT was produced under zinc starvation conditions by Zur-
415 dependent up-regulation of gene expression. Among other effects, ZupT was required for efficient
416 RpoC folding and stable production of CzcA. Third, CorA₁, CorA₂, CorA₃, which seem to
417 cooperate, were also required for proper RpoC folding under certain conditions, for zinc, cobalt and
418 nickel import. CorA₁₂₃ could be substitutes for ZupT and PitA but also counteract the PitA function.
419 Fourth, ZntB could contribute to zinc and cadmium import in the $\Delta 5$ mutant, and expression of
420 *hoxN* was specifically up-regulated in the $\Delta 6$ mutant. All these deletion strains up to $\Delta 6$ remained at
421 the fitness level of the $\Delta zupT$ single mutant, kept their overall metal content and bouquet on that
422 level with the exception of an increased magnesium content, and also, with some ups and downs,
423 their metal resistance in the deletion series $\Delta 4/\Delta 5/\Delta 6$. In contrast, when CorA₁₂₃ remained in the
424 mutants and the deletion series was $\Delta zupT/\Delta hoxN/\Delta zntB/\Delta pitA$, cobalt and cadmium resistance
425 decreased by half in every deletion step, indicating a stepwise activation of CorA₁₂₃ as a
426 consequence of the removal of the other import systems, plus the importance of all seven systems
427 for metal uptake. Consequently, when all seven secondary importers were gone, the resulting
428 strain $\Delta 7$ suffered from decreased fitness and metal resistance but was still able to maintain its
429 metal homeostasis to some extent. Since $\Delta 7$ could be partially rescued by addition of 10 μM
430 Zn(II) to the TMM growth medium, deletion of the seven systems primarily effected zinc
431 homeostasis.

432

433

434

Discussion

435
436
437 Growth medium. Bacterial growth media usually contain Lewis bases such as phosphate, thiol
438 group-containing molecules, sulfate, carbonate, organic acids used as carbon source and a weak
439 acid (e.g. Tris) serving as buffer. Those Lewis bases interact with metal cations, which are in fact
440 Lewis acids, resulting in decreased availability of the respective metal and in some cases to stable
441 Lewis acid-base complexes. These complexes may serve as substrate for the cells in addition to
442 the “naked” metal cation, more exactly the respective aquo complexes. The Tris-buffered mineral
443 salts medium TMM used in this study contained 50 mM Tris, 120 mM chloride, 3 mM sulfate, 642
444 μM phosphate, 100 nM hydroxide (at pH 7), the carbon source gluconate (0.2 % w/v = 9.2 mM)
445 and the respiration product carbonate as possible metal-chelating Lewis bases (8). Since strong
446 acids are usually weak Lewis bases (27), chloride and sulfate should not be able to compete with
447 the weaker acids for divalent metal cations. Indeed, the decadic logarithm $\lg K$ of the complexes of
448 Mg(II), Ca(II) and the transition metal cations from Mn(II) to Zn(II) is between 2.2 and 2.4 for sulfate
449 (28). The respective value for Zn(II) gluconate is 1.7 (28) and that of divalent metal complexes of
450 Tris between 5 and 6 (29), so that sequestration of the metal cations by Tris should prevent their
451 binding by gluconate, chloride or sulfate.

452
453 To calculate the $\lg K_{app}$ for the Zn(II) phosphate complex, the Zur-dependent (15) up-regulation of
454 *zupT-lacZ* by increasing phosphate concentrations was compared to the effect of increasing EDTA
455 concentrations. At pH 7, 762 μM phosphate decreases availability of 200 nM Zn(II) to a similar
456 extent as 28.9 μM EDTA with a $\lg K_{app}$ of 13.1, (1, 28), leading to a $\lg K$ of 11.6 for the Zn(II)
457 phosphate complex and a ranking of the Zn(II) complex stabilities of EDTA > phosphate > Tris >
458 sulfate > gluconate.

459
460 Complex stability constants for other metal cations and Lewis bases are difficult to obtain. Since
461 formation of a metal complex may be the first step for precipitation of metal-containing compounds,
462 the solubility product constants $-\lg L$ may serve as a proxy to compare the affinities of metal
463 cations to Lewis bases (30, 31). With respect to Zn(II), the $-\lg L$ rank the affinities as phosphate
464 (32) > sulfide (24.7) > hydroxide (16.9) > carbonate (10.8) (Table 6). Other divalent transition metal
465 cations form similar ranks and the metal phosphate values are very similar for Cd(II), Co(II), Cu(II),
466 Ni(II) and Zn(II), with those for Ca(II), Mg(II) and Mn(II) being smaller (Table 6). In the absence of
467 EDTA, divalent metal cations should be available to a high proportion as metal:phosphate
468 complexes in TMM and in phosphate-buffered mineral salts medium.

469
470 PitA. These considerations illustrate why PitA was important as metal uptake system. In TMM, all
471 phosphate molecules should be occupied by metal cations. The transition metal cations Co(II),
472 Cu(II), Ni(II) and Zn(II) with their high affinity to phosphate and their nM concentrations should bind

473 to the 642 μM phosphate first, followed by the 200 μM Ca(II). The remaining 442 μM phosphate
474 should bind about half of the 1 mM Mg(II). In *E. coli*, PitA also seems to be involved in zinc uptake
475 (32) and some strains of this bacterium even contain a paralog of PitA, PitB (33). Consequently,
476 mutations in *pitA* cause zinc resistance (34). PitA also imports phosphate complexes with
477 magnesium and calcium, and Zn(II) competes with Mg(II) for import by PitA (34), as should be
478 expected from the higher affinity of phosphate for zinc compared to magnesium (Table 6).

479
480 Mn(II) should be out-competed by Mg(II), explaining the need of most bacteria to carry a
481 manganese-proton-symporter of the NRAMP protein family or ABC importers for this metal (35),
482 e.g. to metallate client proteins with manganese under conditions of redox stress (36, 37). *C.*
483 *metallidurans*, however, does contain such a manganese importer to decrease import of Cd(II) and
484 consequently seems not to use this metal, which explains the low cellular content of manganese in
485 *C. metallidurans* (1).

486
487 Since import of an anion by PitA would be against the proton motive force $\text{pmf} (= \Delta\psi + Z \cdot \Delta\text{pH})$, the
488 actually imported species of the divalent metal Me(II) phosphate complex should be MeHPO_4 or
489 $\text{MeH}_2\text{PO}_4^+$ with the import of the neutral species driven by the $Z \cdot \Delta\text{pH}$ portion of the pmf and that
490 of the cation by $\Delta\psi$ and $Z \cdot \Delta\text{pH}$. This would be a very energy-efficient import route for essential
491 micro- and macroelements. If, however, all 110 million phosphate molecules needed by *C.*
492 *metallidurans* (1) would be imported as metal:phosphate complex by PitA, far too many metal
493 cations would be imported into the cytoplasm, e.g. 76 million Mg(II) with 11 million actually needed.
494 These surplus cations would have to be exported again.

495
496 As an alternative for energy-dependent efflux of surplus Mg(II) and Ca(II), metal:phosphate import
497 by the low-affinity PitA transporter could be synchronized with phosphate import by the high-affinity
498 ABC-type import system PstABC, which transports non-metallated H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} (38, 39).
499 *C. metallidurans* contains 1700 copies of the periplasmic-binding component PstS. Its genome
500 possesses genes for two additional paralogs of this protein, one synthesized in 100 copies per cell
501 (17). This argues for a strong participation of PstABC in phosphate import in TMM-grown cells,
502 which may have the role to prevent any over-accumulation of metal cations. This scenario agrees
503 with the fact that PitA is up-regulated with increasing phosphate concentrations (1) starting at 100
504 μM phosphate and reaching maximum expression at 5 mM phosphate: at such a high phosphate
505 concentration, the ratio of hydrogen/dihydrogenphosphate : Mg(II)phosphate : Ca(II)phosphate
506 would be 3.8 : 1 : 0.2 so that mainly metal-free phosphate is imported and usage of the energy
507 efficient PitA system would be much more attractive than importing phosphate by the “expensive”
508 PstACB pathway.

509

510 Pho regulon and increased magnesium accumulation in the $\Delta pitA$ mutants. Import of
511 magnesium:phosphate complexes by PitA as an important supply route for magnesium to the cells
512 also explains the long-standing observation that the Pho system controls magnesium and
513 phosphate uptake. This compound should be available in the environment but not in a host
514 infected by pathogenic bacteria, illustrating also importance of the Pho system in virulence. In
515 enterobacteria, a two-component regulatory system composed of the membrane-bound histidine
516 kinase sensor PhoR (*C. metallidurans* ortholog Rmet_2179) and the response regulator PhoB
517 senses low phosphate concentrations at the inside of the cells. This leads to PhoB-phosphate
518 dependent up-regulation of a variety of operons including *phoBR* itself, *pstSCAB-phoU* for the
519 phosphate-specific ABC importer, and, interestingly, *phoQ* (40, 41). PhoU is a dimer that binds
520 Mn(II) and Mg(II) and interacts with PhoR and the component of the high-affinity phosphate uptake
521 system PstABC, PstB (42). This leads to formation of a signaling complex that responds to low
522 environmental phosphate levels by scanning activity of the PstABC uptake system, and may
523 integrate this information with the cytoplasmic magnesium content.

524
525 PhoQ (*C. metallidurans* ortholog Rmet_5129) is another membrane-bound histidine kinase sensor.
526 It senses low magnesium concentrations outside of the cells, which leads to phosphorylation of its
527 response regulator PhoP (43, 44). The PhoPQ two-component regulatory system is up-regulated
528 at low magnesium concentrations, acidic pH values, and in the presence of antimicrobial peptides
529 in *Salmonella* (45). When this system is activated at low magnesium concentrations, expression of
530 the genes responding to this signal need the magnesium-transporting P-type ATPase MgtA, while
531 activation of another part of the PhoR regulon by acidic stress or antimicrobial peptides does not
532 (46). At acidic pH values, the PhoPQ system also promotes uptake of Fe(II) by the Feo iron uptake
533 system via the response regulator RstA (45). At low magnesium concentrations, a variety of
534 operons are up-regulated, including the genes for the magnesium-importing P-type ATPases MgtA
535 in *E. coli*, or MgtA and MgtB in *Salmonella enterica*. In addition to transcription initiation control,
536 transcription elongation into the coding regions of these genes is regulated by a riboswitch, and
537 only allowed at low cytosolic magnesium concentrations (47). This all highlights the important role
538 of phosphate in metal homeostasis.

539
540 As indicated by the phenotype of all $\Delta pitA$ deletion mutants of *C. metallidurans*, Zn(II), Cu(II), Cd(II),
541 Fe(II/III) and Co(II) may enter the cell as metal:phosphate complexes by PitA. Deletion of *pitA*
542 results in a three to fourfold higher magnesium content, 30 to 40 million Mg per cell compared to
543 11 million (Table 2), and to a higher phosphate content, 200 million instead of 110 million P per cell
544 (1). Since the cellular content of nucleic acids and phospholipids is unlikely to be increased in the
545 $\Delta pitA$ mutants, the additional 90 million phosphate moieties could reside as polyphosphate
546 granules. Indeed, *C. metallidurans* contains a *ppk* gene for a polyphosphate kinase {Rmet_2177,
547 300 copies per cell, (17, 48)}. This gene is in a monocistronic operon region Op0627f, flanked by
548 Op0626r harboring the *ppx* gene for the phosphatase and the large operon region Op0627r

549 containing the *pstSCAB-phoUBR* genes for the PstABC phosphate uptake system, the periplasmic
550 binding protein PstS and the Pho regulators. Deletion of *pitA* should lead to phosphate starvation,
551 up-regulation of the phosphate starvation response by Pho, increased import and subsequent
552 storage of surplus phosphate as polyphosphate. The additional 20 to 30 million Mg atoms per cell,
553 representing about 50 million positive charges, might have been sequestered by the additional 90
554 million phosphate moieties in the polyphosphate, which represent 90 million negative charges.

555
556 The importance of PitA and or the phosphate concentration of the growth medium for
557 *C. metallidurans* is also demonstrated by the fact that the metal-resistant, plasmid-containing wild
558 type strain CH34 and the plasmid-free derivative AE104 are able to produce hydrogenases,
559 actually required for chemolithoautotrophic growth, in a phosphate-rich (36 mM) medium, however,
560 only CH34 is able to do so in the phosphate-poor (642 μ M) Tris-buffered medium TMM. In TMM,
561 AE104 silences several genomic islands, among those islands containing the genes for the
562 hydrogenases, due to a disturbed metal homeostasis (18). In the Δ *zupT* mutant, this *aut1* region
563 is transcribed again, leading also to expression of *hoxN*. Comparison of the metal contents of the
564 Δ 5, Δ 6 (= Δ 5 Δ *zntB*) and Δ 7 (= Δ 6 Δ *hoxN*) demonstrated that HoxN was responsible for a
565 decreased cellular iron and copper content in the Δ 5 mutant as consequence of the preceding
566 Δ *pitA* deletion.

567
568 The MIT proteins CorA₁₂₃. The three CorAs are able to provide Zn(II) to RpoC in the Δ *zupT* Δ *pitA*
569 mutant. Moreover, CorA₁ and CorA₂ are involved in nickel import. CorA₁ and CorA₃ have
570 something to do with cobalt toxicity although CorA₁₂₃ together functioned as cobalt importers.
571 TMM-grown *C. metallidurans* cells contain 117 \pm 8 copies of CorA₁ (Rmet_3052) per cell, 38 \pm 19
572 copies of CorA₂ (Rmet_0036) and 37 \pm 5 copies of CorA₃ (Rmet_3287), yielding a 3.2 \pm 0.2 :
573 1.0 \pm 0.5 : 1 \pm 0.1 ratio of CorA₁:CorA₂:CorA₃ (17). Since CorA-like proteins are pentameres (49),
574 this could mean that the CorA of *C. metallidurans* is actually a (CorA₁)₃(CorA₂)₁(CorA₃)₁
575 heteromultimer with the individual protomers under different flux control regimes, CorA₁ by Mg(II),
576 CorA₂ by Ni(II) and CorA₃ by Co(II). These CorA substrates were identified already a long time
577 ago in *E. coli* and *Aerobacter* (= *Enterobacter*) *aerogenes* (50), nickel uptake by a magnesium
578 uptake system in *Cupriavidus necator* (= *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*) (51) and
579 *C. metallidurans* (48, 52). Heteromultimers with different functions have also been described for
580 other metal transporters (53) so that this hypothesis is worth to be tested.

581
582 When first characterized in *Salmonella* (54, 55), CorA was also described as part of a magnesium
583 efflux system. The structure of CorA from *Thermotoga maritima* indeed supports this function. A
584 ring of conserved aspartate residues at the cytoplasmic entrance may mediate dehydration of a
585 divalent metal cation, and a carbonyl funnel at the periplasmic side of the pore rehydration (56). An

586 efflux function of CorA may also explain the fate of surplus magnesium imported as phosphate
587 complexes by PitA. Moreover, in the absence of ZupT but presence of PitA and CorA₁₂₃, zinc was
588 not sufficiently allocated to RpoC while additional deletion of $\Delta corA_{123}$ in the $\Delta zupT$ mutant
589 allowed this allocation again: surplus metal cations imported as phosphate complexes may be
590 rapidly exported again by CorA₁₂₃ so that ZupT is needed for an additional import of zinc.

591
592 On the other hand, CorA is the primary magnesium channel in *Salmonella* (57) and essential for
593 virulence (58). Metal uptake in the archaeum *Methanococcus jannaschii* is in the order Co(II) >
594 Ni(II) > Mn(II) > Mg(II) > Ca(II) (59). Co(II) and Ni(II) – but not Ca(II) and Fe(II/III) transport – was
595 also demonstrated from a homolog from the plant *Arabidopsis thaliana* (60). In *C. metallidurans*,
596 contribution of CorA₁₂₃ to cobalt, zinc, nickel, and cadmium import (Table 1, 3) is likely due to the
597 metal resistance phenotypes of the deletion mutants. Expression of *corA₁* is also up-regulated
598 under conditions of magnesium starvation (1), indicating also a function in magnesium import.

599
600 Import activity of CorA from *T. maritima* is under flux control. The pentameric complex is locked in
601 a transport-incompetent conformation by allosteric, sequential binding of cytoplasmic Mg(II) cations
602 to the five protomers (61). Since the amino acids required for transport and flux control by gating
603 are all conserved within the MIT protein family, eukaryotic homologs included, this flux-controlled
604 uptake of magnesium seems to be a general mechanism (62). Despite this complicated ability for
605 controlled magnesium uptake, CorA from *T. maritima* cannot be the primary magnesium importer
606 in this bacterium since it is incapable of regulating magnesium homeostasis (63).

607
608 This implicates that magnesium homeostasis is a complex process involving PitA, CorA,
609 magnesium-transporting P-type ATPases and the interwoven PhoRB/PhoQP regulatory systems.
610 At high magnesium concentrations, the MgtC homolog YhiD plays a role in *E. coli* (64). In
611 *Salmonella*, *mgtC* is in an operon with the gene for a magnesium-transporting ATPase, *mgtB*.
612 Expression of this operon is under attenuator control, responding to a rise in the cytoplasmic ATP
613 and a decrease to the level of proline-charged prolyl-tRNAs (65, 66). MgtC is required for virulence
614 in several bacterial pathogens (67, 68). It does not bind Mg(II) or transports these metal but may
615 influence activity of other proteins by protein-protein interaction, e.g. by binding to CorA and
616 switching its function from that of an importer to that of an efflux system. It is not only worth testing
617 if CorA₁₂₃ form heteropentamers in *C. metallidurans* to allow independent flux control of the
618 uptake reaction by Co(II), Ni(II) and Mg(II), but also if additional components may even change the
619 direction of transport.

620
621 The MIT protein ZntB. There are also conflicting data concerning the 4th member of the MIT protein
622 family in *C. metallidurans*, ZntB. In *Salmonella*, mutations in its *zntB* gene conferred decreased
623 zinc and cadmium resistance and capacity for zinc efflux was demonstrated (69). The structure of

624 ZntB is that of a pentameric funnel similar to CorA (70). In *C. metallidurans*, however, a *zntB-lacZ*
625 fusion was down-regulated with increasing zinc and especially cadmium concentrations (Fig. 2).
626 This regulatory pattern agrees more with that of an importer than with that of an exporter. The
627 consequence of a *zntB* deletion even from the genome of the $\Delta 5$ mutant with ZupT, PitA and
628 CorA₁₂₃ gone were small with the exception of a two-fold increase in zinc and cadmium resistance.
629 This assigned to ZntB the role of a minor zinc and cadmium importer in *C. metallidurans*. ZntB
630 could have a different function in different bacteria or, similar to CorA, may switch between an
631 importer and exporter, depending on the conditions and acting upon a regulatory event such as
632 protein:protein interaction or a covalent modification.

633
634 The NiCoT protein HoxN. The *hoxN* gene is part of the *aut1* region and its product is expected to
635 supply nickel to the nickel-containing hydrogenases of *C. metallidurans* (18). When cultivated in
636 the low-phosphate TMM medium, *aut1* and other genomic islands are silenced in the plasmid-free
637 *C. metallidurans* strain AE104 but un-silenced again in the $\Delta zupT$ strain. Expression of a *hoxN-*
638 *lacZ* fusion increased in the $\Delta 6$ strain compared to $\Delta 5$, indicating that additional deletion of *zntB*
639 resulted in activation of the last known secondary import system with some potential in zinc import.
640 Consequently, the $\Delta 6$ strain performed not much different from the $\Delta zupT$ single deletion strain
641 while the growth problems of the $\Delta 7$ (= $\Delta 6 \Delta hoxB$) were eminent.

642
643 Finally, again ZupT. All these findings highlight the importance of ZupT among the other secondary
644 metal uptake systems in *C. metallidurans*. Removal of the tested transport system did not prevent
645 import of zinc, magnesium or other metals but no $\Delta zupT$ mutant was fully proficient to accumulate
646 sufficient zinc atoms per cell. While PitA and CorA₁₂₃ were able to supply Zn(II) to RpoC when the
647 respective other transporter did not counteract, this task was fulfilled by ZupT in the parent strain
648 AE104. Efficient synthesis of RpoC needed the presence of zinc in a pool that is filled by ZupT in
649 general, by PitA or CorA₁₂₃ exceptionally, and emptied again by at least one of the efflux systems
650 deleted in $\Delta e4$, namely ZntA, CadA, DmeF or FieF.

651
652 Even when zinc is not being removed from this pool in the $\Delta e4$ mutant, deletion of *zupT* still
653 resulted in an incompatibility to harbor the central component of the RND-driven zinc efflux pump
654 CzcCBA. This was not due to acute growth-preventing condition but rather the result of prolonged
655 zinc starvation of stock cultures. Since a *czcA* transcript was always present in the $\Delta zupT$ cells (16),
656 the zinc starvation caused by the absence of ZupT may prevent translation of the *czcA* message or
657 enhance CzcA degradation. Replenishment of the zinc pool required for RpoC folding nevertheless
658 is not sufficient to allow CzcA presence again (16).

659
660 Deletion of *zupT* resulted in a pleiotropic effect caused by a mild zinc starvation and decreased
661 efficiency to allocate zinc to client proteins such as the RpoC subunit of the DNA dependent RNA

662 polymerase and the periplasmic Cu-Zn-superoxide dismutase. Deletion of more secondary import
663 systems could always be compensated by activation of other secondary import systems but this
664 activation was not on the level of gene expression up to the $\Delta 5$ mutant ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_{123}$).
665 Additional deletion of *zntB* in the resulting $\Delta 6$ mutant was again compensated by up-regulation of
666 *hoxN*, now on the level of gene expression, and $\Delta 6$ was still similar in fitness as the $\Delta zupT$ mutant.
667 Finally, deletion of *hoxN* in $\Delta 6$ leading to $\Delta 7$ caused a loss of fitness, especially in the presence of
668 Co(II) and Cd(II), although no metal efflux system had been deleted. This clearly demonstrates the
669 importance of ZupT for zinc import and allocation, and that of the remaining “battery”, the other six
670 secondary import systems PitA, CorA₁₂₃, ZntB and HoxN for full multiple metal homeostasis
671 competence.

672
673 Beyond ZupT. An overall picture of the multiple metal homeostasis of *C. metallidurans* is
674 emerging, although by far not all questions have been solved. When cultivated in the TMM medium
675 used, PitA should be an important contributor of metal:phosphate complexes, providing, however,
676 more metal cations than actually needed. One possibility to solve the resulting problem would be
677 that the MIT family proteins CorA₁₂₃ and ZntB are recruited as efflux systems by an unknown
678 post-translational process, so that PitA on the one hand and CorA₁₂₃/ZntB on the other form a
679 cytoplasmic shunt for metal cations. ZupT is required under these conditions for an efficient
680 allocation of Zn(II) to zinc-dependent client proteins. Consequently, deletion of *zupT* leads to a low
681 cytoplasmic zinc availability. This can be partially compensated either by deletion of zinc efflux
682 systems ($\Delta e4$ efflux mutant) or deletion of *corA₁₂₃* (also to decrease export) or deletion of *pitA*
683 (leading to up-regulation of other phosphate and metal importers including reversion direction of
684 import of CorA₁₂₃ via the complicated Pho regulatory system). In the $\Delta 5$ ($\Delta zupT \Delta corA_{123} \Delta pitA$)
685 mutant, ZntB as uptake system supplies zinc and other transition metal cations, and in $\Delta 6$ ($\Delta 5$
686 $\Delta zntB$) HoxN is activated for this purpose by up-regulation of the *hoxN* gene. The $\Delta 7$ ($\Delta 6 \Delta hoxN$)
687 mutant, finally, can no longer remain of the fitness level of the $\Delta zupT$ mutant and is very sensitive
688 to cobalt and cadmium ions.

689
690 Beyond the seven secondary metal import systems. The seven secondary metal uptake systems
691 characterized here seem to interact and, in an act of emergence, form the core of the metal
692 transportome (71, 72) of *C. metallidurans* AE104 by an interplay with the four metal efflux systems
693 ZntA, CadA, DmeF and FieF. This is supported by a remarkable similarity of the metal content and
694 cobalt resistance, a feature severely affected by deletion of metal import genes, of the $\Delta 7$ metal
695 uptake and the $\Delta e4$ efflux mutant. Since $\Delta 7$ is to some degree still able to maintain its cellular
696 metal composition, a “dark matter” of metal uptake systems exists in *C. metallidurans* beyond the
697 seven secondary importers. Up to $\Delta 6$, the plasticity of the metal uptake transportome revealed here
698 seems not to involve increased gene expression for substitute importers but post-transcriptional

699 events. Taken together with the disappearance of CzcA in *zupT* mutants, an important post-
700 transcriptional level of control of the metal transportome seems to exist in *C. metallidurans*.

701

702

703

Acknowledgments

704

705 Funding for this work was provided by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (Ni262/10). We
706 thank Grit Schleuder for skilful technical assistance.

707

708

709

Literature

710

- 711 1. **Kirsten A, Herzberg M, Voigt A, Seravalli J, Grass G, Scherer J, and Nies DH.** 2011.
712 Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus*
713 *metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **193**:4652-4663.
- 714 2. **Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, Benotmane**
715 **MA, Leys N, Vallaeyts T, Lapidus A, Monchy S, Medigue C, Taghavi S, McCorkle S,**
716 **Dunn J, van der Lelie D, and Mergeay M.** 2010. The complete genome sequence of
717 *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic
718 environments. *PLoS One* **5**:e10433.
- 719 3. **Diels L, and Mergeay M.** 1990. DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from
720 soils highly polluted by heavy metals. *Appl Environ Microbiol* **56**:1485-1491.
- 721 4. **Reith F, Rogers SL, McPhail DC, and Webb D.** 2006. Biomineralization of gold: biofilms
722 on bacterioform gold. *Science* **313**:233-236.
- 723 5. **Dressler C, Kües U, Nies DH, and Friedrich B.** 1991. Determinants encoding multiple
724 metal resistance in newly isolated copper-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol*
725 **57**:3079-3085.
- 726 6. **Nies DH, Rehbein G, Hoffmann T, Baumann C, and Grosse C.** 2006. Paralogs of genes
727 encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Mol*
728 *Micobiol Biotechnol* **11**:82-93.
- 729 7. **Scherer J, and Nies DH.** 2009. CzcP is a novel efflux system contributing to transition
730 metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Mol Microbiol* **73**:601-621.
- 731 8. **Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, and van Gijsegem F.** 1985.
732 *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance
733 to heavy metals. *J Bacteriol* **162**:328-334.
- 734 9. **von Rozycki T, and Nies DH.** 2009. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-
735 resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**:115-139.
- 736 10. **Busch W, and Saier MHJ.** 2002. The transporter classification (TC) system. *Crit Rev*
737 *Biochem Mol Biol* **37**:287-337.
- 738 11. **Saier MHJ, Tran CV, and Barabote RD.** 2006. TCDB: the Transporter Classification
739 Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucl Acid Res*
740 **34**:D181-D186.
- 741 12. **Lee SM, Grass G, Haney CJ, Fan B, Rosen BP, Anton A, Nies DH, and Rensing C.**
742 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol Lett*
743 **215**:273-278.
- 744 13. **Nies DH.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol*
745 *Rev* **27**:313-339.
- 746 14. **Nies DH.** 2007. Bacterial transition metal homeostasis, p. 118-142. *In* Nies DH and Silver S
747 (ed.), *Molecular microbiology of heavy metals*, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin.

- 748 15. **Schmidt C, Schwarzenberger C, Grosse C, and Nies DH.** 2014. FurC regulates
749 expression of *zupT* for the central zinc importer ZupT of *Cupriavidus metallidurans*. J
750 Bacteriol **196**:3461-3471.
- 751 16. **Herzberg M, Bauer L, and Nies DH.** 2014. Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer
752 influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. Metallomics **6**:421-436.
- 753 17. **Herzberg M, Dobritzsch D, Helm S, Baginski S, and Nies DH.** 2014. The zinc repository
754 of *Cupriavidus metallidurans*. Metallomics **6**:2157-2165
- 755 18. **Herzberg M, Schüttau M, Reimers M, Grosse C, Schlegel HG, and Nies DH.** 2015.
756 Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-
757 dependent silencing and un-silencing of genomic islands. Metallomics **7**:632 - 649.
- 758 19. **Wiesemann N, Mohr J, Grosse C, Herzberg M, Hause G, Reith F, and Nies DH.** 2013.
759 Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus*
760 *metallidurans* strain CH34. J Bacteriol **195**:2298-2308.
- 761 20. **Liesegang H, K. Lemke, R. A. Siddiqui, H.-G. Schlegel.** 1993. Characterization of the
762 inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes*
763 *eutrophus* CH34. J Bacteriol **175**:767-778.
- 764 21. **Nies A, Nies DH, and Silver S.** 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding
765 resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol **171**:5065-5070.
- 766 22. **von Rozycki T, Nies DH, and Saier MHJ.** 2005. Genomic analyses of transport proteins in
767 *Ralstonia metallidurans*. Comp Func Genom **6**:17-56.
- 768 23. **Munkelt D, Grass G, and Nies DH.** 2004. The chromosomally encoded cation diffusion
769 facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of
770 broad metal specificity. J Bacteriol **186**:8036-8043.
- 771 24. **Papp-Wallace KM, and Maguire ME.** 2007. Bacterial homologs of eukaryotic membrane
772 proteins: the 2-TM-GxN family of Mg²⁺ transporters. Mol Membrane Biol **24**:351-356.
- 773 25. **Wan Q, Ahmad MF, Fairman J, Gorzelle B, de la Fuente M, Dealwis C, and Maguire**
774 **ME.** 2011. X-ray crystallography and isothermal titration calorimetry studies of the
775 *Salmonella* zinc transporter ZntB. Structure **19**:700-710.
- 776 26. **Eitinger T, Suhr J, Moore L, and Smith JAC.** 2005. Secondary transporters for nickel and
777 cobalt ions: Theme and variations. Biometals **18**:399-405.
- 778 27. **Housecroft CE, and Constable EC.** 2006. Chemistry (3rd edition). Pearson Education
779 Limited, Essex, England.
- 780 28. **Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, and Jones KM.** 1969. Data for biochemical
781 research, second edition ed. At The Clarendon Press, Oxford.
- 782 29. **Brignac PJ, and Mo C.** 1975. Formation constants and metal-to-ligand ratios for
783 Tris(hydroxymethyl)aminomethane-metal complexes. Anal Chem **47**:1465-1466.
- 784 30. **Clever HL, Derrick ME, and Johnson SA.** 1992. The solubility of some sparingly soluble
785 salts of zinc and cadmium in water and in aqueous electrolyte solutions. J Phys Chem Ref
786 Data **21**:941-966.
- 787 31. **Weast RC.** 1984. CRC handbook of chemistry and physics, 64 ed. CRC Press, Inc., Boca
788 Raton, Florida, USA.
- 789 32. **Beard SJ, Hashim R, Wu GH, Binet MRB, Hughes MN, and Poole RK.** 2000. Evidence
790 for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in
791 *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters **184**:231-235.
- 792 33. **Harris RM, Webb DC, Howitt SM, and Cox GB.** 2001. Characterization of PitA and PitB
793 from *Escherichia coli*. J Bacteriol **183**:5008-5014.
- 794 34. **Jackson RJ, Binet MRB, Lee LJ, Ma R, Graham AI, McLeod CW, and Poole RK.** 2008.
795 Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc
796 and inorganic phosphate levels. FEMS Microbiol. Lett. **289**:219-224.
- 797 35. **Papp-Wallace KM, Moomaw AS, and Maguire ME.** 2005. Manganese: uptake, biological
798 function, and role in virulence, p. 235-257. In Nies DH and Silver S (ed.), Molecular
799 microbiology of heavy metals, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin.
- 800 36. **Anjem A, Varghese S, and Imlay JA.** 2009. Manganese import is a key element of the
801 OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **72**:844-58.
- 802 37. **Imlay JA.** 2014. The mismetallation of enzymes during oxidative stress. J Biol Chem
803 **289**:28121-28128.

- 804 38. **Wang ZM, Choudhary A, Ledvina PS, and Quioco FA.** 1994. Fine-tuning the specificity
805 of the periplasmic phosphate-transport receptor - site-directed mutagenesis, ligand-binding,
806 and crystallographic studies. *J Biol Chem* **269**:25091-25094.
- 807 39. **Rosenberg H, Gerdes RG, and Chegwidden K.** 1977. Two systems for uptake of
808 phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**:505-511.
- 809 40. **van Bogelen RA, Olson ER, Wanner BL, and Neidhardt FC.** 1996. Global analysis of
810 proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*
811 **178**:4344-4366.
- 812 41. **Marzan LW, Hasan CMM, and Shimizu K.** 2013. Effect of acidic condition on the
813 metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* mutant. *Arch Microbiol* **195**:161-171.
- 814 42. **Gardner SG, Johns KD, Tanner R, and McCleary WR.** 2014. The PhoU protein from
815 *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling
816 complex at the membrane. *J Bacteriol* **196**:1741-1752.
- 817 43. **Soncini FC, Vescovi EG, Solomon F, and Groisman EA.** 1996. Molecular basis of the
818 magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: Identification of PhoP-
819 regulated genes. *J Bacteriol* **178**:5092-5099.
- 820 44. **Vescovi EG, Soncini FC, and Groisman EA.** 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal:
821 environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**:165-174.
- 822 45. **Choi E, Groisman EA, and Shin D.** 2009. Activated by different signals, the PhoP/PhoQ
823 two-component system differentially regulates metal uptake. *J Bacteriol* **191**:7174-81.
- 824 46. **Park SY, and Groisman EA.** 2014. Signal-specific temporal response by the *Salmonella*
825 PhoP/PhoQ regulatory system. *Mol Microbiol* **91**:135-44.
- 826 47. **Cromie MJ, Shi YX, Latifi T, and Groisman EA.** 2006. An RNA sensor for intracellular
827 Mg²⁺. *Cell* **125**:71-84.
- 828 48. **Legatzki A, Franke S, Lucke S, Hoffmann T, Anton A, Neumann D, and Nies DH.** 2003.
829 First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in
830 *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation* **14**:153-168.
- 831 49. **Lunin V, Dobrovetsky E, Khutoreskaya G, Zhang R, Joachimiak A, Doyle DA,
832 Bochkarev A, Maguire ME, Edwards AM, and Koth CM.** 2006. Crystal structure of the
833 CorA Mg²⁺ transporter. *Nature* **440**:833-837.
- 834 50. **Webb M.** 1970. Interrelationship between utilization of magnesium and the uptake of other
835 bivalent cations by bacteria. *Biochim Biophys Acta* **222**:428-439.
- 836 51. **Lohmeyer M, and Friedrich CG.** 1987. Nickel transport in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch*
837 *Microbiol* **149**:130-135.
- 838 52. **Nies DH, and Silver S.** 1989. Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive
839 *Alcaligenes eutrophus* strain. *J Bacteriol* **171**:4073-4075.
- 840 53. **Golan Y, Berman B, and Assaraf YG.** 2015. Heterodimerization, altered subcellular
841 localization, and function of multiple zinc transporters in viable cells using bimolecular
842 fluorescence complementation. *J Biol Chem* **290**:9050-9063.
- 843 54. **Hmiel SP, Snavely MD, Florer JB, Maguire ME, and Miller CG.** 1989. Magnesium
844 transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three
845 magnesium transport loci. *J Bacteriol* **171**:4742-4751.
- 846 55. **Snavely MD, Florer JB, Miller CG, and Maguire ME.** 1989. Magnesium transport in
847 *Salmonella typhimurium*: ²⁸Mg²⁺ transport by CorA, MgtA, and MgtB systems. *J Bacteriol*
848 **171**:4761-4766.
- 849 56. **Eshaghi S, Niegowski D, Kohl A, Molina DM, Lesley SA, and Nordlund P.** 2006. Crystal
850 structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution. *Science*
851 **313**:354-357.
- 852 57. **Payandeh J, Li C, Ramjeesingh M, Poduch E, Bear CE, and Pai EF.** 2008. Probing
853 structure-function relationships and gating mechanisms in the CorA Mg²⁺ transport system.
854 *J Biol Chem* **283**:11721-33.
- 855 58. **Papp-Wallace KM, Nartea M, Kehres DG, Porwollik S, McClelland M, Libby SJ, Fang
856 FC, and Maguire ME.** 2008. The CorA Mg²⁺ channel is required for the virulence of
857 *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol* **190**:6517-23.
- 858 59. **Kean J, Cleverley RM, O'Ryan L, Ford RC, Prince SM, and Derrick JP.** 2008.
859 Characterization of a CorA Mg²⁺ transport channel from *Methanococcus jannaschii* using a
860 Thermofluor-based stability assay. *Mol Membr Biol* **25**:653-661.

- 861 60. **Ishijima S, Shigemi Z, Adachi H, Makinouchi N, and Sagami I.** 2012. Functional
862 reconstitution and characterization of the *Arabidopsis* Mg²⁺ transporter AtMRS2-10 in
863 proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* **1818**:2202-2208.
- 864 61. **Pfoh R, Li A, Chakrabarti N, Payandeh J, Pomes R, and Pai EF.** 2012. Structural
865 asymmetry in the magnesium channel CorA points to sequential allosteric regulation. *Proc*
866 *Natl Acad Sci USA* **109**:18809-18814.
- 867 62. **Guskov A, Nordin N, Reynaud A, Engman H, Lundback AK, Jong AJO, Cornvik T,**
868 **Phua T, and Eshaghi S.** 2012. Structural insights into the mechanisms of Mg²⁺ uptake,
869 transport, and gating by CorA. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:18459-18464.
- 870 63. **Xia Y, Lundback AK, Sahaf N, Nordlund G, Brzezinski P, and Eshaghi S.** 2011. Co²⁺
871 selectivity of *Thermotoga maritima* CorA and its inability to regulate Mg²⁺ homeostasis
872 present a new class of CorA proteins. *J Biol Chem* **286**:16525-32.
- 873 64. **Ishijima S, Uda M, Hirata T, Shibata M, Kitagawa N, and Sagami I.** 2015. Magnesium
874 uptake of *Arabidopsis* transporters, AtMRS2-10 and AtMRS2-11, expressed in *Escherichia*
875 *coli* mutants: Complementation and growth inhibition by aluminum. *Biochim Biophys Acta-*
876 *Biomembr* **1848**:1376-1382.
- 877 65. **Lee EJ, and Groisman EA.** 2012. Control of a *Salmonella* virulence locus by an ATP-
878 sensing leader messenger RNA. *Nature* **486**:271-5.
- 879 66. **Lee EJ, and Groisman EA.** 2012. Tandem attenuators control expression of the
880 *Salmonella* *mgtCBR* virulence operon. *Mol Microbiol* **86**:212-24.
- 881 67. **Günzel D, Kucharski LM, Kehres DG, Romero MF, and Maguire ME.** 2006. The MgtC
882 virulence factor of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* activates Na(+),K(+)-ATPase.
883 *J Bacteriol* **188**:5586-94.
- 884 68. **Yang Y, Labesse G, Carrere-Kremer S, Esteves K, Kremer L, Cohen-Gonsaud M, and**
885 **Blanc-Potard AB.** 2012. The C-terminal domain of the virulence factor MgtC is a divergent
886 ACT domain. *J Bacteriol* **194**:6255-63.
- 887 69. **Worlock AJ, and Smith RL.** 2002. ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica*
888 serovar *typhimurium*. *J Bacteriol* **184**:4369-4373.
- 889 70. **Tan KM, Sather A, Robertson JL, Moy S, Roux B, and Joachimiak A.** 2009. Structure
890 and electrostatic property of cytoplasmic domain of ZntB transporter. *Protein Sci* **18**:2043-
891 2052.
- 892 71. **Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai ZY, Reinhold**
893 **WC, Papp A, Weinstein JN, and Sadee W.** 2004. Membrane transporters and channels:
894 Role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*
895 **64**:4294-4301.
- 896 72. **Mauchline TH, Fowler JE, East AK, Sartor AL, Zaheer R, Hosie AHF, Poole PS, and**
897 **Finan TM.** 2006. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-
898 dependent transportome. *Pro Natl Acad Sci U S A* **103**:17933-17938.
- 899 73. **Nies DH, Nies A, Chu L, and Silver S.** 1989. Expression and nucleotide sequence of a
900 plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl*
901 *Acad Sci U S A* **86**:7351-7355.
- 902
- 903
- 904

905 **Tables**
 906 **Table 1. Minimal inhibitory concentrations of various *C. metallidurans* mutant strains up to**
 907 **$\Delta 5$ ($\Delta zupT \Delta corA123 \Delta pitA$) on solid Tris-buffered mineral salts medium^a.**

Mutant strain	Zn ²⁺ , (μ M)	Co ²⁺ , (μ M)	Ni ²⁺ , (μ M)	Cd ²⁺ , (μ M)	Cu ²⁺ , (mM)
AE104 ^b	127 \pm 43	500 \pm 100	360 \pm 83	150 \pm 39	1.5 \pm 0.2
<u>Single Mutants</u>					
$\Delta zupT$ ^b	133 \pm 58	600 \pm 0	350 \pm 50	160 \pm 7	1.4 \pm 0.1
$\Delta pitA$ ^b	120 \pm 35	400 \pm 0	380 \pm 84	140 \pm 35	1.3 \pm 0.1
$\Delta corA_1::kan$ ^b	113 \pm 42	400 \pm 0	480\pm150	100 \pm 56	1.3 \pm 0
$\Delta corA_2$ ^b	120 \pm 35	400 \pm 0	340 \pm 55	150 \pm 34	1.5 \pm 0
$\Delta corA_3$ ^b	113 \pm 42	400 \pm 0	320 \pm 84	150 \pm 34	1.5 \pm 0.1
<u>Double mutants</u>					
$\Delta zupT \Delta pitA$ ^b	130 \pm 14	337 \pm 19	300 \pm 82	140 \pm 20	1.4 \pm 0.1
$\Delta zupT \Delta corA_1::kan$	130 \pm 14	200 \pm 141	530\pm58	150 \pm 12	1.5 \pm 0.1
$\Delta zupT \Delta corA_2$	120 \pm 20	193 \pm 209	370 \pm 58	140 \pm 20	1.5 \pm 0.1
$\Delta zupT \Delta corA_3$	120 \pm 20	193 \pm 209	330 \pm 58	140 \pm 20	1.6 \pm 0.1
$\Delta pitA \Delta corA_1::kan$	130 \pm 14	200 \pm 0	470\pm58	170 \pm 12	1.3 \pm 0.1
$\Delta pitA \Delta corA_2$	120 \pm 20	193 \pm 209	300 \pm 0	150 \pm 12	1.5 \pm 0.1
$\Delta pitA \Delta corA_3$	120 \pm 20	203 \pm 202	300 \pm 0	170 \pm 12	1.5 \pm 0.1
$\Delta corA_1::kan \Delta corA_2$	130 \pm 14	60\pm0	530\pm58	170 \pm 12	1.5 \pm 0.1
$\Delta corA_1::kan \Delta corA_3$	130 \pm 14	225 \pm 106	600\pm100	170 \pm 12	1.6 \pm 0.1
$\Delta corA_2 \Delta corA_3$	130 \pm 14	73\pm23	370 \pm 58	180 \pm 0	1.5 \pm 0.1

Table 1 continues

<u>Triple mutants</u>					
$\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_3$	130±14	107±81	300±82	140±20	1.5±0.1
$\Delta corA_1::kan \Delta corA_2 \Delta corA_3$	150±71	600±0	450±132	110±14	1.6±0.2
<u>Quadruple mutans</u>					
$\Delta 4: \Delta zupT \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$	130±14	362±19	530±58	140±20	1.6±0.1
$\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1::Kan \Delta corA_2$	120±0	450±71	570±115	170±42	1.4±0.2
$\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1::Kan \Delta corA_3$	120±0	275±177	440±167	140±20	1.5±0.1
$\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_2 \Delta corA_3$	150±71	600±0	500±141	120±0	1.4±0.1
$\Delta 5 = \Delta 4 \Delta pitA \Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$	135±19	400±0	450±131	150±27	1.5±0.1

908 ^b for reference as published (1). **Bold faced numbers** indicate decreased cobalt or increased
 909 nickel resistance. At least three independent experiments, deviations indicated.

910

Table 2. Metal content of *C. metallidurans* strains

Bacterial Strain	Mg, 10 ⁶	Fe, 10 ³	Zn, 10 ³	Cu, 10 ³	Co, 10 ³	Ni, 10 ³
CH34(pMOL28, pMOL30)^a	11.8±1.1	674±87	64.4±10.1	8.59±2.38	1.21±0.48	3.11±1.51
AE104 a, b	11.5±1.1	743±70	72.8±9.5	9.00±1.53	3.32±0.71	4.68±2.21
Δ<i>zupT</i> a, b	9.9±1.2	708±106	21.1±5.8	10.97±3.39	5.92±1.58	3.07±0.35
Δ<i>pitA</i>	36.8±4.4	649±68	58.3±5.4	11.14±3.65	1.73±0.40	1.40±0.81
Δ<i>hoxN</i>	12.7±0.8	816±151	61.2±4.3	14.18±3.65	2.48±0.49	1.75±1.35
Δ<i>zupT</i> Δ<i>pitA</i> a	35.9±1.6	760±144	24.9±2.5	9.55±2.76	2.81±0.86	3.02±2.55
Δ4 (Δ<i>zupT</i> Δ<i>corA</i>1,2,3)	10.7±1.5	691±174	30.5±4.1	10.13±3.15	3.57±0.79	1.76±0.86
Δ5 (Δ4 Δ<i>pitA</i>)	28.1±1.2	434±20	39.2±4.8	6.16±0.81	4.25±0.58	1.58±0.13
Δ6 (Δ5 Δ<i>zntB</i>)	29.9±2.1	486±34	36.9±4.4	6.93±0.80	5.26±1.25	2.34±1.63
Δ7 (Δ6 Δ<i>hoxN</i>)	43.5±3.9	745±59	31.6±3.9	13.43±3.83	5.19±1.35	1.48±0.30
Δe4 (Δ<i>zntA</i> Δ<i>cadA</i> Δ<i>dmeF</i> Δ<i>fieF</i>) b	36.3±2.0	662±45	62.6±9.9	9.42±3.86	3.57±1.45	1.37±0.97
Δe4 (Δe4 Δ<i>zupT</i>) b	35.3±5.6	686±138	31.9±7.4	12.78±5.52	5.49±1.57	1.29±0.43

As determined by ICP-MS. Some values are additional reproductions under parallel conditions with the new mutant strain, ^a(1)) and ^b(16).

Table 3. Metal resistance of deletion strains in liquid culture^a

Bacterial strain	IC ₅₀ , (µM)		
	Zinc	Cobalt	Cadmium
AE104 parent strain	442±40	94±6	93±10
AE104 $\Delta zupT$	156±16	34±6	16±3
AE104 $\Delta pitA$	79±5	38±4	56±16
$\Delta zupT \Delta pitA$	182±21	14±1	9.1±1.3
$\Delta 4 (= \Delta zupT \Delta corA_{123})$	374±16	41±2	6.7±1.4
$\Delta 5 (= \Delta 4 \Delta pitA)$	70±5	43±3	19.7±2.2
$\Delta 5 \Delta hoxN$	88±7	30±6	4.7±0.7
$\Delta 6 (= \Delta 5 \Delta zntB)$	184±12	41±3	10.5±0.8
$\Delta 7 (= \Delta 6 \Delta hoxN)$	53±4	8.3±1.6	2.19±0.4
AE104 $\Delta hoxN$	323±23	31±4	15.8±1.4
$\Delta zupT \Delta hoxN$	93±9	20±2	5.9±1.2
$\Delta zupT \Delta hoxN \Delta zntB$	104±4	9.6±2.4	2.6±0.6
$\Delta zupT \Delta hoxN \Delta zntB \Delta pitA$	53±4	4.1±0.4	1.2±0.3
AE104 $\Delta corA_1::kan \Delta corA_2 \Delta corA_3$	n.d.	228±30	104±8
<u>Efflux mutants</u>			
AE104 $\Delta e4$	8.3±0.7	4.8±0.3	0.02±0.00
AE104 $\Delta e4 \Delta zupT$	3.9±0.4	4.8±0.4	0.03±0.00

^a Dose response experiments were performed (n>3 per conditions) and the IC₅₀ values calculated. Bold-faced values indicate significant derivations from metal resistance of the direct parent strain.

Table 4. Metal resistance of deletion strains in liquid culture^a

Bacterial strain	IC ₅₀ , (μM)			
	Copper	Gold ^b	Nickel	EDTA
AE104 parent strain	906±82	25.3±2.1	348±16	249±9
AE104 $\Delta zupT$	400±77	13.0±1.3	171±10	183±13
AE104 $\Delta hoxN$	686±69	12.1±1.7	235±14	221±11
$\Delta 5$ (= $\Delta zupT \Delta corA_{123} \Delta pitA$)	475±50	11.3±1.1	328±27	219±18
$\Delta 6$ (= $\Delta 5 \Delta zntB$)	496±61	11.4±1.1	367±12	241±15
$\Delta 7$ (= $\Delta 6 \Delta hoxN$)	265±32	14.8±2.6	145±16	205±22
<u>Efflux mutants</u>				
AE104 $\Delta e4$	637±41	23.1±1.9	n.d.	1339±92
AE104 $\Delta e4 \Delta zupT$	460±49	14.4±2.0	n.d.	951±69

^a Dose response experiments were performed (n>3 per conditions) and the IC₅₀ values calculated. Bold-faced values indicate significant derivations from metal resistance of the direct parent strain. ^bAu(III)Cl₄⁻.

Table 5. Oxidativ stress resistance of deletion strains in liquid culture^a

Strain	IC ₅₀ , (μM)	
	H ₂ O ₂	Paraquat
AE104 parent strain	2650±279	169±10
AE104 $\Delta zupT$	894±133	111±6
AE104 $\Delta pitA$	1915±205	255±7
$\Delta zupT \Delta pitA$	1507±125	94±10
$\Delta 4 (= \Delta zupT \Delta corA_{123})$	1105±160	69±2
$\Delta 7$	989±102	135±4
AE104 $\Delta hoxN$	810±124	128±6
$\Delta zupT \Delta hoxN$	653±81	94±8
$\Delta zupT \Delta hoxN \Delta zntB$	529±82	82±8
AE104 $\Delta corA_1::kan \Delta corA_2 \Delta corA_3$	1142±132	142±7
<u>Efflux mutants</u>		
AE104 $\Delta e4$	1059±111	257±12
AE104 $\Delta e4 \Delta zupT$	953±191	147±10

^a Dose response experiments were performed (n>3 per conditions) and the IC₅₀ values calculated. Bold-faced values indicate significant derivations from metal resistance of the direct parent strain

Table 6. Solubility product constants at 25°C of metal compounds^a

Metal	Phosphate	Sulfide	Hydroxide	Carbonate
Cd(II)	32.6	27.1	13.6	11.3
Ca(II)	28.7	7.2	5.3	8.5
Co(II)	34.7	20.4	14.8	12.8
Cu(II)	37.1	36.2	19.7	9.8
Fe(II)	n.a.	18.2	15.1	10.5
Fe(III)	21.9	n.a.	37.4	n.a.
Mg(II)	25.0	n.a.	10.7	7.5
Mn(II)	14.5	13.5	12.7	10.7
Ni(II)	31.3	18.5	14.7	8.2
Zn(II)	32.0	24.7	16.9	10.8

The decadic logarithm of the solubility constants is given. The values were assembled from various sources, <http://www.csudh.edu/oliver/chemdata/data-ksp.htm>, <http://bilbo.chm.uri.edu/CHM112/tables/KspTable.htm>, (28, 30, 31)

Figures

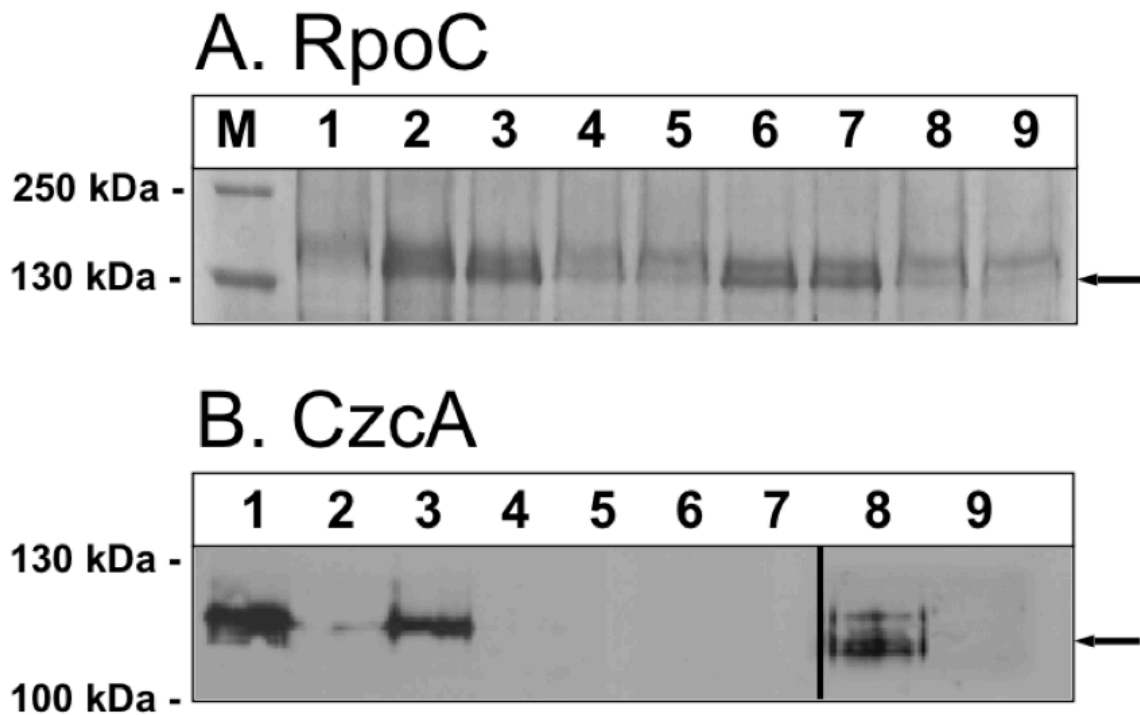


Figure 1. Presence of RpoC and CzcA proteins in mutant strains of *C. metallidurans* AE104. Accumulation of the RpoC subunit of the RNA polymerase (Panel A, arrow) was demonstrated in crude extracts in Coomassie-stained SDS gel (16). Samples corresponding to 20 μ g cellular dry mass was used per lane. Only the part of gel between the 130 kDa and the 250 kDa marker band is shown. Additionally (Panel B), the plasmid pDNA130 (73) that expressed the *czcCBAD'* determinant constitutively in *C. metallidurans* cells, was transferred by conjugation into the mutant strains and their ability to produce the CzcA (arrow) central part of the CzcCBA efflux pump was determined in a Western blot using anti-CzcA antibodies, as published (16). Marker (M); AE104 negative control (1); $\Delta zupT$ positive control (2); $\Delta pitA$ (3); $\Delta zupT \Delta pitA$ (4), $\Delta z123$ (5); $\Delta 5$ (6); $\Delta 6$ (7); $\Delta e4$ (8); $\Delta e4 \Delta zupT$ (9).

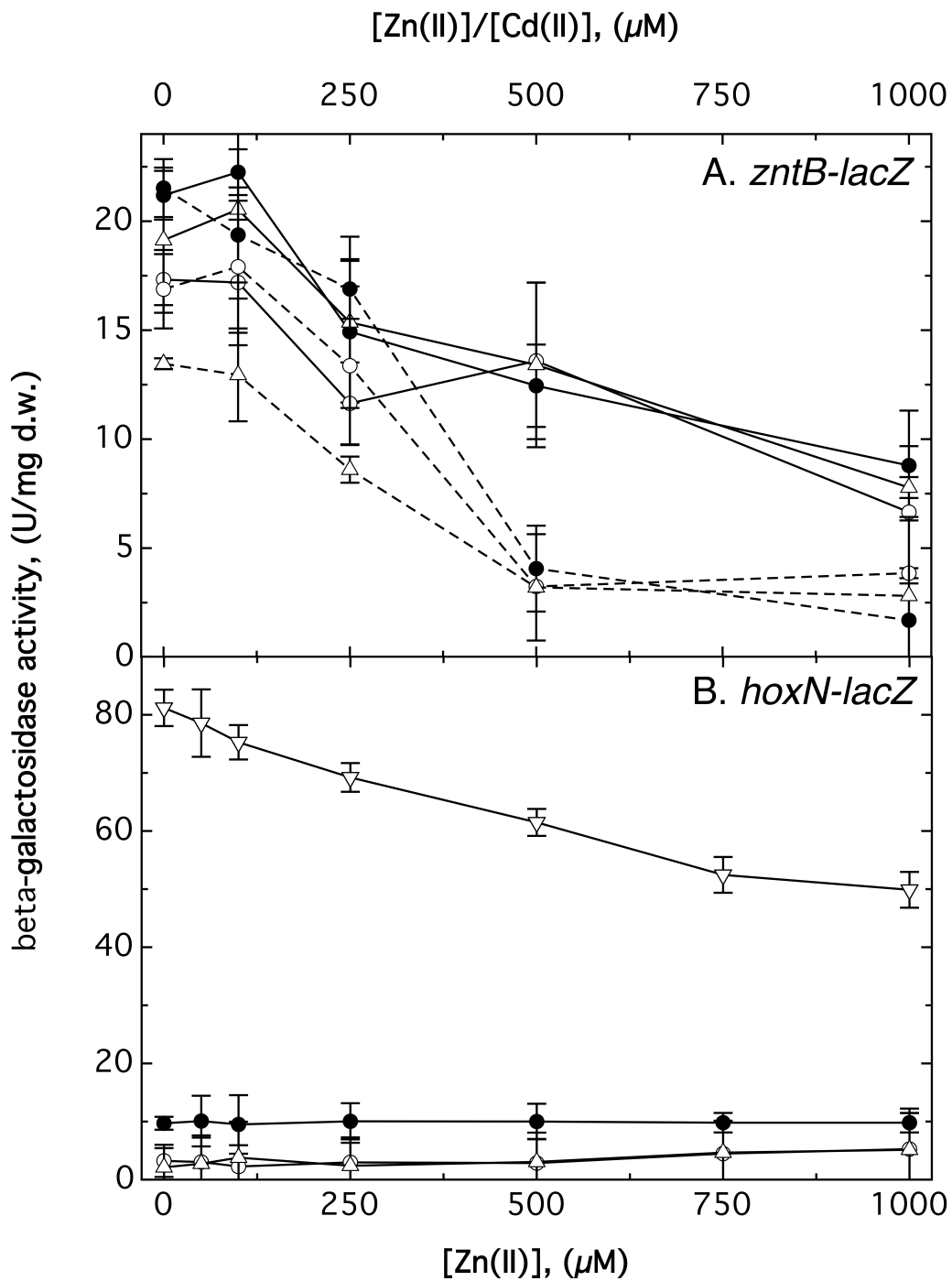


Figure 2. Regulation of a *zntB*- and *hoxN-lacZ* fusion in *C. metallidurans*. Exponentially growing cells of strain AE104 (closed circles, ●), $\Delta zupT$ (open circles, ○), $\Delta 5$ (open triangles, △) or $\Delta 6$ (open inverted triangle, ▽, only in Panel B), all carrying a *lacZ*-fusion with the full-length *zntB* (Panel A) or *hoxN* (Panel B) gene, were divided into parallel culture and zinc chloride (solid lines) or cadmium chloride (dashed lines) were added. Incubation was continued with shaking at 30°C and the specific activity of the β -galactosidase was determined after 3 h.

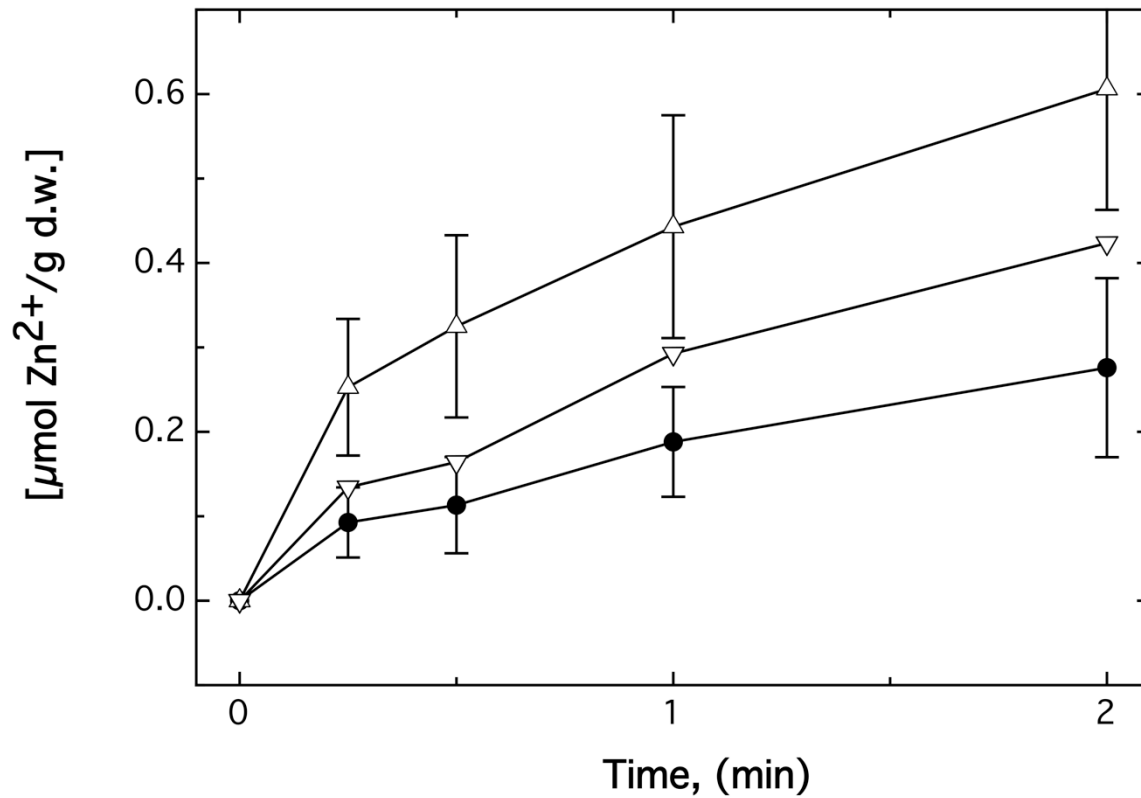


Figure 3. Zinc uptake by *C. metallidurans* mutant strains. *C. metallidurans* strain AE104 (closed circles, ●), $\Delta 5$ (open triangles, Δ) and $\Delta 6$ (open inverted triangles, ∇) were cultivated in Tris mineral salts. The cells were harvested by centrifugation, suspended in Tris buffer and used in uptake experiments with $^{65}\text{Zn}^{2+}$. Mean values of three experiments shown, deviation bars shown except for $\Delta 6$ to avoid cluttering since these bars overlap with the AE104 and the $\Delta 5$ deviations bars.

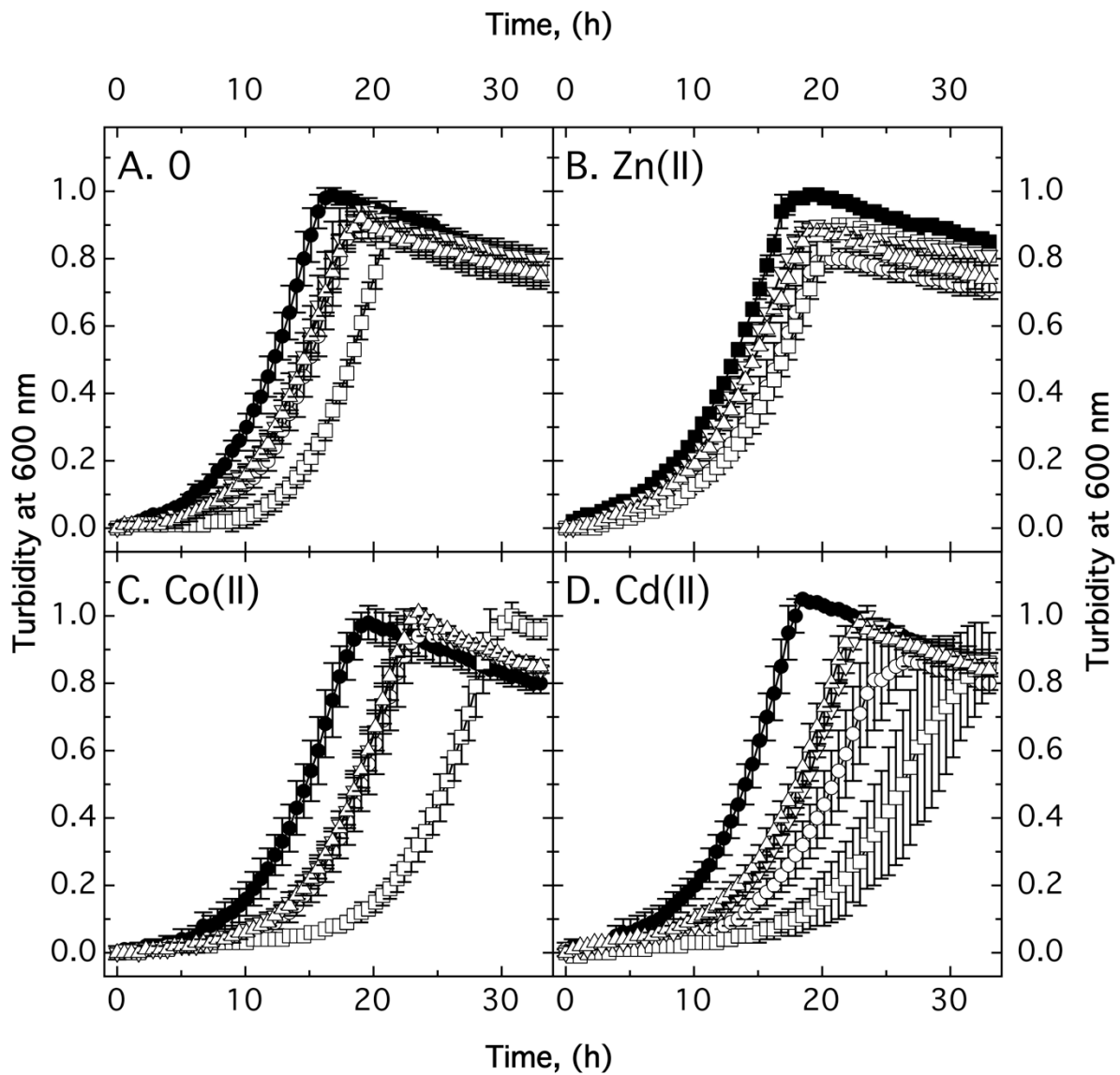


Figure 4. Growth impairment of the mutant strains. The strains AE104 (closed circles), $\Delta zupT$ (open circles), $\Delta 7$ (open squares), $\Delta 5$ (open triangles) or $\Delta 6$ (open inverted triangles) were cultivated in TMM at 30°C without further additions (Panel A), in the presence of 10 μM Zn(II) (Panel B), 10 μM Co(II) (Panel C) or 2.5 μM Cd(II) (Panel D) and growth was measured as turbidity at 600 nm.

Manuskript: “The metal transportome of *Cupriavidus metallidurans* contains more members than the previously known seven secondary metal uptake systems”

Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung

Cupriavidus metallidurans ist in der Lage seine Metallhomöostase bei hohen externen Metallkonzentrationen durch kontrollierte Aufnahme- und Efflux-Transportvorgänge zu kontrollieren. Neben den Effluxsystemen, den P_{IB}-Typ-ATPasen, CDF- und RND-Transportern, sind die primären und sekundären Aufnahmesysteme von zentraler Bedeutung. Die Deletion aller sekundären Aufnahmesysteme beeinträchtigt die Metallhomöostase nicht, mit Ausnahme eines dreifachen Anstieges des zellulären Magnesiumgehaltes ($\Delta pitA$) und eines Absinkens des Zinkgehaltes ($\Delta zupT$). So interagieren diese Systeme als Kern der Plastizität des Metall-Aufnahme-Transportoms in *C. metallidurans*. In dieser resultierende Deletionsmutante ($\Delta 7$) kommt es jedoch zu einer Abnahme der Fitness und steigender Sensitivität gegenüber Metallkationen (Herzberg *et al.*, eingereicht).

Vergleichende Transkriptomanalysen der $\Delta 7$ Deletionsmutante ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN$) mit dem $\Delta zupT$ und dem Wildtyp-Stamm ergeben, dass es zu einer verminderten Zink-Mangelsituation kommt, ausgelöst durch die Deletion von ZupT, aber auf Kosten Zink-abhängiger Reprimierung zentraler, metabolischer Prozesse. Etwa 10 % von 5255 analysierten Genen zeigen veränderte Expressionsmuster, darunter Gene für die Chemotaxis, TonB-abhängige Rezeptoren der äußeren Membran, der Flagellumsynthese, ABC-Transporter, ribosomale Proteine, Translationsfaktoren und der RNA-Polymerase.

Mittels Reporterfusion unter Metallmangelbedingungen konnte die verstärkte Expression zur Verifizierung der Transkriptomdaten für Rmet_1819 und Rmet_5377 bestätigt werden. Beide haben einen Einfluss auf die Kobalt- und Cadmiumresistenz im $\Delta zupT$ Hintergrund. Rmet_1819 kodiert für einen TonB-abhängigen Rezeptor der äußeren Membran und könnte im Zusammenhang mit der Zinkaufnahme stehen. Dagegen ist Genprodukt von Rmet_5377 (*hmuU*) Teil eines ABC-Hämin-Transporters.

Durch die Deletion der verbleibenden zwei primären Aufnahmesysteme des Transportoms, der P-Typ-ATPasen MgtA und MgtB (TC3.A.3), wurde die strategische Deletion der Aufnahmesysteme zur $\Delta 9$ Deletionsmutante fortgeführt.

Die Charakterisierung der resultierenden Neunfach-Deletionsmutante führt zu einer weiteren Abnahme der Fitness (Zunahme der Latenzphase und Abnahme der Wachstumsrate) und steigende Sensitivität gegenüber Kobalt, Cadmium und oxidativen Stress in Wachstums-Endbestimmungen. Dies zeigt wichtige Funktionen dieser deletierten Aufnahmesysteme in der Metallresistenz und -homöostase von *C. metallidurans* auf.

Untersuchungen von *mgtA* und *mgtB* mittels Reporterfusion zeigen jedoch eine Metall-unabhängige Expression und bestätigen die Transkriptomanalysen.

In der $\Delta 9$ Deletionsmutante bleibt der durch die Deletion von *zupT* hervorgerufene zelluläre Zinkmangel unberührt und der Anstieg der Magnesiumkonzentration durch den Verlust von PitA kann nicht kompensiert werden. MgtA und MgtB sind damit zwar nicht essentiell für die Magnesiumaufnahme, doch sind sie an der Plastizität des Transportoms beteiligt.

Obwohl alle bekannten Magnesium- und Zink-Aufnahmesysteme deletiert sind, ist dieser Stamm noch in der Lage die zellulär benötigten Metalle aufzunehmen, was gleichzeitig die Existenz unbekannter Aufnahmesysteme andeutet. Diese verbleibenden Aufnahmesysteme werden in der $\Delta 7$ Deletionsmutante im Vergleich zum Stamm AE104 und $\Delta zupT$ nicht verstärkt exprimiert, aber möglicherweise durch posttranskriptionale Regulation bzw. Modifikation aktiviert. Zusammengefasst wird durch diese Studie die Komplexität des Metall-Transportoms und der involvierten regulatorischen Prozesse demonstriert.

Co-Autoren der Publikation

Dr. Cornelia Große	wissenschaftl. Mitarbeiterin, AG Nies
Marcel Schüttau (Diplomand)	fertigte im selben Labor seine Diplomarbeit unter meiner Betreuung an: „Screening von Disruptionsmutanten nach unbekanntem Zinktransportern in <i>Cupriavidus metallidurans</i> “
Prof. Dr. D.H. Nies	ist der <i>Corresponding Author</i> und Arbeits-/Projektgruppenleiter

1
2 **- Manuskript -**

3
4 **The metal transportome of *Cupriavidus metallidurans***
5 **contains more members than the previously known seven**
6 **secondary metal uptake systems**

7
8 Cornelia Große[#], Martin Herzberg[#], Marcel Schüttau, and Dietrich H. Nies^{*}

9
10 Molecular Microbiology, Institute for Biology/Microbiology,
11 Martin-Luther-University Halle-Wittenberg

12
13 [#]Both authors contributed equally to this study

14
15 ^{*}Corresponding author: Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle/Saale, Germany.

16 Phone +49/0-345-5526352, Fax +49/0-345-5527010,

17 Email: d.nies@mikrobiologie.uni-halle.de

18
19 Running title: Metal uptake transportome in *C. metallidurans*.

20
21 Key words: *Cupriavidus*, *Ralstonia*, zinc, cadmium,

22
23 Abbreviations:

24

Abstract

Cupriavidus metallidurans is able to maintain its metal homeostasis even at high metal concentrations and metal mixtures. Central for this ability is the metal transportome, composed of uptake and efflux systems. Seven secondary metal import systems, ZupT, PitA, CorA₁, CorA₂, CorA₃, ZntB and HoxN, interact and are at the core of the metal uptake transportome. The overall system that emerges by the interplay of these seven transporters shows much plasticity. Deletion of one importer after the other can be compensated by the remaining components so that the cellular metal content can be maintained to a large degree. Activation of the remaining systems seems to occur at the transcriptional and post-transcriptional level. The sevenfold deletion mutant $\Delta 7$ ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN$) is still able to maintain its cellular metal content in most parts (Herzberg et al., preceding publication). Here, we demonstrate that in $\Delta 7$ compared to the parent strain AE104 and the $\Delta zupT$ single deletions strain, no obvious metal uptake systems were up-regulated at the transcriptional level, indicating that the importers responsible for metal supply of the $\Delta 7$ cells were already in place in strains AE104 or $\Delta zupT$, and were post-transcriptionally activated similar to the 7 secondary importers. Exemplary, it was demonstrated that two P-type ATPases, MgtA and MgtB, were indeed involved in metal transport in $\Delta 7$ and are thus the first two characterized members of the dark matter of the metal uptake transportome beyond the seven secondary importers.

Importance

Bacteria, including pathogenic strains, need to transform the metal composition and speciation in their environment into the cytoplasmic metal content and bouquet composition. This task is performed by the bacterial metal transportome, composed of uptake and efflux systems. The preceding publication has demonstrated that an interplay of seven secondary metal uptake systems is at the core of the metal transportome in *C. metallidurans*. This publication verifies that post-transcriptional events were responsible for activation of even more, yet unknown, metal import systems in the sevenfold deletion mutant $\Delta 7$. Tapping this dark matter of the metal uptake transportome, two P-type ATPases were identified as new members. Together, both publications demonstrate the complexity of the metal transportome and the regulatory processes involved.

Introduction

60
61
62 Multiple transition metal ion homeostasis in the beta-proteobacterium *Cupriavidus*
63 *metallidurans* strain CH34 seems to result from an interplay of transport processes with
64 metal sequestration. On the one hand, a kinetical flow equilibrium is formed by controlled
65 import and export processes in the cytoplasm and periplasm (1-5). On the other hand,
66 transition metal cations may be sequestered in the cytoplasm by the zinc repository (6, 7)
67 and possibly the thiol pool (8-10). The kinetical transport flow equilibrium formed by the metal
68 transportome (11) keeps the transition metal mélange in the cytoplasm and periplasm in the
69 desired range of concentrations (12, 13). Export is mediated by P_{1B}-type ATPases
70 {TC#3.A.3; TC, Transporter classification (14, 15)}, CDF proteins (TC#2.A.4) (16)} and efflux
71 systems of other protein families such as the nickel exporter CnrT from the cytoplasm to the
72 periplasm. From here RND-driven (TC# 2.A.6) transenvelope efflux systems such as
73 CzcCBA, CnrCBA and CusCBA expel surplus metals back across the outer membrane to the
74 outside (1, 3, 12). Import is probably mediated by facilitated diffusion through outer
75 membrane porins into the periplasm and from here by a battery of redundant secondary
76 transport systems with low substrate specificity to the cytoplasm.

77
78 The seven members of this battery are: (i) the ZIP protein ZupT (TC#1.A.5); (ii) the metal-
79 phosphate importer PitA (TC#2.A.20); (iii) four members of the MIT family CorA₁ to CorA₃
80 and ZntB (TC#1.A.35), and the NiCoT protein HoxN (TC#2.A.52). Neither deletion of the
81 single genes (2) nor multiple deletion up to the $\Delta 7$ mutant strain changes the metal content of
82 *C. metallidurans* cells, with the exception of an increased magnesium level in all mutants
83 carrying a $\Delta pitA$ deletion and a decreased zinc content in all those with a deleted *zupT* gene
84 (11). This indicates that the metal uptake transportome of *C. metallidurans* contains more but
85 unknown members beyond these seven systems.

86
87 During the course of the successive deletion of the genes for the seven secondary metal
88 import systems up to the $\Delta 6$ mutant ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB$) only few
89 changes in $\Delta 6$ compared to the parent strain AE104 could be observed, namely pleiotropic
90 effects and a decreased zinc content resulting from the $\Delta zupT$ deletion, the increased Mg
91 content resulting from the $\Delta pitA$ deletion, and a decreased cobalt and cadmium resistance.
92 This demonstrated much plasticity of the metal uptake transportome because any deletion
93 could be compensated by activation of other importers, for the most part. But, as judged by
94 studies with *lacZ* reporter fusions, this activation could not be completely explained by up-
95 regulated gene expression of the genes for the remaining known transporters or unknown
96 ones. Only in $\Delta 6$, the *hoxN* gene, which was supposed to supply nickel to the hydrogenases

97 of *C. metallidurans*, was in a higher expression level compared to the preceding mutant $\Delta 5$
98 ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$). To understand this effect, the global transcriptome of
99 the $\Delta 7$ strain ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN$) was analyzed here. With
100 the exception of genes for TonB-dependent outer membrane receptors, no obvious genes for
101 metal uptake systems were up-regulated in $\Delta 7$. The importers responsible for metal supply in
102 $\Delta 7$ must have been in place already in the metal-starved parent strain AE104, and activated
103 similar to the secondary metal uptake systems largely by post-transcriptional events. As a
104 start to uncover the dark matter of the metal uptake transportome in *C. metallidurans*, two
105 genes for P-type ATPases MgtA and MgtB (TC3.A.3) were characterized and indeed shown
106 to be part of the metal uptake transportome.

107

108

109

110

Material and Methods

111

112 Bacterial strains and growth conditions, genetic techniques including construction of in-frame
113 deletion without polar effects and interruption of genes by insertion of a kanamycin
114 resistance cassette, determination of the MIC (minimal inhibitory concentration) on solid Tris-
115 buffered mineral salts medium (TMM), dose response curves in 96 well plates and the
116 calculation of the IC₅₀ value, β -galactosidase assay and *lacZ*-reporter constructions,
117 determination of cellular metal content by ICP-MS (inductively coupled plasma mass
118 spectrometry), RNA isolation, quantitative RT-PCR and gene array experiments were done a
119 described many times, e.g in (17). A detailed Material and Methods section is given in the
120 Supplementary Material, including the sequences of the primers used (Suppl. Table S1). The
121 bacterial strains used are listed in Table 1. The microarray data were deposited in the GEO
122 database at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession
123 numbers GSE64196 and GSE71011. All experiments and data points mean values from a
124 least 3 biological reproductions.

125

126

127

128

Results

129

130 Transcriptome of $\Delta 7$. During construction of the $\Delta 7$ mutant strain and with exception of the
131 $\Delta zupT$ deletion, the effect of every deletion step could always be compensated by remaining
132 metal uptake systems, however, with exception of *hoxN* and as indicated by *lacZ* reporter
133 gene fusions, this plasticity was not reached by increased gene expression for substitute

134 transporters. Moreover, the nearly undisturbed metal content of $\Delta 7$ clearly indicated the
135 presence of unknown metal importers. The global transcriptome of the $\Delta 7$ strain was
136 investigated to reveal if the genes for these unknown importers were up-regulated at the
137 level of gene expression specifically in the $\Delta 7$ strain, or if they were already in place in the
138 $\Delta zupT$ parent or the AE104 ultimate parent strain.

139

140 The global transcriptome of $\Delta 7$ was analyzed in cells grown under global metal starvation
141 conditions (50 μ M EDTA) or in the presence of sufficient zinc (10 μ M zinc chloride). These
142 data were also compared to those of the $\Delta zupT$ strain and AE104 parent (Table 2, Suppl
143 Table S2, Suppl. Data Base). All values with an up- or down-regulation more than two-fold (Q
144 ≤ 0.5 or $Q \geq 2.0$) were considered. Namely, nearly 10 % of the 5255 genes analyzed
145 changed expression, 307 in the comparison $\Delta 7/\Delta zupT$, 144 in the comparison $\Delta 7/AE104$,
146 and another 144 in AE104 in the comparison EDTA/Zn(II) (Table 2). Differences were judged
147 as significant if their D values were larger than 1, meaning that the deviation bars of the
148 respective data points did not touch or overlap. Three biological reproductions were done for
149 $\Delta 7$ and AE104, two for $\Delta zupT$. Comparison of $\Delta zupT$ to AE104 has been published
150 elsewhere (18).

151

152 Comparison of $\Delta 7$ and $\Delta zupT$: effect of the deletion of *pitA*, *corA123*, *zntB* and *hoxN*. A
153 number of 73 genes were up-regulated in the presence of EDTA but not changed in
154 expression by zinc (Table 2), but only 13 with significant changes in the EDTA comparison,
155 10 of them involved in chemotaxis, 1 encodes a putative uncharacterized protein and 2 a
156 TonB-dependent receptor and an uncharacterized protein adjacently encoded. These might
157 be involved in specific uptake of metals across the outer membrane, being part of novel
158 metal uptake channels present in $\Delta 7$. Two genes encoding putative uncharacterized proteins
159 were up-regulated in the presence of EDTA but down-regulated by zinc but the results were
160 not significant.

161

162 Twenty-four genes were up-regulated in the $\Delta 7/\Delta zupT$ comparison in the presence of EDTA
163 and of zinc. Genes encoded flagellum synthesis and an ABC importer, Rmet_3185/86 in
164 Op0895f (all genes located in an un-interrupted series in the same direction of transcription
165 had been previously numbered and designated as “operon regions” (18) to facilitate analysis
166 of the *C. metallidurans* genome and its transcription, “f” forward direction, “r” reverse). These
167 two genes were also up-regulated in the $\Delta 7/AE104$ comparison independent on the
168 conditions but not by metal starvation in strain AE104 (Suppl. Table S2). Other genes up-
169 regulated independent of zinc starvation in the $\Delta 7/\Delta zupT$ and $\Delta 7/AE104$ comparisons
170 concerned Rmet_5924/25 in Op1799r encoding a SlyX-type protein of unknown function and

171 a possible metal-containing protein. No gene encoding an uncharacterized membrane
172 protein or a putative transporter was up-regulated by EDTA specifically in the $\Delta 7$ strain.
173 Transport systems already in place in strain AE104 or the $\Delta zupT$ strain should be
174 responsible for metal import into the cells of the $\Delta 7$ strain.

175
176 Twelve genes were down-regulated in $\Delta 7/\Delta zupT$ in EDTA but not by zinc, two of them
177 significantly, one was located adjacent to the *cobW₁*-cluster and encoded a TonB-dependent
178 receptor, the other an unknown ATPase-like protein. Significantly down-regulated by EDTA
179 but unchanged by zinc were the 6 genes in the *cobW₁*-cluster Op0317f (mean ratio
180 0.29 ± 0.02 -fold), which were strongly up-regulated in the presence of EDTA in the $\Delta 7/\text{AE104}$
181 comparison (7.46 ± 1.50 -fold) but only slightly in AE104 under zinc starvation (1.75 ± 0.37 -fold).
182 Since the *cobW₁* cluster was up-regulated only under severe zinc starvation conditions, this
183 indicated that zinc starvation lessened to some degree when additional genes for secondary
184 importers were deleted in the $\Delta zupT$ strain. However, strong up-regulation in the $\Delta 7/\text{AE104}$
185 comparison demonstrated that the $\Delta 7$ strain was still suffering zinc starvation conditions even
186 though these conditions were less severe than those experienced by the $\Delta zupT$ mutant.

187
188 Regulation of expression of the *cobW₁* gene Rmet_1098 has been published (18) and was
189 again confirmed by RT-PCR (Table 3) and *lacZ* fusions (Suppl. Table S3), here serving as
190 positive control for zinc starvation conditions. Transcription of *cobW₁* was induced by 50 μM
191 EDTA (Table 3), in $\Delta zupT$ stronger than in $\Delta 7$, and in both strains stronger than in the parent
192 AE104, verifying some decrease of intensity of zinc starvation conditions in strain $\Delta 7$.

193
194 Only three genes were down-regulated in the $\Delta 7/\Delta zupT$ comparison under both conditions,
195 most strongly and as a false positive result the deletion scar of the gene for the HoxN nickel
196 importer. The other two genes were up-regulated in AE104 under zinc starvation conditions
197 but down-regulated in the $\Delta 7/\text{AE104}$ comparisons, Rmet_3359 significantly and Rmet_3519
198 as part of an ABC importer slightly. These results could not be confirmed with reporter gene
199 fusions (Suppl. Table S3).

200
201 A number of 154 genes were not regulated by EDTA in the $\Delta 7/\Delta zupT$ comparison but down-
202 regulated by zinc, agreeing to the lower zinc resistance of the $\Delta 7$ strain compared to $\Delta zupT$
203 (11). These genes encoded the ribosomal proteins and translation factors, Sec- and TAT-
204 dependent protein export, the components of the RNA polymerase, the HU DNA binding
205 protein Rmet_4749 and other histon-like, DNA- and small RNA-binding proteins, FtsZ, the
206 components of the F_1F_0 ATPase, sulfate adenylyltransferase, components of the tricarboxylic
207 acid cycle, phosphoglycerate mutase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. This

208 indicated that deletion of the other 6 metal import systems leading from the $\Delta zupT$ mutant to
209 the $\Delta 7$ mutant resulted in a global zinc-dependent down-regulation of the complete gene
210 expression and protein synthesis machinery, from generation of NADH via the TCC via ATP-
211 generation, transcription and translation to protein export. Zinc exporters such as ZntA were
212 not up-regulated and the zinc concentration used was very low (10 μ M), so that this global
213 zinc-dependent answer was more a regulatory event than the result of excessive zinc stress.
214 This also agreed with the answer of the *cobW₁* region that indicated that the $\Delta 7$ strain was
215 still suffering from some degree of zinc starvation ultimately resulting from the $\Delta zupT$
216 deletion, which was in contrast to its decreased zinc resistance.

217
218 Thirty-three genes were not changed by EDTA in the $\Delta 7/\Delta zupT$ comparison but up-regulated
219 by zinc, however, up-regulation was less than 3-fold and these results presented no clues
220 about the physiological condition of the $\Delta 7$ strain.

221
222 In summary, half (154) of the 307 genes that were altered in expression in the $\Delta 7/\Delta zupT$
223 comparison were not changed under condition of overall metal starvation but significantly
224 down-regulated even by the low (10 μ M) zinc concentrations used in this experiment. These
225 genes encoded important components for metabolism, energy conservation, translation and
226 transcription. On the other hand, the genes in the *cobW₁* cluster, required to provide zinc to
227 paralogs of important zinc-dependent enzymes and up-regulated only under conditions of
228 severe zinc starvation, were down-regulated from the high expression level of the $\Delta zupT$
229 mutant, however, not completely down to the low expression level of metal-starved AE104
230 cells. The $\Delta 7$ strain managed to mollify its zinc starvation condition to some extent but at the
231 cost of an increased zinc sensitivity of its metabolic backbone. This happened despite the
232 presence of powerful zinc efflux systems such as ZntA and CadA, which were not changed in
233 expression in $\Delta 7$ compared to $\Delta zupT$.

234
235 Comparison of $\Delta 7$ and AE104: The 144 genes not changed in expression in the $\Delta 7/\Delta zupT$
236 comparison but in the $\Delta 7/AE104$ comparison (Table 2) indicated genes already up- or down-
237 regulated in the $\Delta zupT$ mutant due to the loss of this central zinc import system but not
238 further influenced by deletion of the six other secondary metal uptake systems. A number of
239 40 genes were down-regulated only in EDTA but not regulated by zinc, 22 genes down-
240 regulated under both conditions, no gene down-regulated by EDTA but up-regulated by zinc.
241 Among the 22 genes down-regulated, two encoded possible sulfate importers Rmet_4472
242 and Rmet_4600.

243

244 Thirty-eight genes of the *aut1* region (plus 1 more gene outside of *aut* region 1) encoding the
245 soluble hydrogenase and Calvin cycle proteins were up-regulated under both conditions (3
246 exception up-regulated by zinc only between 1.5- and 2.0-fold). As published (18) this was
247 the result of an un-silencing of the *aut1* region due to the $\Delta zupT$ -mediated disturbance of
248 metal-homoeostasis. This region as part of a large genomic island plus other genomic
249 islands had been previously silenced specifically in AEA104 cells grown in the low-phosphate
250 TMM medium. Deletion of additional metal import systems, namely that of the
251 metal:phosphate importer PitA, did not change expression of *aut1* again.

252
253 One gene was up-regulated 2.1-fold by EDTA but 0.42-fold down-regulated by zinc. This last
254 gene encoded the zinc uptake regulator Zur but both results were not significant ($D = 0.81$
255 and 0.63, respectively). Another 36 genes were not influenced by EDTA but down-regulated
256 by zinc, only six of them significantly but only close to a two-fold down-regulation. Six genes
257 were up-regulated only by zinc, two of them also members of *aut* region 1.

258
259 The published (18) main results of the $\Delta zupT$ deletion visible on the level of the global
260 transcriptome were the up-regulation of the *cobW₁*-cluster under conditions of metal
261 starvation and of the *aut1* region independent of these conditions. While up-regulation of the
262 *cobW₁*-cluster was mollified in $\Delta 7$, that of the *aut1* region was not changed, indicating that
263 the “deal” of the $\Delta 7$ strain, somewhat decreased zinc starvation at the cost of increased
264 sensitivity to metals, did not silence *aut1* again.

265
266 Metal starvation versus zinc supply in the parent strain AE104. In strain AE104 the effect of
267 50 μM EDTA was compared to that of 10 μM Zn(II) to determine the effect of metal starvation
268 versus zinc supply that was independent of the deletion of the secondary metal import
269 systems. A number of 42 genes were down-regulated in the EDTA/Zn(II) comparison (Table
270 2). These genes encoded components of the tricarboxylic acid cycle (TCC), the iron-containing
271 superoxide dismutase SodB, the elongation factor Ts, biotin synthesis, the cadmium/zinc
272 exporting P_{1B}-type ATPase CadA (but not ZntA) and the *czc₁C₂B₂'* cluster for the
273 interrupted *czc*-like system on chromosome 2. While down-regulation of SodB and the TCC
274 proteins indicated iron starvation, that of CadA and the ancient chromosomal *czc* system an
275 EDTA-mediated decrease of the zinc stress in strain AE104 (18).

276
277 A higher number of genes, 102, were up-regulated in AE104 in the EDTA/Zn(II) comparison.
278 These encoded many genes involved in iron uptake such as the siderophore biosynthesis
279 region, TonB-dependent receptors, the ECF sigma factors RpoI and RpoK, the regulator
280 FurB but not FurA, the Feo system and the HmuTUV ABC-type importer. The *feoB* gene was

281 up-regulated in the presence of EDTA in AE104, $\Delta zupT$ and $\Delta 7$ as indicated by RT-PCR
282 experiments (Table 3) and the HmuTUV transporter also as shown with *lacZ* fusions, but also
283 by addition of metal cations, except in the $\Delta 7$ strain (Suppl. Table S3).

284

285 This indicated that treatment of strain AE104 with EDTA decreased zinc stress but yielded
286 iron starvation, which was compensated by up-regulation of siderophore-dependent and
287 alternative iron uptake pathways. Due to the presence of ZupT in AE104 cells, there was no
288 zinc starvation in the cytoplasm as indicated by the strong up-regulation of the *cobW₁* zinc
289 starvation gene cluster in EDTA-treated $\Delta zupT$ cells compared to AE104 cells (18).

290

291 The gene *zntA* for the mainly zinc-exporting P_{1B}-type ATPase, however, was unchanged
292 under none of the strains and conditions tested, indicating no increased zinc stress anywhere
293 in these experiments. No changes under all these conditions were observed for Rmet_5396
294 (*mgtA*) and Rmet_2211 (*mgtB*), both encoding P-type ATPases that might be involved in
295 magnesium transport. Other genes possibly involved in metal transport were also not
296 changed in expression: Rmet_0450 (*corC*), Rmet_4765, Rmet_1762, and Rmet_0698 (*corC*-
297 like).

298

299 Reporter gene fusions. Regulation of expression of some genes that might be involved in
300 metal homeostasis was characterized in more detail using *lacZ* reporter gene fusions. The
301 middle part of the respective gene was cloned *in frame* upstream of a *lacZ* gene in the
302 plasmid pECD794-1, which is not able to replicate in *C. metallidurans*. The resulting hybrid
303 plasmid was conjugated into *C. metallidurans* strains AE104, $\Delta zupT$ and in some cases also
304 $\Delta 7$, and kanamycin-resistant transconjugants were selected. These strains should carry the
305 hybrid plasmid inserted into the target gene, leading to inactivation of this gene with possible
306 polar effects, and expression of the *lacZ* reporter under the same control as the target gene.

307

308 Of the fusion strains constructed (Suppl. Table S3), only Rmet_1794, Rmet_1819, and
309 Rmet_5377 (*hmuU*) showed a change in metal resistance but only in the $\Delta zupT$ mutant
310 background (data not shown). Deletion of *zupT* decreases cobalt and cadmium resistance in
311 liquid growth medium (19), and this decrease was partially reverted in the mutants. This
312 indicated that these three gene products might be involved in cobalt and cadmium uptake in
313 the $\Delta zupT$ strain.

314

315 To test expression of these and other genes, similar gene interruption strains in AE104 and
316 $\Delta zupT$ were constructed and compared to expression of *cobW₁* (Rmet_1098) in these
317 strains as an indicator of zinc starvation. The tested strains (Suppl. Table S3) confirmed up-

318 regulation by EDTA in case of Rmet_0837, the positive control Rmet_1098, Rmet_1106,
319 Rmet_1114, Rmet_1819, Rmet_5377, Rmet_5460 and Rmet_5747 but not Rmet_1794.

320

321 In a similar approach the *mgtA* (Rmet_5396) and *mgtB* (Rmet_2211) genes, encoding P-type
322 ATPases possibly involved in calcium or magnesium transport, were also interrupted in strain
323 AE104. The basic expression level of the *mgtA-lacZ* fusion was about two times higher than
324 that of the *mgtB* fusion (Fig. 1). The genes were not regulated by zinc (Fig. 1), calcium,
325 cobalt, cadmium, copper, manganese, nickel, or magnesium, with the exception of a two to
326 three-fold down-regulation of *mgtA-lacZ* in the presence of 1 mM Cu(II) and a two-fold up-
327 regulation of *mgtB-lacZ* at 10 mM Ca(II). The latter increase was only visible after incubation
328 for 16 h instead of the routinely used 3 h (data not shown). No difference measured was
329 significant whether the genes were interrupted (as in Fig. 1) or a full-length fusion of the gene
330 with *lacZ* was constructed (data not shown).

331

332 High EDTA concentrations (> 250 μ M), however, increased expression level of *mgtA-lacZ*
333 but not that of *mgtB-lacZ* (Fig. 1). When the *mgtA-lacZ* fusion was constructed in the $\Delta 7$
334 mutant strain, the expression level was decreased and no longer regulated by EDTA.
335 Instead, increasing zinc concentrations down-regulated *mgtA-lacZ* expression from
336 9.33 ± 1.27 U/mg dry mass at no added zinc to 0.69 ± 0.92 U/mg (representing no activity at all
337 in two of the three repetitions) at 1 mM Zn(II) (Fig. 1). Similar fusions were constructed in the
338 $\Delta 5$ mutant strain but there was no difference compared to strain AE104 (Fig. 1).

339

340 In summary, no clear candidate genes were obvious in the $\Delta 7$ strain that were responsible
341 for metal supply in this bacterium, indicating a “dark matter” of the metal uptake transportome
342 composed of importers already in place in the parent strain AE104. Expression of the genes
343 for two P-type ATPases that might be involved in metal uptake were not regulated by added
344 metals, as also demonstrated by the transcriptomic data. Only *mgtA* was up-regulated by
345 decreasing availability of metals. Expression of this gene, which was interrupted by the *lacZ*
346 fusion, was decreased in the $\Delta 7$ strain compared to the $\Delta 5$ strain or parent AE104, and
347 repressed even more by increasing zinc concentrations. Loss of *zntB* and *hoxN* in the $\Delta 5$
348 strain leading to the $\Delta 7$ strain changed the expression pattern of *mgtA*.

349

350 Deletion of the genes for putative magnesium-importing P-type ATPases. Thus, *mgtA* and
351 *mgtB* were characterized as first members of the “dark matter” of the metal uptake
352 transportome of *C. metallidurans*. The gene *mgtA* was interrupted in the $\Delta 7$ strain and *mgtB*
353 was deleted, leading to the $\Delta 8$ multiple deletion mutant. In a last step *mgtA* was interrupted in
354 $\Delta 8$ by insertion of a kanamycine resistance cassette leading to $\Delta 9$. A “clean” deletion of *mgtA*

355 in $\Delta 8$ could not yet be constructed. The $\Delta 8$ and $\Delta 9$ strains accumulated RpoC (data not
356 shown), indicating disturbed zinc allocation to a client protein. The metal content of $\Delta 8$ and
357 $\Delta 9$ was similar to that of the $\Delta 7$ strain with the exception of the magnesium content, which
358 was significantly lower in the $\Delta 9$ strain than in the $\Delta 7$ strain, but not back down to the level of
359 strain AE104 (Table 4). Net zinc, magnesium or general transition metal import was not
360 abolished in the $\Delta 9$ strain. MgtA and/or MgtB were not essential for Mg import in
361 *C. metallidurans* although the P-type ATPases contributed to the high Mg content in strain
362 $\Delta 7$.

363

364 Growth of the mutant strains in liquid TMM in the presence and absence of transition metal
365 cations. Growth of the $\Delta 7$ strain with all known secondary zinc uptake systems deleted was
366 retarded in non-amended TMM while the preceding mutant, $\Delta 6$, grew similar to the $\Delta zupT$
367 strain. Addition of a low zinc concentration (10 μM) compensated this growth defect partially,
368 while 10 μM Co(II) and especially 2.5 μM Cd(II) increased it (11)(Fig. 2). Deletion of *mgtB* or
369 interruption of *mgtA* in strain $\Delta 7$ improved growth again under all four conditions (Fig. 2), also
370 in the presence of 250 μM Cu(II) and 50 μM EDTA (data not shown). Both strains grew
371 similar to the $\Delta zupT$ deletion strain. Deletion of both genes, however, severely effected the
372 cells, even when 10 μM Zn(II) were added, which rescued all other mutants up to $\Delta 8$ and $\Delta 7$
373 *mgtA::kan* to the $\Delta zupT$ level of fitness (Fig. 2). Growth of the $\Delta 9$ mutant strain was
374 compromised in the absence of added metal and even more by addition of 10 μM Zn(II) <<
375 250 μM Cu(II) << 2.5 μM Cd(II), while addition of 250 μM EDTA had only a small effect (Fig.
376 3).

377

378 To verify and differentiate these findings, metal resistance of the mutant strains in liquid
379 culture was determined in dose response curves (data not shown), and the respective IC_{50}
380 values of the inhibiting substance were calculated (Table 5). Deletion of both genes for P-
381 type APTases increased zinc, copper, gold and EDTA resistance again, for zinc and copper
382 to the $\Delta zupT$ level, and EDTA to a higher resistance level. In contrast, resistance to oxidative
383 stress decreased. Resistance to cobalt and cadmium increased in both single deletion
384 derivatives of $\Delta 7$. This indicated that MgtA and MgtB were in fact import systems with a very
385 low substrate specificity, importing Mg(II), Zn(II), Co(II), Cd(II), Cu(II) and even Au(III)
386 complexes.

387

388 In the mutant $\Delta 9$, however, resistance to Co(II) and Cd(II) dropped sharply (Table 5),
389 although the cobalt efflux system DmeF and the cadmium efflux system CadA were still
390 present in $\Delta 9$. Cobalt resistance was at the level of the $\Delta e4$ efflux deletion mutant, cadmium
391 resistance still 20-fold higher than in $\Delta e4$ (11). Obviously, to maintain its zinc content, the $\Delta 9$

392 mutant strain was forced to activate import pathways that decreased its ability to handle high
393 concentrations of cobalt and cadmium.

394

395

396

Discussion

397

398 The known secondary and primary divalent metal cation import systems in *C. metallidurans*.

399 The seven secondary metal uptake systems ZupT, PitA, CorA₁₋₃, ZntB and HoxN seem to
400 interact and form together with the metal efflux systems ZntA, CadA, DmeF and FieF the
401 core of the metal transportome of *C. metallidurans* (11). The metal uptake transportome
402 shows much plasticity since deletion of most importers could be compensated in most part
403 by activation of others. Exception was the $\Delta zupT$ deletion, resulting in a decreased cellular
404 zinc level and many other pleiotropic effects (6, 18, 19).

405

406 With increasing number of deletions in metal import systems, the *C. metallidurans* cells,
407 when grown in non-amended TMM minerals salts medium, remained at the fitness level and
408 overall metal content of the $\Delta zupT$ mutant strain although especially the cobalt and cadmium
409 resistance of the multiple deletion mutants dropped step by step. The cells could tolerate
410 deletion of the above mentioned “triad” PitA-CorAs plus ZupT, and even an additional
411 deletion of the zinc transporter ZntB. When, however, the remaining secondary metal import
412 system HoxN, supposed to supply nickel ions to the hydrogenases of the bacterium, was
413 removed, fitness and Co(II)/Cd(II) sensitivity of the resulting $\Delta 7$ mutant reached a new
414 minimum (11).

415

416 The $\Delta 7$ strain could maintain its overall cellular metal content with exception of a lower zinc
417 and higher magnesium level at the cost of increased cobalt, cadmium and zinc sensitivity
418 (11), the latter resulting from a higher impact of zinc toxicity on the central metabolism of the
419 cells despite signs of zinc starvation at the same time. No clear candidate genes were
420 obvious in the $\Delta 7$ strain that were responsible for metal supply in this bacterium, indicating a
421 “dark matter” of the metal uptake transportome composed of importers already in place in the
422 parent strain AE104.

423

424 As first possible constituents of this “dark matter”, the P-type APTases MgtA (Rmet_5396)
425 and MgtB (Rmet_2211) were characterized, which were annotated as Mg/Ca importers (Fig.
426 4). Deletion of both genes resulted in a decreased magnesium content of the $\Delta 9$ mutant cell
427 compared to the $\Delta 7$ cells, indicating that these proteins should be involved in magnesium
428 transport. Moreover, deletion of these genes yielded a another round of fitness loss and

429 Co(II)/Cd(II) resistance decrease in the resulting mutant strain $\Delta 9$ (Fig. 2, Fig. 3).
430 Interestingly, single gene deletion or interruption of either gene in $\Delta 7$ increased fitness and
431 Co(II)/Cd(II) resistance again, indicating that presence of either P-type ATPases negatively
432 interfered with the other protein, similar to the negative interference of PitA and the CorAs in
433 the $\Delta zupT$ mutant strain when it comes to an efficient allocation of zinc to RpoC. The $\Delta 9$
434 mutant had more problems than the $\Delta 7$ mutant, indicating that both P-type ATPases
435 increased performance of the $\Delta 7$ mutant, but only one of these systems was even better than
436 both.

437

438 The $\Delta 9$ mutant was still able to maintain its cellular metal content, indicating the presence of
439 at least one more metal import system for Mg(II), Zn(II) and other metals, and the activity of
440 this systems should be responsible for the low Co(II)/Cd(II) resistance of the $\Delta 9$ mutant,
441 despite the presence of the cadmium efflux system CadA and the cobalt efflux system DmeF
442 in $\Delta 9$. *E. coli* and *Salmonella* do not contain such an additional metal uptake system, need
443 higher magnesium concentrations in the growth medium when CorA and MgtA (*E. coli*) or
444 CorA, MgtA, MgtB (*Salmonella*) were deleted (20-23), and do no longer import magnesium.
445 The two MgtA and MgtB proteins from *C. metallidurans* are much more related to the Ca(II)-
446 transporting SERCA protein from muscles than to the Mg(II) importers from *Salmonella* (Fig.
447 4). This indicates that MgtA and MgtB from *C. metallidurans* may have a function different
448 from that of the respective proteins in *Salmonella*. Nevertheless, the decrease of the cellular
449 magnesium content and the change in fitness and metal resistance upon deletion of the two
450 genes in $\Delta 7$ clearly demonstrate an important function of both in global metal homeostasis
451 in *C. metallidurans*.

452

453 The remaining “dark matter” of the metal uptake transportome of *C. metallidurans*. There are
454 several candidates for the metal import systems still available to the $\Delta 9$ mutant: (i) ABC
455 importers, (ii) siderophore-related systems; (iii) TonB-dependent systems; and (iv) metal
456 citrate importers. In *Staphylococcus aureus*, the Opp1 ABC importer imports Ni(II) and Co(II)
457 under zinc-depleted conditions (24). Operation of a similar system in *C. metallidurans* would
458 explain the decreased cobalt resistance of all multiple deletion strains by a stepwise up-
459 regulation of such a system due to increasing zinc starvation conditions. *C. metallidurans*
460 does not contain a Znu-like ABC importer for Zn(II) or Mn(II) cations as found in *E. coli*,
461 *Paracoccus denitrificans* or *Treponema pallidum* (25-27) but Rmet_1819, and Rmet_5377
462 (*hmuU*) could be part of Opp1-like ABC uptake systems in *C. metallidurans*.

463

464 In *Pseudomonas putida*, a siderophore is involved in zinc utilization (28). Similarly, the
465 siderophore yersiniabactin of *Yersinia pestis* contributes to zinc acquisition, in addition to a

466 Znu-like ABC import system (29). Under metal starvation conditions production of
467 staphyloferrin B in *C. metallidurans* was up-regulated in strain AE104 although iron, provided
468 as iron ammonium citrate, should be readily available to the cells. This indicates that the
469 siderophore may also be recruited for a function different from iron uptake. In *Bacillus*
470 *subtilis*, the citrate transporters CitM transport the acid in complex with Mg(II), Ni(II), Mn(II),
471 Co(II) and Zn(II), CitH in complex with Ca(II) and other cations (30). A putative tricarboxylic
472 transport system TctABC is encoded by Rmet_3549, 50, 51 in operon region Op0985f, not
473 regulated in the $\Delta 7$, $\Delta zupT$ mutant or strain AE0104 by EDTA or zinc but the TctC gene
474 product is present in AE104 cells in a copy number of 3000 per cell. Such a system is readily
475 in place and only needs to be activated.

476
477 Unusual metal siderophore, citrate or other complexes need to be imported into the
478 periplasm before a further uptake into the cytoplasm can occur. Such an active transport
479 across the outer membrane may be mediated by a TonB-dependent receptor protein (31).
480 Similar systems are involved in zinc acquisition in *Neisseria meningitides* (32) and import of a
481 nickel complex in *Helicobacter pylori* (33, 34). Seven TonB-dependent outer membrane
482 proteins and the *exbD1-exbB1-tonB* gene cluster were up-regulated in strain AE104 under
483 metal starvation conditions, one (Rmet_4617) 9-fold in AE104 and additionally 3.6-fold in
484 EDTA-treated $\Delta 7$ cells compared to $\Delta zupT$ cells. The gene Rmet_4617 is co-regulated with
485 the genes for an RND-driven efflux system for organic substances, maybe a metal-binding
486 compound. Two of the seven genes are part of adjacent to the staphyloferrin B synthesis
487 cluster and probably import systems for the siderophore or derivatives thereof, one encoded
488 as part of the *hmuVUT* operon region Op1600f, which is in a divergon with Op1599r,
489 encoding the *katG* catalase of *C. metallidurans*.

490
491 There are sufficient candidates for additional metal import pathways in *C. metallidurans*.
492 Unfortunately, a “clean” deletion of *mgtA* could not yet be obtained in the $\Delta 8$ mutant strain, so
493 that the strategy for the identification of more metal import systems in *C. metallidurans* need
494 to be changed. Nevertheless, the impaired fitness of the $\Delta 9$ mutant clearly demonstrates that
495 the seven secondary and two primary metal importers are required for multiple metal
496 homoeostasis in this bacterium, with more systems awaiting identification.

497
498 The metal transportome of *C. metallidurans*. With this, the inventory of the metal
499 transportome of *C. metallidurans* and the function of the individual components become
500 clear. The efflux transportome is already known to a large extent (3). At the core, surplus
501 metal cations are removed by P-type ATPases and CDF proteins: Zn(II) by ZntA, Cd(II) by
502 CadA, Cu(I) by CupA, Co(II) and Ni(II) by DmeF, and Fe(II) by FieF (3, 17, 35, 36). At higher

503 metal concentrations, powerful RND-driven transenvelope efflux systems such as CzcCBA,
504 CnrCBA, and CusCBA are synthesized, which, together with additional efflux systems in the
505 inner membrane such CzcP, CzcD and CnrT, remove toxic metals from the cytoplasm to the
506 periplasm and from here across the outer membrane to the outside. The most sophisticated
507 of these systems are encoded by the two native plasmids of *C. metallidurans* CH34 but there
508 are also some minor, maybe more “ancient” RND systems that are encoded by the
509 chromosomes (3, 37, 38).

510

511 This and the preceding publication (11) adds the metal uptake transportome to the picture. It
512 is composed of the seven secondary metal transporters ZupT, PitA, CorA₁₋₃, ZntB, HoxN,
513 and the two primary transporters MgtA and MgtB. *C. metallidurans* does not contain any
514 high-affinity and –specificity metal uptake systems such as ZnuABC for Zn(II) and NikABC
515 for Ni(II) (25, 39). Nevertheless, up-regulation of TonB-dependent outer membrane receptors
516 in the $\Delta 7$ mutant strain of *C. metallidurans* indicate the existence of additional metal uptake
517 channels, maybe as metal complexes with citrate or a (modified?) siderophore, and further
518 import into the cytoplasm by ABC importers. Overall, the metal transportome of
519 *C. metallidurans* transforms the metal composition and speciation in the environment, with
520 individual metal concentrations spanning a wide range between nM and mM, into the metal
521 content and bouquet composition in the periplasm and cytoplasm. The open questions at this
522 point concern the unknown members of the metal uptake transportome and which
523 periplasmic and cytoplasmic proteins interact with the transportome to remove surplus
524 metals, regulate its components at the transcriptional and post-transcriptional level, and,
525 finally, allocate essential metal cations to their client proteins (40, 41).

526

527

528

529

530

Acknowledgments

531 Funding for this work was provided by the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (Ni262/10).

532 We thank Grit Schleuder for skilful technical assistance.

533

534

Literature

535

536

- 537 1. **Nies DH.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS*
538 *Microbiol Rev* **27**:313-339.
- 539 2. **Kirsten A, Herzberg M, Voigt A, Seravalli J, Grass G, Scherer J, and Nies DH.**
540 2011. Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of
541 *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **193**:4652-4663.

- 542 3. **Scherer J, and Nies DH.** 2009. CzcP is a novel efflux system contributing to
543 transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Mol Microbiol* **73**:601-
544 621.
- 545 4. **von Rozycki T, and Nies DH.** 2009. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-
546 resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**:115-139.
- 547 5. **Legatzki A, Franke S, Lucke S, Hoffmann T, Anton A, Neumann D, and Nies DH.**
548 2003. First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal
549 resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation* **14**:153-168.
- 550 6. **Herzberg M, Dobritzsch D, Helm S, Baginski S, and Nies DH.** 2014. The zinc
551 repository of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **6**:2157-2165
- 552 7. **Imlay JA.** 2014. The mismetallation of enzymes during oxidative stress. *J Biol Chem*
553 **289**:28121-28128.
- 554 8. **Ma Z, Chandrangsu P, Helmann TC, Romsang A, Gaballa A, and Helmann JD.**
555 2014. Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol*
556 *Microbiol* **94**:756-770.
- 557 9. **Helbig K, Bleuel C, Krauss GJ, and Nies DH.** 2008. Glutathione and transition
558 metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:5431–5438.
- 559 10. **Große C, Schleuder G, Schmole C, and Nies DH.** 2014. Survival of *Escherichia coli*
560 cells on solid copper surfaces is increased by glutathione. *Appl Environ Microbiol*
561 **80**:7071-7078
- 562 11. **Herzberg M, Bauer L, Kirsten A, and Nies DH.** in preparation. Strategic deletion of
563 seven secondary metal transport systems in *Cupriavidus metallidurans* reveals
564 plasticity of the metal uptake transportome.
- 565 12. **Nies DH.** 2007. Bacterial transition metal homeostasis, p. 118-142. *In* Nies DH and
566 Silver S (ed.), *Molecular microbiology of heavy metals*, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin.
- 567 13. **Nies DH.** 2007. How cells control zinc homeostasis. *Science* **317**:1695-1696.
- 568 14. **Busch W, and Saier MHJ.** 2002. The transporter classification (TC) system. *Crit Rev*
569 *Biochem Mol Biol* **37**:287-337.
- 570 15. **Saier MHJ, Tran CV, and Barabote RD.** 2006. TCDB: the Transporter Classification
571 Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucl Acid Res*
572 **34**:D181-D186.
- 573 16. **Lee SM, Grass G, Haney CJ, Fan B, Rosen BP, Anton A, Nies DH, and Rensing**
574 **C.** 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS*
575 *Microbiol Lett* **215**:273-278.
- 576 17. **Wiesemann N, Mohr J, Grosse C, Herzberg M, Hause G, Reith F, and Nies DH.**
577 2013. Influence of copper resistance determinants on gold transformation by
578 *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Bacteriol* **195**:2298-2308.
- 579 18. **Herzberg M, Schüttau M, Reimers M, Grosse C, Schlegel HG, and Nies DH.**
580 2015. Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled
581 by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands. *Metallomics* **7**:632
582 - 649.
- 583 19. **Herzberg M, Bauer L, and Nies DH.** 2014. Deletion of the *zupT* gene for a zinc
584 importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* **6**:421-
585 436.
- 586 20. **Hmiel SP, Snavely MD, Florer JB, Maguire ME, and Miller CG.** 1989. Magnesium
587 transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three
588 magnesium transport loci. *J Bacteriol* **171**:4742-4751.
- 589 21. **Snavely MD, Florer JB, Miller CG, and Maguire ME.** 1989. Magnesium transport in
590 *Salmonella typhimurium*: $^{28}\text{Mg}^{2+}$ transport by CorA, MgtA, and MgtB systems. *J*
591 *Bacteriol* **171**:4761-4766.
- 592 22. **Snavely MD, Miller CG, and Maguire ME.** 1991. The *mgtB* Mg^{2+} transport locus of
593 *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem* **266**:815-823.
- 594 23. **Ishijima S, Uda M, Hirata T, Shibata M, Kitagawa N, and Sagami I.** 2015.
595 Magnesium uptake of *Arabidopsis* transporters, AtMRS2-10 and AtMRS2-11,
596 expressed in *Escherichia coli* mutants: Complementation and growth inhibition by
597 aluminum. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* **1848**:1376-1382.

- 598 24. **Remy L, Carriere M, Derre-Bobillot A, Martini C, Sanguinetti M, and Borezee-**
599 **Durant E.** 2013. The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter imports nickel
600 and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. *Mol Microbiol*
601 **87:730-743.**
- 602 25. **Patzer SI, and Hantke K.** 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its
603 regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28:1199-1210.**
- 604 26. **Handali M, Neupane DP, Roychowdhury H, and Yuki ET.** 2015. Transcriptional
605 regulation, metal binding properties and structure of Pden1597, an unusual zinc
606 transport protein from *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **290:11878-11889.**
- 607 27. **Hazlett KRO, Rusnak F, Kehres DG, Bearden SW, La Vake CJ, La Vake ME,**
608 **Maguire ME, Perry RD, and Radolf JD.** 2003. The *Treponema pallidum* tro operon
609 encodes a multiple metal transporter, a zinc-dependent transcriptional repressor, and
610 a semi-autonomously expressed phosphoglycerate mutase. *J Biol Chem* **278:20687-**
611 **20694.**
- 612 28. **Leach LH, Morris JC, and Lewis TA.** 2007. The role of the siderophore pyridine-2,6-
613 bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) in zinc utilization by *Pseudomonas putida* DSM 3601.
614 *Biometals* **20:717-726.**
- 615 29. **Bobrov AG, Kirillina O, Fetherston JD, Miller MC, Burlison JA, and Perry RD.**
616 2014. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both
617 contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in
618 mice. *Mol Microbiol* **93:759-75.**
- 619 30. **Krom BP, Warner JB, Konings WN, and Lolkema JS.** 2000. Complementary metal
620 ion specificity of the metal-citrate transporters CitM and CitH of *Bacillus subtilis*. *J*
621 *Bacteriol* **182:6374-6381.**
- 622 31. **Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, and Buchanan SK.** 2010. TonB-dependent
623 transporters: regulation, structure, and function, p. 43-60, *Ann Rev Microbiol*, vol. 64.
- 624 32. **Stork M, Bos MP, Jongerius I, de Kok N, Schilders I, Weynants VE, Poolman JT,**
625 **and Tommassen J.** 2010. An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis*
626 involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS pathogens* **6:e1000969.**
- 627 33. **Shaik MM, Cendron L, Salamina M, Ruzzene M, and Zanotti G.** 2014. *Helicobacter*
628 *pylori* periplasmic receptor CeuE (HP1561) modulates its nickel affinity via organic
629 metallophores. *Mol Microbiol* **91:724-735.**
- 630 34. **Schauer K, Gouget B, Carriere M, Labigne A, and de Reuse H.** 2007. Novel nickel
631 transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the
632 TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol* **63:1054-1068.**
- 633 35. **Legatzki A, Anton A, Grass G, Rensing C, and Nies DH.** 2003. Interplay of the
634 Czc-system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia*
635 *metallidurans*. *J Bacteriol* **185:4354-4361.**
- 636 36. **Munkelt D, Grass G, and Nies DH.** 2004. The chromosomally encoded cation
637 diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are
638 transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* **186:8036-8043.**
- 639 37. **Nies DH.** 2013. RND-efflux pumps for metal cations, p. 79-122. *In* Yu EW, Zhang Q,
640 and Brown MH (ed.), *Microbial efflux pumps: current research*. Caister Academic
641 Press, Norfolk, UK.
- 642 38. **Nies DH, Rehbein G, Hoffmann T, Baumann C, and Grosse C.** 2006. Paralogs of
643 genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J*
644 *Mol Microbiol Biotechnol* **11:82-93.**
- 645 39. **Navarro C, Wu LF, and Mandrand-Berthelot MA.** 1993. The *nik* operon of
646 *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport-system
647 for nickel. *Mol Microbiol* **9:1181-1191.**
- 648 40. **Totley S, Harvie DR, and Robinson NJ.** 2007. Understanding how cells allocate
649 metals, p. 3-36. *In* Nies DH and Silver S (ed.), *Molecular microbiology of heavy*
650 *metals*, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin.
- 651 41. **Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, and Robinson NJ.** 2009. Metalloproteins and
652 metal sensing. *Nature* **460:823-830.**

- 653 42. **Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, and van Gijsegem F.** 1985.
654 *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound
655 resistance to heavy metals. J Bacteriol **162**:328-334.
656
657

658

Tables

659 **Table 1. Bacterial strains used^a**

660

Bacterial strain	Genotype	Reference
AE104	Plasmid-free parent strain	(42)
$\Delta zupT$	$\Delta zupT$	(2)
$\Delta 5$	$\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3$	(11)
$\Delta 7$	$\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN$	(11)
$\Delta 7A$	$\Delta 7 \Delta mgtA::kan$	This study
$\Delta 8$	$\Delta 7 \Delta mgtB$	This study
$\Delta 9$	$\Delta 8 mgtA::kan$ or $\Delta 7 \Delta mgtB mgtA::kan$	This study

661 ^aFurther derivatives such as $\Delta 7 mgtA::kan$ or *lacZ* fusion strains are not listed. Construction
662 of these strain is described in the Supplementary Material.

663

664

665

666 **Table 2. Changes in the global transcriptome of the $\Delta 7$ mutant compared to the $\Delta zupT$**
 667 **single mutant and the parent strain AE104^a**
 668

$\Delta 7/\Delta zupT$		$\Delta 7/AE104$		AE104	Number	Remarks
EDTA	Zn(II)	EDTA	Zn(II)	EDTA/Zn(II)		
U	N	U, N	D, N	U, D, N	73	13 significant, e.g. 2 TonB-dependent receptors
U	D	N	N	N	2	No change significant
U	U	U, D, N	U, N	N	24	Flagellum synthesis
D	N	D, N	N	N	12	1 TonB-dependent receptor
D	N	U	N	N	6	<i>cobW1</i> -cluster
D	D	D	D	U, N	3	<i>hoxN</i> -scar
N	D	N (1 D)	N (8 D)	N (6 D)	154	Metabolism, translation and transcription
N	U	N (1 D)	N (1 U)	N (3 D)	33	Up-regulation < 3-fold
N	N	D	N	N, U	40	No clues
N	N	D	D	N, U	22	2 sulfate transporters
N	N	U	U, N	N	39	<i>aut1</i> -region
N	N	U	D	N	1	<i>zur</i> (result not significant)
N	N	N	D	U, D, N	36	Only 6 results significant but down-regulation > 0.42-fold
N	N	N	U	N	6	2 members of the <i>aut1</i> region
N	N	N	N	D	42	Biotin, respiration, <i>cadA</i> , <i>czcl₂C₂B₂'</i>
N	N	N	N	U	102	Iron import, e.g. <i>feo</i> , <i>hmuTUV</i> , <i>rpoI</i> , <i>furB</i> , siderophore production
N	N	N	N	N	5255	89.8 % off all genes

669 Regulation of 5850 chromosomal genes in the comparison (quotient of the mean signals Q)
 670 $\Delta 7/\Delta zupT$ and $\Delta 7/AE104$ in the presence of 50 μ M EDTA or 10 μ M Zn(II), and the
 671 comparison of these conditions in the parent strain is indicated as up-regulated (U, Q \geq 2),
 672 down-regulated (D, Q \leq 0.5) or not regulated (N). The number gives all genes regulated in
 673 the indicated pattern, including non-significant results (D < 1). The full results are given in the
 674 Suppl. Table S2.

675
 676

677 **Table 3. RT-PCR verification of gene array data^a**

678

Gene	$\Delta 7$		$\Delta zupT$		AE104	
	Zn	EDTA	Zn	EDTA	Zn	EDTA
<i>rpoZ</i> (control)	++	++	++	++	++	++
Rmet_1098, <i>cobW1</i>	/	++	/	+++	/	+
Rmet_0837	/	++	/	++	/	+(+)
Rmet_5640	/	(+)	/	/	/	(+)
Rmet_5890, <i>feoB</i>	/	+(+)	+	++	+	+(+)
Rmet_1533, <i>hoxN</i>	/	/	++	++	(+)	(+)
Rmet_1794	/	/	/	/	+	(+)

679

680 The cells were incubated in TMM in the presence of 10 μM Zn(II) or 50 μM EDTA, RNA was
681 isolated, reversely transcribed and amplified by PCR. Three experiments, positive control
682 DNA, negative control water. No signal, /; signal strength decreasing from +++ and ++ via
683 +(+) and + to (+), which represents a weak signal.

Table 4. Metal content of *C. metallidurans* mutant strains

Bacterial Strain	Mg, 10 ⁶	Fe, 10 ³	Zn, 10 ³	Cu, 10 ³	Co, 10 ³	Ni, 10 ³
AE104 a, b	11.5±1.1	743±70	72.8±9.5	9.00±1.53	3.32±0.71	4.68±2.21
Δ_{zupT} a, b	9.9±1.2	708±106	21.1±5.8	10.97±3.39	5.92±1.58	3.07±0.35
Δ7 (Δ6 Δ_{hoxN})	43.5±3.9	745±59	31.6±3.9	13.43±3.83	5.19±1.35	1.48±0.30
Δ8 (Δ7 Δ_{mgtB})	39.8±6.2	693±130	31.8±7.2	13.33±2.34	5.38±1.16	1.71±1.46
Δ9 (Δ8 Δ_{mgtA::kan})	30.4±5.1	553±118	23.2±4.5	10.17±2.21	4.20±1.17	1.30±0.93

As determined by ICP-MS. Some values are additional reproductions under parallel conditions with the new mutant strain, ^a(2) and ^b(19), published values (11) for AE104, Δ_{zupT} and Δ7 were provided for reference.

Table 5. Metal resistance of deletion strains in liquid culture^a

Bacterial strain	IC ₅₀ (µM)									
	Zinc	Cobalt	Cadmium	Copper	Gold ^b	Nickel	EDTA	H ₂ O ₂	Paraquat	
AE104 parent strain	442±40	94±6	93±10	906±82	25.3±2.1	348±16	249±9	2650±279	169±10	
AE104 Δ zupT	156±16	34±6	16±3	400±77	13.0±1.3	171±10	183±13	894±133	111±6	
Δ 7	53±4	8.3±1.6	2.19±0.4	265±32	14.8±2.6	145±16	205±22	989±102	135±4	
Δ 7 Δ mgfA:: <i>kan</i>	113±8	43±8	8.5±0.8	449±51	13.2±2.4	352±16	217±32	n.d.	n.d.	
Δ 8 (= Δ 7 Δ mgfB)	145±9	45±7	9.0±0.7	444±46	9.5±2.4	367±12	210±11	421±75	64±5	
Δ 9 (= Δ 8 Δ mgfA:: <i>kan</i>)	176±27	3.7±0.5	0.40±0.04	681±72	25.8±5.2	n.d.	406±43	491±96	71±10	

^a Dose response experiments were performed (n>3 per conditions) and the IC₅₀ values calculated. Bold-faced values indicate significant derivations from metal resistance of Δ 7. ^bAu(III)Cl₄⁻. The values for AE104, Δ zupT and Δ 7 are published (11) and given for reference. n. d., not done

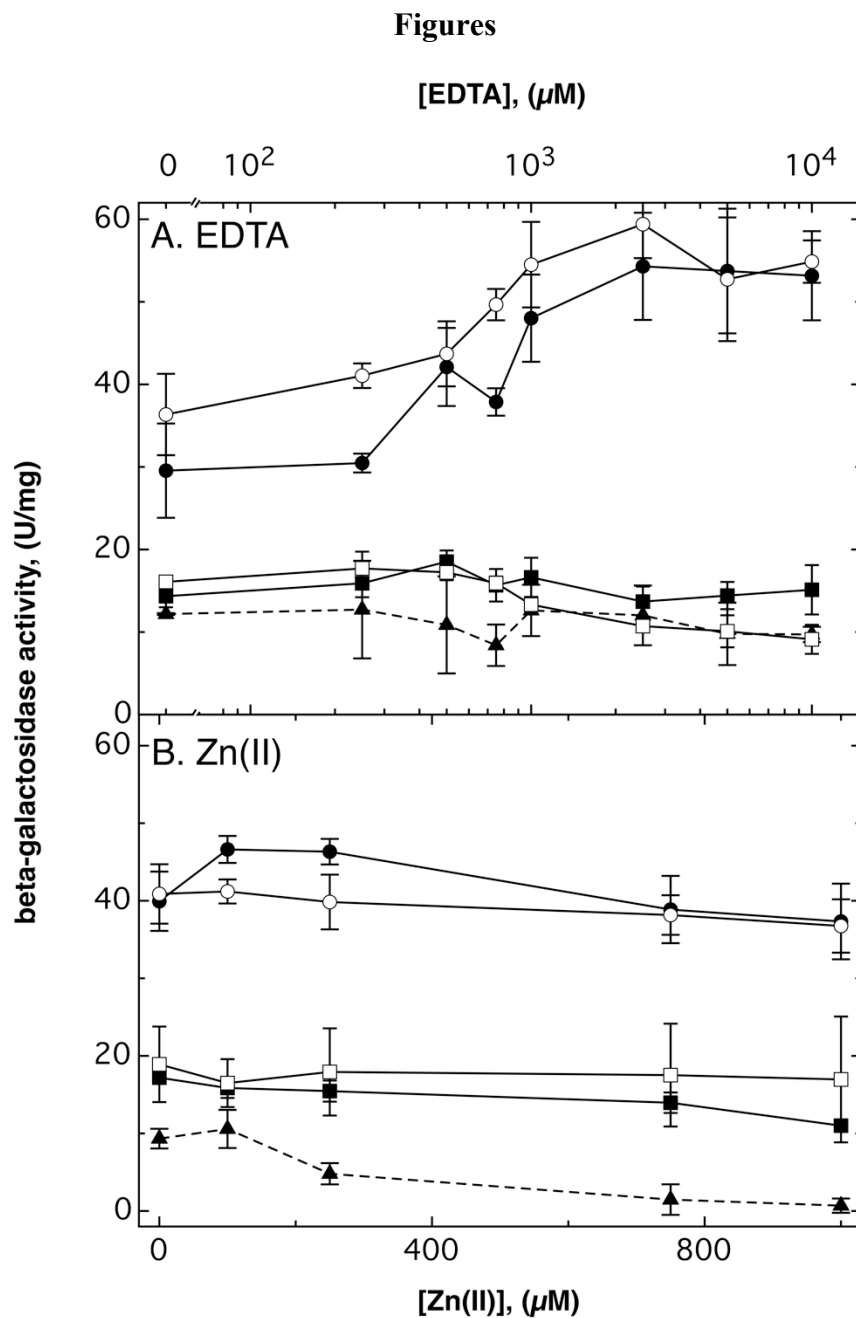


Figure 1. Regulation of *mgtA-lacZ* and *mgtB-lacZ* fusions in *C. metallidurans*. Exponentially growing cells of strain AE104 (closed circles or squares), the $\Delta 5$ mutant (open circles or squares), and the $\Delta 7$ mutant (closed triangles) carrying a *lacZ*-fusion inside the *mgtA* (circles, triangles) or *mgtB* (squares) gene were divided into parallel cultures and EDTA (Panel A) or zinc chloride (Panel B) were added. Incubation was continued with shaking at 30°C and the specific activity of the β -galactosidase was determined after 3 h, $n \geq 3$, deviation bars indicated.

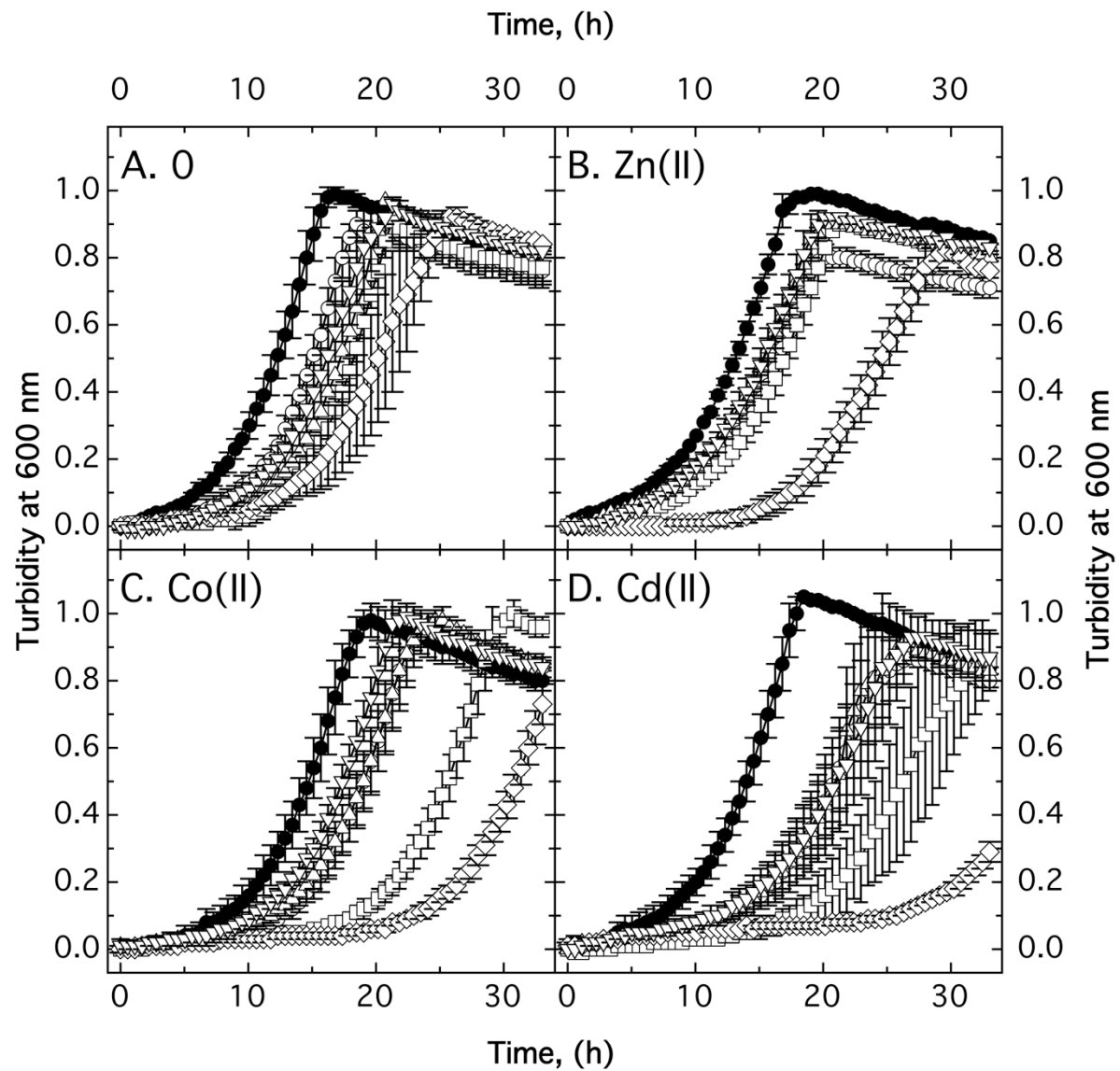


Figure 2. Growth impairment of the mutant strains. The strains AE104 (closed circles), Δ zupT (open circles), Δ 7 (open squares), Δ 8 (open triangles) or Δ 7 *mgtA::kan* (open inverted triangles) and Δ 9 (open diamonds) were cultivated in TMM at 30°C without further additions (Panel A), in the presence of 10 μ M Zn(II) (Panel B), 10 μ M Co(II) (Panel C) or 2.5 μ M Cd(II) (Panel D) and growth was measured as turbidity at 600 nm. n \geq 3, deviation bars indicated.

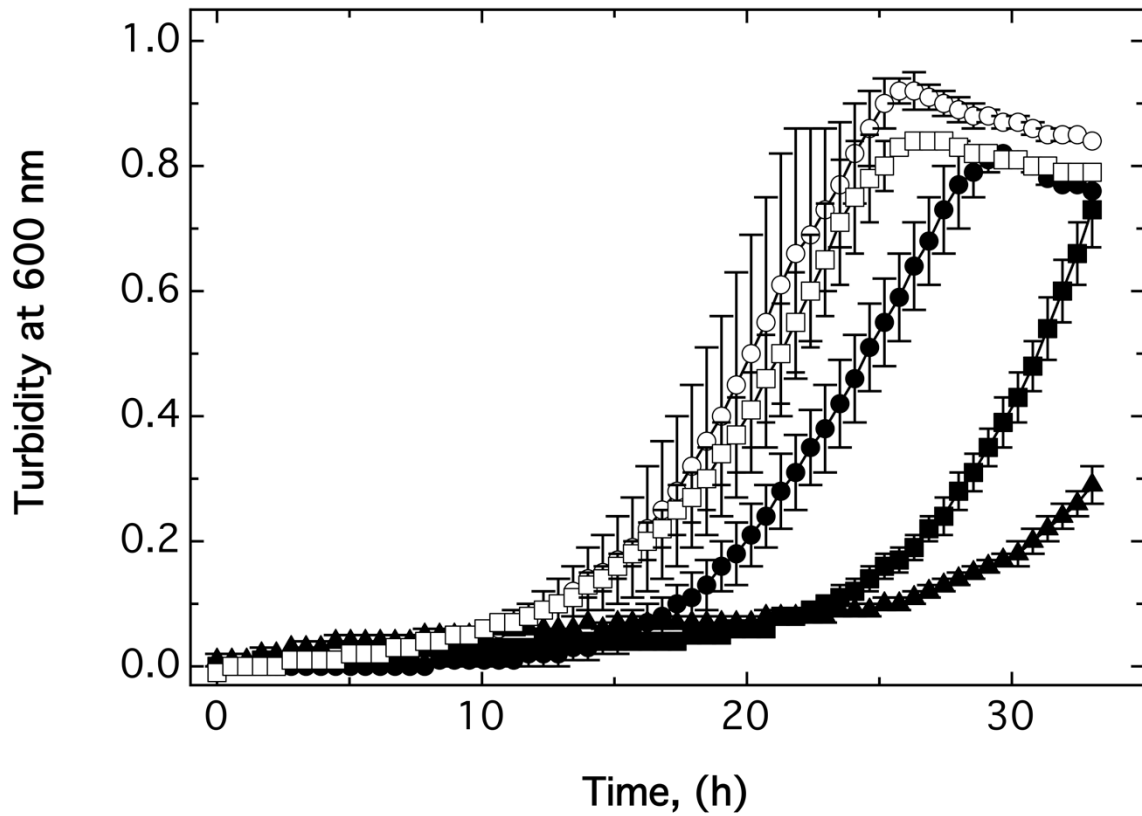


Figure 3. Growth impairment of the $\Delta 9$ mutant strain. The $\Delta 9$ mutant strain was cultivated in TMM at 30°C without further additions (open circles), or in the presence of 50 μM EDTA (open squares), 10 μM Zn(II) (closed circles), 10 μM Co(II) (closed squares), or 2.5 μM Cd(II) (closed triangles), and growth was measured as turbidity at 600 nm. $n \geq 3$, deviation bars indicated.

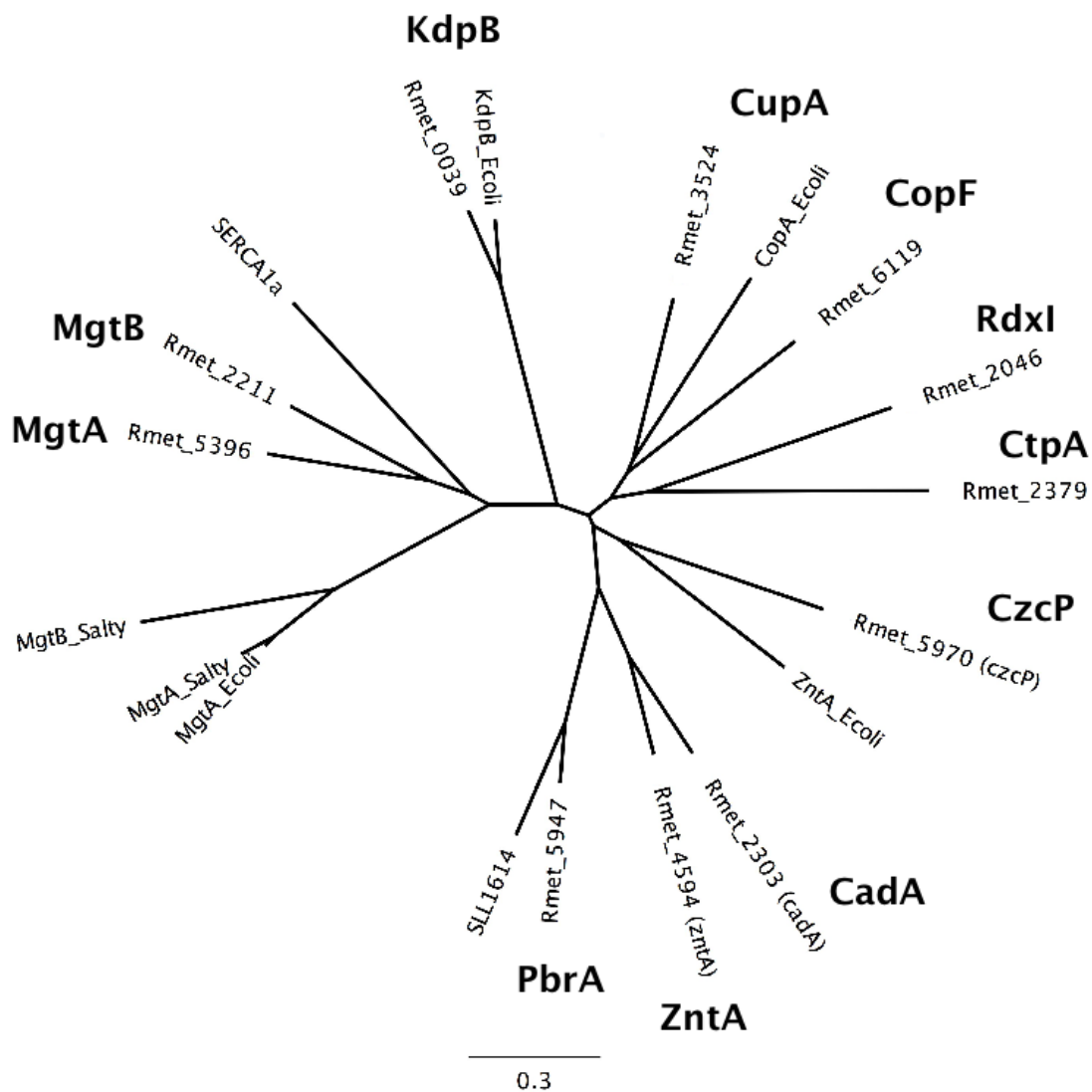


Figure 4. Relationship of the P-type ATPases from *C. metallidurans*. A multiple alignment of all P-type ATPases from *C. metallidurans* with all *E. coli* proteins, MgtA and MgtB from *Salmonella*, SERCA1a from *Rattus norvegicus* and SLL1614 from the cyanobacterium *Synechocystis* was performed, showing the position of the three PIB2-type ATPases for export of lead (PbrA), zinc (ZntA), and cadmium (CadA), the PIB4-type zinc exporter CzcP, the anabolic (CtpA, RdxI) and detoxifying (CopF, CupA) copper exporter, the part of the potassium/sodium exchange system KdpB, and finally of Rmet_2211 (MgtB) and Rmet_5396 (MgtA), which were much more related to SERCA1a than to MgtA and MgtB from *Salmonella*. Constructed with Geneious 6.1.6 (www.geneious.com), scale bar indicated.

Zusammenfassende Diskussion

Einfluss der sekundären und primären Aufnahmesysteme auf die Metallhomöostase von *C. metallidurans*

Die zelluläre Metallhomöostase beruht auf dem Wechselspiel von Aufnahme- und Efflux-Transportvorgängen zur Aufrechterhaltung eines dynamischen Gleichgewichtes und unterliegt einer meist Metall-spezifischen Regulation (Kirsten *et al.*, 2011). Neben diesen Transportvorgängen besitzen die Zellen ein Puffervermögen, um einströmende Metallionen zu speichern, zu verteilen und toxische Effekte zu minimieren (Herzberg *et al.*, 2014b). *C. metallidurans* CH34 ist durch eine hohe Anzahl von Effluxsystemen an Metall-kontaminierte Umgebungen adaptiert und eignet sich daher als Modellorganismus für die Metallhomöostase (Janssen *et al.*, 2010; von Rozycki und Nies, 2008). Jedoch müssen Organismen ihre zellulären Metallgehalte bzw. -konzentrationen auch bei hohen Schwankungen in ihrer Umwelt von picomolar bis millimolar kontrollieren. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass *C. metallidurans* durch sein Repertoire an Effluxsystemen hohen Konzentrationen biologisch-relevanter und nicht relevanter Metalle entgegenwirken kann. Diese Effluxsysteme sind meist auf ein Hauptelement abgestimmt und führen mit einem überlappenden Substratspektrum zur Anpassung an multiple toxische Übergangsmetall-Konzentrationen bis in den mittleren millimolaren Bereich ihrer Umwelt (Scherer und Nies, 2009). Sie erreichen ihre hohe Spezifität durch Substrat-spezifische Regulation (Grass *et al.*, 2000; Grosse *et al.*, 1999).

Organismen müssen jedoch die zelluläre Versorgung mit essentiellen Metallen als Kofaktoren für eine hohe Anzahl von biochemischen Reaktionen auch bei niedrigen Konzentrationen bis in den picomolaren Bereich in ihrer Umgebung sicherstellen. Um dieses dynamische Zusammenspiel näher zu betrachten, ist das Verständnis der Aufnahmesysteme zwingend notwendig. So war ein Hauptteil dieser Arbeit die Untersuchung der bisher nur annotierten sekundären und primären Aufnahmesysteme für divalente Kationen wie Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} sowie ihr Einfluss auf die Metallhomöostase von *C. metallidurans* AE104. Der Stamm AE104 wurde aufgrund eines verringerten Repertoires an Metalleffluxsystemen infolge des Fehlens der nativen Plasmide pMOL28 und pMOL30 im Vergleich zum Wildtypstamm CH34 verwendet.

Bioinformatische Analysen zeigen, dass *C. metallidurans* weder ein NRAMP (TC2.A.55) orthologes MntH wie *E. coli* noch ein SitABC Transporter zur Manganaufnahme besitzt (Boyer *et al.*, 2002; von Rozycki *et al.*, 2005). Ebenso verfügt *C. metallidurans* im Vergleich zu *E. coli* über keine Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD), besitzt jedoch eine FeSOD (Roux und Coves, 2002). Die Bestimmung und der Vergleich der zellulären Metallgehalte dieser beiden Organismen zeigte einen wesentlich geringeren Mangananteil (12-fach verringert, unter 1000 Atome pro Zelle) im Metallpool von *C. metallidurans* (Kirsten *et al.*, 2011). Weiterhin ist nur eine

geringe Anzahl von Mangan-abhängigen Enzymen bekannt und gleichzeitig existieren substituierende, funktional-homologe Eisen-abhängige Enzyme wie Superoxiddismutasen und Ribonukleotid-Reduktasen. So führt das Fehlen eines Haupt-Manganenzymes, wie der MnSOD, sowie bekannter Mangan-Aufnahmesysteme und die geringe Manganabundanz im relativen Vergleich der divalenten biologisch-relevanten Kationen im Metallpool zu einer untergeordneten Bedeutung der Manganhomöostase in *C. metallidurans* (Atta *et al.*, 1992; Kehres und Maguire, 2003, Martin *et al.*, 1986). Da NRAMP Transporter auch an der unspezifischen Cadmiumaufnahme beteiligt sind, liefert gleichzeitig das Fehlen von MntH in der Kombination mit den Effluxsystemen CadA, CzcD und CzcCBA möglicherweise einen Hinweis auf die hohe Cadmiumresistenz von *C. metallidurans* (Courville *et al.*, 2004; Kirsten *et al.*, 2011; Makui *et al.*, 2000; Scherer und Nies, 2009).

Weitere zellulär benötigte divalente Metallkofaktoren werden über diverse spezifische und unspezifische Transportsysteme von der Zelle aufgenommen. Im Fall von Magnesium (Mg^{2+}) als essentielles und meist abundantes divalentes Kation in biologischen Systemen sind drei unterschiedliche bakterielle Transportsysteme bekannt, zu denen MgtA / MgtB, MgtE und CorA („Co resistance A“) zählen (Maguire, 2006; Moomaw und Maguire, 2008; Romani, 2011). Im Genom von *C. metallidurans* konnte kein Gen identifiziert werden, das für ein MgtE kodiert. Jedoch ergaben Sequenz- und Motiphomologien das Vorhandensein von vier möglichen CorA Protein kodierenden Genen sowie für ein MgtA- und MgtB-Protein (TC3.A.3) (Kirsten *et al.*, 2011). Die CorA Transporter (TC1.A.35) gehören zur MIT (metal ion transporter) Proteinfamilie und gelten als Hauptaufnahmesystem für Magnesium (Knoop *et al.*, 2005). Ursprünglich wurden diese Transporter in Verbindung mit gesteigerter Kobaltresistenz benannt (Hmiel *et al.*, 1986; Nelson und Kennedy, 1971, Park *et al.*, 1976). Neben dem Magnesiumtransport sind die CorA Proteine in der Lage Übergangsmetallionen wie Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+} schnell und unspezifisch zu transportieren (Wang *et al.*, 2006). Strukturelle Analysen ergaben, dass CorA einen trichterförmigen pentameren Komplex in der Zytoplasma-Membran bildet, wobei jedes Monomer aus zwei transmembranen Helices (TMH) besteht. Der innere Raum wird hauptsächlich von TMH I gebildet, der von einem Ring, bestehend aus TMH II, umgeben ist (Niegowski und Eshaghi, 2007). Die Transportaktivität ist zytoplasmatisch durch Magnesiumbindung reguliert und führt durch Konformationsänderung zu einem *gating*-Mechanismus (Dalmas *et al.*, 2014). Die Expression des Gens dieses Transporters erfolgt in *E. coli* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium konstitutiv, wobei in anderen Organismen eine von *mgtE* bekannte *riboswitch* vermittelte Regulation vermutet wird (Cromie und Groisman, 2009; Groisman, 2001; Shin *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 1993). In dieser Arbeit konnte ausschließlich für *corA*₁ (Rmet_3052) eine Magnesium-abhängige Induktion von 40 auf 90 U/mg Trockengewicht unter Mangelbedingungen mittels

chromosomaler Reporterfusion gezeigt werden. Die Expression von *corA₂* (Rmet_0036), *corA₃* (Rmet_3287) und *zntB* (Rmet_0549) erfolgt unter den meisten getesteten Bedingungen konstitutiv. Ausschließlich hohe Zinkkonzentrationen sind in der Lage die Expression aller Transportergene herunter zu regulieren.

ZntB als viertes Mitglied der MIT Proteinfamilie weist nicht das typische konservierte „GMNFXMP(E/X)L“ Sequenzmotiv auf, sondern lediglich ein konserviertes „GMN“ Motiv und den ersten Prolinrest (Abbildung 6). In *S. enterica* Serovar Typhimurium wurde ZntB als Zink-Effluxsystem beschrieben (Worlock und Smith, 2002). Des Weiteren besitzt dieser Transporter drei Bindungsstellen für Zink, von denen zwei am Zinktransport beteiligt sein könnten, wobei unklar ist, ob es sich dabei um Zink-Efflux oder Zink-Aufnahme in *Salmonella* handelt (Wan *et al.*, 2011). So lassen lediglich die Expressionsmuster von *corA₁* in *C. metallidurans* auf ein Magnesium-reguliertes Aufnahmesystem schließen.

Zur weiteren Untersuchung wurde eine systematische Deletion aller annotierten Aufnahmesysteme durchgeführt. Dabei zeigte die Dreifachdeletion von *corA₁₋₃* und zusätzlich von *zntB* im AE104 Hintergrund keinen signifikanten Einfluss auf den zellulären Magnesiumgehalt (Herzberg *et al.*, eingereicht). Aufgrund dieser Daten kommt keines der vier Mitglieder der MIT Proteinfamilie als Haupt-Magnesium-Aufnahmesystem in Frage. Ebenso konnte kein direkter Einfluss von ZntB auf die Zinkhomöostase in *C. metallidurans* ermittelt werden. In wie weit diese vier Systeme Magnesium bzw. Zink transportieren können bleibt damit ungeklärt. Zukünftige *in vitro* Studien mit gereinigten und in Proteoliposomen rekonstituierten Transporterproteinen wären in der Lage auf biochemischer Ebene Informationen zur Transportkinetik und Substratspezifität zu liefern.

Die Expressionsdaten von ca. 20-25 U/mg Trockengewicht im Kontrollwert für die zwei verbleibenden möglichen Magnesium-Homöostasesysteme MgtA (Rmet_5396) und MgtB (Rmet_2211) führten unter fast allen getesteten Bedingungen zu keinen veränderten Induktionsraten (Große *et al.*, eingereicht). Dagegen wird das Gen des Magnesiumtransporters MgtA in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium während der Transkriptionsinitiation und am Elongationsschritt reguliert (Cromie und Groisman, 2009). Die Transkriptionsinitiation ist vom Zwei-Komponenten-System PhoP/PhoQ abhängig (Groisman 2001). Diese wird durch die Interaktion der membrangebundene Histidinkinase PhoQ mit Magnesiumionen, sauren pH und antimikrobiellen Peptiden im Periplasma initiiert (Bader *et al.*, 2005; Garcia Vescovi *et al.*, 1996; Prost *et al.*, 2007).

GMNFxxMPEL -Sequenzmotiv

```

CorA1 almpptliasiygmnfkvmpeidwaagypwailma
CorA2 ilavptvvslygmnfmpelkfhyaappvvgfta
CorA3 vfmpltlitgifgmnfarmplgepegfwsiglmg
ZntB lalpinivagffgmnvggipladhphgf-wvlvvlv
  
```

Abbildung 6: Vergleich der Aminosäuresequenz der vier Mitglieder der MIT-Proteinfamilie, CorA₁, CorA₂, CorA₃ und ZntB.

Die Aminosäuresequenzen wurden nach BLOSUM 62 mit CorA₁ als Referenz verglichen und ergaben Homologien von ca. 20 %. Dargestellt ist ein Ausschnitt Aminosäuresequenzen mit dem typisch konservierten CorA Sequenzmotiv (GMNFXMP(E/X)L) abweichend zum reduzierten ZntB Motiv (GMN + erstes Prolin).

Dabei kommt es zur Bindung von PhoP (*response regulator*) am *phoP*-abhängigen Promoter von *mgtA* (Shin *et al.*, 2006). Zusätzlich wird die Elongation in die Protein-kodierende Region durch einen zytoplasmatisch Magnesiumionen-bindenden *riboswitch* kontrolliert (Cromie *et al.*, 2006). In *C. metallidurans* konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt weder ein *riboswitch* identifiziert, noch eine PhoP/PhoQ-abhängige Regulation gezeigt werden, was die Expressionsdaten dieser Arbeit bestätigen (Große *et al.*, eingereicht). Die Deletion von *mgtB* führte in den Mehrfach-Deletionsmutanten zu keiner signifikanten Änderung des zellulären Magnesiumgehaltes. Obwohl es durch die zusätzliche Disruption von *mgtA* in der achtfach Deletionsmutant ($\Delta 8$, $\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN \Delta mgtB$) zu einem Absinken des Magnesiumgehaltes von $39,8 \pm 6,2 \times 10^6$ auf $30,4 \pm 5,1 \times 10^6$ Atome pro Zelle kommt, zeigt sich jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied (Herzberg *et al.*, eingereicht). Damit können neben den vier sekundären Transportern der MIT Proteinfamilie auch die primären Transporter MgtA und MgtB als Haupt-Magnesium-Aufnahmesystem in *C. metallidurans* ausgeschlossen werden. Dies legt die Existenz eines unbekanntes und nicht charakterisierten Magnesium-Aufnahmesystems nahe.

Eine weitere Möglichkeit wäre die unspezifische Aufnahme durch bisher für die Magnesiumaufnahme nicht charakterisierte sekundäre oder primäre Transporter anderer Metallkationen oder Metallkomplexe. Auch wenn keiner dieser sechs Transporter direkt als Haupt-Aufnahmesystem der Magnesiumhomöostase zugeordnet werden kann, führt die weitere systematische Deletion aller annotierten Aufnahmesysteme zu steigender Störung der Metallhomöostase auf physiologischer Ebene in *C. metallidurans* AE104. Diese Effekte zeigen sich in Zeit-abhängigen Wachstumskurven durch eine verlängerte Anlaufphase/Latenzphase (*lag phase*) und einem Absinken der Wachstumsrate (μ) (Große *et al.*, eingereicht; Herzberg *et al.*, eingereicht). Neben diesen untersuchten Aufnahmesystemen können weitere Proteine wie MgtC und CorC in die bakterielle Magnesiumhomöostase involviert sein (Ishijima *et al.*, 2015; Snavelly *et al.*, 1991). Drei chromosomal kodierte Gene (Rmet_0450, Rmet_1762 und Rmet_4765) möglicher CorC Orthologer und ein MgtC-ähnliches (Rmet_5334) kommen momentan als Kandidaten aufgrund konservierter CorC_HylC Domänen oder Sequenzhomologien in Frage. Deren möglicher Einfluss auf die Metallhomöostase muss jedoch erst experimentell gezeigt bzw. ausgeschlossen werden. Jedoch zeigte die Transkriptomanalyse der $\Delta 7$ Deletionsmutante ($\Delta zupT \Delta pitA \Delta corA_1 \Delta corA_2 \Delta corA_3 \Delta zntB \Delta hoxN$) keine Metall-abhängige Expression dieser Gene (Herzberg *et al.*, eingereicht).

Ein weiteres untersuchtes Aufnahmesystem ist PitA (Rmet_1973) der gleichnamigen Proteinfamilie. Neben dem Pst System (*pstSCAB*) ist PitA das zweite Haupt-Aufnahmesystem für anorganisches Phosphat in *E. coli*. Das *pst*-Operon ist Teil des Pho-Regulons und induzierbar bei niedrigen Phosphatkonzentrationen. Die Energetisierung ist ATP-abhängig und das Pst-Transportsystem ist ein Mitglied der ABC-Superfamilie (TC3.A.1) mit hoher Phosphataffinität

(Chan und Torriani, 1996; Gardner *et al.*, 2014; Webb *et al.*, 1992). Dagegen ist PitA (TC2.A.1) ein sekundärer Transporter, der durch die *pmf* (*proton motive force*) energetisiert wird und mit geringer Affinität zu Phosphat, und als konstitutiv exprimiert beschrieben wurde (Rosenberg *et al.*, 1977; Rosenberg *et al.*, 1979; Willsky *et al.*, 1973). Die konstitutive Expression wird jedoch kontrovers diskutiert. In späteren Jahren konnte eine Zink-abhängige Regulation und ein Einfluss auf den zellulären Magnesiumgehalt gezeigt werden. So ist der PitA Transporter in der Lage, Übergangsmetalle wie Zink (Zn^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}) als Phosphat-Komplexe aufzunehmen (Beard *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2008; van Veen *et al.*, 1994). Resultierend aus den Löslichkeitsprodukt-Konstanten legen die Bindungsaffinitäten der meisten Übergangsmetalle, wie die von Zink oder Magnesium zu Phosphat, nahe, dass der Großteil aller Metallkationen im TrisMM (in dieser Arbeit verwendetes Mineralsalzmedium mit 642 μM Phosphat) als Phosphatkomplexe vorliegen könnten (Kirsten *et al.*, 2011). Diese Annahme unterstützt die Bedeutung von PitA als wichtiges Metall-Phosphat-Aufnahmesystem in *C. metallidurans*.

In *C. metallidurans* ist das *pitA* Gen, mit einer Grundinduktion von ca. 100 U/mg Trockengewicht und einem Anstieg auf 500-600 Units bei steigenden Phosphatkonzentrationen, das am stärksten exprimierte Aufnahmesystem. Bei steigenden Zinkkonzentrationen wird *pitA* stark herunterreguliert (Kirsten *et al.*, 2011). Eine EDTA hervorgerufene Metall-Mangelsituation führt jedoch zu keiner verstärkten Expression. So scheint die Induktion in *C. metallidurans*, abweichend von der in *E. coli*, vorrangig Phosphat und nicht Zink- sowie Phosphat-abhängig zu sein (Herzberg *et al.*, eingereicht).

Das Fehlen des PitA Transporters führt in *E. coli* nur zu einer geringen Abnahme der zellulären Phosphatkonzentration, jedoch in *C. metallidurans* zu einer Verdopplung (Jackson *et al.*, 2008; Kirsten *et al.*, 2011). Eine Änderung des zellulären Phosphatgehalts liegt möglicherweise in einer veränderten Regulation des *pst*-Systems (Rmet_2179-85) begründet und kompensiert damit ein Absinken des Phosphatspiegels. Die *pho*-Region enthält in *C. metallidurans* die Gene für das PstABC-Transportsystem, das periplasmatische Phosphat-Bindeprotein (PBP) PhoS und die regulatorischen Proteine PhoU (Rmet_2181, Transkriptions-Regulator), PhoB (Rmet_2180, *response regulator*) und PhoR (Rmet_2179, Histidinkinase).

Der Einfluss dieses Phosphat-Metall-Transporters (PitA) auf die Magnesiumhomöostase konnte aber auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Doch im Gegensatz zur Deletion von *pitA* in *E. coli* führt diese in *C. metallidurans* nicht zu einem Absinken des zellulären Magnesiumgehaltes, sondern zu einer Verdreifachung von $11,8 \pm 1,1 \times 10^6$ auf $36,8 \pm 4,4 \times 10^6$ Atome pro Zelle (Herzberg *et al.*, eingereicht; Jackson *et al.*, 2008; Kirsten *et al.*, 2011).

Interessanterweise konnte diese Zunahme des Magnesiumgehaltes ebenfalls bei einer vierfach-Deletionsmutante ($\Delta e4$, $\Delta zntA$ $\Delta cadA$ $\Delta dmeF$ $\Delta fieF$) der chromosomal kodierten Gene der

Zinkresistenz vermittelnden-Effluxsysteme beobachtet werden (Herzberg *et al.*, 2014a). Die molekularen Hintergründe sind jedoch unklar. Der Anstieg der zellulären Magnesiumkonzentration korreliert jedoch mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Paraquat induziertem oxidativen Stress (Herzberg *et al.*, 2014a). Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass hohe zelluläre Magnesiumkonzentrationen möglicherweise präventiv vor reaktiven Sauerstoffspezies (*reaktive oxygen species*, ROS) und infolge von Falschmetallierung von Metalloenzymen schützen können (Imlay, 2014). Zusammen genommen weisen auch diese Daten auf eine verstärkte Expression oder posttranslationale Aktivierung eines unbekanntes bzw. noch nicht charakterisierten Magnesium-Aufnahmesystems hin (Große *et al.*, eingereicht).

Das HoxN Protein, ein Vertreter der NiCoT-(„Nickel-Cobalt-Transporter“) Familie stellt als weiterer möglicher Transporter ein Nickelaufnahmesystem dar, das Nickel für die Hydrogenase-Biosynthese bereitstellt (Eitinger *et al.*, 2005). Allerdings wurde die Funktion von HoxN als Aufnahmesystem für Kobalt- und Nickelionen in *Ralstonia eutropha* beschrieben, dessen HoxN kein Ortholog zu dem HoxN in *C. metallidurans* darstellt, sondern zu einer anderen NiCoT-Unterfamilie gehört. Die Expressionsdaten von *hoxN* aus *C. metallidurans* zeigen unter den getesteten Bedingungen lediglich ein schwach konstitutiv exprimiertes Gen und die zusätzliche Deletion von *hoxN* in den Mehrfach-Deletionsmutanten führte zu keinem veränderten zellulären Metallgehalt. Jedoch kommt es in einer sechsfach Deletionsmutante ($\Delta 6$, $\Delta zupT$ $\Delta pitA$ $\Delta corA_1$ $\Delta corA_2$ $\Delta corA_3$ $\Delta zntB$) zu einer verstärkten Expression von *hoxN* und bei zusätzlicher Deletion zu einer Abnahme der Fitness (verlängerte Latenzphase und geringere Wachstumsrate) und einer verringerten Kobalt- und Cadmiumresistenz (Herzberg *et al.*, eingereicht). *C. metallidurans* ist offensichtlich in der Lage, in der $\Delta 6$ Deletionsmutante HoxN als Transportsystem für divalente Metall-Kationen zu rekrutieren.

Der ZIP Transporter ZupT und seine Einflüsse auf die Zinkhomöostase von *C. metallidurans*.

Die Bezeichnung „ZIP“ steht für *Zrt-, Irt-like protein* (TC2.A.5) und reflektiert die ersten entdeckten Mitglieder dieser Transporterfamilie. Zrt1 und Zrt2 sind die primären Zinkaufnahmesysteme in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und Irt1 ist das wichtigste Eisenaufnahmesystem im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana*, aber auch für Irt1 konnte ein Zinktransport gezeigt werden (Eide, 2005). Die ZIP Transporter sind in allen Reichen des Lebens ubiquitär verbreitet und sind in fast allen Organismen an der Zinkaufnahme ins Zytoplasma beteiligt. In pflanzlichen Modellorganismen wie *A. thaliana* konnten 15 verschiedene ZRT/IRT Proteine identifiziert werden (Maser *et al.*, 2001). Das humane Genom beinhaltet 14 Gene die für ZIP Transporter der SLC39A Familie kodieren. Zusammen mit den 10 Mitgliedern (ZnTs) der SLC30A (CDF) Proteinfamilie sind sie die Hauptakteure der humanen Zinkhomöostase (Jeong und Eide, 2013; Myers *et al.*, 2012; Schweigel-Rontgen 2014).

Der erste entdeckte bakterielle ZIP Transporter war ZupT_{EC} aus *E. coli* (Grass *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde der physiologische Einfluss des ZIP Transporters ZupT_{CM} (Rmet_2621) auf die

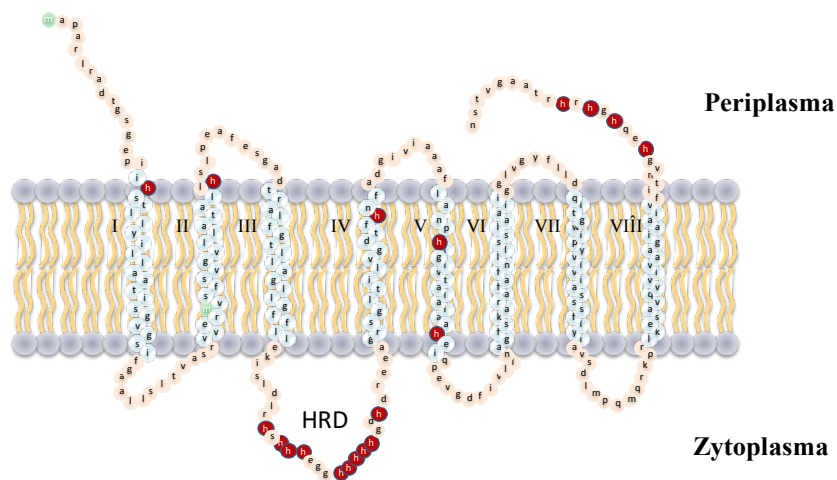


Abbildung 7: Topologiemodell des ZIP Transporters ZupT_{CM}.

Das dargestellte Topologiemodell beruht auf einer Phyre² Transmembranhelix (TMH) Vorhersage (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). ZupT_{CM} weist die typischen 8 TMHs (I-VIII), einen Histidin-reichen zytoplasmatischen Loop (HRD, *Histidin Rich Domain*) zw. THM III und IV, einen periplasmatisch lokalisierten N- und Histidin-reichen C-Terminus. Histidine sind rot und Methionine grün unterlegt.

Zinkhomöostase von *C. metallidurans* untersucht. Charakteristisch für diesen ZIP Transporter (Abbildung 7) und die meisten orthologen Permeasen ist eine vorhergesagte Topologie von acht TMHs, eine oft Histidin-reiche „variable Region“ des zytoplasmatischen *loops* zwischen TMH 3 und 4, ein extrazytoplasmatischer N- und C-Terminus sowie

konservierte Histidine und polare/geladene Aminosäurereste der TMH 4 und 5 (Eide 2005, Guerinot 2000). Die eukaryotischen ZIP Transporter sind sehr differenziert reguliert sowie Gewebe- und Kompartiment-spezifisch exprimiert bzw. lokalisiert und ihr Substratspektrum reicht von Zink und Eisen über Mangan, Kobalt und Cadmium (Girijashanker *et al.*, 2008; Ricachenevsky *et al.*, 2015). Auch wenn der erste bakterielle ZIP Transporter ZupT_{EC} als Zink-Aufnahmesystem entdeckt wurde, konnte in späteren Arbeiten ein breites Substratspektrum ähnlich einigen

eukaryotischen Vertretern gezeigt werden (Grass *et al.*, 2005a; Taudte und Grass, 2010). Es wird davon ausgegangen, dass Aminosäurereste des extrazytoplasmatischen *loops* zwischen TMH 2 und 3, der TMH 4 und 5, des Histidin-reichen zytoplasmatischen *loops* und/oder des N-Terminus (Abbildung 8) an der Substratspezifität und der Transportvermittlung unterschiedlicher Mitglieder dieser Proteinfamilie beteiligt sind (Milon *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2008; Nishida *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2000; Taudte und Grass, 2010). Der Transporter ZupT_{CM} verfügt im Vergleich zu den bisher untersuchten bakteriellen ZIP Transportern über eine ausgedehnte Histidin-reiche Region des zytoplasmatischen *loops* zwischen TMH 3 und 4 sowie einen Histidin-reichen C-Terminus (Cerasi *et al.*, 2014; Hudek *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2010; Taudte und Grass, 2010). Die in diesen Bereichen präsentierten, möglichen Metall-Bindestellen geben einen Hinweis auf eine abweichende Funktion in der Regulation des Transportes und der Zinkkoordinierung (Abbildung 8).



Abbildung 8: Vergleich der Aminosäuresequenz ausgewählter bakterieller ZIP Transporter.

Die Aminosäuresequenzen wurden nach BLOSUM 62 mit ZupT_{CM} als Referenz verglichen und ergaben eine Homologie von ca. 20 % der ZIP-Transporter. Dargestellt ist das Sequenzalignment von ZupT_{CM} (Rmet_2621) aus *C. metallidurans* CH34, ZupT_{EC} (b3040, ygiE) aus *E. coli* K12, ZupT_{SE} (ERS450001_04064) aus *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhimurium, ZIP11/63 (Npun_F2202/3111) aus *Nostoc punctiforme* PC73102 und ZIPB aus *Burdetella bronchiseptica* (NP_888945). Die Topologie und Anzahl der Transmembranhelices (TMHs) stützt sich auf Vorhersagen mittels Geneious 8.1.5 und Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Eingezeichnet und grün eingerahmt sind die konservierten Aminosäurereste der TMH 4 und 5 sowie des zytoplasmatischen *loops* der bakteriellen ZIP Transporter (nach Eide, 2005).

Wie aber für die meisten ZIP Transporter liegen auch für ZupT_{CM} aus *C. metallidurans* keine *in vitro* transportkinetischen und biophysikalischen Daten vor. Eine Folge daraus ist das Fehlen jeglicher Strukturinformationen zur Zinkkoordinierung und Identifizierung der Bindestellen dieser Transporterfamilie. Hintergründe sind schwierige Expression und funktionelle Rekonstitution der ZIP Transporter (Blindauer, 2015). Auch in dieser Arbeit war es nicht möglich trotz unterschiedlichster Ansätze ZupT_{CM} rekombinant weder in *E. coli* noch im nativen

Wirtsorganismus in ausreichender Menge für *in vitro* Studien als Volllängen-Protein oder segmentiert zu produzieren. Vielversprechend sind Expressionssysteme wie das *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System* (Taudte, 2010).

Alle in dieser Arbeit erhobenen *in vivo* Daten weisen auf eine primäre Involvierung von ZupT_{CM} in der Zinkhomöostase bzw. Zinkaufnahme sowie zytoplasmatische Zinkverfügbarkeit und -verteilung hin. So führt die Deletion von *zupT*_{CM} im Stamm AE104 zu einer Abnahme des zellulären Zinkgehaltes in der exponentiellen Wachstumsphase von ca. 70.000 auf 20.000 Atome pro Zelle im TrisMM (verwendetes Mineralsalzmedium mit ca. 200 nM Zink) wobei der Eisengehalt von ca. 700.000 Atomen pro Zelle sich nicht signifikant ändert. Die externe Zugabe von 100 µM ZnCl₂ führte im Wildtypstamm wie in der Deletionsmutante zu einem vergleichbaren Auffüllen des „Zinkpools“ auf ca. 120.000 Atome pro Zelle. Der Verlust der chromosomal kodierten Effluxsysteme (Stamm Δe4, Δ*zntA* Δ*cada* Δ*dmeF* Δ*fieF*) führt schon bei der Zugabe von 10 µM ZnCl₂ zu einem Anstieg der zellulären Zinkmenge auf ca. 230.000 Atome pro Zelle. Gleichzeitig kommt es bei Titrationsexperimenten mit einer Zunahme der externen Zinkkonzentration auf 150 µM (AE104) bzw. 15 µM (Δe4) zu einer Sättigung des Zinkpools im Wildtyps AE104 bei ca. 120.000 und in der Efflux-Deletionsmuante Δe4 bei ca. 210.000 Atomen pro Zelle (Herzberg *et al.*, 2014a; Herzberg *et al.*, 2014b). Dies weist auf ein durch die Effluxsysteme eingestelltes zelluläres Zinkequilibrium hin und doch sind die Zellen in der Lage bei Verlust dieser Systeme an einer höheren Schwelle den weiteren Zinkeinstrom zu verhindern. So kommt es lediglich zu einer Verdopplung bzw. Verdreifachung des intrazellulären Zinkgehaltes bei einer 50 - 500fachen Zunahme der externen Zinkkonzentration.

Anzumerken an dieser Stelle ist, dass die verwendeten Zinkkonzentrationen unter den letalen Dosen der jeweiligen Stämme liegen und ein exponentielles Wachstum gegeben ist. ZupT_{CM} ist damit zwar nicht *per se* notwendig für die Zinkaufnahme, jedoch wird es zum Auffüllen des Zinkpools bei Zinkmangel benötigt. Eine *zupT* Deletionsmutante scheint diesen zellulären Zinkmangel im TrisMM zwar zu großen Teilen kompensieren zu können und der Verlust des ZIP Transporters führt auf physiologischer Ebene nur zu einer 1-2 Stunden verlängerten Latenzphase (*lag phase*) bei gleicher Wachstumsrate (µ) in Zeit-abhängigen Wachstumskurven (Herzberg *et al.*, 2014b). Unter erhöhten Metall-Mangelbedingungen durch Zugabe von EDTA verlängert sich jedoch die *lag phase* und die Wachstumsrate verringert sich im Vergleich zum Wildtypstamm AE104. Scheinbar führt das fehlende Auffüllen des Zinkpools unter Mangelbedingungen in der *zupT* Deletionsmutante zu weiteren Defiziten in der Zinkhomöostase. Resultierend aus diesen Arbeiten entstand die Annahme der Existenz unterschiedlicher Zinkpools in *C. metallidurans*. Einem möglichen Pool mit der minimalen Anzahl von ca. 20.000 Zinkatomen pro Zelle von festgebundenem Zink in essentiellen strukturellen und enzymatischen Bindestellen und mindestens einem weiteren Pool mit

losegebundenem Zink von ca. 50.000, die zusammen eine Gesamtmenge von 70.000 Zinkatomen pro Zelle des Wildtypstammes im TrisMM ergeben.

Dieser weitere Zinkpool nimmt bei steigenden externen Zinkkonzentrationen unabhängig von ZupT_{CM} zu und wird durch die Regulation der Effluxsysteme im Gleichgewicht mit einer vermutlich optimalen Anzahl von 120.000 Atomen pro Zelle gehalten. Die Abhängigkeit des minimalen Zinkpools von ZupT unter Zinkmangel und die sich damit ergebene untere Grenze von 20.000 Zinkatomen pro Zelle zeigt sich unter anderem in der Bildung von *inclusion bodies* bzw. Aggregation der RpoC Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (RNAP).

RpoC ist die β' -Untereinheit des prokaryotischen RNAP Core-Enzyms, welches aus RpoA (α), RpoB (β), RpoC (β) und RpoZ (ω) als $\alpha_2\beta\beta'\omega$ Komplex aufgebaut ist. Dabei sind zwei Zinkionen fest in tetraedrischen Komplexen über jeweils vier Cysteine von RpoC (PDB: 4IGC; C₇₀, C₇₂, C₈₅, C₈₈ und C₈₁₄, C₈₈₈, C₈₉₅, C₈₉₈) gebunden (Murakami, 2013; Wu *et al.*, 1992). Die Assemblierung des heteropentameren Komplexes findet in folgender Reihenfolge statt $2\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\omega$, wobei ω die korrekte Faltung von β' vor dem Einbau in das $\alpha_2\beta$ Heterotrimer kontrolliert (Ganguly und Chatterji 2011, Sarkar *et al.*, 2013). Die Transkriptionsaktivität der RNAP ist zwar nicht abhängig von Zinkbeladung RpoCs, jedoch von dessen korrekter Faltung (King *et al.*, 2004, Markov *et al.*, 1999). Die Akkumulation der RpoC Untereinheit als *inclusion bodies* kann durch Zugabe hoher externer Zinkkonzentrationen (25 – 250 μ M) reduziert, aber nicht aufgehoben werden (Herzberg *et al.*, 2014a). Es ist damit nicht ausreichend, dass ein Zinkpool unspezifisch durch unbekannte Systeme bei extern erhöhten Zinkkonzentrationen aufgefüllt wird. Und obwohl ein $\Delta zupT$ Stamm für ein nahezu ungestörtes Wachstum ausreichend aktive RNAP synthetisieren kann, führt eine fehlende ZupT-vermittelte Zinkaufnahme und Verteilung zur Akkumulation von RpoC.

Weiterhin hat die *zupT* Deletion einen Resistenzverlust gegenüber H₂O₂ und Paraquat induzierten oxidativen Stress zur Folge (Herzberg *et al.*, 2014a). Paraquat erzeugt Superoxidradikale, welche schließlich durch Superoxiddismutasen (SOD) entgiftet werden (Hassan und Fridovich, 1979). *C. metallidurans* besitzt keine MnSOD aber eine zytoplasmatische FeSOD und eine periplasmatische CuZnSOD (SodC, Rmet_2757). Die Intensität der Enzymaktivität im Nativgel der FeSOD ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Herzberg *et al.*, 2014a). Dies weist auf eine verminderte Aktivität der CuZnSOD durch den hervorgerufenen Zinkmangel hin. Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalysen bestätigen diese Annahme in sofern, dass SodC mit einer geringeren Abundanz im Deletionsstamm (98 \pm 12 Proteine pro Zelle) im Vergleich zum Wildtypstamm (164 \pm 43 Proteine pro Zelle) gefunden wurde (Herzberg *et al.*, 2014b). Für SodC von *C. metallidurans* wird ein Sec-abhängiges Signalpeptid, wie für sein Ortholog aus *E. coli* bekannt, vorhergesagt (Sargent *et al.*, 2006). Da Sec-abhängige Proteine ungefaltet über die Zellmembran

transloziert werden, erfolgt die Insertion beider Metallkofaktoren (Kupfer und Zink) im Periplasma. Eine solche Beladung mit Kupfer konnte bereits für *Salmonella* gezeigt werden (Osman *et al.*, 2013). Die mögliche Beteiligung von ZupT an einem Belieferungsweg von Zink an SodC in *C. metallidurans* lässt auf eine zytoplasmatische Herkunft und wiederum auf einen ZupT-abhängigen Zinkpool schließen. Dieser könnte einen Teil des Zinkpools von festgebundenem Zink als Kofaktor in Proteinen darstellen. Unterschiedliche zelluläre Zinkpools scheinen auch in anderen Bakterien und eukaryotischen Zellen zu existieren (Maret, 2011).

Darüber hinaus führt die Deletion von *zupT* im CH34 Hintergrund zu einer Inkompatibilität mit dem Zink-Effluxsystem CzcCBA (TC2.A.6). Das *czc* System ist auf dem nativen Plasmid pMOL30 kodiert und das Fehlen von ZupT führt zum Verlust des Plasmids. Um diese Inkompatibilität zu verifizieren wurden die Strukturgene des RND-Systems *czcCBAD'* im AE104 Hintergrund Plasmid-kodiert und konstitutiv unter Kontrolle des *lac*-Promoters exprimiert. Durch Mangelsituationen der stationären Phase der Stammkulturen auf TrisMM Agarplatten und die konstitutive Synthese der CzcCBA Effluxpumpe kommt es offensichtlich zu einer zusätzlichen verringerten Zinkaufnahme. Dies führt nach mehreren Transfers der Stammhaltungsplatten in Kombination mit der *zupT* Deletion zum Verlust der Czc-vermittelten Zinkresistenz und der zentralen Komponente CzcA. Im Wildtypstamm AE104 ist diese konstitutive Expression der Czc-vermittelten Zinkresistenz zeitlich stabil. Das „Abschalten“ des Czc-vermittelten Zinkeffluxes unter diesen erhöhten Zink-Mangelbedingungen ermöglicht der *zupT* Deletionsmutante wahrscheinlich das Überleben. Obwohl das *czcCBAD'* kodierende Plasmid und das *czcA*-spezifische Transkript durch semi-quantitative RT-PCR nachweisbar waren, konnte kein CzcA Protein immunologisch detektiert werden. So scheint das „Abschalten“ bzw. der Verlust von CzcA auf einer verminderten Translation oder spezifischen Degradation zu beruhen. Die molekularen Mechanismen, die zu diesem „Abschalten“ führen, sind momentan jedoch unklar (Herzberg *et al.*, 2014a).

Die auftretende Mangelsituation durch die Stammhaltung auf TrisMM Platten konnte bei der Bestimmung der minimalen Inhibitorkonzentration (MIC) auf Festmedium bestätigt werden. Im Gegensatz zum AE104 ist eine *zupT* Deletionsmutante nicht mehr in der Lage bis zu einer Konzentration von 1,5 mM EDTA und damit steigender Zink-Mangelsituation auf Festmedium zu wachsen. Das Wachstum des $\Delta zupT$ Stammes wird dagegen schon bei 0,5 mM EDTA gehemmt. Durch Zugabe von Zink ins Medium sowie Komplementation mit konstitutiv exprimiertem *zupT* kann dieser Phänotyp komplementiert werden und bestätigt das ZupT als Zink-Aufnahmesystem unter Mangelbedingungen benötigt wird (nicht veröffentlichte Daten).

Die systematische Deletion aller neun untersuchten Aufnahmesysteme für divalente Kationen bestätigte eine spezifische Inkompatibilität von ZupT und dem CzcCBA-Effluxsystem. Ebenso führt die Bestimmung des zellulären Zinkgehaltes zu einem ausschließlich durch die Deletion von

zupT hervorgerufenen zellulären Zinkmangel. Mit ca. 23.000 Zinkatomen pro Zelle kommt es auch in der neunfach Deletionsmutante ($\Delta 9$, $\Delta zupT$ $\Delta pitA$ $\Delta corA_1$ $\Delta corA_2$ $\Delta corA_3$ $\Delta zntB$ $\Delta hoxN$ $\Delta mgtB$ $mgtA::Dis$) zu keinem weiteren Absinken des zellulären Zinkgehaltes (Große *et al.*, eingereicht). Alle Daten weisen damit auf ein unbekanntes Zink-Aufnahmesystem hin, welches in der Lage ist, die Zellen unabhängig von ZupT mit mindestens 20.000 Zinkatomen pro Zelle zu versorgen. Jedoch kann dieses unbekanntes System die zelluläre Funktion in der Zinkaufnahme und -verteilung von ZupT nicht vollständig komplementieren sowie unter steigenden Mangelbedingungen die Zelle nicht mit ausreichend Zink versorgen.

Ein *bottom-up* Proteomikansatz wurde in dieser Arbeit durchgeführt um das synthetisierte Proteom während der exponentiellen Wachstumsphase zu quantifizieren und die Anzahl der Zink-abhängigen Proteine sowie weitere in der Zinkhomöostase involvierten Systeme von *C. metallidurans* AE104 und vergleichend zur *zupT* Deletionsmutante zu ermitteln. Dieser Ansatz führte zur Identifizierung und Quantifizierung von ca. 60 % des theoretisch-maximalen Proteoms (3469 von 5804 Proteinen) (Herzberg *et al.*, 2014b). Um die Anzahl der Zink-bindenden und -beinhaltenden Proteine zu bestimmen und in Korrelation mit der Anzahl zellulärer Zinkionen zu setzen, wurden bekannte *E. coli* Orthologe und in der NCBI Datenbank annotierte Sequenzen herangezogen (Katayama *et al.*, 2002). Die Auswertung ergab, dass der Stamm AE104 109.000 ± 11.000 und der $\Delta zupT$ Stamm 123.000 ± 14.000 Zink-bindende Proteine pro Zelle enthalten. Ausgehend von jeweils nur einer Zink-Bindestelle pro Protein ergibt dies eine untere Grenze und die mögliche Anzahl an Bindestellen liegt wahrscheinlich höher, da manche dieser Proteine, wie z.B. RpoC, mehr als nur eine Zink-Bindestelle pro Monomer besitzen. Dies führt zur Aussage, dass beide Stämme eine höhere Anzahl an Zink-Bindestellen vorhalten als zelluläre Zinkatome pro Zelle besitzen. Bei externer Zugabe von Zink (100 - 150 μM) steigt die Anzahl der Atome pro Zelle im AE104 von ca. 70.000 auf ca. 120.000 und erreicht damit die Anzahl der Zink-bindenden Proteine. Der $\Delta zupT$ Stamm liegt mit 20.000 Zinkatomen pro Zelle im TrisMM mit ca. 200 nM Zink weit unter der Sättigung der Zink-Bindestellen. So besitzt *C. metallidurans* vielleicht ein Zinkrepositorium, gebildet aus den Zink-Bindestellen der zytoplasmatischen Proteine.

Die Hypothese des Repositoriums geht in diesem Fall von einer hohen Anzahl nicht gesättigter Bindestellen aus. Diese Bindestellen könnten für eine schnelle und unspezifische Bindung von einströmenden Übergangsmetallen dienen, um toxische Effekte zu minimieren. Diese Metalle können dann exportiert oder als Kofaktor in Enzymen mit niedrigem Metallierungsgrad verwendet werden, wie *in vivo* beschrieben (Anjem *et al.*, 2009). So ist das Zinkrepositorium möglicherweise ein Puffer zwischen den Transportsystemen für Aufnahme und Efflux. Gleichzeitig kann die höhere Anzahl von Zink-Bindestellen zu Atomen pro Zelle eine Erklärung für die geringe freie zelluläre Zinkverfügbarkeit liefern. Da regulatorische Zink-Bindestellen der *flux control* von

Transportproteinen, der Regulatoren wie ZntR und Zur sowie primäre Substrat-Bindestellen der Zink-Effluxsysteme als Teil des Repositorium gesehen werden können, erklärt dies möglicherweise auch die femtomolare Sensitivität von Regulatorproteinen selbst (Nies 2007b, Outten und O'Halloran 2001). Die dadurch erzeugte niedrige, freie Zinkverfügbarkeit von 10^{-12} – 10^{-10} M korreliert mit Proteinaffinitäten zu Zink von 10^{-11} M und verhindert in Verbindung mit Bindepräferenzen Falschmetallierungen von Proteinen bzw. Enzymen (Foster *et al.*, 2014; Krezel und Maret, 2006; Maret, 2004; Maret, 2015; Wang, *et al.*, 2011). Zusätzlich können organische Säuren, inorganische Liganden, Oberflächen-Interaktionen von Makromolekülen, kleine Moleküle wie Aminosäuren und Glutathion (GSH) oder Bacillithiol in diesem und in anderen Organismen am Repositorium bzw. an der Pufferung des Zinkpools beteiligt sein (Foster *et al.*, 2014; Helbig *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2014).

Um das Bild von ZupT_{CM} in der Zinkhomöostase weiter zu vervollständigen, ist das Wissen über die Regulation und Kontrolle zwingend, da die bakteriellen ZIP Transporter sich in ihrer Funktion der Zinkhomöostase unterscheiden. So ist das Gen *zupT* für den ZIP Transporter in *Salmonella* und *E. coli* konstitutiv exprimiert und im Frischwasser Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* induzierbar bzw. durch Zink reguliert (Cerasi *et al.*, 2014; Grass *et al.*, 2005a; Hudek *et al.*, 2013). In *E. coli* ist ZupT als gering affines Zink-Aufnahmesystem im Vergleich zum hoch affinen induzierbaren ABC-Transporter ZnuABC beschrieben (Hantke, 2005; Patzer und Hantke, 1998; Sabri *et al.*, 2009). *C. metallidurans* besitzt keinen orthologen ZnuABC ähnlichen Transporter und damit kein hochaffines Zur-reguliertes ABC-System (Patzer und Hantke, 1998).

Alle in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass ZupT_{CM} nicht konstitutiv, sondern induzierbar reguliert wird. Das Gen dieses Transporters wird mit steigenden Zinkkonzentrationen herunterreguliert und durch Zink-Mangelsituationen, hervorgerufen durch Chelatoren wie EDTA, DPTA, TPEN oder Phosphat, herauf-reguliert (Kirsten *et al.*, 2011). Mittels EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) und chromosomaler Reporterfusion konnte gezeigt werden, dass Zur_{CM} (Rmet_0128) an der Operatorregion stromaufwärts von *zupT*_{CM} bindet und die Regulation Zur-abhängig erfolgt (Schmidt *et al.*, 2014). Zur gehört als Mitglied der Fur-Familie zu den Transkriptionsregulatoren, welche in vielen Fällen als Repressor fungieren. Diese Familie der Metalloregulatoren umfasst Sensorproteine für Eisen (Fur), Zink (Zur), Mangan (Mur), Nickel (Nur) und oxidativen Stress (PerR) (Ahn *et al.*, 2006; Hantke, 2005; Imlay, 2015; Stojiljkovic *et al.*, 1994). Durch Promoterstudien konnte diese Zur_{CM}-abhängige Regulation bestätigt werden und gleichzeitig eine rückkoppelnde Induktion von *zupT*_{CM} durch dessen Verlust gezeigt werden. So führt die Deletion von *zupT* zu einem Zinkmangel, gezeigt durch das Absinken des zellulären Zinkgehaltes auf 20.000 Atome pro Zelle, welcher durch Zur erkannt wird und die Expression am

zupT Promoter induziert. Ähnliche Induktionsraten ruft der Verlust des Repressors (Deletion von *zur*) hervor bzw. eine durch EDTA erzeugte Zink-Mangelsituation (Herzberg *et al.*, 2015).

Um weitere an der Zinkhomöostase beteiligte, Zur-regulierte oder Zur-unabhängige, Faktoren und Systeme zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit vergleichende Transkriptomstudien (*microarray*) vom Stamm AE104 und $\Delta zupT$ durchgeführt (Herzberg *et al.*, 2015). Sieben Gene wurden signifikant und spezifisch unter Zinkmangel (50 μM EDTA im Vergleich zu 10 μM Zn^{2+}) verstärkt exprimiert. Sechs von diesen Genen sind in einem möglichen hexacystronischen Operon (Op0317f) kodiert, das siebte Gen (Rmet_1104) ist gegenläufig orientiert (Op0318r). Rmet_1104 kodiert für ein TonB-abhängiges Protein der äußeren Membran und ist vielleicht, wie für *Anabaena* sp. gezeigt, am Zinktransport über die äußere Membran beteiligt (Napolitano *et al.*, 2012). Das erste Gen (Rmet_1098) des Op0317f-Operons kodiert für CobW₁, ein YeiR Ortholog aus *E. coli* und Mitglied der COG0523 Proteinfamilie der GE3-GTPasen. Für YeiR wurde eine Involvierung in der Zinkhomöostase als mögliches Metallochaperon beschrieben (Blaby-Haas *et al.*, 2012). Die folgenden fünf Gene stromabwärts dieses *cobW*₁-Clusters kodieren für Zink-abhängige paraloge Genprodukte, die an anderen Stellen des Genoms kodiert werden. Rmet_1099 kodiert für eine Cyclohydrolase, Rmet_1100 für eine Cystein-tRNA Synthetase, Rmet_1101 für eine 6-Pyrovoyl-Tetrahydropterin Synthase, Rmet_1102 für eine Carboanhydrase und Rmet_1103 für eine Dihydroorotase.

Chromosomale sowie Promoter-Reportergenfusionen bestätigten die Zink-abhängige Regulation von *cobW*₁. Unter Zink-Mangelbedingungen kommt es zu einer starken Zunahme der Expressionsraten und einer Herunter-Regulation durch steigende Zinkkonzentrationen. Der durch den $\Delta zupT$ Hintergrund hervorgerufenen Zinkmangel zeigt eine weitere Steigerung der Expressionsraten im Vergleich zum AE104. Gleichzeitig konnte eine Zur-abhängige Regulation auch für *cobW*₁ gezeigt werden. Die Unterbrechung des Gens *cobW*₁ (Disruption) '' mittels einer Vektorinsertion hatte in physiologischen Untersuchungen einen sensitiven Phänotyp gegenüber CoCl_2 und CdCl_2 zur Folge. Diese Sensitivität erreicht nicht ganz das Niveau einer *zupT* Einzeldelation, aber eine Doppeldelation ($\Delta zupT$ *cobW*₁::Disruption) zeigt keine additiven Effekte (Herzberg *et al.*, 2015).

Zusammenfassend kann von einer kooperativen Funktion des Aufnahmesystems ZupT und des möglichen Zinkchaperons CobW₁ unter Mangelbedingungen in der Zinkhomöostase ausgegangen werden. Neben der CobW₁ und YeiR zugehörigen Unterfamilie COG0523 der G3E-GTPasen existieren drei weitere Familien, deren repräsentative Mitglieder HypB, UreG und MeaB an der Insertion von Nickel oder Kobalt als Metallochaperone in Hydrogenasen, Ureasen oder Methalmalonyl-CoA Mutasen beteiligt sind (Hubbard *et al.*, 2007; Sydor *et al.*, 2014, Zambelli *et al.*, 2009). So könnte das *cobW*₁-Cluster für ein mögliches Zinkchaperon (CobW₁) kodieren,

welches die genannten fünf Proteine dieses Clusters unter Zink-Mangelbedingungen mit Zn^{2+} beliefert. Der ähnliche Phänotyp, hervorgerufen durch Verlust beider Einzelsysteme, liefert einen zusätzlichen Hinweis auf eine ZupT-abhängige Herkunft des Zinks. Erste Daten der CobW₁ Kofaktor- und Bindekapazitätsbestimmung bestätigen die mögliche Funktion als Zinkchaperon (nicht veröffentlichte Daten). Auch in anderen Organismen konnten ähnliche Operonregionen mit *cobW*-Orthologen und Zink-abhängigen paralogen Genprodukten sowie vorhergesagten Zur-Bindestellen identifiziert werden (Haas *et al.*, 2009).

In *C. metallidurans* ist *zur* selber als erstes Gen in einem weiteren Cluster mit *cobW* orthologen kodiert (Haas *et al.*, 2009). Dieses Cluster ist ebenfalls als mögliches Operon (Op0032r) aufgebaut und in der regulatorischen Region stromaufwärts von *zur* befindet sich eine vorhergesagte Zur

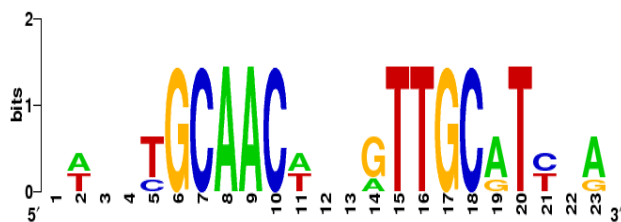


Abbildung 9: Darstellung des konservierten Zur-Bindemotivs. Die stromaufwärts gelegenen regulatorischen Bereiche der Gene *zupT* (Rmet_2621), *cobW*₁ (Rmet_1098), *zur* (Rmet_0128) und *cobW*₃ (Rmet_0125) sind mit Hilfe des Onlineservers WEBLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu>) dargestellt und weisen ein konserviertes Zur-Bindemotiv, T/C GCAAC A/T XX G/A TTGC A/G T C/T, auf. Verändert nach Haas *et al.*, 2009.

Bindestelle. Stromabwärts von *zur* (Rmet_0128) sind die Gene *cobW*₂ (Rmet_0127) und *cobW*₃ (Rmet_0125) lokalisiert, welche für weitere Mitglieder der COG0523 Proteinfamilie kodieren, sowie das Gen *dksA* (Rmet_0124) und ein Gen für ein TonB-abhängiges Protein der äußeren Membran (Rmet_0123). Eine weitere mögliche Zur Bindestelle befindet sich stromaufwärts von *cobW*₃.

Somit ergibt die bioinformatische Auswertung der möglichen Zur-Bindestelle stromaufwärts in den regulatorischen Bereichen der Gene *zur* selbst, *cobW*₁, *cobW*₃ und *zupT* ein konserviertes Bindemotiv (Abbildung 9). Zusätzlich konnten die Proteomanalysen zeigen, dass CobW₂ in einer Kopienzahl von 2000, CobW₃ von 300, DksA von 3000 und Zur von 100 Proteinen pro Zelle, unabhängig von der *zupT* Deletion, ohne erzeugte Mangelbedingungen in *C. metallidurans* vorliegen (Herzberg *et al.*, 2014b). Aufgrund der Lokalisation in einem Zur-regulierten Gencluster und damit als möglicher Bestandteil des Zur-Regulons, nehmen diese beiden weiteren potenziellen Zinkchaperone CobW₂ und CobW₃ eine denkbare Rolle im Zinkrepositorium ein. Im Vergleich zu CobW₁ weist die Aminosäuresequenz beider Chaperone ausgedehnte Histidineinschübe (*histidine stretches*) auf. Auch hier konnten die ersten Daten zur Kofaktorbestimmung eine Zinkpräferenz mit höherer Bindekapazität bestätigen (nicht veröffentlichte Daten).

In *E. coli* ist DksA ein globaler Regulator der mit ppGPPP als Kofaktor interagiert und über ein Zinkfingermotiv die RNA-Polymerase mit Einfluss auf die Kinetik der Transkriptionsinitiation bindet (Chandrangsu *et al.*, 2011). DksA (Rmet_0126) besitzt im Vergleich zu drei weiteren Genen auf dem Chromosom 2 die für DksA Paraloge (Rmet_4453, Rmet_4470 und Rmet_4602) kodieren kein Zinkfingermotiv (CX₂T-X₁₆-SX₂A statt CcXCh-X₁₆-CX₂C) und wurde als einziges dieser vier

in hoher Kopienzahl in der Proteomanalyse gefunden (Herzberg *et al.*, 2014b; Perederina *et al.*, 2004; Vassylyeva *et al.*, 2004). In welchem Zusammenhang dieser globale Regulator mit der Zinkhomöostase steht, muss jedoch noch ermittelt werden. Da die Kopienzahl von DksA nahe der Anzahl der RNA-Polymerase-Komplexe liegt, existiert ein potentieller Kontrolleinfluss auf höherer zellulärer Hierarchie-Ebene.

Mit der in dieser Arbeit erhobenen und publizierten Daten, fügt sich ein Bild der Zinkhomöostase aus Efflux- und Aufnahmesystemen, verbunden mit dem Zinkrepositorium von *C. metallidurans*, zusammen (Abbildung 10). So führt einerseits der auftretende Zinkmangel, wie durch EDTA ausgelöst, zu einer Abnahme des zytoplasmatischen Zinkgehaltes von ca. 70.000 auf ca. 42.000 Atomen pro Zelle (Herzberg *et al.*, 2014a). Dies wird unter anderem durch den globalen Zinkregulator erkannt und Zur-abhängige Gene werden induziert (Schmidt *et al.*, 2014). Zu diesen zählt *zupT* und das *cobW*₁-Cluster. Unter diesen Bedingungen ist ZupT essentiell, um ein weiteres Absinken auf ca. 20.000 Zinkatome pro Zelle und damit einhergehende Störungen der Zinkhomöostase zu verhindern (Herzberg *et al.*, 2014a). Dabei sind ein oder mehrere noch unbekannte Systeme in der Lage die Zellen mit der möglichen Untergrenze von 20.000 Zinkatomen zu versorgen. Gleichzeitig kommt es zur verstärkten Synthese des möglichen Zinkchaperons CobW₁ und der dadurch ermöglichten Versorgung der Zink-abhängigen Proteine dieses Clusters. Die im Zur-Cluster kodierten Genprodukte CobW₂ und CobW₃ könnten hier als weiterer Bestandteil des Zinkrepositoriums durch Speicherung, Pufferung und Verteilung der Zinkionen fungieren (Abbildung 10).

Auf der anderen Seite führt ein erhöhter Einstrom von Zinkionen in den zellulären Metallpool zu einer Herunter-Regulation der Zur-abhängigen Gencluster sowie der meisten Aufnahmesysteme für divalente Kationen (Kirsten *et al.*, 2011). Diese zunehmenden Zinkmengen führen zu einem Auffüllen des Repositoriums von ca. 70.000 auf ca. 120.000 Zinkatome pro Zelle. Gleichzeitig kommt es zur meist MerA-Typ-Regulator-abhängigen Induktion der Gene kodierend für die P_{IB2}-Typ-ATPasen, ZntA und möglicherweise CadA (Brocklehurst *et al.*, 1999; Legatzki *et al.*, 2003b; Wang, *et al.*, 2012). Der vermittelte zytoplasmatische Efflux dieser beiden Systeme hält das Repositorium im Equilibrium bei ca. 120.000 Atomen pro Zelle. Zusammen mit den beiden CDF-Proteinen, DmeF und FieF, stellen diese vier Systeme aufgrund überlappender Substratspektren und Komplementation das erste Level der Zinkresistenz durch die Detoxifizierung des Zytoplasmas dar (Scherer und Nies, 2009). Das zweite Resistenzlevel wird durch einen periplasmatischen Efflux des RND-Systems CzcCBA gestellt. Dieses System kann parallel mittels periplasmatischer Zinkbindung durch das Zwei-Komponenten-System CzcRS induziert werden und ermöglicht *C. metallidurans* CH34 das Wachstum vom hohen µM bis in den mittleren mM Bereich externer Zinkkonzentrationen (Grosse *et al.*, 2004; Legatzki *et al.*, 2003b). Dabei bindet CzcR (*response*

regulator) an einen von drei Promotoren des *czcCBA*-Operons sowie im Promoterbereich der P_{IB4}-Typ-ATPasen CzcP (Abbildung 10).

Dieses komplexe und verflochtene Zusammenspiel unterschiedlicher Komponenten der Zinkhomöostase macht diesen Organismus zu einem Überlebenskünstler in Zink-kontaminierten Umgebungen sowie in Zeiten des Mangels (Nies, 2000).

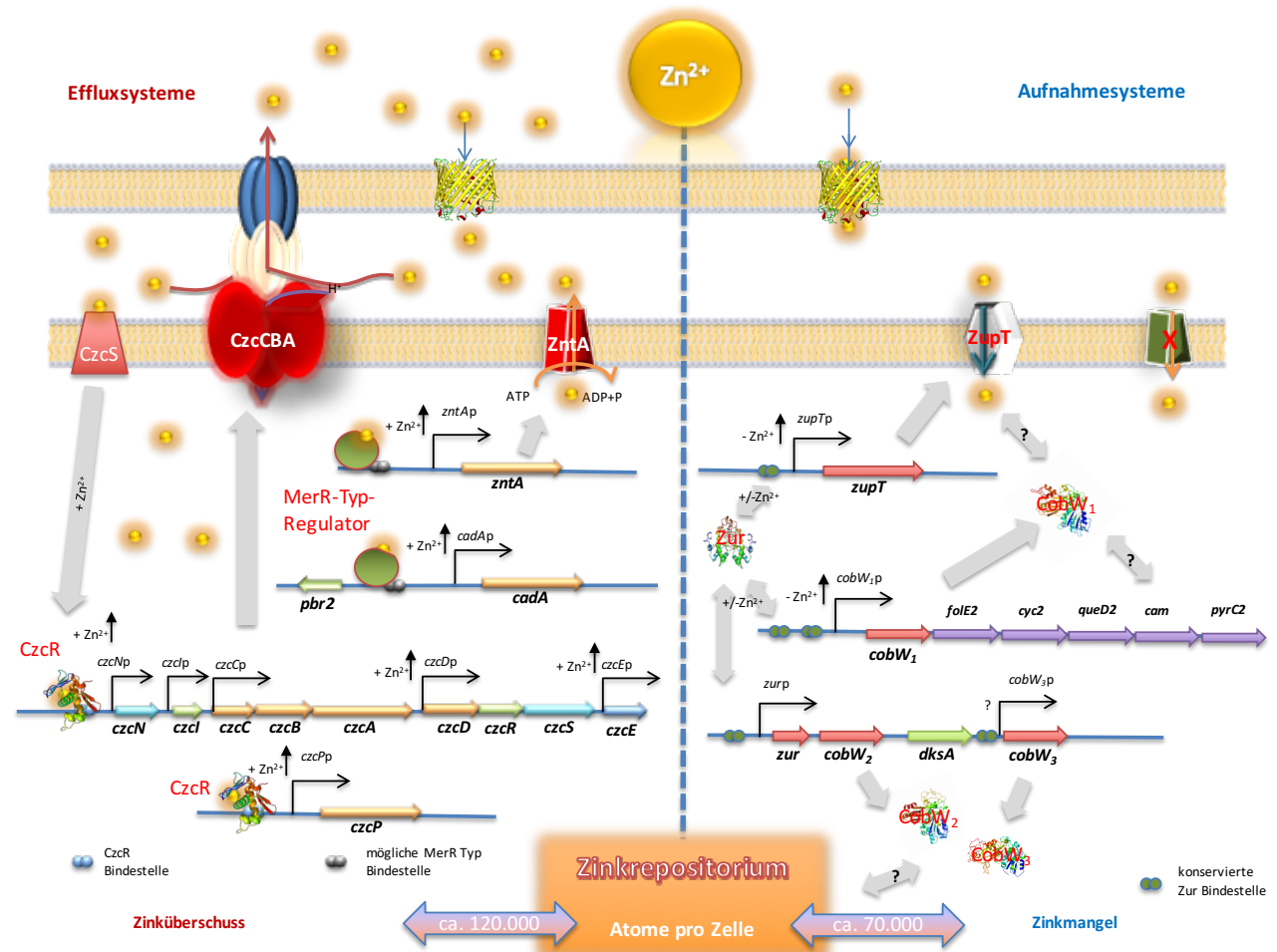


Abbildung 10: Dargestellt ist eine begrenzte Anzahl von Effluxsystemen und ihrer Regulatoren bei Zinküberschuss (nach Brocklehurst *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 2004; Legatzki *et al.*, 2003b) sowie bekannte Zink-Aufnahme- und -Homöostasesysteme als Antwort auf Zinkmangel basierend auf Daten dieser Arbeit.

Das dargestellte *czc*-Operon besteht aus den uncharakterisierten Genen *czcN* (Rmet_5984) und *czcI* (Rmet_5983), den Strukturgenen des RND-Systems *czcC* (Rmet_5982), *czcB* (Rmet_5981) und *czcA* (Rmet_5980), einem Gen für ein CDF Protein CzcD (Rmet_5979), den Genen für ein Zwei-Komponenten-System CzcRS (Rmet_5977-8) und dem Gen für ein periplasmatisches Bindeprotein CzcE (Rmet_5976), das Gen der P_{IB4}-Typ-ATPase CzcP (Rmet_5980), die Genregionen der P_{IB2}-Typ-ATPasen ZntA (Rmet_4594) und CadA (Rmet_2303) sowie das Gen *pbr2* (Rmet_2302), stromaufwärts von *cadA*, eines MerR-Typ-Regulators. Weiterhin dargestellt ist die Genregion von *zupT* (Rmet_2621) mit konservierter Zur-Bindestelle, das *cobW*₁-Cluster mit konservierter Zur-Bindestelle und den Genen *cobW*₁ (Rmet_1098), *folE2* (Rmet_1099), *cys2* (Rmet_1100), *queD2* (Rmet_1101), *cam* (Rmet_1102) und *pyrC2/allB* (Rmet_1103) und das *zur*-Cluster mit konservierten Zur-Bindestellen und den Genen *zur* (Rmet_0128), *cobW*₂ (Rmet_0128), *dksA* (Rmet_0128) und *cobW*₃ (Rmet_0128). Mögliche Promotoren sind als Pfeil und mit zugehörigen Gennamen + p und möglichen Induktionsbedingungen gekennzeichnet. Die Dreidimensionale Struktur von CobW₁, CobW₂, CobW₃ und Zur basiert auf Strukturvorhersagen des Phyre² Servers (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Eine Struktur vorhersage für den ZIP Transporter ZupT ist momentan aufgrund fehlender homologer Strukturen der PDB Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) nicht möglich. Alle weiteren Proteinstrukturen sind schematisch dargestellt. Details siehe Text. Mögliche Interaktionen und regulatorische Vorgänge, über die bisher keine Informationen vorliegen, sind mit Fragezeichen gekennzeichnet.

Zink und die Hydrogenasen in *C. metallidurans*

C. metallidurans CH34 ist in der Lage heterotroph wie auch autotroph als H₂-oxidierendes Bakterium in aerober Umgebung zu wachsen und zwei aktive NiFe-Hydrogenasen zu synthetisieren (Mergeay *et al.*, 1985). Auf dem Chromosom 1 kodiert jeweils ein Gencluster für eine membrangebundene und ein weiteres für eine lösliche, NAD⁺-reduzierende Hydrogenase mit einem benachbarten Gencluster für die benötigten Proteine des Calvin-Zyklus zur CO₂-Fixierung. Der Stamm CH34 synthetisiert diese beide Hydrogenasen unter autotrophen wie heterotrophen Bedingungen unabhängig von molekularem Wasserstoff und besitzt weder eine hochaffine Typ-5- noch eine Sensorhydrogenase (Bernhard *et al.*, 2001; Mergeay *et al.*, 1985; Schafer *et al.*, 2013). Jedoch ist die Synthese der Hydrogenasen Nickel-abhängig und wird während der CO₂-Fixierung durch Kohlendioxid als Elektronensenke stimuliert (Mergeay *et al.*, 1985).

Untersuchungen in dieser Arbeit zum autotrophen Wachstum zeigten, dass der Stamm AE104 im Phosphat-armen TrisMM (Tris-gepuffertes Mineralsalzmedium mit 642 µM PO₄²⁻) im Gegensatz zum Phosphat-reichen SGK-Medium (Schlegel-Gottschalk-Kaltwasser Medium mit 36 mM PO₄²⁻) durch den Verlust der nativen Plasmide (pMOL28 & pMOL30) nicht mehr in der Lage ist zu wachsen und weder die membrangebundene noch die lösliche Hydrogenase zu synthetisieren. Erste Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Zinkhomöostase und der Hydrogenase-Synthese lieferten die Proteomanalysen der Stämme AE104 und des Deletionsstammes $\Delta zupT$. Der $\Delta zupT$ Stamm synthetisiert eine Anzahl von 40.651 Proteinen mehr, die dem Cluster der löslichen Hydrogenase und dem Calvinzyklus zugeordnet werden konnten. Der Ausgangsstamm AE104 dagegen synthetisiert lediglich 1.282 Proteine dieser Cluster wobei ca. 50 % auf das Regulationsprotein HoxA des NtrC-Typs entfallen (Herzberg *et al.*, 2014b). HoxA von *C. metallidurans* ist jedoch eine verkürzte Version ohne HTH (*helix-turn-helix*) DNA-bindende Domäne. Der Verlust des ZIP Transporters ZupT führt einerseits zu einem zellulären Zinkmangel verbunden mit Defiziten in der Zinkverteilung. Andererseits haben diese Effekte einen Einfluss auf die Bildung von Nickel-abhängigen Proteinen und implizieren eine Verbindung von Zink- und Nickelhomöostase. Diese ZupT-abhängige Zinkverteilung im Zinkrepositorium stellt eventuell diesen Metallkofaktor effizient für Zink-abhängige Proteine wie RpoC oder auch HypA bereit. Dabei ist HypA in Verbindung mit HypB entscheidend für die Nickeldiskriminierung und die Weiterleitung dieses Kofaktors zu Nickel-abhängigen Proteinen wie den Hydrogenasen (Foster *et al.*, 2014; Hube *et al.*, 2002; Kaluarachchi *et al.*, 2010; Sydor *et al.*, 2014).

Vergleichende Transkriptomanalysen der Stämme AE104 und CH34 (pMOL28 & pMOL30) zeigen einmal eine gestörte Zinkhomöostase durch verstärkte Expression der Genregion von *zntA* (P_{IB2}-Typ-ATPase, zytoplasmatisches Zink-Effluxsystem) und der unterbrochenen *czcI₂C₂B₂'* (RND-System, CzcCBA, periplasmatisches Zink-Effluxsystem) und bestätigten die Herunter-Regulation

von sechs, die Hydrogenase-Cluster beinhaltenden, Regionen. Kürzlich konnten 11 katabolisch-genomische Inseln (CMGIs) auf dem Chromosom 1 von *C. metallidurans* identifiziert werden (Van Houdt *et al.*, 2009). Diese Art von genomischen Inseln sind meist ein Produkt horizontalen Gentransfers oder von Rekombinationsereignissen und sind ähnlich wie Transposons und Plasmide oft ausschlaggebend für die Differenzierung und die Nischennutzung von Bakterien (Coleman *et al.*, 2006; Dressler *et al.*, 1991; Gaillard *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2014). Insgesamt wurde die Expression von 250 Genen, von denen die meisten in diesen sechs Genregionen lokalisiert sind, im Stamm AE104 gehemmt. Dazu zählen über 55 Gene der Region 1 auf CMGI-3 (*aut*-Region 1), kodierend für Proteine der löslichen Hydrogenase (Rmet_1492-1521) und des Calvin-Zyklus (Rmet_1522-1542), sowie 63 Gene der Region 3 auf CMGI-2 (*aut*-Region 2) kodierend für die membrangebundene Hydrogenase (Rmet_1281-98) und für den Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen (Herzberg *et al.*, 2015). Der Verlust der Fähigkeit zur Synthese beider Hydrogenasen im Stamm AE104 im Vergleich zum CH34 liegt in der gehemmt bzw. unterdrückten Expression der Gene beider CMGIs (*aut*-Region 1 & 2). Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente unter „Knallgas“ Atmosphäre, des Aktivitätsnachweises der membrangebundenen Hydrogenase und die Aktivität der NAD⁺-reduzierenden löslichen Hydrogenase bestätigen ebenfalls die Resultate der Transkriptom- und Proteomanalysen aller drei Stämme (Herzberg *et al.*, 2015).

Die veränderte Regulation dieser Regionen beruht möglicherweise auf einer gestörten Metallhomöostase im Stamm AE104 und beteiligten Histon-ähnlichen Proteinen sowie Sigmafaktoren. So führt der Verlust der nativen Plasmide im Stamm AE104 im Phosphat-armen TrisMM im Vergleich zum Phosphat-reichen SGK-Medium zu einer steigenden zellulären Zinkverfügbarkeit, gezeigt durch die verstärkte Expression von *zntA-czcI₂C₂B₂'*. Ein möglicher Hintergrund ist die Komplexierung von Metallen durch die hohen Phosphatkonzentrationen des SGK-Mediums und daraus resultierende verringerte Zinkverfügbarkeit im Vergleich zum TrisMM. Ein Metall- und Phosphat-abhängiger regulatorischer Prozess scheint damit die Expression der Hydrogenasegene in *C. metallidurans* zu kontrollieren und führt zur Stilllegung der *aut*-Regionen (Herzberg *et al.*, 2015).

Molekulare Hintergründe für die Stilllegung ganzer Genregionen könnte das Verpacken mittels Histon-ähnlicher Proteine und eine dadurch hervorgerufene sterische Behinderung der RNA-Polymerase sein. In *E. coli* sind HU / HN-S Faktoren der Genomorganisation, welche über horizontalen Gentransfer erworbene genetische Elemente stilllegen können und globale Transkriptionsfaktoren sind. HU kommt als Homodimer HupA₂ und HupB₂ sowie als Heterodimer HupAB, abhängig von den Wachstumsbedingungen, vor. Es ist beteiligt an der Reorganisation des Transkriptoms, bindet nicht kodierende RNAs, ist involviert in Stressantworten und benötigt für die

Synthese des Sigmafaktors der stationären Phase, RpoS (Balandina *et al.*, 2001; Kar *et al.*, 2005, Macvanin und Adhya, 2012; Macvanin *et al.*, 2012; Oberto *et al.*, 2009). Darüber hinaus existiert ein Polyphosphat-stimulierter Abbau von HupA, verknüpft mit der exponentiellen Wachstumsphase und der Nukleoidorganisation, was die Wachstumsphasen mit dem Phosphatstatus der Zelle verbindet (Kuroda *et al.*, 2006). Im Genom von *C. metallidurans* sind sieben Gene für HupAB verwandte Proteine lokalisiert, von denen drei Plasmid (Rmet_6397, Rmet_6191, Rmet_6090) und vier chromosomal kodiert sind (Rmet_3538, Rmet_4749, Rmet_4742, Rmet_5558). Die vier chromosomal kodierten Genprodukte konnten mit ähnlicher Abundanz von 6000, 6000, 8500 und 1700 Proteinen pro Zelle in allen drei Stämmen (CH34, AE104, $\Delta zupT$) bestimmt werden (Herzberg *et al.*, 2014b). Das H-NS Protein legt Fremd-DNA still. *E. coli* Orthologe konnten mit einer ebenfalls ähnlichen Kopienzahl von 3800 (Rmet_3677) und 450 (Rmet_5562) Proteinen pro Zelle in den drei Stämmen bestimmt werden (Herzberg *et al.*, 2014b). Ein Zusammenhang zur Zinkhomöostase zeigte sich in einer 2,5fach erhöhten Expression bei Inkubation mit 100 μ M Zink des Stammes AE104 (Herzberg *et al.*, 2015). Weiterhin können Sigmafaktoren die globale Kontrolle der Transkriptionsinitiation durch die Aktivität der RNA-Polymerase beeinflussen. Für die Charakterisierung der 11 bekannten ECF (*extracytoplasmatic function family*) Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34 wurden Doppel- und Dreifachmutanten hergestellt und der Einfluss dieser Sigmafaktoren unter multiplen Metallstress (30 μ M CoCl₂, NiCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ und CdCl₂) untersucht (Große und Nies, nicht veröffentlicht; Grosse *et al.*, 2007; Helmann, 2002; Lonetto *et al.*, 1994; Nies, 2004). Dies führte unabhängig der Sigmafaktordeletionen zu einer Herunterregulation der *aut*-Region 2 auf CMGI-2 sowie der *aut*-Region 1 auf CMGI-3 und bestätigt eine durch Metallstress hervorgerufene Stilllegung dieser Region. Eine dreifach Sigmafaktor-Deletionsmutante ($\Delta rpoE \Delta rpoP \text{ cnrH}::\text{pLO2-lacZ}$) mit erhöhtem zellulären Nickelgehalt exprimiert wiederum spezifisch die *aut*-Region 1 unter diesen Bedingungen ähnlich der $\Delta zupT$ Deletion im AE104 Hintergrund (Große und Nies, nicht veröffentlicht). Der erhöhte zelluläre Nickelgehalt liegt im Verlust des CnrH Sigmafaktors, welcher für die Expression des *cnrCBA*-Operons (RND-System, Nickel- und Kobaltresistenzsystem) benötigt wird (Grass *et al.*, 2005b; Grass *et al.*, 2000, Tibazarwa *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse beschreiben eine weitere Metallhomöostase-abhängige Stilllegung mehrere CMGIs sowie die selektive und erneute Expression der *aut*-Region 1. Eine Verbindung zwischen Metallhomöostase und Hydrogenase-Synthese konnte ebenfalls für *E. coli* beobachtet werden (Leonhartsberger *et al.*, 2001; Pinske *et al.*, 2011).

Zusammengefasst führen unterschiedliche Ursachen zu Störungen der Metallhomöostase und in Folge dessen zu einer globalen Regulationsänderung der CMGIs. Nicht nur der Verlust der nativen Plasmide (pMOL28 & pMOL30) im AE104 und steigende zelluläre Zinkmengen im Phosphat-

armen TrisMM auch Multimetallstress im CH34 führt zur Stilllegung mehrerer CMGIs. Die selektive und spezifische Expression der *aut*-Region 1 auf CMGI-3, aber nicht der *aut*-Region 2 im $\Delta zupT$ Stamm und der dreifach Sigmafaktor-Deletionsmutante ($\Delta rpoEP\ cnrH::pLO2-lacZ$) legen unterschiedliche regulatorische Prozesse nahe. Die Gesamtheit dieser Daten offenbart eine enge Verflechtung des Zinkstatus im Repitorium mit globalen Regulationsmechanismen, unter deren Kontrolle nicht nur Zink-Homöostasesysteme sondern auch die Hydrogenase-Synthesecluster stehen.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Chemischer Zustand der Atmosphäre und der Ozeane sowie zeitliche Veränderungen in der Elementabundanz. _____ 3
- Abbildung 2:** Übersicht der methodischen Ansätze der Metalloproteomik und Metallomik _____ 7
- Abbildung 3:** Dargestellt sind die an der Zinkhomöostase beteiligten Proteine der gramnegativen Bakterien. _____ 16
- Abbildung 4:** Dargestellt sind die an dem zweistufigen Metallefflux beteiligten Proteine bzw. Transporter in *C. metallidurans* CH34. _____ 24
- Abbildung 5:** Dargestellt sind die annotierten, aber nicht näher charakterisierten Aufnahmesysteme relevanter divalenter Kationen mit Ausnahme von Eisen und Kupfer in *C. metallidurans* CH34. _ 25
- Abbildung 6:** Vergleich der Aminosäuresequenz der vier Mitglieder der MIT-Proteinfamilie, CorA₁, CorA₂, CorA₃ und ZntB. _____ 157
- Abbildung 7:** Topologiemodell des ZIP Transporters ZupT_{CM}. _____ 161
- Abbildung 8:** Vergleich der Aminosäuresequenz ausgewählter bakterieller ZIP Transporter. ____ 162
- Abbildung 9:** Darstellung des konservierten Zur-Bindemotivs. _____ 169
- Abbildung 10:** Dargestellt ist eine begrenzte Anzahl von Effluxsystemen und ihrer Regulatoren bei Zinküberschuss (nach Brocklehurst *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 2004; Legatzki *et al.*, 2003b) sowie bekannte Zink-Aufnahme- und -Homöostasesysteme als Antwort auf Zinkmangel basierend auf Daten dieser Arbeit. _____ 171

Literaturverzeichnis

- Aebersold R. and M. Mann** (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**:198-207.
- Agranoff D., L. Collins, D. Kehres, T. Harrison, M. Maguire and S. Krishna** (2005) The Nramp orthologue of *Cryptococcus neoformans* is a pH-dependent transporter of manganese, iron, cobalt and nickel. *Biochemical Journal*, **385**:225-232.
- Ahn B.E., J. Cha, E.J. Lee, A.R. Han, C.J. Thompson and J.H. Roe** (2006) Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, **59**:1848-1858.
- Alterio V., E. Langella, G. De Simone and S.M. Monti** (2015) Cadmium-Containing Carbonic Anhydrase CDCA1 in Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Marine Drugs*, **13**:1688-1697.
- Alterio V., E. Langella, F. Viparelli, D. Vullo, G. Ascione, N.A. Dathan, F.M. Morel, C.T. Supuran, G. De Simone and S.M. Monti** (2012) Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CDCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie*, **94**:1232-1241.
- Anbar A.D.** (2008) Oceans. Elements and evolution. *Science*, **322**:1481-1483.
- Anbar A.D., Y. Duan, T.W. Lyons, G.L. Arnold, B. Kendall, R.A. Creaser, A.J. Kaufman, G.W. Gordon, C. Scott, J. Garvin and R. Buick** (2007) A whiff of oxygen before the great oxidation event? *Science*, **317**:1903-1906.
- Anbar A.D. and A.H. Knoll** (2002) Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge? *Science*, **297**:1137-1142.
- Andreini C., L. Banci, I. Bertini, S. Elmi and A. Rosato** (2007) Non-heme iron through the three domains of life. *Proteins*, **67**:317-324.
- Andreini C., L. Banci, I. Bertini, C. Luchinat and A. Rosato** (2004a) Bioinformatic comparison of structures and homology-models of matrix metalloproteinases. *Journal of Proteome Research*, **3**:21-31.
- Andreini C., L. Banci, I. Bertini and A. Rosato** (2006a) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research*, **5**:196-201.
- Andreini C., L. Banci, I. Bertini and A. Rosato** (2006b) Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research*, **5**:3173-3178.
- Andreini C., L. Banci, I. Bertini and A. Rosato** (2008a) Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. *Journal of Proteome Research*, **7**:209-216.
- Andreini C., I. Bertini, G. Cavallaro, G.L. Holliday and J.M. Thornton** (2008b) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **13**:1205-1218.
- Andreini C., I. Bertini, G. Cavallaro, G.L. Holliday and J.M. Thornton** (2009a) Metal-MACiE: a database of metals involved in biological catalysis. *Bioinformatics*, **25**:2088-2089.
- Andreini C., I. Bertini and A. Rosato** (2004b) A hint to search for metalloproteins in gene banks. *Bioinformatics*, **20**:1373-1380.
- Andreini C., I. Bertini and A. Rosato** (2009b) Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts of Chemical Research*, **42**:1471-1479.

- Andreini C., G. Cavallaro, S. Lorenzini and A. Rosato** (2013a) MetalPDB: a database of metal sites in biological macromolecular structures. *Nucleic Acids Research*, **41**:D312-319.
- Andreini C., G. Cavallaro, A. Rosato and Y. Valasatava** (2013b) MetalS2: a tool for the structural alignment of minimal functional sites in metal-binding proteins and nucleic acids. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **53**:3064-3075.
- Anjem A., S. Varghese and J.A. Imlay** (2009) Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **72**:844-858.
- Anton A., A. Weltrowski, C.J. Haney, S. Franke, G. Grass, C. Rensing and D.H. Nies** (2004) Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **186**:7499-7507.
- Appia-Ayme C., A. Hall, E. Patrick, S. Rajadurai, T.A. Clarke and G. Rowley** (2012) ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochemical Journal*, **442**:85-93.
- Argüello J.M., E. Eren and M. Gonzalez-Guerrero** (2007) The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases. *BioMetals*, **20**:233-248.
- Argüello J.M., D. Raimunda and M. Gonzalez-Guerrero** (2012) Metal transport across biomembranes: emerging models for a distinct chemistry. *Journal of Biological Chemistry*, **287**:13510-13517.
- Arnold G.L., A.D. Anbar, J. Barling and T.W. Lyons** (2004) Molybdenum isotope evidence for widespread anoxia in mid-Proterozoic oceans. *Science*, **304**:87-90.
- Assuncao A.G., D.P. Persson, S. Husted, J.K. Schjorring, R.D. Alexander and M.G. Aarts** (2013) Model of how plants sense zinc deficiency. *Metallomics*, **5**:1110-1116.
- Atta M., P. Nordlund, A. Aberg, H. Eklund and M. Fontecave** (1992) Substitution of manganese for iron in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. Spectroscopic and crystallographic characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **267**:20682-20688.
- Bader M.W., S. Sanowar, M.E. Daley, A.R. Schneider, U. Cho, W. Xu, R.E. Klevit, H. Le Moual and S.I. Miller** (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, **122**:461-472.
- Balandina A., L. Claret, R. Hengge-Aronis and J. Rouviere-Yaniv** (2001) The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. *Molecular Microbiology*, **39**:1069-1079.
- Banci L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, L.A. Finney, C.E. Outten and T.V. O'Halloran** (2002) A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118). *Journal of Molecular Biology*, **323**:883-897.
- Banci L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, L. Poggi, M. Vanarotti, S. Tottey, K.J. Waldron and N.J. Robinson** (2010) NMR structural analysis of the soluble domain of ZiaA-ATPase and the basis of selective interactions with copper metallochaperone Atx1. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **15**:87-98.
- Bannister W.H.** The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life: By J J R Fraústo da Silva and R J P Williams. pp 561. Clarendon Press, Oxford. 1991. £60 ISBN 0-19-855598-9, vol. 20: Headington Hill Hall; 1992.
- Bantscheff M., S. Lemeer, M.M. Savitski and B. Kuster** (2012) Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **404**:939-965.

- Barnett J.P., D.J. Scanlan and C.A. Blindauer** (2014) Identification of major zinc-binding proteins from a marine cyanobacterium: insight into metal uptake in oligotrophic environments. *Metallomics*, **6**:1254-1268.
- Barrett A.J.** (1997) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997). *European Journal of Biochemistry*, **250**:1-6.
- Bayle L., S. Chimalapati, G. Schoehn, J. Brown, T. Vernet and C. Durmort** (2011) Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Molecular Microbiology*, **82**:904-916.
- Beard S.J., R. Hashim, G. Wu, M.R. Binet, M.N. Hughes and R.K. Poole** (2000) Evidence for the transport of zinc(II) ions via the *pit* inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, **184**:231-235.
- Becker J.S., A. Matusch, C. Depboylu, J. Dobrowolska and M.V. Zoriy** (2007) Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (slugs-genus arion) measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **79**:6074-6080.
- Behrens S., A. Kappler and M. Obst** (2012) Linking environmental processes to the in situ functioning of microorganisms by high-resolution secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) and scanning transmission X-ray microscopy (STXM). *Environmental Microbiology*, **14**:2851-2869.
- Bengtson S., B. Rasmussen and B. Krapež** (2007) The Paleoproterozoic megascopic Stirling biota. *Paleobiology*, **33**:351-381.
- Bensimon A., A.J. Heck and R. Aebersold** (2012) Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annual Review of Biochemistry*, **81**:379-405.
- Berman H., K. Henrick, H. Nakamura and J.L. Markley** (2007) The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Research*, **35**:D301-303.
- Berman H.M., G.J. Kleywegt, H. Nakamura and J.L. Markley** (2013) The future of the protein data bank. *Biopolymers*, **99**:218-222.
- Bernhard M., T. Buhrke, B. Bleijlevens, A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, S.P. Albracht and B. Friedrich** (2001) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**:15592-15597.
- Bertini I. and G. Cavallaro** (2008) Metals in the "omics" world: copper homeostasis and cytochrome *c* oxidase assembly in a new light. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **13**:3-14.
- Bjerrum C.J. and D.E. Canfield** (2002) Ocean productivity before about 1.9 Gyr ago limited by phosphorus adsorption onto iron oxides. *Nature*, **417**:159-162.
- Blaby-Haas C.E., J.A. Flood, V. Crecy-Lagard and D.B. Zamble** (2012) YeiR: a metal-binding GTPase from *Escherichia coli* involved in metal homeostasis. *Metallomics*, **4**:488-497.
- Blindauer C.A.** (2011) Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **16**:1011-1024.
- Blindauer C.A.** (2015) Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. *Chemical Communications (Cambridge, England)*.
- Blindauer C.A., M.D. Harrison, A.K. Robinson, J.A. Parkinson, P.W. Bowness, P.J. Sadler and N.J. Robinson** (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Molecular Microbiology*, **45**:1421-1432.

- Blindauer C.A. and R. Schmid** (2010) Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins. *Metallomics*, **2**:510-529.
- Bottke W.F., D. Vokrouhlicky, S. Marchi, T. Schwindle, E.R.D. Scott, J.R. Weirich and H. Levison** (2015) Dating the Moon-forming impact event with asteroidal meteorites. *Science*, **348**:321-323.
- Boyer E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros and M.F. Cellier** (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, **70**:6032-6042.
- Braun V. and F. Endriss** (2007) Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *BioMetals*, **20**:219-231.
- Brocklehurst K.R., J.L. Hobman, B. Lawley, L. Blank, S.J. Marshall, N.L. Brown and A.P. Morby** (1999) ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **31**:893-902.
- Brocks J.J., G.A. Logan, R. Buick and R.E. Summons** (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, **285**:1033-1036.
- Buesseler K.O., S.C. Doney, D.M. Karl, P.W. Boyd, K. Caldeira, F. Chai, K.H. Coale, H.J. de Baar, P.G. Falkowski, K.S. Johnson, R.S. Lampitt, A.F. Michaels, S.W. Naqvi, V. Smetacek, S. Takeda and A.J. Watson** (2008) Environment. Ocean iron fertilization--moving forward in a sea of uncertainty. *Science*, **319**:162.
- Buick R.** (2007) Did the Proterozoic 'Canfield Ocean' cause a laughing gas greenhouse? *Geobiology*, **5**:97-100.
- Byerly G.R., D.R. Lower and M.M. Walsh** (1986) Stromatolites from the 3,300-3,500-Myr Swaziland Supergroup, Barberton Mountain Land, South-Africa. *Nature*, **319**:489-491.
- Caldwell A.M. and R.L. Smith** (2003) Membrane topology of the ZntB efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **185**:374-376.
- Cameron V., C.H. House and S.L. Brantley** (2012) A First Analysis of Metallome Biosignatures of Hyperthermophilic Archaea. *Archaea*, **2012**:12.
- Canfield D.E.** (1998) A new model for Proterozoic ocean chemistry. *Nature*, **396**:450-453.
- Canfield D.E.** (2005) The early history of atmospheric oxygen: Homage to Robert A. Garrels. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **33**:1-36.
- Cerasi M., J.Z. Liu, S. Ammendola, A.J. Poe, P. Petrarca, M. Pesciaroli, P. Pasquali, M. Raffatellu and A. Battistoni** (2014) The ZupT transporter plays an important role in zinc homeostasis and contributes to *Salmonella enterica* virulence. *Metallomics*.
- Chan F.Y. and A. Torriani** (1996) PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *Journal of Bacteriology*, **178**:3974-3977.
- Chandrangsu P., J.J. Lemke and R.L. Gourse** (2011) The *dksA* promoter is negatively feedback regulated by DksA and ppGpp. *Molecular Microbiology*, **80**:1337-1348.
- Chao Y. and D. Fu** (2004) Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the *Escherichia coli* zinc transporter YiiP. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:17173-17180.
- Chen L.X., X. Zhang and M.L. Shelby** (2014) Recent advances on ultrafast X-ray spectroscopy in the chemical sciences. *Chemical Science*, **5**:4136-4152.

- Chillappagari S., A. Seubert, H. Trip, O.P. Kuipers, M.A. Marahiel and M. Miethke** (2010) Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **192**:2512-2524.
- Chivers P.T.** (2007) A galvanizing story-protein stability and zinc homeostasis. *Journal of Bacteriology*, **189**:2953-2954.
- Choi S.Y. and A.J. Bird** (2014) Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics*, **6**:1198-1215.
- Ciancaglini P., J.M. Pizauro, C. Curti, A.C. Tedesco and F.A. Leone** (1990) Effect of membrane moiety and magnesium ions on the inhibition of matrix-induced alkaline phosphatase by zinc ions. *International Journal of Biochemistry*, **22**:747-751.
- Clugston S.L., J.F. Barnard, R. Kinach, D. Miedema, R. Ruman, E. Daub and J.F. Honek** (1998) Overproduction and characterization of a dimeric non-zinc glyoxalase I from *Escherichia coli*: evidence for optimal activation by nickel ions. *Biochemistry*, **37**:8754-8763.
- Coleman M.L., M.B. Sullivan, A.C. Martiny, C. Steglich, K. Barry, E.F. Delong and S.W. Chisholm** (2006) Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science*, **311**:1768-1770.
- Colvin R.A., W.R. Holmes, C.P. Fontaine and W. Maret** (2010) Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, **2**:306-317.
- Conejo M.C., I. Garcia, L. Martinez-Martinez, L. Picabea and A. Pascual** (2003) Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, **47**:2313-2315.
- Coneyworth L.J., K.A. Jackson, J. Tyson, H.J. Bosomworth, E. van der Hagen, G.M. Hann, O.A. Ogo, D.C. Swann, J.C. Mathers, R.A. Valentine and D. Ford** (2012) Identification of the human zinc transcriptional regulatory element (ZTRE): a palindromic protein-binding DNA sequence responsible for zinc-induced transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry*, **287**:36567-36581.
- Courville P., R. Chaloupka, F. Veyrier and M.F. Cellier** (2004) Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:3318-3326.
- Cragg R.A., G.R. Christie, S.R. Phillips, R.M. Russi, S. Kury, J.C. Mathers, P.M. Taylor and D. Ford** (2002) A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:22789-22797.
- Cromie M.J. and E.A. Groisman** (2009) Promoter and riboswitch control of the Mg²⁺ transporter MgtA from *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, **192**:604-607.
- Cromie M.J., Y. Shi, T. Latifi and E.A. Groisman** (2006) An RNA sensor for intracellular Mg²⁺. *Cell*, **125**:71-84.
- Culotta V.C., M. Yang and T.V. O'Halloran** (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1763**:747-758.
- Dai Y., P.C. Wensink and R.H. Abeles** (1999) One protein, two enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **274**:1193-1195.
- Dalmas O., P. Sompornpisut, F. Bezanilla and E. Perozo** (2014) Molecular mechanism of Mg²⁺-dependent gating in CorA. *Nature Communications*, **5**:3590.

- Davidson A.L. and J. Chen** (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, **73**:241-268.
- De Angelis F., J.K. Lee, J.D. O'Connell, 3rd, L.J. Miercke, K.H. Verschueren, V. Srinivasan, C. Bauvois, C. Govaerts, R.A. Robbins, J.M. Ruyschaert, R.M. Stroud and G. Vandebussche** (2010) Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**:11038-11043.
- Dechen K., C.D. Richards, J.C. Lye, J.E. Hwang and R. Burke** (2015) Compartmentalized zinc deficiency and toxicities caused by ZnT and Zip gene over expression result in specific phenotypes in *Drosophila*. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Diels L. and M. Mergeay** (1990) DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**:1485-1491.
- Dieppois G., V. Ducret, O. Caille and K. Perron** (2012) The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*, **7**:e38148.
- Donoghue P.C. and J.B. Antcliffe** (2010) Early life: Origins of multicellularity. *Nature*, **466**:41-42.
- Dressler C., U. Kues, D.H. Nies and B. Friedrich** (1991) Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**:3079-3085.
- Dudev T. and C. Lim** (2014) Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins. *Chemical Reviews*, **114**:538-556.
- Dufner-Beattie J., Y.M. Kuo, J. Gitschier and G.K. Andrews** (2004) The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:49082-49090.
- Dupont C.L., A. Butcher, R.E. Valas, P.E. Bourne and G. Caetano-Anolles** (2010) History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**:10567-10572.
- Dupont C.L. and G. Caetano-Anollés** (2010) Reply to Mulikidjanian and Galperin: Zn may have constrained evolution during the Proterozoic but not the Archean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**:E138.
- Dupont C.L., K. Neupane, J. Shearer and B. Palenik** (2008) Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. *Environmental Microbiology*, **10**:1831-1843.
- Dupont C.L., S. Yang, B. Palenik and P.E. Bourne** (2006) Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:17822-17827.
- Eide D.J.** (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition*, **18**:441-469.
- Eide D.J.** (2009) Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **284**:18565-18569.
- Eide J.E.: The Zip Family of Zinc Transporters.** In: *Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function*. vol. Chapter 35. Landes Bioscience/Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publisher: Landes Bioscience/Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publisher; 2005.

- Eitinger T. and M.A. Mandrand-Berthelot** (2000) Nickel transport systems in microorganisms. *Archives of Microbiology*, **173**:1-9.
- Eitinger T., J. Suhr, L. Moore and J.A. Smith** (2005) Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *BioMetals*, **18**:399-405.
- Ellis C.D., F. Wang, C.W. MacDiarmid, S. Clark, T. Lyons and D.J. Eide** (2004) Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *Journal of Cell Biology*, **166**:325-335.
- Enz S., H. Brand, C. Orellana, S. Mahren and V. Braun** (2003) Sites of interaction between the FecA and FecR signal transduction proteins of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **185**:3745-3752.
- Fernandes S., B. Geueke, O. Delgado, J. Coleman and R. Hatti-Kaul** (2002) Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**:313-321.
- 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.
- Fleischmann R.D., M.D. Adams, O. White, R.A. Clayton, E.F. Kirkness, A.R. Kerlavage, C.J. Bult, J.F. Tomb, B.A. Dougherty, J.M. Merrick and et al.** (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**:496-512.
- Foster A.W., D. Osman and N.J. Robinson** (2014) Metal preferences and metallation. *Journal of Biological Chemistry*, **289**:28095-28103.
- Foster A.W. and N.J. Robinson** (2011) Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules. *BMC Biology*, **9**:25.
- Funk C. and W. Vermaas** (1999) A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry*, **38**:9397-9404.
- Gaillard M., T. Vallaey, F.J. Vorholter, M. Minoia, C. Werlen, V. Sentschilo, A. Puhler and J.R. van der Meer** (2006) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *Journal of Bacteriology*, **188**:1999-2013.
- Ganguly A. and D. Chatterji** (2011) Sequential Assembly of an Active RNA Polymerase Molecule at the Air-Water Interface. *Langmuir*, **27**:3808-3814.
- Garcia Vescovi E., F.C. Soncini and E.A. Groisman** (1996) Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, **84**:165-174.
- Gardner S.G., K.D. Johns, R. Tanner and W.R. McCleary** (2014) The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *Journal of Bacteriology*, **196**:1741-1752.
- Gebhard S., N. Ekanayaka and G.M. Cook** (2009) The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for in vitro growth of *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiology*, **9**:254.
- Girijashanker K., L. He, M. Soleimani, J.M. Reed, H. Li, Z. Liu, B. Wang, T.P. Dalton and D.W. Nebert** (2008) *Slc39a14* gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Molecular Pharmacology*, **73**:1413-1423.
- Goris J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diels, M. Mergeay, K. Kersters and P. Vandamme** (2001) Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**:1773-1782.

- Gourdon P., X.Y. Liu, T. Skjorringe, J.P. Morth, L.B. Moller, B.P. Pedersen and P. Nissen** (2011) Crystal structure of a copper-transporting P_{1B}-type ATPase. *Nature*, **475**:59-64.
- Graham A.I., S. Hunt, S.L. Stokes, N. Bramall, J. Bunch, A.G. Cox, C.W. McLeod and R.K. Poole** (2009) Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **284**:18377-18389.
- Grass G., S. Franke, N. Taudte, D.H. Nies, L.M. Kucharski, M.E. Maguire and C. Rensing** (2005a) The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of Bacteriology*, **187**:1604-1611.
- Grass G., B. Fricke and D.H. Nies** (2005b) Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *BioMetals*, **18**:437-448.
- Grass G., C. Grosse and D.H. Nies** (2000) Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *Journal of Bacteriology*, **182**:1390-1398.
- Grass G., M.D. Wong, B.P. Rosen, R.L. Smith and C. Rensing** (2002) ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **184**:864-866.
- Groisman E.A.** (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology*, **183**:1835-1842.
- Grosse C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder and D.H. Nies** (2004) Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Archives of Microbiology*, **182**:109-118.
- Grosse C., S. Friedrich and D.H. Nies** (2007) Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **12**:227-240.
- Grosse C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A.N. Santos, B. Lawley, N.L. Brown and D.H. Nies** (1999) Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, **181**:2385-2393.
- Große C., M. Herzberg, M. Schüttau and D.H. Nies** (submitted) The metal transportome of *Cupriavidus metallidurans* contains more members than the previously known seven secondary metal uptake systems. *Journal of Bacteriology*.
- Grotz N., T. Fox, E. Connolly, W. Park, M.L. Guerinot and D. Eide** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**:7220-7224.
- Guerinot M.L.** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1465**:190-198.
- Guerra A.J. and D.P. Giedroc** (2012) Metal site occupancy and allosteric switching in bacterial metal sensor proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **519**:210-222.
- Gunther V., U. Lindert and W. Schaffner** (2012) The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1823**:1416-1425.
- Haas C.E., D.A. Rodionov, J. Kropat, D. Malasarn, S.S. Merchant and V. de Crecy-Lagard** (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics*, **10**.
- Hantke K.** (2005) Bacterial zinc uptake and regulators. *Current Opinion in Microbiology*, **8**:196-202.

- Haraguchi H.** (2004) Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **19**:5-14.
- Hasnain S.S. and R.W. Strange** (2003) Marriage of XAFS and crystallography for structure-function studies of metalloproteins. *Journal of synchrotron radiation*, **10**:9-15.
- Hassan H.M. and I. Fridovich** (1979) Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry*, **254**:10846-10852.
- Helbig K., C. Bleuel, G.J. Krauss and D.H. Nies** (2008) Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **190**:5431-5438.
- Helmann J.D.** (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial Physiology*, **46**:47-110.
- Herzberg M., L. Bauer, A. Kirsten and D.H. Nies** (submitted) Strategic deletion of seven secondary metal transport systems in *Cupriavidus metallidurans* reveals plasticity of the metal uptake transportome. *Journal of Bacteriology*.
- Herzberg M., L. Bauer and D.H. Nies** (2014a) Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics*, **6**:421-436.
- Herzberg M., D. Dobritzsch, S. Helm, S. Baginsky and D.H. Nies** (2014b) The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics*, **6**:2157-2165.
- Herzberg M., M. Schüttau, M. Reimers, C. Große, H.G. Schlegel and D.H. Nies** (2015) Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands. *Metallomics*, **7**:632-649.
- Higgins K.A., C.E. Carr and M.J. Maroney** (2012) Specific metal recognition in nickel trafficking. *Biochemistry*, **51**:7816-7832.
- Hinchliffe P., M.F. Symmons, C. Hughes and V. Koronakis** (2013) Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annual Review of Microbiology*, **67**:221-242.
- Hmiel S.P., M.D. Snavelly, C.G. Miller and M.E. Maguire** (1986) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *Journal of Bacteriology*, **168**:1444-1450.
- Holland H.D.** (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **361**:903-915.
- Hood M.I., B.L. Mortensen, J.L. Moore, Y. Zhang, T.E. Kehl-Fie, N. Sugitani, W.J. Chazin, R.M. Caprioli and E.P. Skaar** (2012) Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. *PLoS Pathogens*, **8**:e1003068.
- Huang L. and J. Gitschier** (1997) A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nature Genetics*, **17**:292-297.
- Huang M., M.J. Parker and J. Stubbe** (2014) Choosing the right metal: case studies of class I ribonucleotide reductases. *Journal of Biological Chemistry*, **289**:28104-28111.
- Hubbard P.A., D. Padovani, T. Labunska, S.A. Mahlstedt, R. Banerjee and C.L. Drennan** (2007) Crystal structure and mutagenesis of the metallochaperone MeaB: insight into the causes of methylmalonic aciduria. *Journal of Biological Chemistry*, **282**:31308-31316.

- Hube M., M. Blokesch and A. Bock** (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. *Journal of Bacteriology*, **184**:3879-3885.
- Hudek L., L.A. Pearson, A. Michalczyk, B.A. Neilan and M.L. Ackland** (2013) Functional characterization of the twin ZIP/SLC39 metal transporters, NpunF3111 and NpunF2202 in *Nostoc punctiforme*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**:8649-8662.
- Hung H.C. and G.G. Chang** (2001) Differentiation of the slow-binding mechanism for magnesium ion activation and zinc ion inhibition of human placental alkaline phosphatase. *Protein Science*, **10**:34-45.
- Ilari A., F. Alaleona, G. Tria, P. Petrarca, A. Battistoni, C. Zamparelli, D. Verzili, M. Falconi and E. Chiancone** (2014) The *Salmonella enterica* ZinT structure, zinc affinity and interaction with the high-affinity uptake protein ZnuA provide insight into the management of periplasmic zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1840**:535-544.
- Imlay J.A.** (2014) The mismetallation of enzymes during oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, **289**:28121-28128.
- Imlay J.A.** (2015) Transcription Factors That Defend Bacteria Against Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Microbiology*.
- Irving H. and R.J.P. Williams** (1948) Order of Stability of Metal Complexes. *Nature*, **162**:746-747.
- Isani G. and E. Carpena** (2014) Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, **4**:435-457.
- Ishijima S., M. Uda, T. Hirata, M. Shibata, N. Kitagawa and I. Sagami** (2015) Magnesium uptake of *Arabidopsis* transporters, AtMRS2-10 and AtMRS2-11, expressed in *Escherichia coli* mutants: Complementation and growth inhibition by aluminum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1848**:1376-1382.
- Isley A.E. and D.H. Abbott** (1999) Plume-related mafic volcanism and the deposition of banded iron formation. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, **104**:15461-15477.
- Jackson R.J., M.R. Binet, L.J. Lee, R. Ma, A.I. Graham, C.W. McLeod and R.K. Poole** (2008) Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiology Letters*, **289**:219-224.
- Janssen P.J., R. Van Houdt, H. Moors, P. Monsieurs, N. Morin, A. Michaux, M.A. Benotmane, N. Leys, T. Vallaey, A. Lapidus, S. Monchy, C. Medigue, S. Taghavi, S. McCorkle, J. Dunn, D. van der Lelie and M. Mergeay** (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PloS One*, **5**:e10433.
- Jensen P.E., L.C. Gibson, K.W. Henningsen and C.N. Hunter** (1996) Expression of the *chlI*, *chlD*, and *chlH* genes from the Cyanobacterium *synechocystis* PCC6803 in *Escherichia coli* and demonstration that the three cognate proteins are required for magnesium-protoporphyrin chelatase activity. *Journal of Biological Chemistry*, **271**:16662-16667.
- Jeong J. and D.J. Eide** (2013) The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, **34**:612-619.
- Jiang Y.Y., D.X. Kong, T. Qin, X. Li, G. Caetano-Anolles and H.Y. Zhang** (2012) The impact of oxygen on metabolic evolution: a chemoinformatic investigation. *PLoS Computational Biology*, **8**:e1002426.
- Ju T., R.B. Goldsmith, S.C. Chai, M.J. Maroney, S.S. Pochapsky and T.C. Pochapsky** (2006) One protein, two enzymes revisited: a structural entropy switch interconverts the two isoforms of acireductone dioxygenase. *Journal of Molecular Biology*, **363**:823-834.

- Kagi J.H. and B.L. Vallee** (1961) Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physico-chemical properties. *Journal of Biological Chemistry*, **236**:2435-2442.
- Kaluarachchi H., K.C. Chan Chung and D.B. Zamble** (2010) Microbial nickel proteins. *Natural Product Reports*, **27**:681-694.
- Kambe T.** (2011) An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**:1036-1043.
- Kar S., R. Edgar and S. Adhya** (2005) Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**:16397-16402.
- Kasting J.F.** (1993) Earth's early atmosphere. *Science*, **259**:920-926.
- Katayama A., A. Tsujii, A. Wada, T. Nishino and A. Ishihama** (2002) Systematic search for zinc-binding proteins in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, **269**:2403-2413.
- Kehres D.G. and M.E. Maguire** (2003) Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**:263-290.
- Kim E.H., D.H. Nies, M.M. McEvoy and C. Rensing** (2011) Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *Journal of Bacteriology*, **193**:2381-2387.
- Kim H.M., J.H. Shin, Y.B. Cho and J.H. Roe** (2014) Inverse regulation of Fe- and Ni-containing SOD genes by a Fur family regulator Nur through small RNA processed from 3'UTR of the *sodF* mRNA. *Nucleic Acids Research*, **42**:2003-2014.
- King R.A., D. Markov, R. Sen, K. Severinov and R.A. Weisberg** (2004) A conserved zinc binding domain in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase modulates intrinsic transcription termination and antitermination but does not stabilize the elongation complex. *Journal of Molecular Biology*, **342**:1143-1154.
- Kirsten A., M. Herzberg, A. Voigt, J. Seravalli, G. Grass, J. Scherer and D.H. Nies** (2011) Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology*, **193**:4652-4663.
- Klein J.S. and O. Lewinson** (2011) Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics*, **3**:1098-1108.
- Klug A.** (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, **79**:213-231.
- Knoll A.H., E.J. Javaux, D. Hewitt and P. Cohen** (2006) Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **361**:1023-1038.
- Knoop V., M. Groth-Malonek, M. Gebert, K. Eifler and K. Weyand** (2005) Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. *Molecular Genetics and Genomics*, **274**:205-216.
- Konhauser K.O., S.V. Lalonde, L. Amskold and H.D. Holland** (2007) Was there really an Archean phosphate crisis? *Science*, **315**:1234.
- Korkhov V.M., S.A. Mireku and K.P. Locher** (2012) Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-F. *Nature*, **490**:367-372.
- Kramer U., I.N. Talke and M. Hanikenne** (2007) Transition metal transport. *FEBS Letters*, **581**:2263-2272.

- Krezel A. and W. Maret** (2006) Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11**:1049-1062.
- Kuroda A., K. Nomura, N. Takiguchi, J. Kato and H. Ohtake** (2006) Inorganic polyphosphate stimulates ion-mediated proteolysis of nucleoid proteins in *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, **52**:23-29.
- Lane T.W. and F.M. Morel** (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**:4627-4631.
- Lane T.W., M.A. Saito, G.N. George, I.J. Pickering, R.C. Prince and F.M. Morel** (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, **435**:42.
- Latimer M.J., K. Ito, S.E. McPhillips and B. Hedman** (2005) Integrated instrumentation for combined polarized single-crystal XAS and diffraction data acquisition for biological applications. *Journal of synchrotron radiation*, **12**:23-27.
- Leech H.K., E. Raux, K.J. McLean, A.W. Munro, N.J. Robinson, G.P. Borrelly, M. Malten, D. Jahn, S.E. Rigby, P. Heathcote and M.J. Warren** (2003) Characterization of the cobaltochelate CbiXL: evidence for a 4Fe-4S center housed within an MXCXXC motif. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:41900-41907.
- Legatzki A., S. Franke, S. Lucke, T. Hoffmann, A. Anton, D. Neumann and D.H. Nies** (2003a) First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation*, **14**:153-168.
- Legatzki A., G. Grass, A. Anton, C. Rensing and D.H. Nies** (2003b) Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, **185**:4354-4361.
- Leonhartsberger S., A. Huber, F. Lottspeich and A. Bock** (2001) The *hydH/G* Genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *Journal of Molecular Biology*, **307**:93-105.
- Leszczyszyn O.I., H.T. Imam and C.A. Blindauer** (2013) Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics*, **5**:1146-1169.
- Lim C.K., K.A. Hassan, A. Penesyan, J.E. Loper and I.T. Paulsen** (2013) The effect of zinc limitation on the transcriptome of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Environmental Microbiology*, **15**:702-715.
- Lin W., J. Chai, J. Love and D. Fu** (2010) Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB. *Journal of Biological Chemistry*, **285**:39013-39020.
- Liu Z., H. Li, M. Soleimani, K. Girijashanker, J.M. Reed, L. He, T.P. Dalton and D.W. Nebert** (2008) Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **365**:814-820.
- Lobinski R., C. Moulin and R. Ortega** (2006a) Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie*, **88**:1591-1604.
- Lobinski R., D. Schaumlöffel and J. Szpunar** (2006b) Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**:255-289.
- Lonetto M.A., K.L. Brown, K.E. Rudd and M.J. Buttner** (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**:7573-7577.

- Long F., C.C. Su, H.T. Lei, J.R. Bolla, S.V. Do and E.W. Yu** (2012) Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **367**:1047-1058.
- Lu M. and D. Fu** (2007) Structure of the zinc transporter YjiP. *Science*, **317**:1746-1748.
- Lyons T.W.** (2008) Ocean science. Ironing out ocean chemistry at the dawn of animal life. *Science*, **321**:923-924.
- Ma Z., P. Chandrangsu, T.C. Helmann, A. Romsang, A. Gaballa and J.D. Helmann** (2014) Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **94**:756-770.
- Macomber L. and J.A. Imlay** (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**:8344-8349.
- Macvanin M. and S. Adhya** (2012) Architectural organization in *E. coli* nucleoid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1819**:830-835.
- Macvanin M., R. Edgar, F. Cui, A. Trostel, V. Zhurkin and S. Adhya** (2012) Noncoding RNAs binding to the nucleoid protein HU in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **194**:6046-6055.
- Madigan M.T.** Brock - Mikrobiologie, 13., aktualisierte Aufl. edn. München [u.a.]: Pearson; 2013.
- Maguire M.E.** (2006) Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Frontiers in Bioscience*, **11**:3149-3163.
- Makui H., E. Roig, S.T. Cole, J.D. Helmann, P. Gros and M.F. Cellier** (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology*, **35**:1065-1078.
- Mandelli F., J.P. Franco Cairo, A.P. Citadini, F. Buchli, T.M. Alvarez, R.J. Oliveira, V.B. Leite, A.F. Paes Leme, A.Z. Mercadante and F.M. Squina** (2013) The characterization of a thermostable and cambialistic superoxide dismutase from *Thermus filiformis*. *Letters in Applied Microbiology*, **57**:40-46.
- Manjasetty B.A., W. Shi, C. Zhan, A. Fiser and M.R. Chance** (2007) A high-throughput approach to protein structure analysis. *Genetic Engineering*, **28**:105-128.
- Manjasetty B.A., A.P. Turnbull, S. Panjekar, K. Bussow and M.R. Chance** (2008) Automated technologies and novel techniques to accelerate protein crystallography for structural genomics. *Proteomics*, **8**:612-625.
- Mapolelo D.T., B. Zhang, S. Randeniya, A.N. Albetel, H. Li, J. Couturier, C.E. Outten, N. Rouhier and M.K. Johnson** (2013) Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton Transactions*, **42**:3107-3115.
- Maret W.** (2004) Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry*, **43**:3301-3309.
- Maret W.** (2005) Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **19**:7-12.
- Maret W.** (2011) Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *BioMetals*, **24**:411-418.
- Maret W.** (2013) Zinc and the zinc proteome. *Metal Ions in Life Science*, **12**:479-501.
- Maret W.** (2015) Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics*, **7**:202-211.

- Markov D., T. Naryshkina, A. Mustaev and K. Severinov** (1999) A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes & Development*, **13**:2439-2448.
- Martin M.E., B.R. Byers, M.O. Olson, M.L. Salin, J.E. Arceneaux and C. Tolbert** (1986) A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, **261**:9361-9367.
- Martinez-Finley E.J., S. Chakraborty, S.J. Fretham and M. Aschner** (2012) Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals. *Metallomics*, **4**:593-605.
- Maser P., S. Thomine, J.I. Schroeder, J.M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I.N. Talke, A. Amtmann, F.J.M. Maathuis, D. Sanders, J.F. Harper, J. Tchieu, M. Gribskov, M.W. Persans, D.E. Salt, S.A. Kim and M.L. Guerinot** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**:1646-1667.
- Mergeay M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie and R. Wattiez** (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**:385-410.
- Mergeay M., D. Nies, H.G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles and F. Van Gijsegem** (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, **162**:328-334.
- Milon B., Q. Wu, J. Zou, L.C. Costello and R.B. Franklin** (2006) Histidine residues in the region between transmembrane domains III and IV of hZip1 are required for zinc transport across the plasma membrane in PC-3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1758**:1696-1701.
- Mojzsis S.J., G. Arrhenius, K.D. McKeegan, T.M. Harrison, A.P. Nutman and C.R.L. Friend** (1996) Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature*, **384**:55-59.
- Monchy S., M.A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. van der Lelie and M. Mergeay** (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, **189**:7417-7425.
- Montanini B., D. Blaudez, S. Jeandroz, D. Sanders and M. Chalot** (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, **8**:107.
- Moomaw A.S. and M.E. Maguire** (2008) The unique nature of Mg²⁺ channels. *Physiology (Bethesda, Md)*, **23**:275-285.
- Morel F.M.M.** (2008) The co-evolution of phytoplankton and trace element cycles in the oceans. *Geobiology*, **6**:318-324.
- Muhlenhoff U., S. Molik, J.R. Godoy, M.A. Uzarska, N. Richter, A. Seubert, Y. Zhang, J. Stubbe, F. Pierrel, E. Herrero, C.H. Lillig and R. Lill** (2010) Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metabolism*, **12**:373-385.
- Mulkidjanian A.Y.** (2009) On the origin of life in the zinc world: 1. Photosynthesizing, porous edifices built of hydrothermally precipitated zinc sulfide as cradles of life on Earth. *Biology Direct*, **4**:26.
- Mulkidjanian A.Y. and M.Y. Galperin** (2009) On the origin of life in the zinc world. 2. Validation of the hypothesis on the photosynthesizing zinc sulfide edifices as cradles of life on Earth. *Biology Direct*, **4**:27.

- Mulkidjanian A.Y. and M.Y. Galperin** (2010) On the abundance of zinc in the evolutionarily old protein domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**:E137; author reply E138.
- Mulrooney S.B. and R.P. Hausinger** (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**:239-261.
- Munkelt D., G. Grass and D.H. Nies** (2004) The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *Journal of Bacteriology*, **186**:8036-8043.
- Murakami K.S.** (2013) X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **288**:9126-9134.
- Myers S.A., A. Nield and M. Myers** (2012) Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus. *Journal of Nutrition and Metabolism*, **2012**:173712.
- Napolitano M., M.A. Rubio, J. Santamaria-Gomez, E. Olmedo-Verd, N.J. Robinson and I. Luque** (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, **194**:2426-2436.
- Neilands J.B.** (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, **270**:26723-26726.
- Nelson D.L. and E.P. Kennedy** (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *Journal of Biological Chemistry*, **246**:3042-3049.
- Niegowski D. and S. Eshaghi** (2007) The CorA family: Structure and function revisited. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Nies D., M. Mergeay, B. Friedrich and H.G. Schlegel** (1987) Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Journal of Bacteriology*, **169**:4865-4868.
- Nies D.H.** (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **177**:2707-2712.
- Nies D.H.** (2000) Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles*, **4**:77-82.
- Nies D.H.** (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**:313-339.
- Nies D.H.** (2004) Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Archives of Microbiology*, **181**:255-268.
- Nies D.H.: **Bacterial Transition Metal Homeostasis**. In: *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Edited by Nies D, Silver S, vol. 6: Springer Berlin Heidelberg; 2007a: 117-142.
- Nies D.H.** (2007b) Biochemistry. How cells control zinc homeostasis. *Science*, **317**:1695-1696.
- Nies D.H.: **Essential and Toxic Effects of Elements on Microorganisms**. In: *Elements and Their Compounds in the Environment*. Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008: 256-276.
- Nies D.H.: **RND-Efflux Pumps for Metal Cations (Chapter 5)**. In: *Microbial Efflux Pumps: Current Research*. Caister Academic Press; 2013: 79-122.

- Nies D.H.** (2012) Zinc starvation response in a cyanobacterium revealed. *Journal of Bacteriology*, **194**:2407-2412.
- Nies D.H. and S. Silver** (1989) Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, **171**:896-900.
- Nishida S., T. Mizuno and H. Obata** (2008) Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**:601-606.
- Nishida S., Y. Morinaga, H. Obata and T. Mizuno** (2011) Identification of the N-terminal region of TjZNT2, a Zrt/Irt-like protein family metal transporter, as a novel functional region involved in metal ion selectivity. *FEBS Journal*, **278**:851-858.
- O'Halloran T.V. and V.C. Culotta** (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *Journal of Biological Chemistry*, **275**:25057-25060.
- Oberto J., S. Nabti, V. Jooste, H. Mignot and J. Rouviere-Yaniv** (2009) The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PloS One*, **4**:e4367.
- Ohana E., E. Hoch, C. Keasar, T. Kambe, O. Yifrach, M. Hershfinkel and I. Sekler** (2009) Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *Journal of Biological Chemistry*, **284**:17677-17686.
- Ohrvik H. and D.J. Thiele** (2014) How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1, Ctr1. *Human Disorders of Copper Metabolism I*, **1314**:32-41.
- Ojeda L., G. Keller, U. Muhlenhoff, J.C. Rutherford, R. Lill and D.R. Winge** (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **281**:17661-17669.
- Oram S.W., J. Ai, G.M. Pagani, M.R. Hitchens, J.A. Stern, S. Eggenner, M. Pins, W. Xiao, X. Cai, R. Haleem, F. Jiang, T.C. Pochapsky, L. Hedstrom and Z. Wang** (2007) Expression and function of the human androgen-responsive gene *ADII* in prostate cancer. *Neoplasia*, **9**:643-651.
- Osman D. and J.S. Cavet** (2010) Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Natural Product Reports*, **27**:668-680.
- Osman D., C.J. Patterson, K. Bailey, K. Fisher, N.J. Robinson, S.E. Rigby and J.S. Cavet** (2013) The copper supply pathway to a Salmonella Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P_{1B}-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Molecular Microbiology*, **87**:466-477.
- Outten C.E. and T.V. O'Halloran** (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, **292**:2488-2492.
- Pak J.E., E.N. Ekende, E.G. Kifle, J.D. O'Connell, 3rd, F. De Angelis, M.B. Tessema, K.M. Derfoufi, Y. Robles-Colmenares, R.A. Robbins, E. Goormaghtigh, G. Vandenbussche and R.M. Stroud** (2013) Structures of intermediate transport states of ZneA, a Zn(II)/proton antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**:18484-18489.
- Park M.H., B.B. Wong and J.E. Lusk** (1976) Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: genetics and physiology. *Journal of Bacteriology*, **126**:1096-1103.
- Passerini A., M. Lippi and P. Frasconi** (2011) MetalDetector v2.0: predicting the geometry of metal binding sites from protein sequence. *Nucleic Acids Research*, **39**:W288-W292.
- Patzer S.I. and K. Hantke** (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **28**:1199-1210.

- Pecoits E., Lalonde, S.V. and Konhauser, K.O.: **Ni in banded iron-formations: Potential evolutionary implications.** In: *NASA Astrobiology Science Conference; Santa Clara.* 2008.
- Perederina A., V. Svetlov, M.N. Vassilyeva, T.H. Tahirov, S. Yokoyama, I. Artsimovitch and D.G. Vassilyev** (2004) Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, **118**:297-309.
- Peters J.E., A.D. Fricker, B.J. Kapili and M.T. Petassi** (2014) Heteromeric transposase elements: generators of genomic islands across diverse bacteria. *Molecular Microbiology*, **93**:1084-1092.
- Petrarca P., S. Ammendola, P. Pasquali and A. Battistoni** (2010) The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *Journal of Bacteriology*, **192**:1553-1564.
- Pinske C., M. Bonn, S. Kruger, U. Lindenstraus and R.G. Sawers** (2011) Metabolic deficiencies revealed in the biotechnologically important model bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). *PloS One*, **6**:e22830.
- Price N.M. and F.M.M. Morel** (1990) Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*, **344**:658-660.
- Prost L.R., M.E. Daley, V. Le Sage, M.W. Bader, H. Le Moual, R.E. Klevit and S.I. Miller** (2007) Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular Cell*, **26**:165-174.
- Pruteanu M., S.B. Neher and T.A. Baker** (2007) Ligand-controlled proteolysis of the *Escherichia coli* transcriptional regulator ZntR. *Journal of Bacteriology*, **189**:3017-3025.
- Quigg A., Z.V. Finkel, A.J. Irwin, Y. Rosenthal, T.Y. Ho, J.R. Reinfelder, O. Schofield, F.M. Morel and P.G. Falkowski** (2003) The evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in marine phytoplankton. *Nature*, **425**:291-294.
- Quigg A., A.J. Irwin and Z.V. Finkel** (2011) Evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in phytoplankton. *Proceedings: Biological Sciences*, **278**:526-534.
- Ragsdale S.W.** (2009) Nickel-based Enzyme Systems. *Journal of Biological Chemistry*, **284**:18571-18575.
- Ranquet C., S. Ollagnier-de-Choudens, L. Loiseau, F. Barras and M. Fontecave** (2007) Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **282**:30442-30451.
- Reith F., B. Etschmann, C. Grosse, H. Moors, M.A. Benotmane, P. Monsieurs, G. Grass, C. Doonan, S. Vogt, B. Lai, G. Martinez-Criado, G.N. George, D.H. Nies, M. Mergeay, A. Pring, G. Southam and J. Brugger** (2009) Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Reith F., S.L. Rogers, D.C. McPhail and D. Webb** (2006) Biomineralization of gold: biofilms on bacterioform gold. *Science*, **313**:233-236.
- Reyes-Caballero H., G.C. Campanello and D.P. Giedroc** (2011) Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophysical Chemistry*, **156**:103-114.
- Ricachenevsky F.K., P.K. Menguer, R.A. Sperotto and J.P. Fett** (2015) Got to hide your Zn away: Molecular control of Zn accumulation and biotechnological applications. *Plant Science*, **236**:1-17.
- Robbins L.J., S.V. Lalonde, M.A. Saito, N.J. Planavsky, A.M. Mloszewska, E. Pecoits, C. Scott, C.L. Dupont, A. Kappler and K.O. Konhauser** (2013) Authigenic iron oxide proxies for marine zinc over geological time and implications for eukaryotic metallome evolution. *Geobiology*, **11**:295-306.

- Robinson N.J. and D.R. Winge** (2010) Copper metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry*, **79**:537-562.
- Rogers E.E., D.J. Eide and M.L. Guerinot** (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**:12356-12360.
- Romani A.M.** (2011) Cellular magnesium homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **512**:1-23.
- Rosenberg H., R.G. Gerdes and K. Chegwidden** (1977) Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **131**:505-511.
- Rosenberg H., R.G. Gerdes and F.M. Harold** (1979) Energy coupling to the transport of inorganic phosphate in *Escherichia coli* K12. *Biochemical Journal*, **178**:133-137.
- Rosenzweig A.C.** (2002) Metallochaperones: bind and deliver. *Chemistry & Biology*, **9**:673-677.
- Roux M. and J. Coves** (2002) The iron-containing superoxide dismutase of *Ralstonia metallidurans* CH34. *FEMS Microbiology Letters*, **210**:129-133.
- Rowe J.L., G.L. Starnes and P.T. Chivers** (2005) Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **187**:6317-6323.
- Sabido E., N. Selevsek and R. Aebersold** (2012) Mass spectrometry-based proteomics for systems biology. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**:591-597.
- Sabri M., S. Houle and C.M. Dozois** (2009) Roles of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, **77**:1155-1164.
- Saier M.H., Jr., C.V. Tran and R.D. Barabote** (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research*, **34**:D181-186.
- Saier M.H., Jr., M.R. Yen, K. Noto, D.G. Tamang and C. Elkan** (2009) The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Research*, **37**:D274-278.
- Saito M.A., D.M. Sigman and F.M.M. Morel** (2003) The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: the co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean-Proterozoic boundary? *Inorganica Chimica Acta*, **356**:308-318.
- Salzer R., M. Herzberg, D.H. Nies, G. Biukovic, G. Gruber, V. Muller and B. Averhoff** (2013) The DNA uptake ATPase PilF of *Thermus thermophilus*: a reexamination of the zinc content. *Extremophiles*.
- Salzer R., M. Herzberg, D.H. Nies, F. Joos, B. Rathmann, Y. Thielmann and B. Averhoff** (2014) Zinc and ATP binding of the hexameric AAA-ATPase PilF from *Thermus thermophilus*: role in complex stability, piliation, adhesion, twitching motility, and natural transformation. *The Journal of biological chemistry*, **289**:30343-30354.
- San Francisco B. and R.G. Kranz** (2014) Interaction of holoCcmE with CcmF in heme trafficking and cytochrome *c* biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, **426**:570-585.
- Sandu C. and R. Brandsch** (2002) Evidence for MoeA-dependent formation of the molybdenum cofactor from molybdate and molybdopterin in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, **178**:465-470.
- Sargent F., B.C. Berks and T. Palmer** (2006) Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiology Letters*, **254**:198-207.

- Sarkar P., A.A. Sardesai, K.S. Murakami and D. Chatterji** (2013) Inactivation of the Bacterial RNA Polymerase Due to Acquisition of Secondary Structure by the omega Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, **288**:25076-25087.
- Schafer C., B. Friedrich and O. Lenz** (2013) Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**:5137-5145.
- Schaumloffel D.** (2007) New ways in qualitative and quantitative protein analysis: nano chromatography coupled to element mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **21 Suppl 1**:18-22.
- Scherer J. and D.H. Nies** (2009) CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Molecular Microbiology*, **73**:601-621.
- Schmidt C., C. Schwarzenberger, C. Grosse and D.H. Nies** (2014) FurC regulates expression of *zupT* for the central zinc importer ZupT of *Cupriavidus metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, **196**:3461-3471.
- Schneider E. and S. Hunke** (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**:1-20.
- Schubert H.L., E. Raux, K.S. Wilson and M.J. Warren** (1999) Common chelatase design in the branched tetrapyrrole pathways of heme and anaerobic cobalamin synthesis. *Biochemistry*, **38**:10660-10669.
- Schweigel-Rontgen M.** (2014) The families of zinc (SLC30 and SLC39) and copper (SLC31) transporters. *Current Topics in Membranes*, **73**:321-355.
- Scott C., T.W. Lyons, A. Bekker, Y. Shen, S.W. Poulton, X. Chu and A.D. Anbar** (2008) Tracing the stepwise oxygenation of the Proterozoic ocean. *Nature*, **452**:456-459.
- Sevcenco A.M., M.W.H. Pinkse, H.T. Wolterbeek, P.D.E.M. Verhaert, W.R. Hagen and P.L. Hagedoorn** (2011) Exploring the microbial metalloproteome using MIRAGE. *Metallomics*, **3**:1324-1330.
- Shi W. and M.R. Chance** (2008) Metallomics and metalloproteomics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**:3040-3048.
- Shi W., M. Punta, J. Bohon, J.M. Sauder, R. D'Mello, M. Sullivan, J. Toomey, D. Abel, M. Lippi, A. Passerini, P. Frasconi, S.K. Burley, B. Rost and M.R. Chance** (2011) Characterization of metalloproteins by high-throughput X-ray absorption spectroscopy. *Genome Research*, **21**:898-907.
- Shin D., E.J. Lee, H. Huang and E.A. Groisman** (2006) A positive feedback loop promotes transcription surge that jump-starts *Salmonella* virulence circuit. *Science*, **314**:1607-1609.
- Shin J.H., C.A. Wakeman, J.R. Goodson, D.A. Rodionov, B.G. Freedman, R.S. Senger and W.C. Winkler** (2014) Transport of magnesium by a bacterial Nramp-related gene. *PLoS Genetics*, **10**:e1004429.
- Slack J.F. and W.F. Cannon** (2009) Extraterrestrial demise of banded iron formations 1.85 billion years ago. *Geology*, **37**:1011-1014.
- Smith R.L., J.L. Banks, M.D. Snavely and M.E. Maguire** (1993) Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein. *Journal of Biological Chemistry*, **268**:14071-14080.
- Snavely M.D., J.B. Florer, C.G. Miller and M.E. Maguire** (1989) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: 28Mg^{2+} transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *Journal of Bacteriology*, **171**:4761-4766.
- Snavely M.D., C.G. Miller and M.E. Maguire** (1991) The *mgtB* Mg^{2+} transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, **266**:815-823.

- Sousa S.F., A.B. Lopes, P.A. Fernandes and M.J. Ramos** (2009) The Zinc proteome: a tale of stability and functionality. *Dalton Transactions*:7946-7956.
- Stengel A., I.L. Gugel, D. Hilger, B. Rengstl, H. Jung and J. Nickelsen** (2012) Initial steps of photosystem II de Novo assembly and preloading with manganese take place in biogenesis centers in *Synechocystis*. *Plant Cell*, **24**:660-675.
- Stojiljkovic I., A.J. Baumler 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.
- Stork M., M.P. Bos, I. Jongerius, N. de Kok, I. Schilders, V.E. Weynants, J.T. Poolman and J. Tommassen** (2010) An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS Pathogens*, **6**:e1000969.
- Sun G. and R.J. Budde** (1999) Substitution studies of the second divalent metal cation requirement of protein tyrosine kinase CSK. *Biochemistry*, **38**:5659-5665.
- Suttisansanee U., K. Lau, S. Lagishetty, K.N. Rao, S. Swaminathan, J.M. Sauder, S.K. Burley and J.F. Honek** (2011) Structural variation in bacterial glyoxalase I enzymes: investigation of the metalloenzyme glyoxalase I from *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Biological Chemistry*, **286**:38367-38374.
- Sydor A.M., M. Jost, K.S. Ryan, K.E. Turo, C.D. Douglas, C.L. Drennan and D.B. Zamble** (2013) Metal binding properties of *Escherichia coli* YjiA, a member of the metal homeostasis-associated COG0523 family of GTPases. *Biochemistry*, **52**:1788-1801.
- Sydor A.M., H. Lebrette, R. Ariyakumaran, C. Cavazza and D.B. Zamble** (2014) Relationship between Ni(II) and Zn(II) coordination and nucleotide binding by the *Helicobacter pylori* [NiFe]-hydrogenase and urease maturation factor HypB. *Journal of Biological Chemistry*, **289**:3828-3841.
- Szpunar J.** (2005) Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, **130**:442-465.
- Tan K., A. Sather, J.L. Robertson, S. Moy, B. Roux and A. Joachimiak** (2009) Structure and electrostatic property of cytoplasmic domain of ZntB transporter. *Protein Science*, **18**:2043-2052.
- Tanaka R. and A. Tanaka** (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, **58**:321-346.
- Taudte N.** Eisen und Mangan: Wechselwirkungen und Homöostase in *Escherichia coli* mit dem Schwerpunkt ZupT. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2010.
- Taudte N. and G. Grass** (2010) Point mutations change specificity and kinetics of metal uptake by ZupT from *Escherichia coli*. *BioMetals*, **23**:643-656.
- Thorgersen M.P. and D.M. Downs** (2007) Cobalt targets multiple metabolic processes in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, **189**:7774-7781.
- Thornalley P.J.** (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, **14**:287-371.
- Tibazarwa C., S. Wuertz, M. Mergeay, L. Wyns and D. van Der Lelie** (2000) Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *Journal of Bacteriology*, **182**:1399-1409.
- Totter S., D. Harvie and N. Robinson: **Understanding How Cells Allocate Metals**. In: *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Edited by Nies D, Silver S, vol. 6: Springer Berlin Heidelberg; 2007: 3-35.

- Totley S., K.J. Waldron, S.J. Firbank, B. Reale, C. Bessant, K. Sato, T.R. Cheek, J. Gray, M.J. Banfield, C. Dennison and N.J. Robinson** (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature*, **455**:1138-1142.
- Tseng T.T., K.S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D.H. Nies, A. Goffeau and M.H. Saier, Jr.** (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **1**:107-125.
- Valencia E.Y., V.S. Braz, C. Guzzo and M.V. Marques** (2013) Two RND proteins involved in heavy metal efflux in *Caulobacter crescentus* belong to separate clusters within proteobacteria. *BMC Microbiology*, **13**:79.
- Van Houdt R., S. Monchy, N. Leys and M. Mergeay** (2009) New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **96**:205-226.
- van Veen H.W., T. Abee, G.J. Kortstee, W.N. Konings and A.J. Zehnder** (1994) Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **33**:1766-1770.
- Vandamme P. and T. Coenye** (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**:2285-2289.
- Vanechoutte M., P. Kampfer, T. De Baere, E. Falsen and G. Verschraegen** (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**:317-327.
- Vassilyeva M.N., A.A. Perederina, V. Svetlov, S. Yokoyama, I. Artsimovitch and D.G. Vassilyev** (2004) Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of transcription factor DksA from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **60**:1611-1613.
- Vert G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M.L. Guerinot, J.F. Briat and C. Curie** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**:1223-1233.
- von Meyenburg K., B.B. Jorgensen and B. van Deurs** (1984) Physiological and morphological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12. *EMBO Journal*, **3**:1791-1797.
- von Rozycki T. and D.H. Nies** (2008) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- von Rozycki T., D.H. Nies and M.H. Saier, Jr.** (2005) Genomic analyses of transport proteins in *Ralstonia metallidurans*. *Comparative and Functional Genomics*, **6**:17-56.
- Waldron K.J. and N.J. Robinson** (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Reviews: Microbiology*, **7**:25-35.
- Waldron K.J., J.C. Rutherford, D. Ford and N.J. Robinson** (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, **460**:823-830.
- Wan Q., M.F. Ahmad, J. Fairman, B. Gorzelle, M. de la Fuente, C. Dealwis and M.E. Maguire** (2011) X-ray crystallography and isothermal titration calorimetry studies of the *Salmonella* zinc transporter ZntB. *Structure*, **19**:700-710.
- Wang D. and C.A. Fierke** (2013) The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics*, **5**:372-383.

- Wang D., O. Hosteen and C.A. Fierke** (2012) ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **111**:173-181.
- Wang D., T.K. Hurst, R.B. Thompson and C.A. Fierke** (2011) Genetically encoded ratiometric biosensors to measure intracellular exchangeable zinc in *Escherichia coli*. *J Biomed Opt*, **16**:087011.
- Wang K., O. Sitsel, G. Meloni, H.E. Autzen, M. Andersson, T. Klymchuk, A.M. Nielsen, D.C. Rees, P. Nissen and P. Gourdon** (2014) Structure and mechanism of Zn²⁺-transporting P-type ATPases. *Nature*, **514**:518-522.
- Wang S.Z., Y. Chen, Z.H. Sun, Q. Zhou and S.F. Sui** (2006) *Escherichia coli* CorA periplasmic domain functions as a homotetramer to bind substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **281**:26813-26820.
- Watanabe S., D. Sasaki, T. Tominaga and K. Miki** (2012) Structural basis of [NiFe] hydrogenase maturation by Hyp proteins. *Biological Chemistry*, **393**:1089-100.
- Warren M.A., L.M. Kucharski, A. Veenstra, L. Shi, P.F. Grulich and M.E. Maguire** (2004) The CorA Mg²⁺ transporter is a homotetramer. *Journal of Bacteriology*, **186**:4605-4612.
- Weaver B.P., J. Dufner-Beattie, T. Kambe and G.K. Andrews** (2007) Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biological Chemistry*, **388**:1301-1312.
- Webb D.C., H. Rosenberg and G.B. Cox** (1992) Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *Journal of Biological Chemistry*, **267**:24661-24668.
- Wei Y. and D. Fu** (2006) Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *Journal of Biological Chemistry*, **281**:23492-23502.
- Weston B.F., A. Brenot and M.G. Caparon** (2009) The metal homeostasis protein, Lsp, of *Streptococcus pyogenes* is necessary for acquisition of zinc and virulence. *Infection and Immunity*, **77**:2840-2848.
- Williams R.J.P.** (2001) Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews*, **216**:583-595.
- Williams R.J.P. and J.J.R. Fraústo da Silva** (2003) Evolution was Chemically Constrained. *Journal of Theoretical Biology*, **220**:323-343.
- Williams R.J.P. and J.J.R. Fraústo da Silva** The chemistry of evolution : the development of our ecosystem. Amsterdam; Boston: Elsevier; 2006.
- Willsky G.R., R.L. Bennett and M.H. Malamy** (1973) Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *Journal of Bacteriology*, **113**:529-539.
- Wolf E.T. and O.B. Toon** (2010) Fractal organic hazes provided an ultraviolet shield for early Earth. *Science*, **328**:1266-1268.
- Worlock A.J. and R.L. Smith** (2002) ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **184**:4369-4373.
- Wray J.W. and R.H. Abeles** (1995) The methionine salvage pathway in *Klebsiella pneumoniae* and rat liver. Identification and characterization of two novel dioxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, **270**:3147-3153.

- Wu F.Y.H., W.J. Huang, R.B. Sinclair and L. Powers** (1992) The Structure of the Zinc Sites of *Escherichia coli* DNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, **267**:25560-25567.
- Xiao Z. and A.G. Wedd** (2010) The challenges of determining metal-protein affinities. *Natural Product Reports*, **27**:768-789.
- Zambelli B., F. Musiani, S. Benini and S. Ciurli** (2011) Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. *Accounts of Chemical Research*, **44**:520-530.
- Zambelli B., P. Turano, F. Musiani, P. Neyroz and S. Ciurli** (2009) Zn²⁺-linked dimerization of UreG from *Helicobacter pylori*, a chaperone involved in nickel trafficking and urease activation. *Proteins*, **74**:222-239.
- Zawisza I., M. Rózga and W. Bal** (2012) Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A β , APP, α -synuclein, PrP). *Coordination Chemistry Reviews*, **256**:2297-2307.
- Zerkle A.L., C.H. House, R.P. Cox and D.E. Canfield** (2006) Metal limitation of cyanobacterial N₂ fixation and implications for the Precambrian nitrogen cycle. *Geobiology*, **4**:285-297.
- Zhao H. and D. Eide** (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**:2454-2458.
- Zhao H. and D. Eide** (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**:23203-23210.
- Zimmermann M., O. Clarke, J.M. Gulbis, D.W. Keizer, R.S. Jarvis, C.S. Cobbett, M.G. Hinds, Z. Xiao and A.G. Wedd** (2009) Metal binding affinities of *Arabidopsis* zinc and copper transporters: selectivities match the relative, but not the absolute, affinities of their amino-terminal domains. *Biochemistry*, **48**:11640-11654.

Lebenslauf und Publikationsliste

Persönliche Daten

Name **Martin Herzberg**
Geburtsdatum 04.10.1982 in Leinefelde
Nationalität deutsch
Familienstand ledig
Anschrift Bleichertstraße 14, 04155 Leipzig

Ausbildung und Berufserfahrung

Feb. 2015 – Sep. 2015 wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biologie/Mikrobiologie,
Prof. Dr. D. H. Nies
Naturwissenschaftliche Fakultät I,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Jan. 2015 – Feb. 2015 Qualifikation zum Qualitätsmanagement-Auditor (QMF/QMB/QMA)
VA-Nr.: 1111138-15-004
Training Center Berlin, TÜV SÜD Akademie GmbH

Sept. 2009 – Nov. 2014 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biologie/Mikrobiologie,
Prof. Dr. D. H. Nies
Naturwissenschaftliche Fakultät I,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Sept. 2008 – Juli 2009 Diplomarbeit im Institut für Biologie/Mikrobiologie,
Naturwissenschaftliche Fakultät I, Prof. Dr. D. H. Nies
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Titel:“*Cupriavidus metallidurans* CH34 und die *czc*-
Resistenzdeterminante“

Juni 2007 – Juni 2008 wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Genetik/Entwicklungsgenetik,
Prof. Dr. G. Reuter Naturwissenschaftliche Fakultät I,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Okt. 2002-Juli 2008 Studium der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

April 2003-Dez. 2003 Bundeswehr Bad Frankenhausen

2001 Abitur am Gottfried-Wilhelm-Leibniz Gymnasium Leinefelde

1993-2001 Gottfried-Wilhelm- Leibniz Gymnasium, Leinefeld

Veröffentlichungen und internationale Konferenzbeiträge

Peer-Review Veröffentlichungen

- Herzberg, M.**, L. Bauer and D. H. Nies (2014). Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* **6**: 421-436.
- Herzberg, M.**, D. Dobritzsch, S. Helm, S. Baginsky and D. H. Nies (2014). The zinc repository of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **6**: 2157-2165.
- Herzberg, M.**, M. Schüttau, M. Reimers, C. Grosse, H. G. Schlegel and D. H. Nies (2015). Synthesis of nickel-iron hydrogenase in *Cupriavidus metallidurans* is controlled by metal-dependent silencing and un-silencing of genomic islands. *Metallomics* **7**: 632-649.
- Kirsten, A., **M. Herzberg**, A. Voigt, J. Seravalli, G. Grass, J. Scherer and D. H. Nies (2011). Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology* **193**: 4652-4663.
- Nies, D. H. and **M. Herzberg** (2013). A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria. *Molecular microbiology* **87**: 447-454.
- Riemschneider, S., **M. Herzberg** and J. Lehmann (2015). Subtoxic doses of Cadmium modulate inflammatory properties of murine RAW 264.7 macrophages. *Biomed Research International*
- Salzer, R., **M. Herzberg**, D. H. Nies, G. Biukovic, G. Gruber, V. Müller and B. Averhoff (2013). The DNA uptake ATPase PilF of *Thermus thermophilus*: a reexamination of the zinc content. *Extremophiles* **17**: 697-698.
- Salzer, R., **M. Herzberg**, D. H. Nies, F. Joos, B. Rathmann, Y. Thielmann and B. Averhoff (2014). Zinc and ATP binding of the hexameric AAA-ATPase PilF from *Thermus thermophilus*: role in complex stability, piliation, adhesion, twitching motility, and natural transformation. *The Journal of Biological Chemistry* **289**: 30343-30354.
- Soboh, B., U. Lindenstrauss, C. Granich, M. Javed, **M. Herzberg**, C. Thomas and S. T. Stripp (2014). [NiFe]-hydrogenase maturation in vitro: analysis of the roles of the HybG and HypD accessory proteins. *The Biochemical Journal* **464**: 169-177.
- Soboh, B., S. T. Stripp, C. Bielak, U. Lindenstrauss, M. Braussemann, M. Javaid, M. Hallensleben, C. Granich, **M. Herzberg**, J. Heberle and R. G. Sawers (2013). The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Letters* **587**: 2512-2516.
- Soboh, B., S. T. Stripp, E. Muhr, C. Granich, M. Braussemann, **M. Herzberg**, J. Heberle and R. G. Sawers (2012). [NiFe]-hydrogenase maturation: Isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Letters* **586**: 3882-3887.

Stripp, S. T., B. Soboh, U. Lindenstrauß, M. Braussemann, **M. Herzberg**, D. H. Nies, R. G. Sawers and J. Heberle (2013). HypD is the scaffold protein for Fe-(CN)₂CO cofactor assembly in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Biochemistry* **52**: 3289-3296.

Wiesemann, N., J. Mohr, C. Grosse, **M. Herzberg**, G. Hause, F. Reith and D. H. Nies (2013). Influence of Copper Resistance Determinants on Gold Transformation by *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34. *Journal of Bacteriology* **195**: 2298-2308.

Xie, P., X. Hao, **M. Herzberg**, Y. Luo, D. H. Nies and G. Wei (2015). Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China. *Journal of Environmental Sciences (China)* **27**: 179-187.

Internationale Konferenzbeiträge

Herzberg M., D. Dobritzsch, S. Helm, S. Baginski and D.H. Nies. „Zinc and Zincomöostasis of *Cupriavidus metallidurans*“ - VAAM Annual Conference, Dresden 2014 (Vortrag)

Herzberg M., D. Dobritzsch, S. Helm, S. Baginski and D.H. Nies. „The zinc-buffering system of *Cupriavidus metallidurans* retards efficient zinc allocation in a $\Delta zupT$ mutant“ - Biometals Conference, Durham/NC (USA) 2014 (Posterpräsentation) Poster Preis

Herzberg M., L. Bauer, D. Dobritzsch, and D.H. Nies. „Biometals content of cells during kingdoms of life, a general investigation by use of ICP-MS“ - VAAM Annual Conference, Bremen 2013 (Posterpräsentation)

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

Herzberg M. and D.H. Nies. „ZupT a ZRT/IRT protein, member of the ZIP family of zinc/iron transporters, and pleiotropic effects of zinc homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* CH34“ - Biometals Conference, Brüssel (Belgien) 2012 (Posterpräsentation)

Herzberg M., A. Kirsten and D.H. Nies. „ZupT a ZRT/IRT protein, member of the ZIP family of zinc/iron transporters, and pleiotropic effects of zinc homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* CH34“ - VAAM Annual Conference, Tübingen 2012 (Posterpräsentation)

Herzberg M., A. Kirsten and D.H. Nies. „Interplay between zinc uptake and efflux systems mediates zinc homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* CH34“ - VAAM Annual Conference, Karlsruhe 2011 (Posterpräsentation)

Kirsten A., M. Herzberg, A. Voigt, J. Scherer and D.H. Nies. „Zinc uptake in *Cupriavidus metallidurans*“ – Biometals Conference, Tucson/Arizona (USA) 2010 (Posterpräsentation)

Herzberg M. and D.H. Nies. „CzcI has a negativ effect on *czc*-mediated metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34“ - VAAM Annual Conference, Hannover 2010
(Posterpräsentation)

Herzberg M., J. Scherer, C. Große and D.H. Nies. „Function of CzcI in heavy metal resistance of *Cupriavidus metallidurans* CH34” - VAAM Annual Conference, Bochum 2009
(Posterpräsentation)

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. D.H. Nies für die Überlassung des interessanten Themas, für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit und für die ständig gewährte Diskussionsbereitschaft danken. Als besonders hilfreich in dieser länger dauernden Periode erwiesen sich die zuvor innerhalb der Arbeitsgruppe gesammelten Erfahrungen. Für die Ermöglichung dessen und den Besuchen verschiedener internationaler Konferenzen gebührt ihm mein besonderer Dank.

Weiterhin möchte ich mich für die Übernahme der weiteren Gutachten bei Prof. Dr. R.G. Sawers und Prof. Dr. W. Maret bedanken.

Für die Proteom-Messungen sowie der ständigen Hilfestellung bei Problemlösungen in der Elementanalytik (ICP-MS) danke ich Dr. Dirk Dobritzsch. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dirk Schaumlöffel für die Möglichkeit der Forschungsaufenthalte in Pau und Paris im Rahmen eines PROCOPE Projektes.

Ein weiterer Dank gilt allen Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit und den daraus resultierenden Publikationserfolgen.

Bedanken möchte ich mich bei den ehemaligen Mitgliedern der AG Nies, Nadine Taudte und Judith Scherer, und den verbliebenen oder kürzlich gegangenen, Nicole Wiesemann und Lucy Bauer für das angenehme Arbeitsklima und die hilfreichen Diskussionen welche Anteil an dieser Arbeit genommen haben. Der lieben Grit Schleuder (Griti) danke ich außerdem für jegliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima im Labor 315. Und natürlich soll Frau Otto nicht vergessen sein. Vielen dank für ihre Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft.

Herzlicher Dank gebührt meiner Familie und meiner Freundin Sina für ihre ständige Unterstützung. Danke, dass es euch gibt!

Ebenso möchte ich allen Freunden, vor allem Eike für die geteilten Interessen, danken. Und natürlich der MiRu für die vielen aufmunternden Worte und die beständigen Zusammenkünfte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese eingereichte Doktorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. selbständig verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Halle, den

.....

Martin Herzberg