

Reinigung und aktive Rekonstitution von CzcA, einem Mitglied der RND-Proteinfamilie



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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Martina Goldberg
geb. am 23. Dezember 1966
in Göttingen

Gutachter

1. Prof. Dr. D.H.Nies, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. G.J. Krauß, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. K.H. Altendorf, Universität Osnabrück

Halle (Saale), den 30.09.1999

Verteidigungstermin: 28.02.2000

Inhaltsverzeichnis I

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen IV

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	4
2.1	Organismen und Plasmide	4
2.1.1	<i>Expressionsvektoren</i>	5
2.2	Kultivierungsbedingungen	6
2.2.1	<i>Nährmedien, Antibiotika und Schwermetalle</i>	6
2.2.2	<i>Zellanzucht</i>	8
2.2.3	<i>Stammhaltung</i>	9
2.3	Molekularbiologische Techniken	10
2.3.1	<i>DNA-Präparationsmethoden</i>	10
2.3.2	<i>Plasmid-Mikropräparation zur Bestimmung der Plasmidgröße</i>	10
2.3.3	<i>Plasmidminipräparation</i>	10
2.3.3.1	<i>Präparative Plasmidisolierung</i>	11
2.3.4	<i>Plasmidpräparation mit Qiaprep Spin Plasmid Kit</i>	11
2.3.5	<i>Präparative Plasmidisolierung für Sequenzierungen</i>	11
2.3.6	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	12
2.3.7	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	13
2.3.7.1	<i>DNA-Standardmolekulargewichtsmarker</i>	13
2.3.8	<i>Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonucleasen</i>	14
2.3.9	<i>Mikrodialyse</i>	14
2.3.10	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	14
2.3.11	<i>Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten</i>	14
2.3.12	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	15
2.3.13	<i>Transformation</i>	15
2.3.14	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	16
2.3.14.1	<i>Synthese der Primer</i>	16
2.3.14.2	<i>DNA-Amplifikation mittels PCR</i>	17
2.3.15	<i>Sequenzierung von DNA</i>	18
2.3.15.1	<i>Primer</i>	19
2.3.15.2	<i>Sequenzierung mit unmarkierten Primern und Fluorescein-15-dATP</i>	19
2.3.15.3	<i>Sequenzgel und Auswertung der Daten</i>	20
2.4	Enzymmessung	20
2.4.1	<i>Bestimmung der enzymatischen Aktivität des CzCA-LacZ-Fusionproteins</i>	20
2.5	Proteinchemische Methoden	21
2.5.1	<i>Induktion der Genexpression</i>	21
2.5.2	<i>Zellernte und Gesamtzellaufschluß</i>	21
2.5.3	<i>Membranpräparation</i>	21
2.5.4	<i>Membransolubilisierung</i>	22
2.5.4.1	<i>Solubilisierung mit Digitonin</i>	22
2.5.4.2	<i>Solubilisation mit n-Dodecylmaltosid</i>	22

2.5.5	<i>Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen</i>	23
2.6	Säulenchromatographie	23
2.6.1	<i>Geräte</i>	23
2.6.2	<i>Gelpermeationschromatographie an Sephacryl s-300</i>	24
2.6.3	<i>Substrataffinitätschromatographie an APTG</i>	24
2.6.4	<i>Chromatographie an Hydroxylapatit</i>	24
2.6.5	<i>Chromatographie an Nickel-Chelat-Sepharose</i>	25
2.6.6	<i>Gelpermeationschromatographie an Superose 6HR</i>	25
2.6.7	<i>Strep-tag Reinigung</i>	26
2.6.8	<i>Proteinbestimmung</i>	26
2.6.8.1	<i>Proteinbestimmung von Membranproteinen</i>	26
2.6.9	<i>Chloroform-Methanol-Fällung</i>	27
2.6.10	<i>Elektrophoretische Methoden</i>	27
2.6.10.1	<i>SDS-Page nach Laemmli</i>	27
2.6.10.2	<i>Coomassie-Färbung</i>	29
2.6.11	<i>Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran</i>	30
2.6.11.1	<i>Antikörpernachweis</i>	30
2.6.12	<i>N-terminale Aminosäuresequenzierung</i>	31
2.7	Rekonstitutionsexperimente	31
2.7.1	<i>Herstellung von Liposomen</i>	32
2.7.2	<i>Herstellung von Proteoliposomen nach Racker</i>	32
2.7.3	<i>Herstellung von Proteoliposomen nach Jung</i>	32
2.7.4	<i>Nachweis eines künstlichen pH-Gradienten durch</i>	33
2.7.5	<i>Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen</i>	33
2.7.6	<i>Bestimmung der Größe von Liposomen/Proteoliposomen</i>	34
2.8	Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme	35
3	Experimente und Ergebnisse	37
3.1	Reinigung des CzcA-LacZ-Fusionsprotein über Gefiltration an Sepharose S-300 und Affinitätschromatographie an APTG	37
3.1.1	<i>Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-300</i>	37
3.1.2	<i>Substrataffinitätschromatographie an APTG</i>	38
3.2	Chromatographie an Hydroxylapatit, Nickel-Chelat-Sepharose und Superose 6HR	39
3.2.1	<i>Chromatographie an Hydroxylapatit</i>	39
3.2.2	<i>Chromatographie an Nickel-Chelat-Sepharose</i>	40
3.2.3	<i>Gelpermeationschromatographie an Superose 6HR</i>	41
3.3	Klonierung von <i>czcA</i> bzw. <i>czcA</i> -Fragmenten in unterschiedliche Expressionsvektoren	43
3.4	Überexpression des CzcA-Proteins und dessen Nachweis mittels Westernblot	44
3.4.1	<i>Reinigung des CzcA-Strep-tag-Fusionsprotein</i>	45
3.5	Das CzcA-Strep-tag-Fusionsprotein wurde geblottet und die Aminosäuresequenz N-terminal bestimmt	47

3.6	Das CzcA-Strep-tag-Fusionsprotein diente der Generierung von Antikörpern	47
3.6.1	<i>Das native CzcA-Protein aus Ralstonia spec. CH34 wird mittels des CzcA-Antikörpers detektiert</i>	48
3.7	Rekonstitutionsexperimente	49
3.7.1	<i>Herstellung von Proteoliposomen</i>	49
3.7.2	<i>Bestimmung der Liposomen und Proteoliposomen Durchmesser mittels Photonen Korrelations Spectroskopie</i>	51
3.8	Aufnahmemessung mit radioaktiven Metallen	51
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	77

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDF	cation diffusion facilitator protein
Cys	Cystein
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Dexoxyribonukleinsäure
DNase	Dexoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
His	Histidin
HMW	high-molecular-weight marker
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Km	Kanamycin
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
MFP	membran fusion protein
mg	Milligramm
MIC	Minimale Inhibitor-Konzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenylgalactopyranosid
PAA	Poyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophores
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

psi	pounds per square inch
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RND	resistance nodulation cell division
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
t	Zeit
T	Thymin
TAE	Tris-Hydroxymethylaminomethan / Acetat / Ethylendiamintetraacetat
TE	Tris-Hydroxymethylaminomethan / Ethylendiamintetraacetat
TBE	Tris-Hydroxymethylaminomethan / Borat / Ethylendiamintetraacetat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Units
UV	ultraviolet
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
VIS	visible
X-Gal	5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -galactopyranosid
x g	-fache Erdbeschleunigung
% C	Gewichtsprozent (w/w) N,N-Methylenbisacrylamid an % T
% T	Gewichtsprozent (w/v) Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid an der Lösung

1 Einleitung

An vielen Standorten kommt es aufgrund intensiver industrieller Nutzung natürlicher Ressourcen zu einer erhöhten Schwermetallbelastung. Zink zum Beispiel wird für Legierungen wie Messing (Zink und Kupfer) verwendet. Cadmium ist dem Zink sehr ähnlich und tritt immer als Verunreinigung in natürlichen Zinkvorkommen auf, es wird für Galvanisierungsprozesse, zum Lötten und für Batterien verwendet. Kobalt und Nickel sind chemisch nahe mit dem Eisen verwandt. Kobalt wird zum Galvanisieren benutzt; Kobalt-, Nickel- und Chromsalze haben als Farbstoffe ökonomische Bedeutung.

Während Schwermetall-Ionen im nanomolaren Bereich oft als Spurenelemente benötigt werden, wirken sie in mikro- und millimolaren Konzentrationen toxisch. Da zunächst die Versorgung der Zelle mit Makro-Bioelementen, zu denen C, O, H, N, S, P, K, Ca, Mg und Fe zählen, gewährleistet sein muß, kann die Bakterienzelle bei drohender Metallvergiftung den Einstrom von Metallionen nicht drosseln, denn z.B. Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Cd^{2+} gelangen unter Normalbedingungen durch das Mg^{2+} -Aufnahmesystem in die Zelle (Nies & Silver, 1989b). In *Salmonella typhimurium* sind drei verschiedene Magnesium-Aufnahmesysteme beschrieben worden. Das konstitutive CorA-System, welches das primäre Mg^{2+} -Aufnahmesystem in Bakterien und Archaea darstellt, arbeitet schnell und unspezifisch, so vermittelt es z.B. unter anderen die Aufnahme von Cobalt, Nickel und Mangan (Smith & Maguire, 1998). MgtA und MgtB sind induzierbare Transportsysteme; beide Proteine sind als P-typ-ATPasen charakterisiert worden, die zwar eine Mg^{2+} -Aufnahme katalysieren aber deren primäre Funktion noch nicht geklärt ist (Tao *et al.*, 1998). Als viertes Mg^{2+} -Aufnahmesystem wurde das MgtE-Transportsystem beschrieben (Smith *et al.*, 1995), das für die Aufnahme von Magnesium in *Bacillus firmus* OF4 verantwortlich ist.

Nicht nur Schwermetallbelastung bedeutet Streß für das Bakterium, da Streß im Leben eines Organismus die Regel und nicht die Ausnahme ist, sondern auch Einflüsse, wie Temperaturschwankungen, Nahrungsmangel, UV-Strahlung und Salzstreß besitzen eine schädigende Wirkung. So treten in allen Organismen spezifische Proteine nach Induktion durch einen Streßfaktor auf. In *Bacillus subtilis* z.B. wird Thioredoxin, ein kleines hitzestabiles und ubiquitäres Protein, das an Redoxreaktionen beteiligt ist, nach verschiedenen Stressbedingungen, wie Hitze und Salzstreß oder durch die Behandlung mit Ethanol, Wasserstoffperoxid oder Puromycin exprimiert (Scharf *et al.*, 1998). Thioredoxine besitzen ein konserviertes benachbartes Paar von Cysteinen (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-), das einer reversiblen Oxidation und Reduktion unterzogen wird. Thioredoxin-Systeme dienen als Wasserstoff-Donatoren, z.B. für die Phosphoadenosyl-Phosphosulfat-Reduktase, Ribonucleotid-Reduktase und die Sulfoxid-Reduktase (Holmgren, 1989). Aufgrund seiner Fähigkeit Wasserstoffperoxid zu reduzieren wird angenommen, daß Thioredoxin an der Abwehr oxidativen Stresses beteiligt ist (Spector *et al.*, 1988).

Neben dieser allgemeinen Antwort schützen sich Organismen auch spezifischer vor Schwermetallen. So kennt man verschiedene Mechanismen, wie die intrazelluläre Metallkonzentration reguliert werden kann.

Eukaryoten entgiften Schwermetalle durch Komplexierung. In Tieren und Pilzen sind Metallothionine, kleine schwefelreiche Proteine, weit verbreitet (Hamer, 1986; Furey *et al.*, 1986).

Bakterielle Plasmide vermitteln Resistenzen gegen toxische Metalle und Metalloxide wie z.B. Ag^+ , AsO_2^- , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , TeO_3^{2-} , TI^+ und Zn^{2+} (Silver, 1998). Die meisten Resistenzsysteme beruhen auf Energie-abhängigen Efflux. Einige wenige basieren auf enzymatischen Reduktionen oder Komplexierungen. Für Cyanobakterien, insbesondere *Synechococcus*, wurden Metallothionine beschrieben, die den humanen Metallothioninen funktionell ähneln sollen (Gupta *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1993 und Turner & Robinson 1995). Bisher einmalig ist der Mechanismus der untersuchten Quecksilber-Resistenzsysteme (*mer*), bei denen das Quecksilberkation NADH-abhängig zum metallischen Quecksilber reduziert wird (Silver & Misra, 1988; Silver & Walderhaug, 1992).

In den meisten Systemen beruht die bakterielle Resistenz gegenüber Schwermetallen jedoch auf aktivem Efflux. Die Energie für den Transportprozeß kann durch ATP-Hydrolyse oder durch das Membranpotential bereitgestellt werden. Das *cadCA*-System aus *S. aureus* z.B. ist ein ATP-abhängiges Kationeneffluxsystem für Cd^{2+} und Zn^{2+} (Tynecka *et al.*, 1981; Silver & Walderhaug, 1992). Die *ars*-Determinante aus *E. coli* vermittelt Resistenzen gegenüber Arsenat, Arsenit und Antimonit. Das *ArsA*-Protein wurde als ATPase identifiziert, der *ArsAB*-Komplex katalysiert einen Anionen-Efflux (Rosen *et al.*, 1988).

Metalle sind aber nicht nur Streßfaktoren, sondern essentielle Bestandteile der Zelle. So werden besonders die Ionen der Übergangsmetalle wie Cu^{2+} , Ni^{2+} und Fe^{2+} für Redoxprozesse, Co^{2+} zur Synthese von Vitamin-B 12, Zn^{2+} in DNA-bindenden, regulatorischen Proteinen oder K^+ zur Regulation des intrazellulären osmotischen Drucks, um nur einige Beispiele zu nennen, benötigt. So brauchen die Zellen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Metallhomöostase, welche ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme, Nutzung und Ausscheidung von Metallionen erfordert (Lippard & Berg, 1994). Um die Metallhomöostase näher zu untersuchen, sind bakterielle Metallresistenzen gut geeignet.

So beschäftigt sich diese Arbeit mit dem *czc*-Resistenzsystem. Bei Vorhandensein der *czc*-Determinante werden Cd^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} aktiv aus der Zelle herausgepumpt (Nies & Silver, 1989a), wobei der Efflux als Protonen-Kationen-Antiport funktioniert (Nies, 1995). Der Aufbau des *czc*-Operons ist in Abbildung 1 dargestellt.

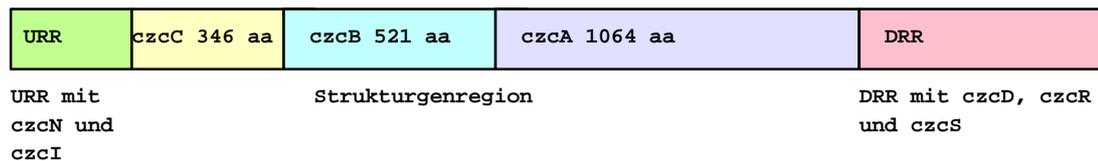


Abbildung 1: Darstellung des *czc*-Operons. Der 'upstream regulatory region' (URR) folgt die Strukturgenregion mit *czcC*, *czcB* und *czcA*. Die 'downstream regulatory region' (DRR) besteht aus *czcD*, *czcR* und *czcS*.

CzcC ist ein ins Periplasma sekretiertes Protein, das aufgrund von Sequenzhomologien zu den OMF-Proteinen (outer membran factor) gezählt wird (Dong & Meargeay, 1994). Es erweitert die Substratspezifität des CzcCBA-Komplexes um Cadmium und erhöht die Cobalt-Resistenz (Nies *et al.*, 1989). CzcB gehört zur Familie der MFP-Proteine (membrane fusion protein). Es ist nach dem derzeitigen Strukturmodell in der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran verankert (Dong & Meargeay, 1994). Das CzcD-Protein ist ein Mitglied der CDF-Proteinfamilie (cation diffusion facilitator) (Nies & Silver, 1995), die als Metallionentransporter beschrieben wurden (Paulsen & Saier, 1997).

Das CzcA-Protein stellt das zentrale Pumpenprotein des CzcCBA-Effluxkomplexes dar und gehört zur Familie der RND-Proteine (resistance, nodulation, cell division). Frühere Arbeiten gaben bereits Hinweise dafür, daß das Protein den Protonen-Kationen-Antiport über die Cytoplasmamembran hinweg katalysiert (Nies, 1995). Nach einem mittels DNA-Sequenzanalysen erstellten Modell besteht das CzcA-Protein aus vier Domänen (Saier, 1994), nämlich aus zwei großen hydrophilen Regionen und zwei hydrophoben, die Plasmamembran durchspannenden Kanäle. Die hydrophilen Regionen befinden sich zwischen Helix eins und zwei, bzw. Helix sieben und acht; durch PhoA-Fusionen konnte ihre bisher im Periplasma vermutete Lage bestätigt werden (Goldberg *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu CadA oder ArsA wurde bei CzcA keine ATP-Bindestelle identifiziert (Nies, 1995). Die treibende Kraft für den Kationen-Efflux ist ein transmembraner Protonengradient. Dieser Protonengradient setzt sich aus einem chemischen Gradienten und einem elektrischen Ladungsgradienten zusammen.

Da bisher außer der rekonstituierten AcrAB Multidrug Efflux-Pumpe, die für den Transport von Gallensäuren, Erythromycin und Cloxacillin verantwortlich ist (Zgurskaya *et al.*, 1999), kein gereinigtes und funktionsanalytisch untersuchtes RND-Protein vorlag, sollte in dieser Arbeit mit der Reinigung und Rekonstitution von CzcA ein Beitrag zum Verständnis der Funktion von RND-Proteinen geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

In Tabelle 1 sind die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide aufgelistet:

Tabelle 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm/Plasmid	Charakteristika	Referenz/Herkunft
Stämme		
<i>Ralstonia spec.</i>		
AE104	metallsensitiv	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE128	pMOL30, Czc ⁺ Cnr ⁻ Chr ⁻ Mer ⁺	Mergeay <i>et al.</i> , 1978
<i>Escherichia coli</i>		
XL1 blue	supE44, hsdR17, recA1, lac, endA1, gyrA46, thi, relA1	Bullock <i>et al.</i> , 1987
XL2 blue	supE44, hsdR17, recA1, lac, endA1, gyrA46, thi, relA1	Stratagene, Heidelberg
WM1704	Δ lon Δ lacU169	W.Messer, Max Planck-Inst. für molekulare Genetik, Deutschland
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ dcm ompT hsdS($r_B^- m_B^-$) lon ⁻ gal λ (DE3)[pLysS Cam ^r]	Stratagene Europe, Amsterdam
Plasmide		
pECD110	pT7-5 mit 6.7 kb czc-EcoRI/BamHI-Fragment	Nies <i>et al.</i> , 1989
pECD297	Amp ^r , czcCBA-lacZ in pTrc99A	Stammsammlung
pQE 70	Amp ^r , His-tag (C-terminal)	Quiagen Inc., 1997
pTrc 99A	Amp ^r	Pharmacia
pMAL-c2	Amp ^r , malE (N-terminal)	New England BioLabs
pASK-IBA3	Amp ^r , Strep-tag II (C- terminal)	IBA GmbH, Göttingen

Tabelle1, Fortsetzung

pECD451	Km.Kassette aus pRME1 mit PCR amplifiziert, und damit NheI/MunI-Fragment aus pECD110 ersetzt, Km ^r , Amp ^r	Juhnke, Diplomarbeit 1997
pECD442	pECD110-Derivat, Asp402Asn in czcA	Juhnke, Diplomarbeit 1997
pECD443	pECD110-Derivat Asp408Asn in czcA	Juhnke, Diplomarbeit 1997
pECD559	Amp ^r , czcA in pASK-IBA3 (EcoRI/BamHI)	diese Arbeit
pECD557	Amp ^r , czcA (mit D402N) in pASK-IBA3 (EcoRI/BamHI)	diese Arbeit
pECD558	Amp ^r , czcA (mit D408N) in pASK-IBA3 (EcoRI/BamHI)	diese Arbeit

2.1.1 Expressionsvektoren

Folgende Expressionsvektoren wurden zur Klonierung und Überexpression des *czcA*-Gens bzw. seiner Domänen herangezogen:

- 1. pTrc99 A Expressionssystem** (Pharmacia): Der Expressionsvektor pTrc99A bietet einen starken *trc* Promotor stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle und ein starkes *rrnB* Trans-kriptions-Terminationssignal stromabwärts. Unter Verwendung des starken *trc* Promotors sollte die C-terminale *czcA-lacZ*-Fusion auf hohem Niveau exprimiert und über eine Affinitäts-säule (p-Aminophenyl-β-Thiogalactopyranosid) gereinigt werden.
- 2. pQE-Sytem** (Quiagen): Der Expressionsvektor pQE70 fusioniert C-terminal den 6 x His-tag an das Zielprotein. Die cytoplasmatisch exprimierten Fusionsproteine können leicht durch die Bindung an Ni-NTA (Nitrilotriacetat) gereinigt werden (Schmitt *et al.*, 1993).
- 3. Strep-tag II System** (Institut für Bioanalytik): Der Expressionsvektor pASK-IBA3 führt zu einer C-terminalen Fusion des Strep-tag II an das Zielprotein. Der Strep-tag besteht aus den acht Aminosäuren WSHPQFEK, die eine hohe StrepTactin-Bindungsaffinität (Voss und Skerra, 1997) aufweisen. Die Reinigung des Fusionsproteins ist somit leicht durch Affi-

nitätschromatographie an StrepTactin möglich. Durch den *tetA*-Promotor/Operator wird außerdem eine strenge transkriptionelle Kontrolle garantiert (Skerrra, 1994).

4. Maltosebindeprotein-Vektoren (NEB): Zur Verfügung stand der Vektor pMAL-c2, der das Maltosebindeprotein (MBP, *malE* codiert) N-terminal an das im Cytoplasma exprimierte Zielprotein fusioniert (Guan *et al.*, 1987; Maina *et al.*, 1988; Duplay *et al.*, 1984). Die Reinigung erfolgt über Affinitätschromatographie an Amylose.

5. β -Galaktosidase-Fusions-Kit (Boehringer): Der Expressionvektor pXa2 führt zu einer N-terminalen Fusion der β -Galaktosidase an das Zielprotein. Die Fusion sollte über eine Affinitätssäule (p-Aminophenyl- β -Thiogalactopyranosid) gereinigt werden

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien, Antibiotika und Schwermetalle

A) (Luria-Bertani-)Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 1 l	aqua bidest., pH 7.0 einstellen

LB-Medium diene als Komplexmedium zur Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen.

B) Tris gepuffertes Minimalmedium (Mergeay *et al.*, 1985)

121.1 g	Tris
HCl	ad pH 7.0
danach Zugabe von:	
93.6 g	NaCl
29.8 g	KCl
21.4 g	NH ₄ Cl
4.0 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
0.45 g	CaCl ₂

0.024 g	Eisen-Ammonium Citrat
2 ml	Spurenelementlösung SL6 (10 fach) nach Pfennig(1974)
ad 1 l	aqua bidest.

Komponente B (20 fach):

19.5 g	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$
4.6 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$
ad 1 l	aqua bidest.

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und zur Kultivierung von *Ralstonia spec.* (vormals: *A. eutrophus*)-Stämmen auf einfache Konzentration verdünnt. Als Kohlenstoffquelle wurden 0.2% (w/v) Dinatriumgluconat zugesetzt.

C) Spurenelementlösung SL6 (10 fach) nach PFENNIG (1974):

900 ml	aqua bidest.
100 mg	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
30 mg	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
300 mg	H_3BO_3
200 mg	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
10 mg	$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
188 mg	$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
30 mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
ad 1 l	aqua bidest.

D) Nährboullion I (Immunpräparate, Berlin)

25 g/l aqua bidest.

Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E.coli*.

E) Nähragar I (Immunpräparate, Berlin)

36.5 g/l aqua bidest.

F) Festmedien

Die Komplexmedien für *E.coli* wurden mit 1.5% (w/v) Agar noble versetzt und autoklaviert. Dem Mineralmedium mit Metallsalzen zur Kultivierung von *Ralstonia spec.*- Stämmen wurde 2% (w/v) Agar noble zugesetzt und autoklaviert.

G) Schwermetalle

Die verwendeten Schwermetallsalze $ZnCl_2$, $CoCl_2$ und $CdCl_2$ lagen als 1M Stammlösungen vor und wurden auf beschriebene Endkonzentrationen im Medium verdünnt.

H) Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden nach Ausubel *et al.*, (1993) hergestellt und den sterilen Nährmedien in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin: Die Stammlösung (100 mg/ml in sterilen aqua bidest.) wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Nährmedium eingesetzt.

Kanamycin: Die Stammlösung (100 mg/ml in sterilen aqua bidest.) wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Nährmedium eingesetzt.

Teracyclin: Die Stammlösung (12.5 mg/ml 70%igen Ethanol) wurde dem Medium in einer Endkonzentration von 12.5 µg/ml zugesetzt.

I) Zusätzliche Nährmedienbestandteile

Zur Induktion der Genexpression wurden auf 1 l Kulturmedium 3 ml 0.1 M IPTG zu dem pTrc99A-Vektor bzw. 50 µl Anhydrotetracyclin (2 mg/ml DMF) zu den pASK-IBA3-Vektor gegeben.

2.2.2 Zellanzucht

E.coli

Die verwendeten *E.coli*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium kultiviert. Dabei erfolgte die Anzucht in Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhält-

nis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Zur Selektion wurde je nach Stamm das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C auf einem Rundschtüttler (KS500) oder auf einem Rotationsschtüttler (HS500) bei 200 rpm angezogen.

Zur Verfolgung des Zellwachstums bei der Herstellung von kompetenten Zellen eignete sich die Messung der optischen Dichte (OD600) mit einem UV/VIS-Spektrometer.

Angeimpfte Agarplatten wurden bei 37°C aerob für 12-24 h inkubiert.

Ralstonia spec.

Die verwendeten *Ralstonia spec.*-Stämme wurden auf Tris-gepuffertem Minimalmedium herangezogen, in dem 0.2 % Dinatriumgluconat als einzige Kohlenstoffquelle vorhanden war.

Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben, Seitenarmkolben und Schikanekolben. Dabei wurde ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 strikt eingehalten, um eine optimale Sauerstoffzufuhr für die obligat aeroben Zellen zu gewährleisten.

Die Zugabe von Antibiotika und Schwermetallsalzen erfolgte in den schon genannten Konzentrationen.

Flüssigkulturen wurden bei 30°C und 200 rpm auf einem Rotationsschtüttler angezogen. Die Verfolgung des Zellwachstums erfolgte mit einem Klett-Summerson Colorimeter als Trübungsmessung gegen unbeimpftes Medium in Klett-Einheiten.

Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30°C für 2-5 Tage inkubiert.

2.2.3 Stammhaltung

Zur Kultivierung dienten LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten. Damit immer frisches Koloniematerial zur Verfügung stand, wurden die Stämme alle 4 Wochen überimpft.

Die Kultivierung der *Ralstonia spec.*-Stämme erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agar-Platten. Den plasmidtragenden Stämmen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

Von allen plasmidtragenden Stämmen wurde zusätzlich eine Glycerinkultur angelegt. Dazu wurde eine Flüssigkultur in der spätexponentiellen Phase mit Glycerin (20 % (v/v)) versetzt.

Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 DNA-Präparationsmethoden

Die Arbeit mit DNA macht die Inaktivierung von DNAsen notwendig. Aus diesem Grund wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.3.2 Plasmid-Mikropräparation zur Bestimmung der Plasmidgröße (nach Chowdhury, 1991)

Bei der Klonierung gelang mit der Plasmid-Mikropräparation eine Vorauswahl von interessanten Klonen. Mit dieser Methode konnte in kurzer Zeit eine große Anzahl von Vektoren auf Einbau eines Inserts untersucht werden.

Zu einer 100 µl-Übernachtskultur in LB-Medium wurden 50 µl Phenol-Chloroform 1:1 (v/v) und 10 µl Stop-Mix (0.25 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol) gegeben. Der Ansatz wurde kräftig durchmischt und dann in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (3 min, 12000 rpm). 20-30 µl des Überstandes wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

2.3.3 Plasmidminipräparation (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Diese Methode diente zur analytischen Präparation kleiner Plasmide. Die Qualität der isolierten DNA war hinreichend für Restriktionsversuche und Klonierungsschritte.

Die Zellen einer 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium wurden durch Zentrifugation geerntet und in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde der Ansatz vorsichtig bis zur Lyse der Zellen geschwenkt und ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde mit 150 µl eiskalter Lösung 3 versetzt und nach mehrmaligem Schwenken 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (12000 rpm, 5 min, Sigma 112) ließ sich das Proteinpräzipitat mit einem sterilen Zahnstocher entfernen.

Der Überstand wurde mit 450 µl Phenol-Chloroform 1:1 (v/v) extrahiert und dann abzentrifugiert (12000 rpm, 3 min). Der wäßrige Überstand wurde abpipettiert und mit 0.7 Volumen Isopropanol gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation sedimentiert (12000 rpm, 20 min), danach mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Das Pellet wurde dann 10 min luftgetrocknet und in 20 µl H₂O (mit 0.1 mg/ml RNase) gelöst. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Lösung I	Lösung II	Lösung III
10 mM EDTA	0.2 N NaOH	3 M K-Acetat
2 mM Tris-HCl, pH 8.0	1 % (w/v) SDS	pH 4.8 (Eisessig)

2.3.3.1 Präparative Plasmidisolierung

Mit dieser Methode wurden große Mengen Plasmid-DNA für Klonierungsschritte isoliert. Eine 200 ml-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 rpm) und das entstehende Zellpellet in 6 ml Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml Lösung II und 9 ml eiskalter Lösung III wurde der Ansatz 10 min auf Eis gelagert, bis die Lösung klar war. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (15 min, 4°C, 5000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und nacheinander mit 1 Vol. Phenol-Chloroform und 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit 2.5 Vol Ethanol gefällt, abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet 10 min luftgetrocknet war, wurde es in 200 µl H₂O aufgenommen.

2.3.4 Plasmidpräparation mit Qiaprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN Inc. 1997)

Die mittels Anionenaustauscher-Säulen (QIAGEN Inc., Chatsworth, USA) isolierte DNA war hinsichtlich des erzielten Reinheitsgrades und der Konzentration für Klonierungen geeignet.

3 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und in 250 µl Puffer P1 (100 µg/ml RNaseA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer P2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) zugesetzt und der Ansatz 5 mal vorsichtig über Kopf geschwenkt. Nach Zugabe von 350 µl Puffer P3 (3 M Kalium-Acetat pH 5.5) wurde der Ansatz erneut geschwenkt und das entstandene Präzipitat mittels einer Zentrifugation von 5 min in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde auf die Säule mit Sammelgefäß gegeben und für 1 min zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde entleert und die Säule mit 750 µl QC-Puffer [1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol (pH 7.0)] gewaschen. Zur Elution der DNA wurden 50 µl steriles Wasser auf die Säule pipettiert und nach einer 1 minütigen Inkubation in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert.

2.3.5 Präparative Plasmidisolierung für Sequenzierungen [nach Quiagen]

Mittels dieser Methode wurden große Mengen an konzentrierter, hochreiner DNA für Sequenzierungen isoliert. Die DNA konnte auf einer Anionenaustauschersäule gereinigt und

mit 1.25 M NaCl eluiert werden. Die Reinigung verzichtet damit auf die Verwendung von Phenol.

100 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden aufgearbeitet und mit je 12 ml der Lösungen I, II und III (siehe Plasmidminipräparation) versetzt. Das entspricht dem 3fachen Ansatz des Standardprotokolls, da gezeigt werden konnte, dass die Säulen mehrfach zu verwenden sind, wenn sie zwischendurch äquilibriert werden. Nach dem Abzentrifugieren der Proteine wurde die Quiagen-tip 100-Säule mit 4 ml QBT-Puffer [750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol (pH 7.0), 0.15 % (v/v) TritonX-100] äquilibriert. Danach wurden 12 ml DNA-Lösung auf die Säule aufgetragen, zweimal mit 10 ml QC-Puffer [1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol (pH 7.0)] gewaschen und mit 5 ml QF-Puffer [1.25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol (pH 8.2)] die DNA eluiert. Durch erneutes Äquilibrieren der Säule konnte die beschriebene Prozedur noch zweimal wiederholt werden. Die DNA wurde aus dem Eluat mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt (30 min, RT) und dann abzentrifugiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 %igen Ethanol und Trocknen wurde die DNA in 60 µl H₂O gelöst und hatte dann eine für die Sequenzierung erforderliche Konzentration von 1 µg/µl.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in horizontalen Flachbett-Apparaturen. Die Gele hatten Agarose-Konzentrationen von 0.7 % (w/v) bis zu 2.0 % (w/v), um eine optimale Auftrennung, je nach Größe der DNA-Fragmente zu erreichen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)] verwendet. Die Agarose wurde in der Mikrowelle in Elektrophorese-Puffer gelöst. Vor dem Gießen wurde der abgekühlten Agarose noch 500 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 0.2 Vol Stop-Mix [40 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 M EDTA, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Aufgetragen wurden 1-20 µl auf ein analytisches Gel, 20-50 µl auf ein präparatives Gel, wobei sich die Mengen nach der DNA-Konzentration richteten.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-120 V (Netzgerät: Pherostab.300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen) bis die Bromphenolblau-Bande das Gelende erreicht hatte. Bei jedem Lauf wurde ein Molekulargewichtsmarker mit DNA-Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Die DNA-Banden wurden durch UV-Licht (UV-Transilluminator, Appligene, Illkirch) sichtbar gemacht und mittels Image-Master (Pharmacia Biotech) dokumentiert.

2.3.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsabschätzung erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Proben mit der Intensität von DNA-Fragmenten bekannter Konzentration unter Beachtung der Fragmentgröße.

2.3.7.1 DNA-Standardmolekulargewichtsmarker

Die Größe von linearen DNA-Fragmenten wurde durch Vergleich mit *Hind*III- und *Pst* I geschnittener Lambda-DNA als Standard festgestellt. Die bei den Restriktionen entstehenden Fragmente sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Fragmentgrößen linearer Standard-DNA, Angaben in bp

<u>λ-DNA, <i>Pst</i> I geschnitten</u>	<u>λ-DNA, <i>Hind</i> III geschnitten</u>
14655	23130
11497	9416
5077	6682
4749	4361
4503	2322
2838	2027
2459	564
2443	139
2140	
1986	
1700	
1159	
1033	
805	
514	

2.3.8 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonucleasen

Pro μg DNA wurden 2-10 Units des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt, wobei die Enzymlösung maximal 1/10 des Gesamtvolumens einnahm. 1 Unit eines Restriktionsenzym ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μg DNA innerhalb einer Stunde bei 37°C vollständig spaltet. Der Restriktionsansatz wurde für 1-14 h bei 37°C inkubiert. Wenn bei Doppelverdauen kein gemeinsamer Reaktionspuffer eingesetzt werden konnte, wurde die DNA zwischen beiden Schritten umgefällt oder mikrodialysiert. Die Restriktion wurde mittels Gelelektrophorese ausgewertet, anschließend folgte eine 10minütige Inkubation bei 80°C zur Inaktivierung des Enzyms.

2.3.9 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse wurde durchgeführt, um Restriktionspuffer bei Doppelverdauen zu wechseln und zur Entsalzung von Ligationsansätzen, die zur Elektroporation eingesetzt werden sollten. Dazu wurden ca. 25 ml 10 %iges Glycerin in eine sterile Petrischale gefüllt und ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0.025 mm (Millipore GmbH, Eschborn) auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die DNA-Probe wurde auf den Filter aufgetropft und nach 30-60 min wieder abgenommen.

2.3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten, wurden diese aus einem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht herausgeschnitten. Danach wurde nach dem Quiaquick-Agarosegel-Extraktions-Protokoll (Quiagen Inc., USA) weiterverfahren. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Bindung von DNA an eine Silica-Gel Membran unter spezifischen Puffer- und pH-Bedingungen, und schließt nachfolgende Waschschrte ein.

Nach Auswiegen der DNA-haltigen Gelstücke, löste man diese im 3fachen Volumen an Puffer QX1. Dazu erfolgte eine Inkubation von 10 min bei 50°C. Die Lösung wurde auf eine Spin-Säule aufgetragen, danach mit 750 μl Puffer PE gewaschen und die DNA mit 30 μl H₂O von der Säule eluiert.

2.3.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Selbstligationsrate von linearisierter Vektor-DNA zu verringern, wurde der Vektor vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert. Die

Dephosphorylierung erfolgte im Restriktionsansatz. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1-2 h vor Abstopfung 1 μl (1U) alkalische Phosphatase zugesetzt.

2.3.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20-50 μl . Das Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA betrug ca. 1:2. Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase (Stratagene, Heidelberg) und in einem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, der ATP enthielt, durchgeführt. Zur Freilegung der kohäsiven Enden wurde der Ansatz vor Zugabe der T4-DNA-Ligase 5 min bei 45°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurde 1 U T4-Ligase zugegeben und kurz gemischt. Die Ligationen wurden 24-48 h bei 4°C inkubiert. Für Schnelligationen wurde der Rapid-DNA-Ligations-Kit (Boehringer-Mannheim) eingesetzt. Dabei wurden 10 μl DNA (Vektor + Insert) in DNA dilution buffer und 10 μl 2fachen T4-DNA ligation buffer gemischt, 1 μl T4 DNA-Ligase (5 Units) zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz konnte dann sofort transformiert werden. Die Transformationsausbeute war bei der Schnelligation deutlich schlechter als bei der klassischen Ligation.

2.3.13 Transformation

Klassische Transformation

Für diese Methode wurden kompetente Zellen nach CaCl_2 -Methode (Mandel und Higa, 1970) hergestellt. Die Transformation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989.

Zur Herstellung der kompetenten Zellen mußte über Nacht eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen werden. Die 100 ml Hauptkultur wurde 1%ig angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600}=0.3$ bei 37°C geschüttelt. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm), das Pellet mit 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl_2 -Lösung gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension erneut abzentrifugiert und der Überstand restlos dekantiert. Das Zellsediment wurde in 2 ml 0.1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und über Nacht auf Eis gelagert. Die kompetenten Zellen wurden dann in Portionen zu je 200 μl bei -80°C gelagert.

200 μl kompetente Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA versetzt, gut gemischt und 30 min erschütterungsfrei auf Eis gelagert. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für genau 90 sec. Nachdem die Zellen auf Eis wieder abgekühlt waren, erfolgte eine Zugabe von 800 μl LB-Medium, und der Ansatz wurde 45 min bei 37°C geschüttelt. Ein Teil des

Transformationsansatzes wurde auf einer Selektionsplatte ausplattiert, der andere Teil konnte bis zu 7 Tagen bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.14 Polymerase-Kettenreaktion

2.3.14.1 Synthese der Primer

Die Sequenzen der Primer wurden unter Zuhilfenahme des Computerprogramms OLIGO ausgewählt. Die Synthese der Primer erfolgte am DNA-Syntheseapparat "Gene Assembler Plus" (Pharmacia) nach der Phosphoramiditmethode. Hauptsächlich wurden gekaufte Primer (GIBCO) eingesetzt (Tabelle 3).

Die Konzentration der Primer wurde am GeneQuant (Pharmacia, Freiburg) vermessen, wenn sie nicht vom Händler mitgeliefert war. Die Primer wurden für die PCR-Reaktion auf ca. 50 pmol/µl in H₂O verdünnt.

Tabelle 3: in dieser Arbeit verwendete PCR-Primer

Name	Nukleotidsequenz
GA923	5'- <u>CGGAATTC</u> CATACGGGGAAACAGCAATG-3'
A-HIS-TAG SphI	5'- <u>G</u> CATGTTTGAACGTATCATTAGTTTCGCC-3'
GA922	5'- <u>CAGGATCC</u> AGGCTGGCGGCCTTGATCCGGTT-3'
A-HIS-TAG BamHI-2	5'- <u>CAGGATCC</u> CTGACCCGGCGCACGAAC-3'
A-HIS-TAG SphI-2	5'- <u>G</u> CATGCGCGAAGAAGGGCAT-3'
A-HIS-TAG SphI-3	5'- <u>G</u> CATGGGTACGGGCGCTGAG-3'
A1-β-GAL-NcoI	5'- <u>G</u> ACCATGGTTTGAACGTATCATTAAGT-3'
A1-β-GAL-SalI	5'- <u>G</u> TGTCGACTTCACTGACCCGGC-3'
A2-β-GAL-NcoI	5'- <u>G</u> ACCATGGACGGGCGCTGAGGTG-3'
A2-β-GAL-SalI	5'- <u>G</u> TGTCGACTTCATGCAGGCTGGCG-3'
A1-pMAL-EcoRI	5'- <u>CGGAATTC</u> TTTGAACGTATCATTAGTTTC-3'
A1-pMAL-BamHI	5'- <u>CAGGATCC</u> TCACTGACCCGGCGC-3'
A2-pMAL-EcoRI	5'- <u>CGGAATTC</u> ACGGGCGCTGAG-3'
A2-pMAL-BamHI	5'- <u>CAGGATCC</u> TCACTGCAGGCTGGCG-3'

^a Die unterstrichenen Bereiche gehören nicht zu *czcA*, sondern beinhalten die eingeführte Schnittstelle.

In Tabelle 4 sind die Primerkombinationen für die einzelnen *czcA*-Domänen in den jeweiligen Expressionsvektoren dargestellt.

Tabelle 4: Primerkombinationen

Amplifizierter Bereich	Expressionsvektor	Primerkombination
RBS von <i>czcA</i> + Gesamtgen	pQE 60	GA923 und GA922
Gesamtgen ohne RBS	pQE 70	A-HIS-TAG SphI / GA922
N-terminale Domäne	pQE 70	A-HIS-TAG SphI / A-HIS-TAG BamHI-2
C-terminale Domäne	pQE 70	A-HIS-TAG SphI-2 / GA 922
C-terminale Domäne	pQE 70	A-HIS-TAG SphI-3 / GA922
N-terminale Domäne	pXa 2	A1- β -GAL-NcoI / A1- β -GAL-SalI
C-terminale Domäne	pXa 2	A2- β -GAL-NcoI / A2- β -GAL-SalI
N-terminale Domäne	pMAL-c2	A1-pMAL-EcoRI / A1-pMAL-BamHI
C-terminale Domäne	pMAL-c2	A2-pMAL-EcoRI / A2-pMAL-BamHI
Gesamtgen ohne RBS	pASK-IBA3	A1-pMAL-EcoRI / GA922

2.3.14.2 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die PCR-Reaktion wurde in Thermocyclern der Firma Biometra (Trio-Thermoblock) durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden Polymerasen ohne 'Proof-reading'-Funktion (Taq, Pharmacia; Tfl, Biozym), für Klonierungszwecke Polymerasen mit 3'-5'-'Proof-reading'-Funktion (Pwo, Boehringer) eingesetzt. Als Template-DNA diente gereinigte Plasmid-DNA.

Eine Standard-PCR wurde mit folgenden Komponenten in einem 50 μ l-Ansatz durchgeführt:

Reaktionspuffer	meist 10fach konzentriert
Mg ²⁺	1.5-2.5 mM (MgSO ₄ für Pwo, MgCl ₂ für Tfl)
dNTP-Mix	10 μ M pro Nukleotid
Primer	20-50 pmol je Primer
Template-DNA	10-100 ng
Enzym	1-2.5 U

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 40 μ l Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet.

Nach einem Hotstart von 3 min bei 96°C, der der vollständigen Denaturierung von Template- und Primer-DNA diente, wurde Polymerase zum Ansatz gegeben und die eigentliche Kettenreaktion begann. Ein repräsentatives Beispiel für einen Zyklus ist nachfolgend beschrieben:

Denaturierung	94°C	20 sec.
Annealing	55°C	20 sec.
Extension	72°C	3 min
Zyklus 26mal wiederholt		
Extension	72°C	5 min

Die Annealingtemperatur wurde je nach verwendetem Primerpaar 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur angesetzt. Die Schmelztemperatur der Primer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$2 \times (A+T) + 3 \times (G+C) = \dots^\circ\text{C}$$

Die Extensionzeiten betragen etwa 1 min pro 1 kb Fragmentlänge. Bei der PCR mit Pwo-Polymerase wurden geringfügig längere Extensionszeiten verwendet und außerdem diese Zeiten pro Zyklus um 2-5 sec. verlängert. Das ist notwendig, da die Pwo-Polymerase im Verlauf der PCR-Reaktion an Aktivität verliert.

Nach Beendigung der PCR wurde der wäßrige Reaktionsansatz vom Mineralöl abgetrennt und 5 µl des Ansatzes zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt. Der Rest der PCR wurde gegebenenfalls gereinigt.

2.3.15 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte enzymatisch über das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) und beruht auf der in vitro DNA-Synthese durch T7-DNA-Polymerase. Dabei entsteht eine fluoreszenzmarkierte, komplementäre Kopie des zu sequenzierenden Matrizenstranges. Die Sequenzierungsreaktionen wurden am automatisierten Sequenziergerät (A.L.F. Sequenzer, Pharmacia) unter Verwendung des AutoReadTM Sequencing Kit (Pharmacia) durchgeführt.

2.3.15.1 Primer

Zum Einsatz kamen unmarkierte Primer, die für die Sequenzierungsreaktion mit Fluoreszin-15-dATP markiert werden mußten.

Tabelle 5: Primer für die Sequenzierungsreaktion

Primer	Sequenz	Bindung
QIAexpress pQE-		
Sequencing Primer	5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'	pQE-Vektoren
Strep-tag 3 up	5'-AGTAGCGGTAAACGGCGAACA-3'	pASK-IBA3
Strep-tag 3 down	5'-CAGTGATAGAGAAAAGTGAA-3'	pASK-IBA3

2.3.15.2 Sequenzierung mit unmarkierten Primern und Fluorescein-15-dATP (Wiemann et al., 1994)

Annealing

Der Annealingansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

5-10 µg Plasmid-DNA	9 µl
5-20 pmol Primer GA587	2 µl
1 M NaOH	1.5 µl

Nach einer Inkubation für 5 min bei 65°C wurde der Ansatz mit 1.5 µl 1 M HCl neutralisiert, mit 2 µl Annealing-Puffer versetzt, 10 min bei 37°C und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Markierung und Sequenzreaktion

Für die Markierungsreaktion wurde dem Ansatz 1 µl FdATP-Labeling Mix zugegeben und mit 2 µl verdünnter T7-DNA-Polymerase gestartet. Die Reaktion inkubierte 10 min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 1 µl 'Extension-Buffer' und 3.5 µl DMSO abgestoppt. Während dieser Zeit wurden je 3 µl der vier Desoxy-Nukleotid-Mixe in getrennte Slots einer Mikrotiterplatte pipettiert und auf 37°C erwärmt. Je 4.5 µl des Markierungsansatzes wurden auf die vorgewärmten Nukleotid-Mixe verteilt und die Sequenzierungsreaktion nach 5 min bei 37°C durch Zugabe von 5 µl Stopper-Lösung beendet. Der Reaktionsansatz wurde 2 min bei 90°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

2.3.15.3 Sequenzgel und Auswertung der Daten

Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgte am A.L.F.TM-Sequencer in einem 6%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel (Acrylamid: Bisacrylamid 19:1) in 0.6 x TBE-Puffer.

Gelzusammensetzung:	25.2 g	Harnstoff (Pharmacia, A.L.F. grade)
	9 ml	40%ige PAA-Lösung (Bio-Rad)
	3.6 ml	10 x TBE-Puffer
	210 µl	APS
	45 µl	TEMED
	ad. 60 ml	aqua bidest.

Die Auftrennung erfolgte unter den folgenden Laufbedingungen:

Vorlaufzeit: 30 min

38 mA, 1500 V, 34 W, 40°C

Laufzeit: 500 min

Die Sequenzdaten wurden unter Anwendung der Analyseprogramme DNAsis und CLONE ausgewertet.

2.4 Enzymmessung

2.4.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität des CzcA-LacZ-Fusionsproteins (mod. nach Miller et al., 1972)

Für den Enzymtest wurden jeweils 50 µl Probe (mit entsprechender Verdünnung) zu 950 µl Z-Puffer [60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM Mercaptoethanol] gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 100µl der Substratlösung o-Nitrophenylgalaktopyranosid (ONPG) (4 mg/ml). Zur Umsetzung des Substrates wurde der Reaktionsansatz in einem Wasserbad bei 30°C inkubiert, bis eine intensive Gelbfärbung eintrat. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl 1 M NaCO₃-Lösung beendet, da der pH-Wert des Reaktionsansatzes somit auf 11 sank. Als Reaktionszeit (T) wurde dabei die Zeit vom Augenblick der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion angenommen. Gemessen wurde die Extinktion bei 420 nm in einem UV/VIS-Spektrophotometer [Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd., England]. Als Nullwert diente dabei die Probe, die ohne Proteinlösung genau wie die anderen Ansätze behandelt worden war.

Mit Hilfe der gemessenen Extinktion [E_{420}] konnte die Aktivität des Fusionsproteins nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität (U/ml)} = 355,6 * E_{420} / T$$

Eine Unit ist definiert als der Substratumsatz (ONPG) in nmol pro min bei 30°C.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Induktion der Genexpression

500 ml-Kulturen (100 µg/ml Ampicillin wurden 1%ig mit der Übernachtvorkultur angeimpft. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0.7-1.0 erfolgte die Induktion der Genexpression mit 1.5 ml 0.1 M IPTG bzw. 25 µl einer 2 mg/ml Anhydrotetracyclin-Lösung in DMF. Die induzierte Kultur wurde für 3 h bei 30°C weiter inkubiert und anschließend geerntet.

2.5.2 Zellernte und Gesamtzellaufschluß

Die 500 ml-Kulturen wurden in 450 ml Polycarbonat-Zentrifugenbecher überführt und mittels Zentrifugation in der Sorvall RC 5B plus-Zentrifuge (Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) im GS3- Rotor bei 8000 rpm und 4°C für 15 min geerntet. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -20°C.

Der Zellaufschluß erfolgte mittels French-Press (Aminco, SLM Instruments, Inc., IL/USA).

2.5.3 Membranpräparation

Im Falle der *czcA::lacZ*-Fusion (pECD297 in WM1704) wurden die Zellen zu 3 Volumen des Feuchtgewichtes (w/v) in Resuspendierungspuffer (100 mM NaPO₄, pH 7.0; 0.25 M Sucrose) aufgenommen und langsam auf Eis auftauen lassen. Nach Zugabe von 10 µg/ml DNaseI und 1 mM PMSF wurde die Zellsuspension durch zweimalige Passage bei einem Druck von 1000 psi in der 20 K-Zelle der vorgekühlten French-Press (Aminco, SLM Instruments, Inc., IL/USA) aufgeschlossen.

Die Zelltrümmer und unaufgeschlossene Zellen wurden bei 20.000 x g für 10 min in dem SS34-Rotor (Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) und bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 1 h bei 100.000 x g (Beckmann Ultrazentrifuge, SW 28-Rotor, 27.000 rpm) ultrazentrifugiert. Das Membranpellet wurde in 100 mM NaPO₄-Puffer, pH 7.0; 0.25 M Sucrose aufgenommen.

Die Membranen wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Lowry *et al.*, 1951, mod.) sofort zur Solubilisation eingesetzt.

Im Falle des Strep-Tag-CzcA-Fusionproteins wurde das Zellpellet einer 1 l BL21-Kultur (pECD559 enthaltend) in 10 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) aufgenommen und langsam bei 4°C auftauen lassen.

Bis einschließlich der Ultrazentrifugation wurde analog der obigen Aufarbeitungsmethode verfahren. Das Membranpellet wurde in 10 ml Puffer W resuspendiert und die Proteinkonzentration anschließend nach der Methode von Lowry *et al.*, 1951 (mod.) ermittelt. Die Membranen wurden ebenfalls sofort zur Solubilisation eingesetzt.

2.5.4 Membransolubilisierung

2.5.4.1 Solubilisierung mit Digitonin

Zur Solubilisierung wurden die Membranproteine auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit Natriumphosphat-Puffer (100 mM NaPO₄, pH 7.0) eingestellt, mit 0.3% Digitonin (w/v) versetzt und über Nacht bei 4°C gerührt. Das Solubilisat wurde anschließend für eine Stunde bei 4°C, 8000 rpm im JA-10-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Da das Volumen des Überstandes immer recht groß war (600-1000 ml) wurde eine Fällung mit Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000) durchgeführt.

Um lokale Überkonzentrationen an PEG 6000 zu vermeiden, wurde eine Stammlösung von 50% (w/v) PEG in H₂O dest. zur Fällung eingesetzt.

Zu dem Solubilisat wurde langsam unter Rühren bei 4°C PEG 6000 zugesetzt, bis die Endkonzentration von 10% (w/v) erreicht war, danach erfolgte noch eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Die so gefällten Membranproteine wurden mittels einer Zentrifugation im JA-Rotor (Beckmann) für 1 h bei 4°C und 8000 rpm sedimentiert. Anschließend wurden die Membranproteine in einem kleinen Volumen (5-10 ml) Natriumphosphatpuffer (150 mM NaPO₄, pH 7.0; 1.0 % Triton X 100) extrahiert und das PEG 6000 durch eine 15 minütige Ultrazentrifugation bei 100.000 x g (Beckmann-Ultrazentrifuge, SW 55-Rotor, 30.000 rpm) abgetrennt. Die nach diesem Verfahren gewonnenen Membranproteine wurden zur Säulenchromatographie eingesetzt.

2.5.4.2 Solubilisation mit n-Dodecylmaltosid (nach Hanada *et al.*, 1988)

Die, wie unter Abschnitt 2.5.3 beschrieben, gewonnenen Membranen/Membranproteine, die das CzcA-Strep-tag-Protein enthielten, wurden auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit Puffer W (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) verdünnt. Anschließend wurden dem Ansatz 1 mg n-Dodecylmaltosid/mg Protein und 3.5 mg/ml L α -Phosphatidylcholin, β -Linoleoyl- γ -Palmitoyl, sowie 0.02 U Avidin zugesetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT

gerührt und die Membranen bei 100.000 x g in der Beckmann-Ultrazentrifuge durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand, d.h. in diesem Falle das Solubilisat, wurde danach zur Affinitätschromatographie an Strep-Tactin Sepharose eingesetzt.

2.5.5 Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen

Das **Umpuffern** von Proteinlösungen erfolgte mittels Dialyse. Die verwendeten Dialyseschläuche besaßen Porengrößen von 12-14 kDa (Fa. Serva, Heidelberg) oder 6-8 kDa (Spectra/Por-Dialyseschläuche, Fa. Spectrum Medical Industries, CA/USA, bezogen über Fa. Carl Roth). Die nach Herstellerangaben ausgekochten Schläuche wurden in 0.1% (w/v) NaN₃ aufbewahrt.

Das **Einengen** von Proteinlösungen erfolgte durch Einlegen der sich in einem Dialyseschlauch befindenden Lösung in trockenes PEG-20.000 (Harris und Angal, 1989). Nach Erreichen des gewünschten Volumens wurde der Dialyseschlauch in den entsprechenden Puffer überführt und die eingengte Lösung einer Dialyse unterzogen.

2.6 Säulenchromatographie

2.6.1 Geräte

Zur Steuerung, Detektion und Fraktionierung wurden sowohl das HiLoadTM-System (bestehend aus Programmer GP-10, Peristaltische Pumpe P-1, Uvicord S II, Fraktionssammler RediFrac) als auch das FPLC-System (bestehend aus Programmer GP-250, High Precision Pump P-500, Uvicord S II, Fraktionssammler RediFrac) der Fa. Pharmacia genutzt. Die Darstellung der Elutionprofile erfolgte mit Hilfe des angeschlossenen Flachbrettschreibers REC 101 (Fa. Pharmacia). Die Temperatur betrug bei allen Versuchen mit diesen Anlagen +4°C. Die gepackten Säulen wurden vor dem Auftragen der Proteinlösung mit dem entsprechenden Puffer bis zu einer konstanten Extinktion des Eluates äquilibriert. Nach dem Auftragen erfolgte ein Waschschriff mit Äquilibrierungspuffer, gefolgt von der Elution über einen ansteigenden Salzgradienten, der durch Gradientenmischer, bestehend aus zwei verbundenen Flaschen, als Pufferkammern bereitgestellt wurde.

Das Austesten von verschiedenen Säulenmaterialien erfolgte in Mini-Polysteren-Säulen unter Schwerkraftfluß.

2.6.2 Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-300

Die Gelpermeationschromatographie ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe; die Ladung spielt dabei keine Rolle, sofern die Ionenstärke im Elutionspuffer hoch genug ist (Cooper, 1981).

2.5 ml Solubilisat [Überstand der Ultrazentrifugation (7.2 mg Prot./ml)] wurden gegen NaPO_4 -Puffer (150 mM NaPO_4 , pH 7.0; 0.05% Triton X-100) dialysiert und anschließend auf 450 ml Sephacryl S-300 HR (Fa. Pharmacia) in einer C 25/100-Säule (25 mm x 100 cm, Fa. Pharmacia) aufgetragen. Die Säule war zuvor mit NaPO_4 -Puffer (150 mM NaPO_4 , pH 7.0; 0.05% Triton X-100) bei einer Flußrate von $3.7 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ äquilibriert worden. Die Elution erfolgte in dem Äquilibrierungspuffer ohne Änderung der Flußrate.

2.6.3 Substrataffinitätschromatographie an APTG (4-Aminophenyl- β -D-thiogalactopyranosid)

Da die exprimierten β -Galaktosidase-Fusionsproteine eine β -Galaktosidase-Enzym-Aktivität aufweisen, können Affinitätschromatographien an APTG-Agarose-Säulen durchgeführt werden. APTG als Substrat ist ein Analogon zu IPTG; es wird gebunden, jedoch durch die β -Galaktosidase nicht gespalten.

2,5 ml bereits gequollenes APTG-Agarose-Material (Fa. Sigma) wurde in eine C10/10-Säule (10 mm x 10 cm; Fa. Pharmacia) gegeben. Die APTG-Säule wurde anschließend mit 10 Bettvolumen NaPO_4 -Puffer (50 mM NaPO_4 , pH 7.0; 0.05% Triton X-100) äquilibriert. Der gegen 50 mM NaPO_4 , pH 7.0; 0.05% Triton X-100 dialysierte Gelfiltrationspool (0.5 mg/ml) wurde mit einer Flußrate von $15.3 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ aufgetragen. Nachfolgend wurde die APTG-Agarose-Säule mit 15 Bettvolumen Natriumphosphat-Puffer (50 mM NaPO_4 , pH 7.0; 0.05% Triton X-100) gewaschen. Eluiert wurde das CzcA::LacZ-Fusionsprotein mit einem linearen KCl-Gradienten (0-500 mM) bei einer Flußrate von $15.3 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

2.6.4 Chromatographie an Hydroxylapatit

Proteine interagieren mit Hydroxylapatit auf zwei unterschiedliche Weisen. Die negativen Ladungen eines Proteins interagieren vorzugsweise mit der Ca^{2+} -Oberfläche des Hydroxylapatits, während die positiven Ladungen an die Phosphatgruppen binden.

65 ml Bio-Gel HT Hydroxylapatite (Fa. Bio Rad) wurde in eine C16/40-Säule (16 mm x 40 cm; Fa. Pharmacia) gegeben. Die Hydroxylapatit-Säule wurde anschließend mit 15 Bettvolumen KPO_4 -Puffer (10 mM KPO_4 , pH 7.0, 200 mM KCl, 0.5 % Triton X-100) äquilibriert. Danach wurden 2.5 ml solubilisierter Membranproteine (7.2 mg Prot./ml), die zuvor gegen KPO_4 -Puffer dialysiert worden waren, mit Flußrate von $6 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ aufgetragen. Gewaschen wurde die

Säule mit dem 12 fachen Bettvolumen an KPO_4 -Puffer und eluiert wurde das CzcA::LacZ-Fusionsprotein mit einem linear steigenden Phosphatgradienten bei einer Flußrate von $14.9 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

2.6.5 Chromatographie an Nickel-Chelat-Sepharose

Die Methode der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (MCAC) sollte, laut einer Produktinformation der Firma Pharmacia, besonders geeignet für die Reinigung von Membranproteinen und Proteinaggregaten sein, da dort hohe Detergenz und/oder Salzkonzentrationen zum Einsatz kommen. Die Bindung der Proteine an den Metall-Chelat-Sepharosekomplex sollte über die exponierten Cystein-, Histidin- und Tryptophanreste erfolgen. Die Bindung von Proteinen wurde jedoch auch beobachtet, wenn die genannten Aminosäurereste nicht exponiert waren, so daß angenommen wurde, daß die Bindung in diesem Falle über die Aminogruppen geschah.

15 ml Metall-Chelat-Sepharose Fast Flow (Fa. Pharmacia) wurde in eine VL-Säule (16 x 250 mm Fa. Amicon) gegeben. Zur Herstellung der Nickel-Säule wurde das Metall-Chelat-Material mit dem 5-fachen Bettvolumen an Natriumphosphat-Puffer (20 mM NaPO_4 , pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM Imidazol) äquilibriert, zur Entfernung des Phosphats mit den 10-fachen Bettvolumen an 0.5 M NaCl gewaschen und anschließend mit einem Bettvolumen 250 mM NiCl_2 (in 0.1 M NaAc, pH 6.0) geladen. Danach erfolgte wiederum ein Waschschrift mit 0.5 M NaCl und eine Äquilibrierung mit Natriumphosphat-Puffer. Die vereinigten Fraktionen des Hydroxylapatitsäulenlaufes wurden gegen Natriumphosphat-Puffer dialysiert und auf die zuvor äquilibrierte Nickel-Chelat-Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem linear ansteigenden Imidazolgradienten.

2.6.6 Gelpermeationschromatographie an Superose 6 HR

Mittels der Gelpermeationschromatographie sollte das CzcA-LacZ-Fusionsprotein aufgrund seines relativ großen Molekulargewichts von bisher kontaminierenden Proteinen abgetrennt werden. Es wurde daher hoch auflösendes Säulenmaterial (Superose 6 HR) gewählt, das einen Trennbereich von 5-5000 kDa aufweist. Die aktiven Fraktionen des Nickel-Chelat-Säulenlaufes wurden mittels PEG 600 eingengt, einer 15 minütigen Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$) unterzogen und der erhaltene Überstand (jeweils 500 μl) über eine Injektionsschleife auf die Superose 6 HR-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetragen.

Um Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und zwischen Protein und Säulenmaterial zu minimieren, wurde dem Elutionspuffer (20 mM NaPO_4 , pH 7.5, 0.1% Triton X 100) bis zu 1 M NaCl zugesetzt.

2.6.7 *Reinigung an Strep-Tactin Sepharose*

Die Solubilisierung erfolgte wie unter 2.5.4.2 beschrieben nach einem modifizierten Protokoll von Hanada *et al.*, 1988.

Das Solubilisat wurde direkt auf die mit Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 % (w/v) n-Dodecylmaltosid, 0.2 mg L α -Phosphatidylcholin, β -Linoleoyl- γ -Palmitoyl/ml] äquilibrierte Strep-Tactin Sepharose-Säule (1.5 ml) gegeben, wobei unter Schwerkraftfluß gearbeitet wurde. Nach dem Auftragen des Solubilisates wurde die Säule mit 12 Bettvolumen Puffer W gewaschen, anschließend erfolgte die Elution mit 10 x 0.75 ml Puffer E [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 % (w/v) n-Dodecylmaltosid, 0.2 mg L α -Phosphatidylcholin, β -Linoleoyl- γ -Palmitoyl/ml, 2.5 mM Desthiobiotin]. Die Regeneration der Säule wurde mit Puffer R [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM HABA] durchgeführt.

2.6.8 *Proteinbestimmung*

2.6.8.1 *Proteinbestimmung von Membranproteinen nach Lowry et al., (1951) mod.*

Um die Konzentration membrangebundener Proteine zu bestimmen, wurde eine nach Lowry *et al.*, 1951; Bensadoun und Weinstein, 1976 und Hess *et al.*, 1978 modifizierte Methode angewandt.

Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

1. 10 mg/ml Natrium-Desoxycholat (frisch hergestellt)
2. 240 mg/ml Trichloressigsäure
3. 0.8 M NaOH
4. Reagenz A: 0.2 g Dinatrium-Tartrat und 10 g Na_2CO_3 wurden in 68 ml 0.8 M NaOH gelöst und auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt
5. Reagenz B: 2 g Dinatrium-Tartrat und 1 g CuSO_4 wurden in 12.5 ml 0.8 M NaOH gelöst und auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt und lichtgeschützt aufbewahrt.
6. Mix: 25 Vol. Lösung 4 und 2 Vol. Lösung 5
7. Reagenz C: 1 Vol. Folin Ciocalteu Reagenz mit 2 Vol. $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Die Lösungen 6 und 7 wurden jeweils vor Versuchsbeginn frisch angesetzt.

Die Proben wurden mit dem entsprechenden Puffer auf 600 µl verdünnt, mit 10 µl 1%iger (w/v) Natriumdesoxycholatlösung versetzt und nach gründlicher Durchmischung 15 min bei 22°C inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 200 µl einer 24%igen (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Nach einer 7 minütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 12.000 rpm wurden die Überstände sorgfältig und die Sedimente mit 450 µl Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente suspendiert waren, wurde den Proben zweimal je 300 µl Reagenz C zugegeben, wobei jeweils sofort nach der Zugabe gründlich gemischt wurde. Zur Farbentwicklung wurden die Proben für 30-60 min im Dunkeln inkubiert, bevor die Extinktion bei 750 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen wurde. Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve im Bereich von 5-60 µg pro Ansatz mit BSA aufgenommen.

2.6.9 Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flüge, 1984)

Die Chloroform-Methanolfällung wurde verwendet, um Proteine aus stark verdünnten Lösungen für die SDS-PAGE aufzukonzentrieren. Dabei wurde nach folgenden Schritten vorgegangen: zunächst wurden jeweils 100 µl Probe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt, darauffolgend wurde 300 µl Wasser zugeben und gut geschüttelt. Danach erfolgte eine zwei minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge. Der Überstand wurde jeweils ohne Interphase abpipettiert und verworfen. Im letzten Schritt wurden 300 µl Methanol zugeben, die Ansätze geschüttelt und für 5 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets getrocknet.

2.6.10 Elektrophoretische Methoden

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurde das Minigelsystem der Fa. Biometra (Göttingen) verwendet. Die Gele wiesen die Maße 8.5 x 7.5 x 0.1 cm auf.

2.6.10.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Das Tris-Glycin-System mit einheitlicher Acrylamidkonzentration nach Laemmli (1970) wurde eingesetzt, um ca. 100 kDa gut aufzutrennen, sowie auch in Gradientengelen, um einen Bereich bis zu ca. 250 kDa gut darzustellen (von Jagow und Schaeffer, 1994).

Als Acrylamidlösung fand die gebrauchsfertige Acrylamid-Bisacrylamidlösung (40% T, 3.3% C) der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Verwendung. Zur Herstellung der Gele und zur anschließenden Elektrophorese wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Sammelgelpuffer:	0.5 M	Tris-HCl pH 6.8
Trenngelpuffer:	3.0 M	Tris-HCl pH 8.8
10 x Elektrodenpuffer:	30.3 g	Tris
	144.0 g	Glycin
	0.1 l	10% SDS
	ad 1 l	H ₂ O
Sammelgellösung:	4.7 ml	Acrylamidlösung (40% T, 3.3% C)
	12.5 ml	Sammelgelpuffer
	0.25 ml	20% SDS
	ad 50 ml	H ₂ O.
10%ige Trenngellsg.:	12 ml	Acrylamidlösung (40% T, 3.3% C)
	6.25 ml	Trenngelpuffer
	0.25 ml	20% SDS
	ad 50 ml	H ₂ O.
2 x SDS-Probenpuffer:	100 mM Tris-HCl pH 6.8	
	20 % Glycerin	
	4 % SDS	
	200 mM DTT	
	0.2 % Coomassie Blue G 250	

Zur Herstellung des SDS-Gels wurden 10 ml Trenngellösung mit 5 µl TEMED und 50 µl einer 10 %igen (w/v) APS-Lösung versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken wurde das Trenngel (6 ml) zwischen die Gelplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war (30 min), wurde das Wasser abgegossen und die Geloberfläche trockengetupft. Anschließend wurden 5 ml Sammelgel mit 5 µl TEMED

und 50 µl APS-Lösung versetzt und über das Trenngel gegossen, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde.

Da Membranproteine bei Temperaturen über 50°C zur Aggregation neigen, wurden zur Denaturierung die Proben mit 1 Vol. SDS-Probenpuffer versetzt und für 30 min bei 40°C denaturiert.

Dem Einwandern der Banden in das Gel bei 10 mA folgte die Elektrophorese bei 25 mA, bis die Farbstoffbande gerade aus dem Gel herausgelaufen war.

Als Molekularmassenmarker wurden der HMW-Marker (Sigma), der einen Größenbereich von 206-24 kDa abdeckte, und der MW-SDS-70L-Marker (Sigma), der einen Größenbereich von 66-6.5 kDa markierte, verwendet.

2.6.10.2 Coomassie-Färbung (Weber und Osborn 1969; mod.)

Färbelösung	Serva Blau G-250	0.6 g
	Serva Blau R-250	0.6 g
	Methanol	454 ml
	Eisessig	92 ml
	H ₂ O _{dem.}	ad 1000 ml

Entfärbelösung1:	Methanol	330 ml
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O _{dem.}	ad 1000 ml

Die Entfärbelösung 1 diente dem Entfärben von Polyacrylamidgelen

Entfärbelösung2:	Methanol	900 ml
	Eisessig	20 ml
	H ₂ O _{dem.}	ad 1000 ml

Die Entfärbelösung 2 wurde zum Entfärben von Blotmembranen eingesetzt.

2.6.10.3 Trocknen der Gele

Die zu trocknenden Gele wurden in Wasser gespült und anschließend zwischen zwei Lagen Celluphan-Folie mit einem Geltrockner (Gel Slab Drier GSD-4, Fa. Pharmacia, Freiburg) für 75 min vakuumgetrocknet.

2.6.11 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)

Folgende Stammlösung wurde verwendet: 0.1 M CAPS-Puffer pH 11.0

Die Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit 800 ml aqua bidest. und 100 ml Methanol verdünnt.

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran, Fa. Millipore, Eschwege). Die PVDF-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und jeweils für 1 min in Methanol, Wasser und zuletzt in 10 mM CAPS-Puffer geschwenkt. Um beim Transfer auf die Membran störende Salze zu entfernen, wurde das Gel nach der Entnahme aus der Elektrophoresekammer für 10 min in 10 mM CAPS-Puffer geschwenkt. In Gelgröße wurden 6 Lagen Whatman-3MM- Chromatographie-Papier zurechtgeschnitten und ebenfalls in 10 mM CAPS-Puffer gelegt. Der Blotstapel bestehend aus Fiberkissen, 3 Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier, SDS-Gel, PVDF-Membran und 3 weiteren Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier sowie Fiberkissen, wurde zwischen den Fixierplatten der Elektrophoresekammer in die Kammer eingesetzt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte für 90 min bei 100 Volt im Kühlraum bei 4°C. Nach dem Transfer wurde das SDS-Gel zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt.

2.6.11.1 Antikörpernachweis

Für den Antikörpernachweis wurde die Membran zur Abschwächung unspezifischer Proteinbindungen an die Membran für 1 h bei RT bzw. für 16 h bei 4°C durch Schwenken in [3% BSA, 0.5% Tween 20 in PBS-Puffer (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl)] inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x für 5 min mit PBS-Tween [PBS-Puffer mit 0.1% (v/v) Tween 20] gewaschen.

Nachweis Strep-tag II-haltiger Proteine mittels Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat:

Um kovalent biotinylierte Proteine aus *E.coli* spezifisch zu blockieren, wurde die Membran für 10 min in PBS-Tween mit 2 µg/ml Avidin geschwenkt, anschließend wurden der Lösung 2.5 µl/10 ml Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat zugesetzt und für weitere 60 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x in PBS-Tween und 2 x in PBS für je 1 min gewaschen.

Nachweis von rekombinanten und nicht-rekombinanten CzcA-Protein mittels Anti-CzcA-Antikörper:

Die Membran wurde in 10 ml PBS mit 1 µl CzcA-Antikörper (1:10.000 Verdünnung) für 16 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 3 x für 5 min in PBS-Tween gewaschen. Danach wurden 2.5 µl Anti-Kaninchen-Alkalische-Phosphatase-Konjugat zu 10 ml PBS zugesetzt und erneut für 1 h bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran für 3 x 5 min in PBS-Tween gewaschen.

Die Farbreaktion wurde in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 8.8 durch Zugabe von 10 µl 7.5% (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70% (v/v) DMF und 60 µl 5% (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Inolyl-Phosphat in DMF gestartet (Blake *et al.*, 1984). Sobald die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten, wurde die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen der Membran in aqua bidest. gestoppt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und zwischen Filterpapier lichtgeschützt aufbewahrt.

2.6.12 N-terminale Aminosäuresequenzierung

Die N-terminale Aminosäuresequenzierung erfolgte im Labor von Dr. Peter Rücknagel (MPI Enzymologie der Peptidbindung, Halle/Saale). Das auf eine PVDF-Membran (Fa. Millipore, Eschwege) geblottete Protein wurde in dem „476A protein sequencer“ (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Vorschrift des Herstellers im automatischen Edman-Abbau eingesetzt.

2.7 Rekonstitutionsexperimente

Zur Herstellung von Proteoliposomen wurde zum einen das Dialyseverfahren nach Racker (1979) ausgewählt, zum anderen durch ein modifiziertes Dialyseverfahren wie es unter anderem von Jung *et al.* (1998), Hagting *et al.* (1997) und Knol *et al.* (1996) beschrieben wurde. In diesem modifizierten Dialyseverfahren kommen Polystyrenkügelchen (Bio-Beads SM-2) zur Adsorption von nicht polaren Detergentien zum Einsatz.

Die reine Dialysmethode nach Racker ist zwar zeitaufwendiger als andere Verfahren, die z. B. auf Ultraschall oder Verdünnung basieren, hat aber den Vorteil, daß Membranproteine aufgrund des langsamen Entzugs von Detergentien häufig in einer definierten Orientierung in die Detergenz destabilisierten, vorgeformten Liposomen eingebaut werden (Casey *et al.*, 1982).

Die Voraussetzung für diese Technik ist ein dialysierbares Detergenz mit hoher CMC (Hjelmeland, 1990a), dies ist bei der Verwendung von Chaps der Fall. Triton X 100 hingegen ist nicht dialysierbar, jedoch adsorbiert dieses neutrale Detergenz an Polystyrenkügelchen und ist somit aus einer Lipid- Protein- Detergenzmischung entfernbar.

2.7.1 Herstellung von Liposomen (nach Reidlinger, 1994)

Zur Herstellung von Liposomen wurde vorgereinigtes Phosphatidylcholin Typ II-S verwendet. Der Lecithinanteil dieser Präparation betrug ca. 17% (Fa. Sigma, Produktinformation). Das Lipidgemisch (50 mg/ml) wurde in Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT) aufgenommen und zur Ultraschallung eingesetzt. Die Suspension wurde in einer Eis-NaCl-Mischung gekühlt und solange für je 30 sec bei 60 W mit Ultraschall behandelt, bis die zunächst trübe Suspension transluzierend war. Es wurde ein Ultraschallgerät vom Typ GM 60 HD (Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried) eingesetzt. Zwischen den Ultraschallpausen wurden die Proben für jeweils 2 min gekühlt.

2.7.2 Herstellung von Proteoliposomen (nach Racker, 1979)

Die vorgeformten Liposomen (s. 2.7.1) wurden auf eine Lipidkonzentration von 10 mg/ml mit Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT) verdünnt und mit Chaps (Endkonz. 11 mM) versetzt. Das gereinigte CzcA-Strep-tag-Protein wurde zu den Lipid-Detergenz-Gemisch gegeben und anschließend für 72 h gegen Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT) unter mehrmaligen Pufferwechsel dialysiert. Das Lipid : Proteinverhältnis wurde dabei auf 100:1 (w/w) eingestellt. Nach der Dialyse wurden die Proteoliposomen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren, gelagert wurden sie bei -80 °C.

2.7.3 Herstellung von Proteoliposomen (nach Jung et al., 1998)

Zur Herstellung von Liposomen wurde vorgereinigtes Phosphatidylcholin Typ II-S verwendet. Der Lecithinanteil dieser Präparation betrug ca. 17% (Fa. Sigma, Produktinformation). Das Lipidgemisch wurde in Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT, 1.5% β -D-Octylglucosid (w/v) suspendiert, wobei die Lipidkonzentration 10 mg/ml betrug. Darauf folgend wurde das β -D-Octylglucosid mittels Dialyse gegen Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT) entfernt und die resultierenden Liposomen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Rekonstitution wurden die so vorbehandelten Liposomen bei RT langsam auftauen lassen und durch einen 400 nm Polycarbonatfilter filtriert. Die vorgeformten Liposomen wurden zwecks Solubilisation mit Triton X-100 versetzt und die Solubilisation durch die Änderung der Adsorption bei 540 nm verfolgt (Rigaud & Pitard,

1995). Die durch Detergenz destabilisierten Liposomen wurden mit gereinigtem CzcA-Strep-tag-Protein in einem Verhältnis (w/w) von 100:1 gemischt und für 15 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Das Detergenz wurde mittels Bio-Beads SM-2 und Dialyse (mehrmaliger Pufferwechsel) gegen (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT) entfernt. Anschließend erfolgte eine Konzentration der Proteoliposomen durch eine Ultrazentrifugation bei 300.000 x g, 4°C für 45 min. Das Pellet wurde in (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2 mM DTT) resuspendiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.4 Nachweis eines künstlichen pH-Gradienten durch Fluoreszenzlöschung

Werden Liposomen und Proteoliposomen mit NH₄Cl geladen und anschließend mit einem NH₄Cl-freien Puffer gleicher Osmolarität verdünnt, so entsteht aufgrund der Dissoziation des NH₄⁺-Ions und der Membranpermeabilität von NH₃ ein pH-Gradient über der Membran (innen sauer, außen alkalisch), der über das Löschen der Fluoreszenz geeigneter Farbstoffe nachgewiesen werden kann (Schuldiner *et al.*, 1972; Deamer *et al.*, 1972).

Das Beladen der Liposomen oder Proteoliposomen geschah durch eine 30minütige Inkubation in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.0, die in Gegenwart von 0.5 M NH₄Cl auf Eis durchgeführt wurde. Um das Löschen der Fluoreszenz nachzuweisen wurden 1999 µl des 2µM Acridin-Orange (3,6 bis-dimethylaminoacridin) enthaltenen Cholinchlorid-Puffers [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M Cholinchlorid, 5 mM MgCl₂] in Plastikkuvetten, die 4 klare Seiten aufwiesen, in einem Spectrofluorometer (Modell SFM 25, Fa. Kontron, Eching) bei einer Wellenlänge von 493 nm vorinkubiert. Die Fluoreszenzemission wurde bei 530 nm detektiert und mittels der Software WIND (32-bit spectroscopy software for windows, Fa. Kontron, Eching) auf den angeschlossenen PC dargestellt. Nachdem sich das Signal stabilisiert hatte, wurden 1µl der Liposomen bzw. Proteoliposomen zugegeben und die Fluoreszenz so lange verfolgt, bis wieder mindestens 90% des Ausgangswertes erreicht wurden.

2.7.5 Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen (nach Rosen *et al.*, 1986 und Nies & Silver 1989b)

Ein Carrier-Protein bindet spezifisch an ein lösliches, kleines Molekül und transportiert es durch die Lipid-Doppelschicht. Dieser Vorgang ist einer Enzym-Substrat-Reaktion völlig analog, und die beteiligten Carrier-Proteine verhalten sich somit wie spezialisierte, Membran-gebundene Enzyme. Jedes Carrier-Protein hat eine spezifische Bindungsstelle für sein zu transportierendes Substrat. Wenn der Carrier gesättigt ist, weil alle diese Bindungsstellen

besetzt sind, erreicht die Transportgeschwindigkeit ein Maximum (V_{\max}). Außerdem hat jeder Carrier eine charakteristische Bindungskonstante, K_M , für das zu transportierende Substrat.

Der Kation / Proton-Antiport findet nur statt, wenn eine „proton motive force“ vorhanden ist. Künstliche Systeme wie Proteoliposomen, die nur die gereinigten Antiporter-Proteine enthalten, besitzen die zellulären primären Protonenpumpen nicht, die die „proton motive force“ in Zellen oder Vesikeln generieren. Aus diesem Grunde wurden die Proteoliposomen zum einen mit einem Tris-Puffer, pH 5.0 und zum anderen mit einem 0.5 M NH_4Cl -Puffer geladen. Der entstandene pH-Gradient wurde genutzt, um Aufnahmemessungen mit radioaktiven Metallen durchzuführen; Voraussetzung dafür ist die Annahme, daß der postulierte Antiporter sich in einer „right-side-out“-Orientierung in der Membran befindet.

Die Kationen-Aufnahmeexperimente wurden mittels der Filtrationsmethode durchgeführt. Die mit NH_4Cl -Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ; 0.5 M NH_4Cl) (s. 2.7.4) vorgeladenen Proteoliposomen wurden in Cholinchlorid-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.5 M Cholinchlorid; 5 mM MgCl_2) verdünnt. Nach einer Minute wurde die Kationen-Aufnahme gestartet, indem die radioaktiven Kationen $^{65}\text{Zn}^{2+}$, $^{57}\text{Co}^{2+}$ oder $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (Amersham, Braunschweig, Deutschland) zugegeben wurden. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C inkubiert und die Proben, jeweils 5 µl Aliquots, in entsprechenden zeitlichen Abständen durch Membranfilter mit einer Porengröße von 0.45 µm (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) gesogen. Die Filter wurden mit 0.3 ml Cholinchlorid-Puffer (0.2 M Cholinchlorid, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 10 mM EDTA und 10 mM Mg^{2+}) gespült. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und die Menge an Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (LS6500, Beckmann, München, Deutschland). Als Kontrollen dienten mit NH_4Cl -Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ; 0.5 M NH_4Cl) geladene Liposomen.

2.7.6 Bestimmung der Größe (Durchmesser) von Liposomen / Proteoliposomen mittels Photonen Korrelations Spectroskopie (laser light scattering)

Die Photonen Korrelations Spectroskopie (PCS) ist eine Methode um die Zeitabhängigkeit der Fluktuationsintensitäten bezüglich der ‘Brown’schen Molekularbewegung (von Teilchen in Lösungen bzw. Suspensionen) im gestreuten Laserlicht (scattered laser light) zu analysieren. Da kleine Partikel sich schneller als große bewegen, variiert die Fluktuationsrate im gestreuten Laserlicht sehr. Der translationale Diffusionskoeffizient (D) kann gemessen werden, so daß man in Folge den Wert des hydrodynamischen Radius (R_h) der Partikel bestimmen kann, indem man die Stokes-Einstein-Gleichung heranzieht.

In Abhängigkeit von der Energie des Lasers ist es möglich Partikel in dem Größenbereich von 3 nm bis 3 µm zu messen. Eine Laserlichtquelle (Helium-Neon oder Argon) wird auf den Inhalt einer absolut reinen Glasküvette (mit zylindrischer oder vorzugsweise quadratischer Grundfläche) fokussiert. Die Küvette wird in einer thermostatisch kontrollierten Goniometer Zelle fixiert. Die zu untersuchende Probe kann in einer Vielzahl von Dispersionsmedien verdünnt bzw. suspendiert werden, die einzige Information die benötigt wird ist die Viskosität und Refraktionsindex des Mediums. Das durch die Probe gestreute Laserlicht wird mittels einer Photomultiplier Anordnung, gewöhnlich in einer 90° Position zum Laserstrahl plaziert, detektiert.

20 µl der Liposomen bzw. Proteoliposomen-Fraktion wurde 1:250 mit Cholinchlorid-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.5 M Cholinchlorid; 5 mM MgCl₂) verdünnt. Dieser Ansatz wurde in eine Glasküvette gegeben, welche in die bei 25°C thermostatisch kontrollierte Goniometer Zelle eines Zetasizers 3000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) fixiert wurde. Anschließend wurde die Messung mit mehrmaligen Zyklen durchgeführt.

2.8 Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme

Biochemikalien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Berlin-Chemie, Berlin

Bio-Rad GmbH, München

C.Roth GmbH & co., Karlsruhe

Difco Laboratories, Augsburg

E.Merk, Darmstadt

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm

IBA, Göttingen

Jenapharm, Jena

Laborchemie, Apolda

Pharmacia, Freiburg

Riedel-de Haen AG, Seelze

Serva Feinbiochemika & Co., Heidelberg

SIFIN GmbH, Berlin (ehemals Immunpräparate Berlin)

Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen

USB, Braunschweig

Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

Appligene, Heidelberg

Biozym, Hess. Oldendorf

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Gibco BRL, Eggenstein

Pharmacia, LBK, Freiburg

Stratagene, Heidelberg

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Quiagen GmbH, Hilden

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Reinigung des CzcA::LacZ-Fusionsproteins über Gelfiltration an Sepharose S-300 und Affinitätschromatographie an APTG (4-Aminophenyl- β -D-thiogalactopyranosid)

Das CzcA::LacZ-Fusionsprotein sollte aufgrund seines relativ hohen Molekulargewichtes (errechnet 232 kDa) nach erfolgreicher Solubilisation aus den Membranen zunächst über eine Gelfiltration an Sepharose S-300 (Trennbereich 10 kDa-1500 kDa) angereichert und über eine Substrataffinitätschromatographie an APTG spezifisch gereinigt werden. Die Vorversuche zur Optimierung der Solubilisation wurden von Herrn Prof. D.H. Nies und Herrn H. Harms durchgeführt (Ergebnisse sind hier nicht gezeigt).

3.1.1 Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-300

Nach der Solubilisierung wurden 18 mg Protein (Überstand der Ultrazentrifugation) an Sepharose S-300 chromatographiert (Abb. 2). Das CzcA::LacZ-Fusionsprotein, bestimmt anhand der β -Galaktosidase-Aktivität, eluierte im Bereich von Fraktion 6 bis Fraktion 23, wobei die Hauptaktivität im Bereich der Fraktionen 10-14 detektiert wurde (Abb. 2). Die β -Galaktosidase-Aktivität eluierte demnach über ein großen Bereich. Es wurden insgesamt 10 Fraktionen (Fraktionen 7-16) vereinigt, dialysiert und anschließend auf die APTG-Agarose-Säule aufgetragen.

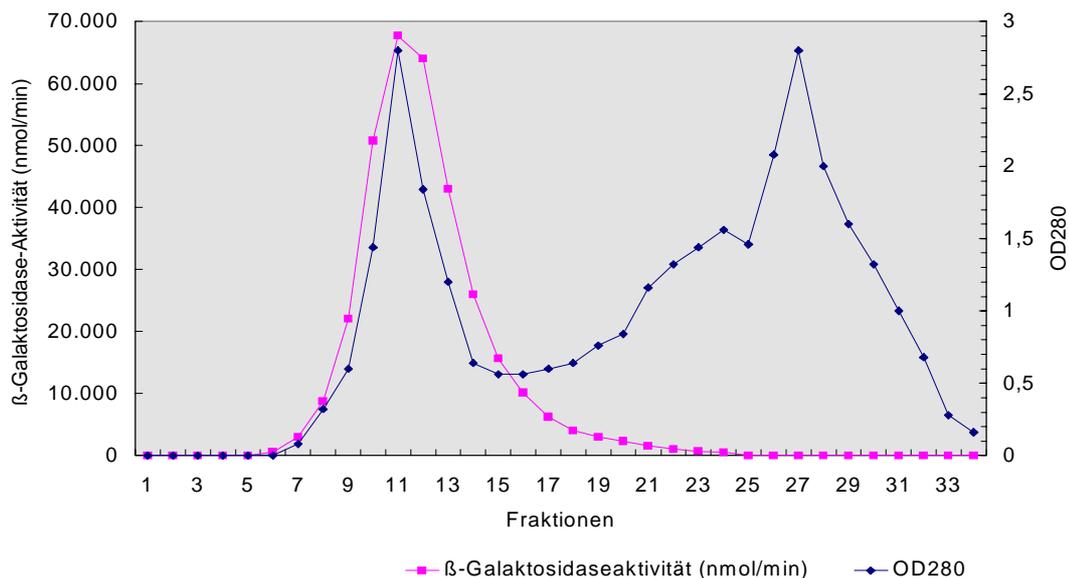


Abb. 2: Elutionsprofil der Gelpermeationschromatographie von 18 mg solubilierten Membranprotein von *E. coli* (WM 1704) an Sephacryl S-300. Fraktionen 7-16 wurden als Pool vereinigt und weiterverwendet.

3.1.2 Substrataffinitätschromatographie an APTG (4-Aminophenyl- β -D-thiogalactopyranosid)

Da die exprimierten Lac-Z-Fusionsproteine die β -Galaktosidase Enzym-Aktivität aufweisen, können Affinitätschromatographien an APTG-Agarose-Säulen durchgeführt werden. APTG als Substrat ist ein Analogon zu IPTG; es wird gebunden, jedoch durch die β -Galaktosidase nicht gespalten.

Der dialysierte Gelfiltrationspool (Fraktionen 7-16) (0.5 mg/ml) wurde auf die APTG-Agarose-Säule aufgetragen. Eluiert wurde das CzcA::LacZ-Fusionsprotein mit einem linearen KCl-Gradienten (0-500 mM) (Abb. 3). Die β -Galaktosidase-Aktivität befand sich in dem Hauptpeak (Fraktionen 16-18); das bedeutete, daß das CzcA::LacZ-Fusionsprotein bei 76 mM KCl eluierte. Die Fraktionen einiger Reinigungsschritte wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 4).

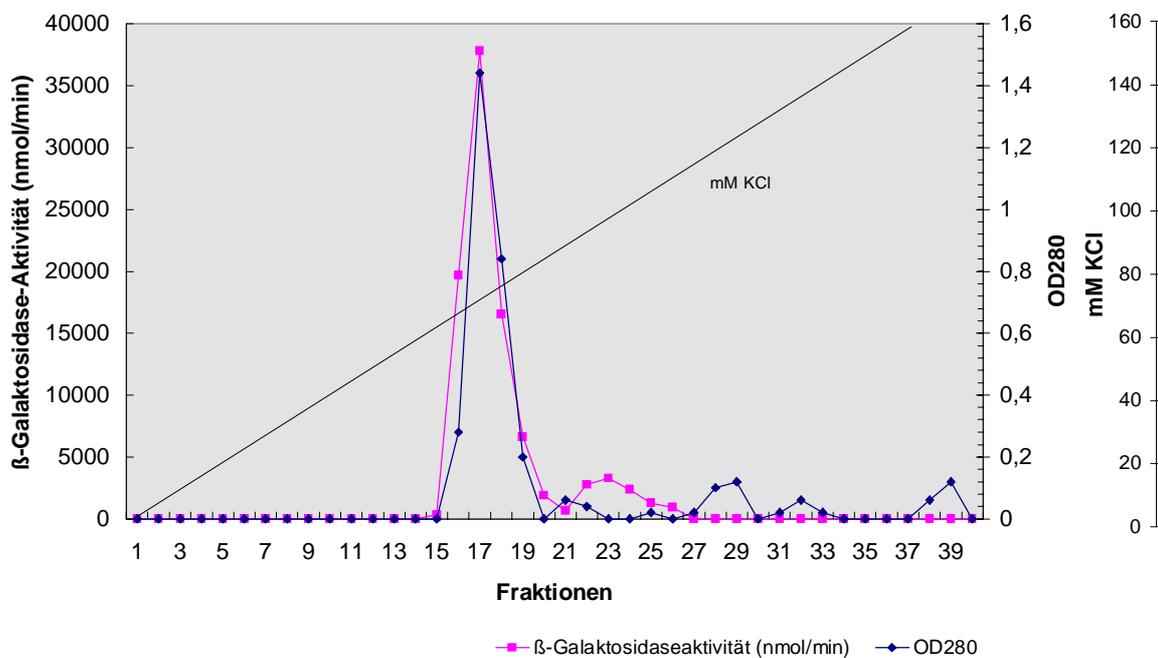


Abb. 3: Elutionsprofil der Substrataffinitätschromatographie von Membranprotein (Pool nach Gelpermeationschromatographie) von *E.coli* (WM 1704) an APTG (4-Aminophenyl- β -D-thiogalactopyranosid). Elution mit linear ansteigenden KCl-Gradienten.

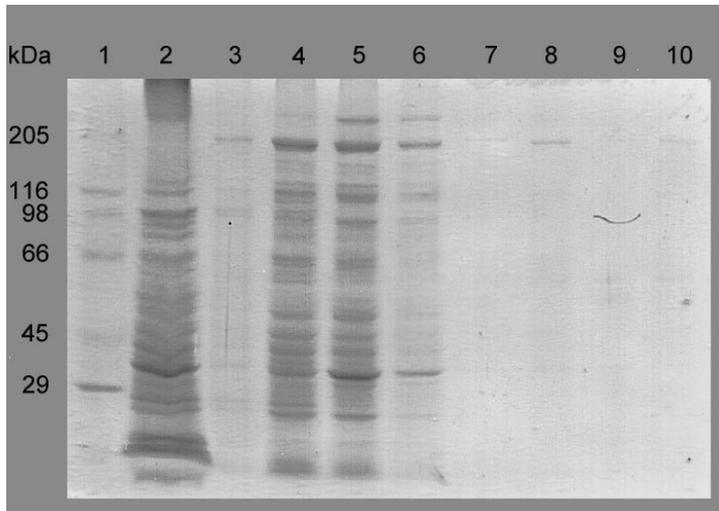


Abb. 4: SDS PAGE (7.5-20 %iges Gradientengel nach Laemmli, Coomassie gefärbt)

Spur 1: Markerproteine, **Spur 2:** solubilisierte Membranproteine, **Spur 3:** dialysierter Pool der aktiven Gelfiltrationsfraktionen, **Spur 4:** Fraktion 16 der APTG-Säule, **Spur 5:** Fraktion 17 der APTG-Säule, **Spur 6:** Fraktion 18 der APTG-Säule, **Spur 7:** Fraktion 19 der APTG-Säule, **Spur 8:** Fraktion 20 der APTG-Säule, **Spur 9:** Fraktion 21 der APTG-Säule, **Spur 10:** Fraktion 22 der APTG-Säule. Die Proteinmengen wurden in diesem Fall nicht bestimmt. Aufgetragen wurde ein mit Chloroform/Methanol gefällter 100 µl Aliquot der jeweiligen Fraktionen.

3.2 Chromatographie an Hydroxylapatit, Nickel-Chelat-Sepharose und Superose 6 HR

3.2.1 Chromatographie an Hydroxylapatit

Da die Reinigungsschritte Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-300 und anschließende Substrataffinitätschromatographie an APTG nicht zu einem homogenen Protein führten (Abb. 4), wurde das CzcA-LacZ-Fusionsprotein an verschiedenen Chromatographiematerialien hinsichtlich seiner Bindung und seines Elutionsverhaltens getestet werden. Überprüft wurden folgende Materialien: Q-Sepharose, S-Sepharose, DEAE-Sepharose, Metallchelatsäulen (beladen mit unterschiedlichen Metallen), verschiedene Farbstoffsäulen und Hydroxylapatit. Das CzcA-LacZ-Fusionsprotein zeigte zufriedenstellendes Bindungs- und Elutionsverhalten an Hydroxylapatit und an Nickelchelatomaterial.

Nach der Solubilisierung wurden 18 mg Protein (Überstand der Ultrazentrifugation) an Bio-Gel HT Hydroxylapatit chromatographiert (Abb. 5). Die β -Galaktosidase-Aktivität eluierte ab 90 mM Phosphat; die Hauptaktivität befand sich in den Fraktionen 39-41. Diese wurden vereinigt, dialysiert und auf die Nickelchelatsäule aufgetragen.

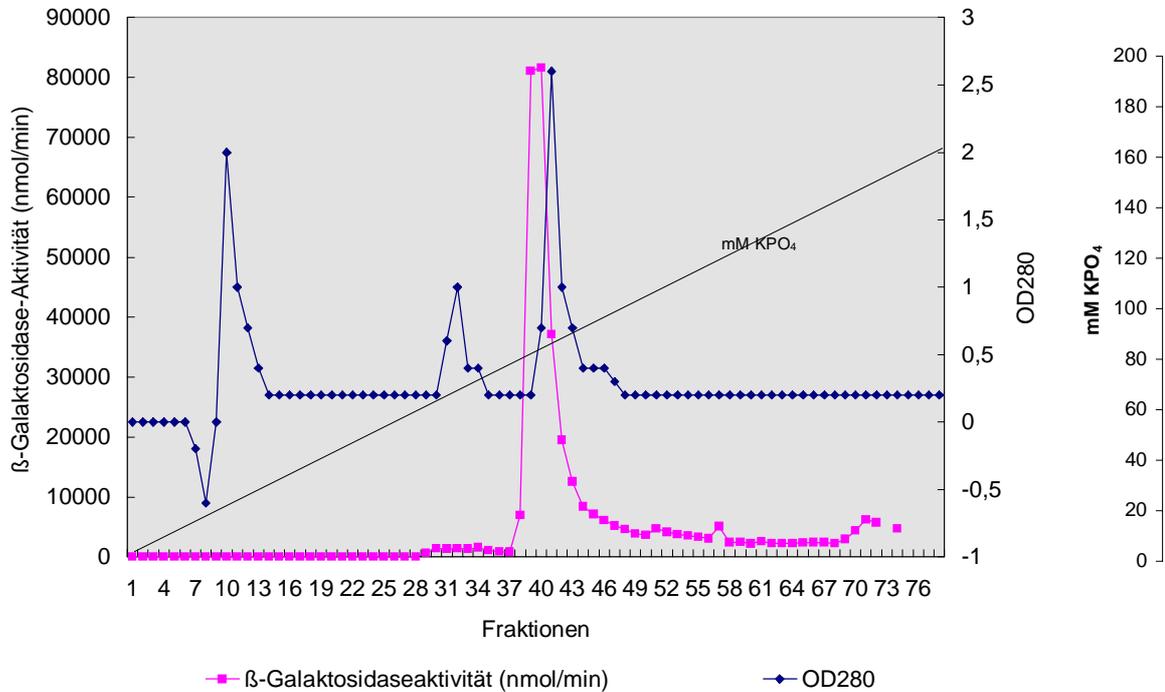


Abb. 5: Elutionsprofil der Chromatographie von 18 mg solubilisierten Membranprotein von *E. coli* (WM 1704) an Hydroxylapatit. Elution mit linear ansteigenden Phosphat-Gradienten. Die Fraktionen 39-41 wurden vereinigt und weiterverwendet.

3.2.2 Chromatographie an Nickel-Chelat-Sepharose

Die vereinigten Fraktionen des Hydroxylapatitsäulenlaufes wurden gegen Natriumphosphat-Puffer dialysiert und auf die zuvor äquilibrierte Nickel-Chelat-Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem linear ansteigenden Imidazolgradienten. Das CzcA-LacZ-Fusionsprotein eluierte bei 40 mM Imidazol (Abb. 6).

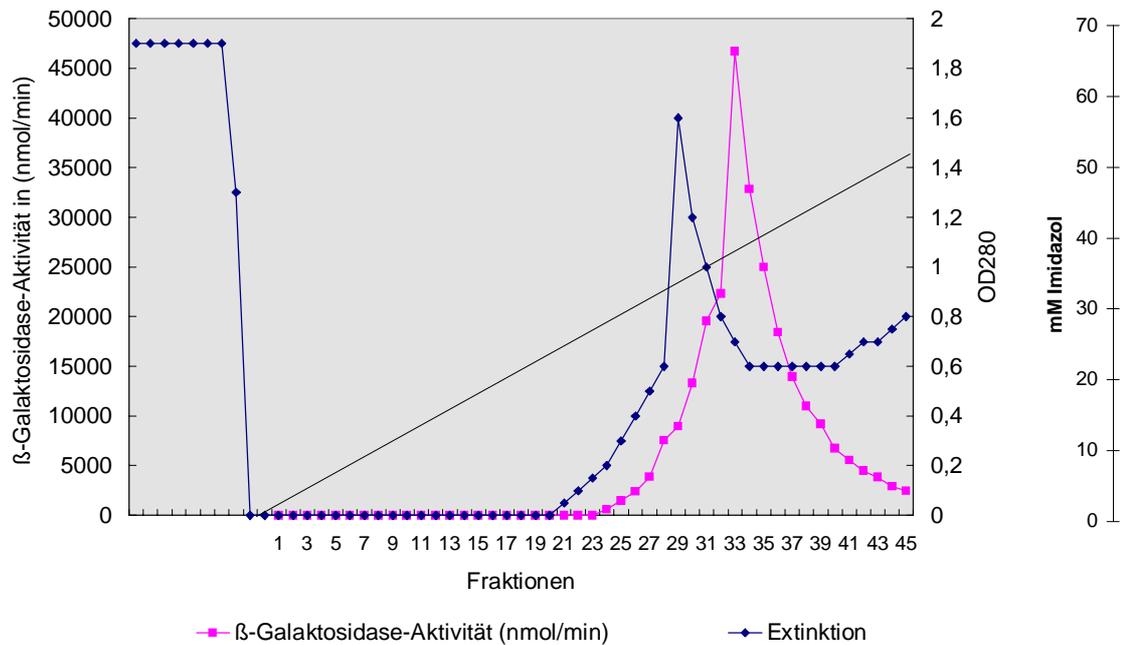


Abbildung 6: Elutionsprofil der Chromatographie von Membranprotein (Pool nach Hydroxylapatit) von *E.coli* (WM1704) an Nickel-Chelat-Sephrose. Elution mittels linear ansteigenden Imidazol-Gradienten. Die Fraktionen 29-37 wurden vereinigt und weiterverwendet.

3.2.3 Gelpermeationschromatographie an Superose 6 HR

Mittels der Gelpermeationschromatographie wurde das CzcA-LacZ-Fusionsprotein aufgrund seines relativ großen Molekulargewichts von bisher kontaminierenden Proteinen abgetrennt. Es wurde hoch auflösendes Säulenmaterial (Superose 6 HR) gewählt, das einen Trennbereich von 5-5000 kDa aufweist. Die aktiven Fraktionen des Nickel-Chelat-Säulenlaufes wurden mittels PEG 600 eingengt, dialysiert, einer 15 minütigen Ultrazentrifugation (100.000 x g) unterzogen und der Überstand (jeweils 500 µl) über eine Injektionsschleife auf die Superose 6 HR-Säule aufgetragen. Um Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und zwischen Protein und Säulenmaterial zu minimieren, wurde dem Elutionspuffer bis zu 1 M NaCl zugesetzt (Abb. 7).

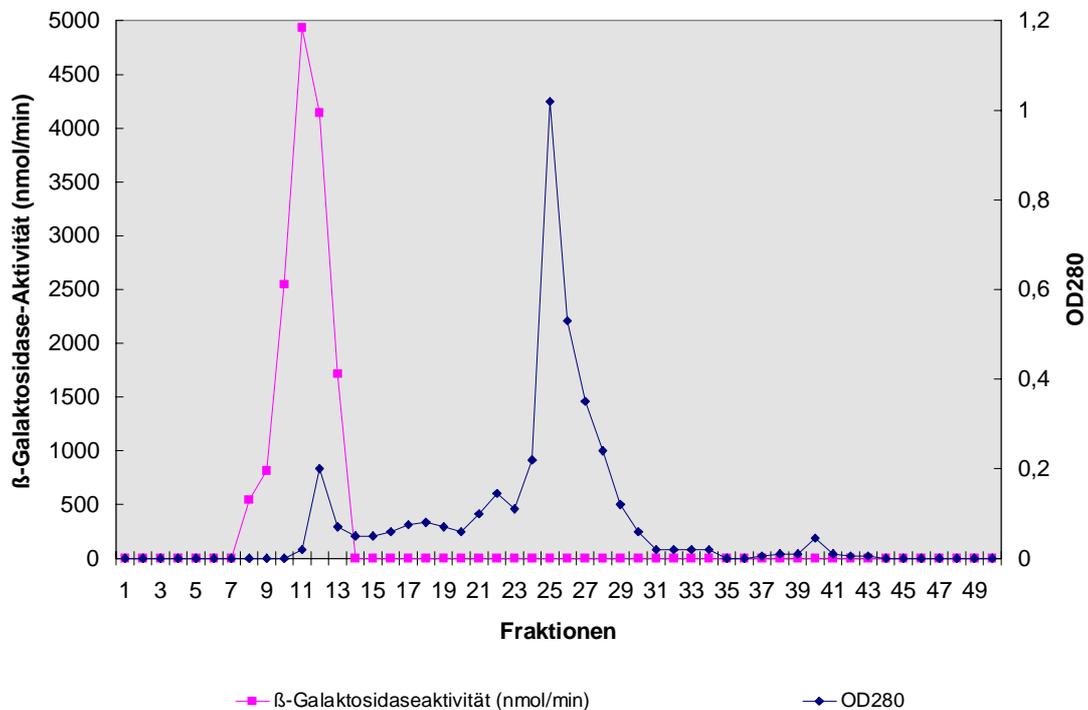


Abb. 7: Elutionsprofil der Gelpermeationschromatographie von Membranprotein (Pool nach Nickel-Chelat-Sepharose) von *E.coli* (WM 1704) an Superose 6HR. Proben der Fraktionen 10-13 wurden im Acrylamid Gel aufgetrennt.

Gemäß der Eichgeraden (Ergebnis hier nicht gezeigt), die vor der Chromatographie der Membranproteine aufgenommen wurde, eluierte die β -Galaktosidase-Aktivität bei einem Molekulargewicht von 490 kDa. Da das CzcA-LacZ-Fusionsprotein ein errechnetes Molekulargewicht von 232 kDa besitzt, könnte es sich bei dem eluierten Protein der Fraktionen 11 und 12 um ein Dimer handeln. Im SDS-PAGE (Abb. 8) zeigte sich, daß zwei Proteinbanden nach dem Superose 6-Lauf (Spur 7-10) im oberen Molekulargewichtsbereich (ca. 205 und ca. 230 kDa) im Gegensatz zum Homogenat (Spur 2) angereichert worden waren. Mittels dieser Reinigung konnte wiederum kein homogen gereinigtes Fusionsprotein dargestellt werden, obwohl ein Anreicherungsfaktor von 103 erzielt wurde (Tab. 7); das CzcA-Fusionsprotein wurde noch von 5 stark angereicherten Nebenbanden begleitet. Zwei davon wurden mittels Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen identifiziert, dabei handelte es sich um die NADH-Oxidoreduktase aus *E. coli* mit einem Molekulargewicht von 62 kDa und um die ATP-Synthase aus *E. coli* (51 kDa) (P. Rücknagel, persönliche Mitteilung). Die beiden Proteinbanden im oberen Molekulargewichtsbereich (ca. 205 und ca. 230 kDa) konnten aufgrund ihrer geringen Menge (wenige N-Termini) nicht N-Terminal sequenziert werden.

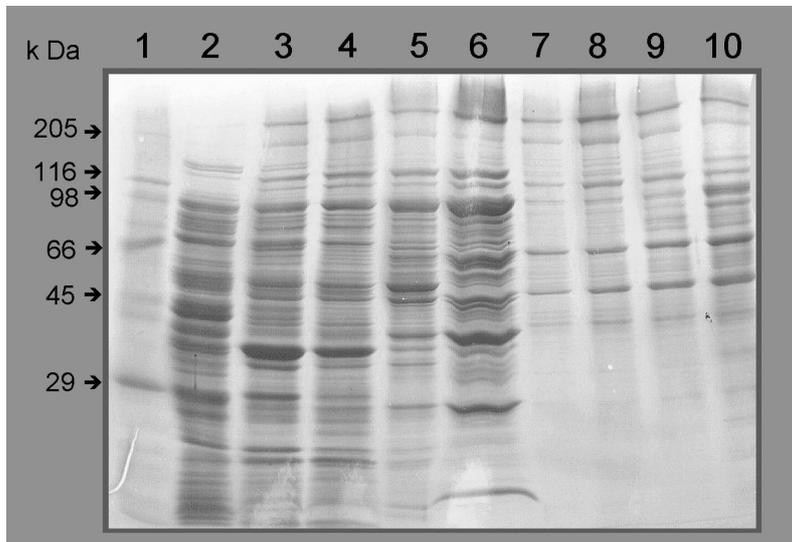


Abb. 8: SDS-Gradientengel (nach LÄMMLI, Coomassie gefärbt)

Spur 1: HMW-Marker, **Spur 2:** Rohextrakt (30 µg Protein), **Spur 3:** Membranen (25 µg Protein), **Spur 4:** solubilisierte Membranen (25 µg Protein), **Spur 5:** aktiver Pool der Hydroxylapatitsäule (20 µg Protein), **Spur 6:** aktiver Pool der Nickelsäule (30 µg Protein), **Spur 7:** Fraktion 10 der Gelfiltration (6 µg Protein), **Spur 8:** Fraktion 11 der Gelfiltration (10 µg Protein), **Spur 9:** Fraktion 12 der Gelfiltration (10 µg Protein), **Spur 10:** Fraktion 13 der Gelfiltration (15 µg Protein)

Tabelle 7: Anreicherung von CzcA-LacZ

Reinigungsschritt	Proteinmenge in mg	Aktivität (nmol/min)	spezifische Aktivität (U/mg)	Anreicherungs- faktor
Rohextrakt	5 200	1 736 324	334	1
solubilisiertes Membranprotein	179	1 305 240	7 273	21
Pool der Hydroxylapatit- säule	15.4	230 000	14 935	44
Pool d. Nickel-Chelat-Sepha- rose	4.5	123 068	27 348	81
Fraktion 12 der Gelfiltration	0.120	4 144	34 533	103

Die Anreicherungstabelle (Tab. 7) zeigt, daß die spezifische b-Galaktosidase-Aktivität zwar um das 103-fache gegenüber dem Rohextrakt angereichert werden konnte, jedoch zeigt die Abbildung 7 auch, daß diese Anreicherung nicht zu einem homogen gereinigten Fusionsprotein führte.

3.3 Klonierung von *czcA* bzw. *czcA*-Fragmenten in unterschiedliche Expressionsvektoren

Da in dieser Arbeit die verschiedenen Reinigungsversuche nicht zu einem homogen gereinigten CzcA-LacZ-Fusionsprotein führten, wurden unterschiedliche Expressionsvektoren hinsichtlich

der Expression von CzcA bzw. einzelner CzcA-Domänen getestet werden. Erfolgreich gereinigte CzcA-Domänen sollten für die Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden, um anschließend z.B. Lokalisationsstudien durchführen zu können.

In der Tabelle 8 sind die verwendeten und unter 2.1.1 beschriebenen Expressionsvektoren aufgelistet. Das *czcA*-Gen bzw. die *czcA*-Fragmente wurden mittels PCR aus dem Plasmid pECD 110 unter Nutzung der in Tabelle 4) aufgeführten Primerkombinationen amplifiziert und in die jeweiligen Vektoren kloniert. Die Tabelle 8 gibt Auskunft über den Erfolg der Klonierung bzw. der Expression der unterschiedlichen Fusionen.

Tabelle 8: Expressionsvektoren

Expressionsvektor	<i>czcA</i> (Gesamtgen)	N-terminale Domäne von <i>czcA</i>	C-terminale Domäne von <i>czcA</i>
pTrc99A		+/-	
pQE70	-/-	+/-	+/-
pMAL-c2		+/+	+/-
pXa2		+/-	+/-
pASK-IBA3	+/+		

^a -/- steht für negative Klonierungsarbeiten

^b +/- steht für positive Klonierungsarbeiten ohne erfolgreiche Expression des Proteins

^c +/+ steht für positive Klonierungsarbeiten mit erfolgreicher Expression des Proteins

Wie Tabelle 8 verdeutlicht, wurde das *czcA*-Gen nur in den Vektor pASK-IBA3 erfolgreich kloniert und exprimiert. Zu einer Proteinexpression führte zudem nur noch die Fusion der N-terminalen Domäne von *czcA* an das Maltosebindeprotein. Jedoch gelang in diesem Fall die Spaltung des Fusionsproteins nach durchgeführter Anreicherung nicht.

Die Überprüfung des korrekten Leserahmens des *czcA*-Gens im Vektor pASK-IBA3 (pECD 559) erfolgte mittels Sequenzierung (Ergebnis hier nicht dargestellt).

3.4 Überexpression des CzcA-Proteins und dessen Nachweis mittels Westernblot

Die Expressionskassetten der Strep-tagII-Vektoren stehen unter der transkriptionellen Kontrolle des *tetA* Promotor/Operators. Die Initiation der Translation wird durch die sich an den *tetA* Promotor/Operator anschließende Ribosombindestelle gewährleistet.

Die Induktion der Genexpression wurde in *E. coli* BL21 mittels der Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin durchgeführt. Nach Auftrennung von 20 µg Membranprotein im SDS-Gel war keine zusätzliche Proteinbande im Vergleich zur mitgeführten Vektorkontrolle erkennbar, erst nach Überführung der Proteine auf eine PVDF-Membran und anschließenden Antikörper-

nachweis konnte auf dem Blot ein Strep-tag tragendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 116 kDa detektiert werden (Abb. 9).

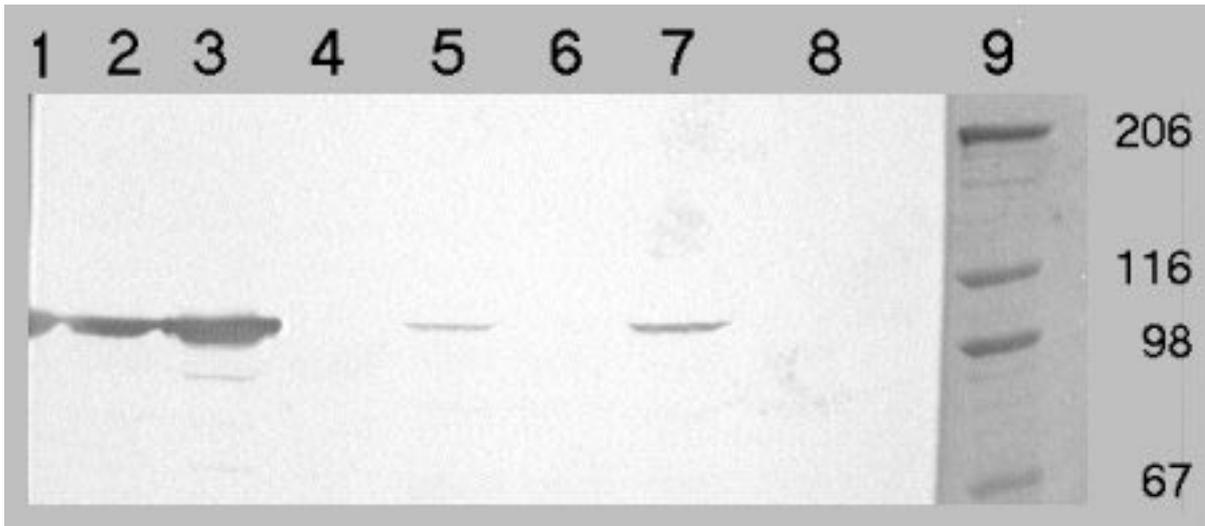


Abb. 9: Westernblot eines 10 %igen SDS-Gels nach Lämml

Spur 1-4: Membranen von *E.coli* BL21 (pECD 559 enthaltend) nach Induktion (Klone 1-4), **Spur 5-8:** Überstände der Membranpräparationen von *E.coli* BL21 (pECD 559 enthaltend) nach Induktion (Klone 1-4), **Spur 9:** HMW-Marker

3.4.1 Reinigung des CzcA-Strep-tag-Fusionsproteins

Das überexprimierte CzcA-Protein wurde aus *E.coli* BL21-Membranen solubilisiert und das Solubilisat direkt auf eine Strep-Tactin Sepharose-Säule gegeben, wobei unter Schwerkraftfluß gearbeitet wurde. Nach dem Auftragen des Solubilisates wurde die Säule mit Puffer W gewaschen, anschließend erfolgte die Elution mit Desthiobiotin. Von der 3.-8. Fraktion konnte mit einer nach Lowry et al., 1959 modifizierten Methode Protein detektiert werden. Das Chromatogramm und das SDS-Gel dieser Reinigung sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

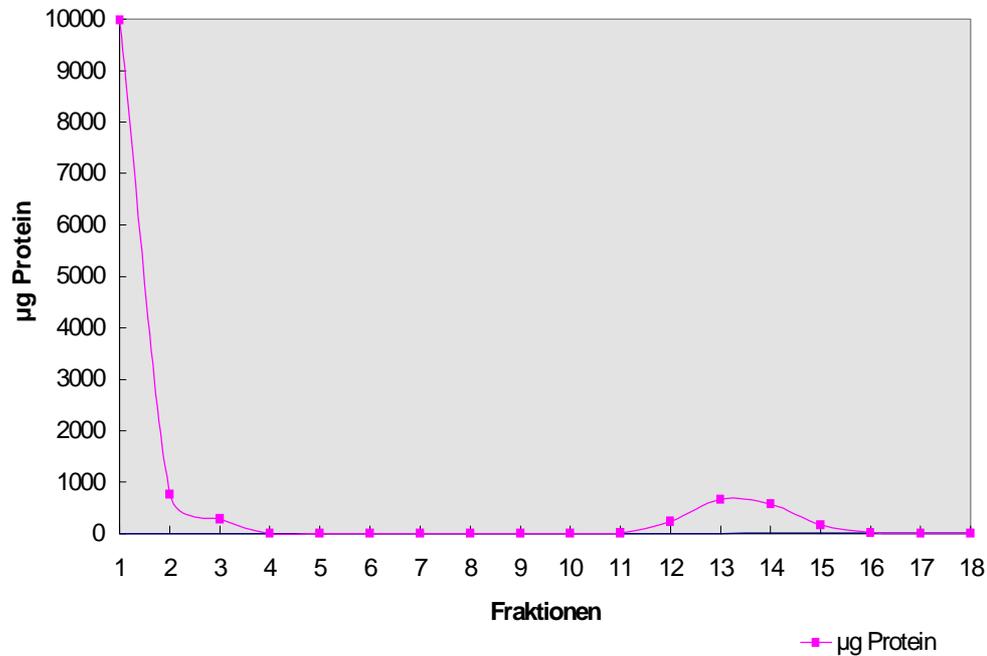


Abb. 10: Elutionsprofil der Strep-tag-Affinitätschromatographie von solubilierten Membranprotein von *E.coli* (BL21) an Strep-Tactin-Sepharose. Die Fraktionen 1-10 sind Waschfraktionen und 11-18 sind Elutionsfraktionen.

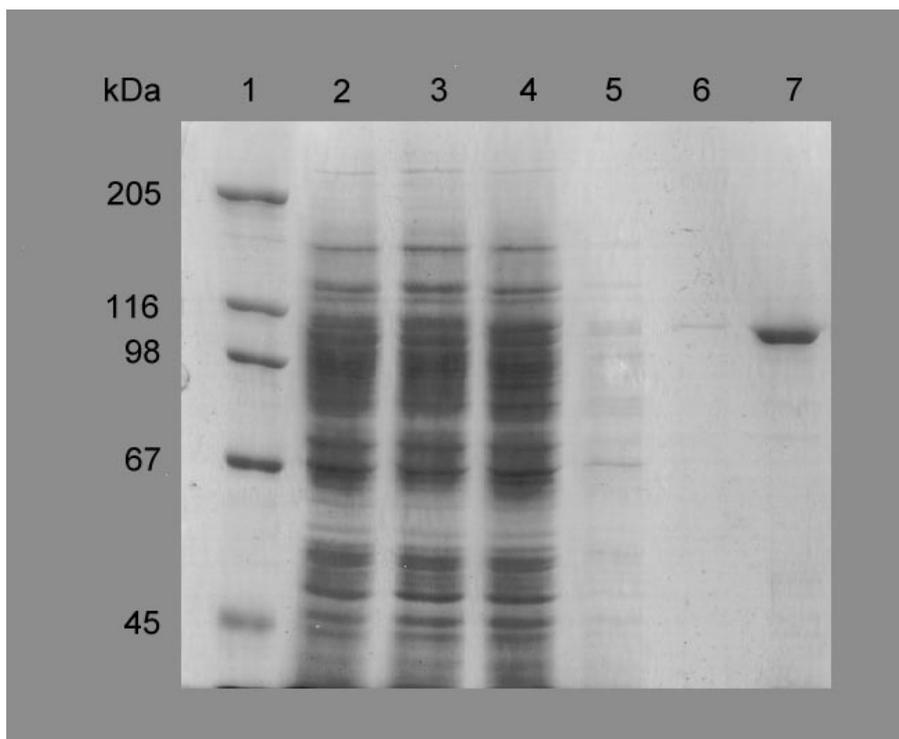


Abb. 11: 10 %iges SDS-Gel nach LÄMMLI, Coomassie gefärbt

Spur 1: HMW Marker, **Spur 2:** solubiliertes Membranprotein (15 µg), **Spur 3:** Durchlauf (15 µg), **Spur 4:** Waschfraktion (15 µg), **Spur 5:** Waschfraktion (2 µg), **Spur 6:** Waschfraktion (n.d.), **Spur 7:** Eluat [CzcA-Strep-tag Fusionsprotein (2 µg)]

3.5 Das CzcA-Strep-tag Fusionsprotein wurde geblottet und die Aminosäuresequenz N-terminal bestimmt

Das gereinigte, den Strep-tag tragende Protein (Abb. 11, Spur 7) wurde auf eine PVDF-Membran transferiert und die N-terminale Aminosäuresequenz durch Herrn P. Rücknagel bestimmt.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz lieferte eine Haupt- und eine Nebensequenz von 12 Aminosäuren. Die Hauptsequenz begann im Gegensatz zur Nebensequenz mit dem Startmethionin, in der Nebensequenz wurde es wahrscheinlich abgespalten. Die Aminosäuren in Position 1-8 in der Hauptsequenz, bzw. 1-7 in der Nebensequenz bestätigten die pASK-IBA3-Sequenz. In der Hauptsequenz begann das CzcA-Protein mit den Phenylalanin in der 9. Aminosäureposition und entsprechend in der Nebensequenz mit den Phenylalanin in der 8. Aminosäureposition. D.h., daß nach Abgleich mit Proteindatenbanken das CzcA-Protein durch die ermittelte Sequenz der 5 Aminosäuren, FERII, bestätigt wurde.

3.6 Das CzcA-Strep-tag Fusionsprotein diente der Generierung von Antikörpern

Einem Kaninchen wurde innerhalb von 6 Wochen (inklusive zweimaligen „Boostern“) insgesamt 1 mg CzcA-Strep-tag Fusionsprotein in die Ohrvene injiziert. Das Serum wurde nach Ausbluten des Tieres gewonnen. Diese Arbeiten wurden von der Firma Dr.W.Reuter (Osmarsleben) ausgeführt.

Nach Erhalt des Serums wurde es auf die Aktivität/Affinität der generierten CzcA-Antikörper hin getestet. Das CzcA-Strep-tag Fusionsprotein wurde auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend der Antikörpernachweis durchgeführt (Abb. 12). Zu sehen war, daß bereits bei Verdünnung des Serums von 1:10.000 das rekombinante Protein sehr gut detektiert wurde.

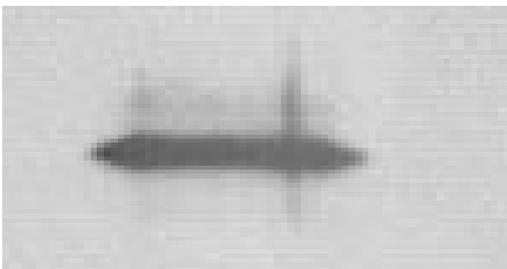


Abb. 12: Westernblot mit CzcA-Antikörpernachweis

3.6.1 Das native CzcA-Protein aus *Ralstonia spec. CH34* wird mittels des CzcA-Antikörpers detektiert

Da der CzcA-Antikörper das rekombinante Fusionsprotein aus *E.coli* sauber, d.h. ohne Kreuzreaktionen, detektierte, sollte überprüft werden, ob auch das native CzcA-Protein aus *Ralstonia spec. CH34* ohne Kreuzreaktionen detektiert würde. Dazu wurden der metall-sensitive Stamm AE04 und der metallresistente Stamm AE28 im Tris-gepufferten Minimalmedium angezogen und anschließend mit 50 bzw. 300 μM Zinkchlorid induziert; Proben wurden nach 0, 30, 60 und 90 min genommen. Der Rohextrakt (jeweils 20 μg Protein) wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen, das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran transferiert und nachfolgend der Antikörpernachweis durchgeführt (Abb. 14).

Der Westernblot (Abb. 14) zeigte, daß das Anti-CzcA-Antikörper enthaltende Serum ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 116 kDa in den mittels SDS-Gel aufgetrennten Rohextraktproben von AE128 erkennt (Spuren 1-4). Weiterhin war zu sehen, daß das Anti-CzcA-Antikörper enthaltende Serum ein weiteres Protein von ca. 55 kDa in sämtlichen Proben (Spuren 1-8) detektierte. Da in diesen Versuchen kein Null-Serum zur Verfügung stand, konnte somit keine Aussage getroffen werden, ob es sich bei der zusätzlich detektierten Proteinbande um ein Produkt einer echten Kreuzreaktion, oder um ein Produkt Kaninchen spezifischer Antikörper handelte.

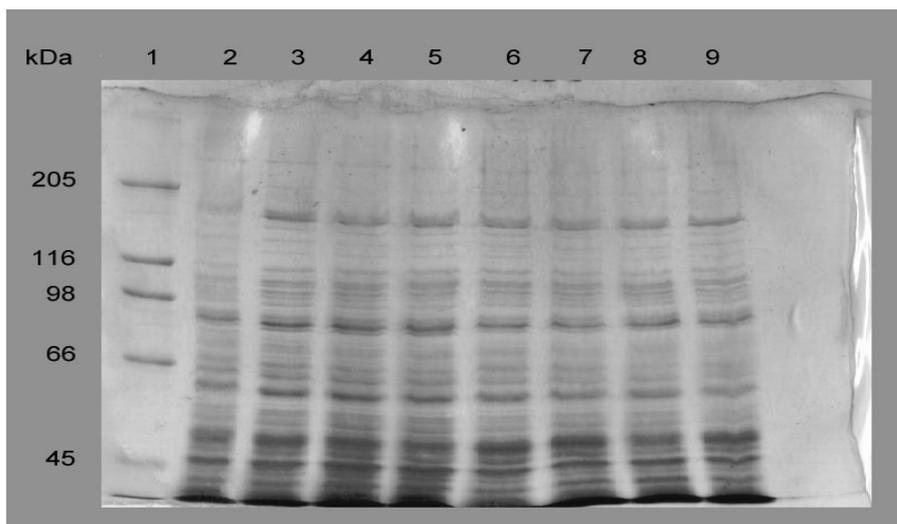


Abb. 13: 10 %iges SDS-Gel nach LÄMMLI, Coomassie gefärbt

Spur 1: HMW Marker, **Spur 2** AE 104 (0 min nach Induktion), **Spur 3:** AE 104 (30 min nach Induktion), **Spur 4:** AE 104 (60 min nach Induktion), **Spur 5:** AE 104 (90 min nach Induktion), **Spur 6:** AE 128 (0 min nach Induktion), **Spur 7:** AE 128 (30 min nach Induktion), **Spur 8:** AE 128 (60 min nach Induktion), **Spur 9:** AE 128 (90 min nach Induktion)

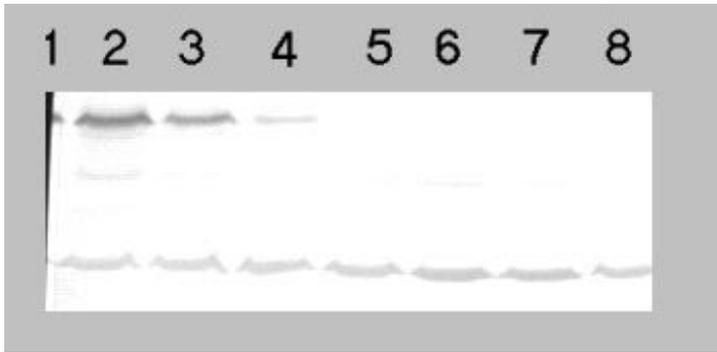


Abb.: 14 Westernblot mit CzcA-Antikörpernachweis

Spur 1: AE 128 (90 min nach Induktion), **Spur 2:** AE 128 (60 min nach Induktion), **Spur 3:** AE 128 (30 min nach Induktion), **Spur 4:** AE 128 (0 min nach Induktion), **Spur 5:** AE 104 (90 min nach Induktion), **Spur 6:** AE 104 (60 min nach Induktion), **Spur 7:** AE 104 (30 min nach Induktion), **Spur 8:** AE 104 (0 min nach Induktion)

3.7 Rekonstitutionsexperimente

3.7.1 Herstellung von Proteoliposomen

CzcA wurde in Detergenz destabilisierte Liposomen rekonstituiert. Vor Beginn der Aufnahmeversuche mit radioaktiven Metallen wurde durch Anlegen eines Ammoniumdiffusionspotentials zunächst die Qualität der Proteoliposomen überprüft. Es wurden nur Proteoliposomen verwendet, bei denen der vollständige Abbau eines künstlichen pH-Gradienten (bei dieser Methode gleichbedeutend mit dem Erreichen von mindestens 90% der Ausgangsfluoreszenz) mindestens 10 min dauerte. In den Abbildungen 15 und 16 sind die Änderungen der relativen Fluoreszenz aufgrund des Abbaus des künstlichen pH-Gradienten dargestellt.

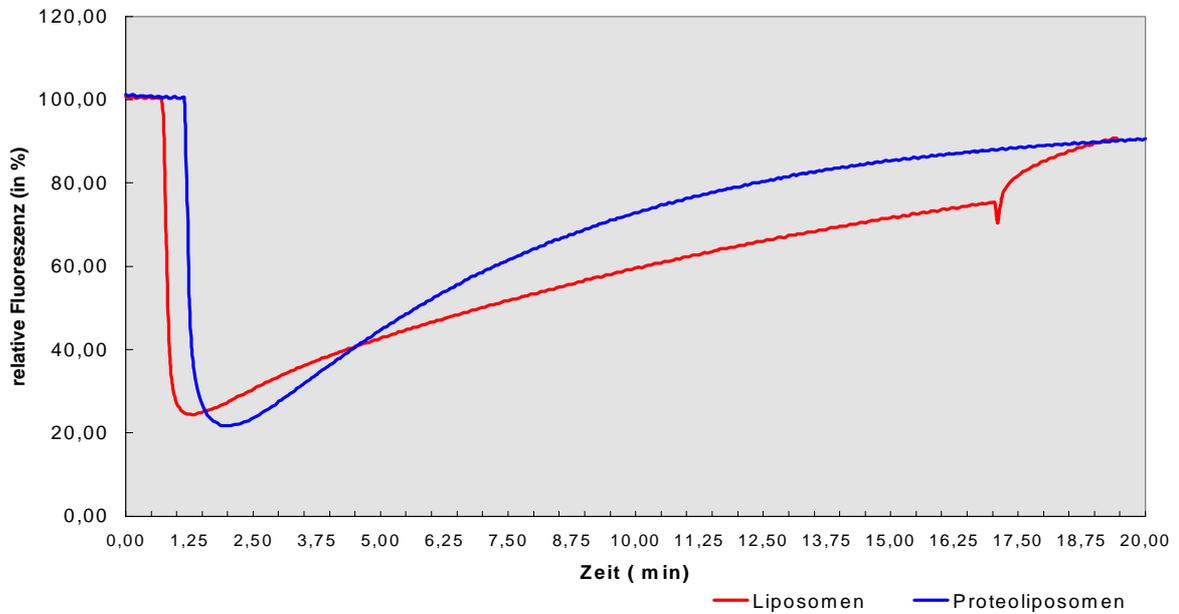


Abb. 15: Fluoreszenzlöschung nach Zugabe geladener Liposomen bzw. Proteoliposomen und relative Fluoreszenzänderung aufgrund der spontanen Dissoziation des künstlichen pH-Gradienten

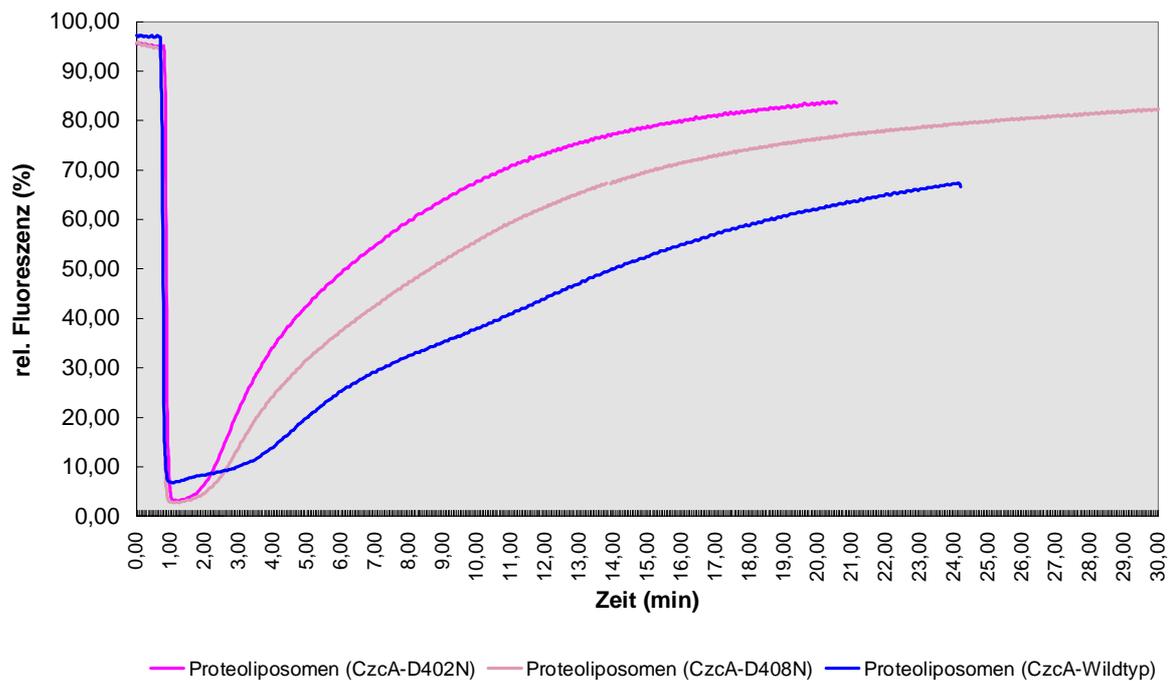


Abb. 16: Fluoreszenzlöschung nach Zugabe geladener Proteoliposomen (rekonstituiert mit Wildtyp CzcA, mit Asp 402 Asn -Mutantenprotein, mit Asp 408 Asn-Mutantenprotein) und relative Fluoreszenzänderung aufgrund der spontanen Dissoziation des künstlichen pH-Gradienten

3.7.2 Bestimmung der Liposomen und Proteoliposomen Durchmesser mittels Photonen Korrelations Spectroskopie

Die Größe (Durchmesser) der Liposomen und Proteoliposomen wurde mittels Photonen Korrelations Spectroskopie (PCS) bestimmt. Es lagen jeweils Mischpopulationen vor, wobei die Hauptpopulation (90 %) einen Durchmesser von 500 nm aufwies. Die Nebenpopulation wies einen Durchmesser von $>1 \mu\text{m}$ auf.

3.8 Aufnahmemessung mit radioaktiven Metallen

Die Proteoliposomen, die mit einem 100 mM TrisHCl-Puffer (pH 5.0) inkubiert wurden, wurden 1:10 in einem 100 mM TrisHCl-Puffer (pH 7.0) verdünnt, danach erfolgte die Zugabe von 1 mM $^{65}\text{Zn}^{2+}$. Sie akkumulierten 100 Mol Zn^{2+} pro Mol CzcA in den ersten 15 Sekunden und weitere 100 Mol Zn^{2+} pro Mol CzcA in den darauffolgenden 2 Minuten (Abb. 17). Die Liposomen, die die gleiche Konzentration an Phospholipiden aufwiesen, akkumulierten ein 1/3 der Zinkmenge, die die Proteoliposomen gebunden hatten, die gebundene Zinkmenge nahm jedoch in diesem Fall nicht über die Zeit zu. Das von den Liposomen gebundene radioaktive Zink war zudem durch nicht radioaktives Zink austauschbar, bei den Proteoliposomen hingegen wurde das radioaktive Zink nicht verdrängt (Abb. 18). Dieses Ergebnis zeigte, daß im Fall der Liposomen das radioaktive Zink nur an die Phosphatgruppen der Phospholipide band und sich somit verdrängen ließ.

Bei den Proteoliposomen war die aufgenommene Zinkmenge abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration (Abb. 19); in diesem Versuchsansatz wurde die aufgenommene Zinkmenge auf das eingesetzte Volumen von Proteoliposomen und Liposomen bezogen. Bei den Liposomen war die aufgenommene Zinkmenge unabhängig von dem eingesetzten Volumen.

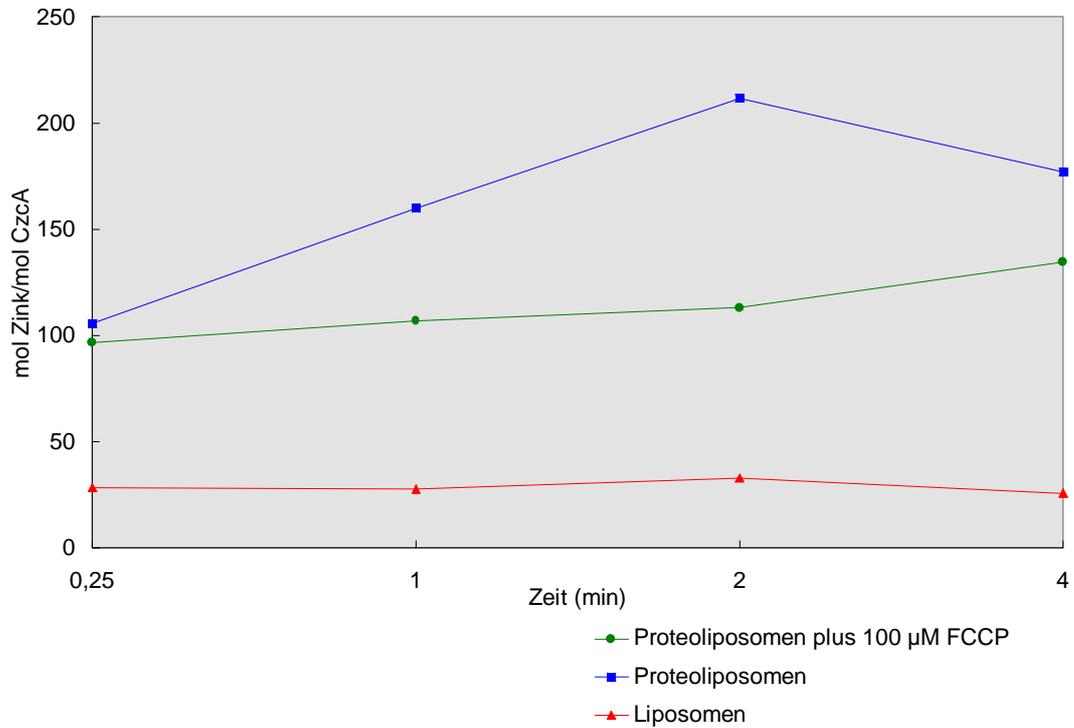
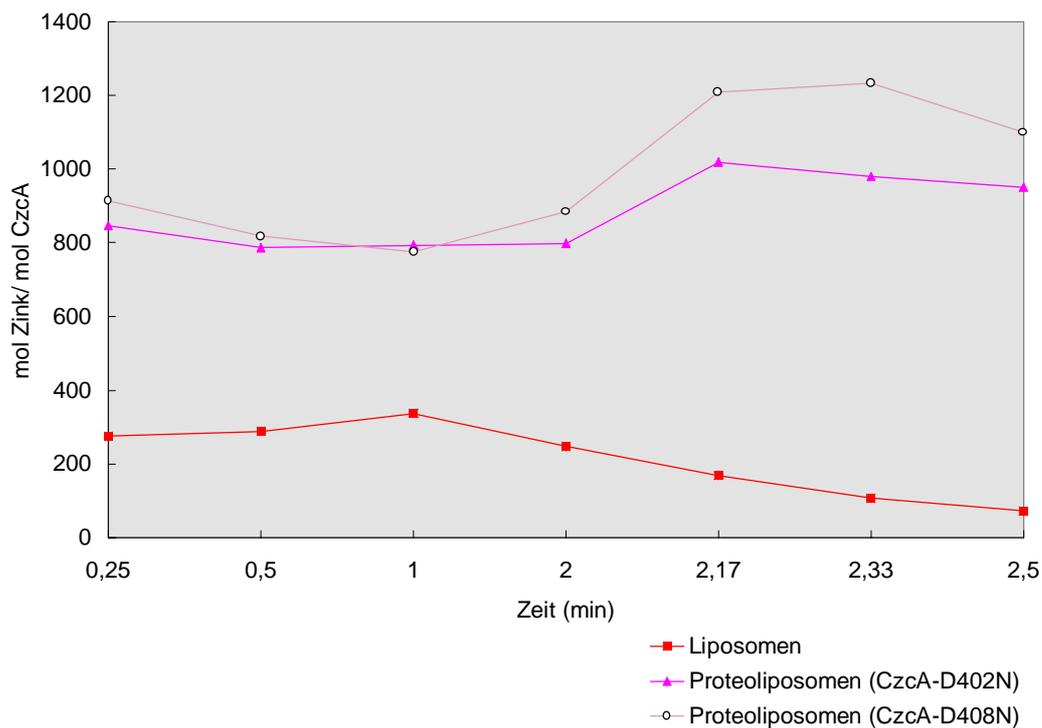


Abb. 17: Aufnahme von $^{65}\text{Zn}^{2+}$ in Proteoliposomen (■) und Liposomen (▲), die mit Tris-Puffer pH 5.0 vorgeladen und in Tris-Puffer pH 7.0 verdünnt worden waren. Hemmung dieser Proteoliposomen mit 100 μM FCCP (●)



Legende siehe umseitig.

Abb. 18: Verdrängungsversuch mittels nicht radioaktiven Zink. Nach 2 minütiger Inkubation mit 1 mM $^{65}\text{Zn}^{2+}$ wurde den Liposomen (■) sowie den Proteoliposomen [jeweils die mutierten Proteine enthaltend; (○ ▲)] 10 mM nicht radioaktives Zink zugesetzt.

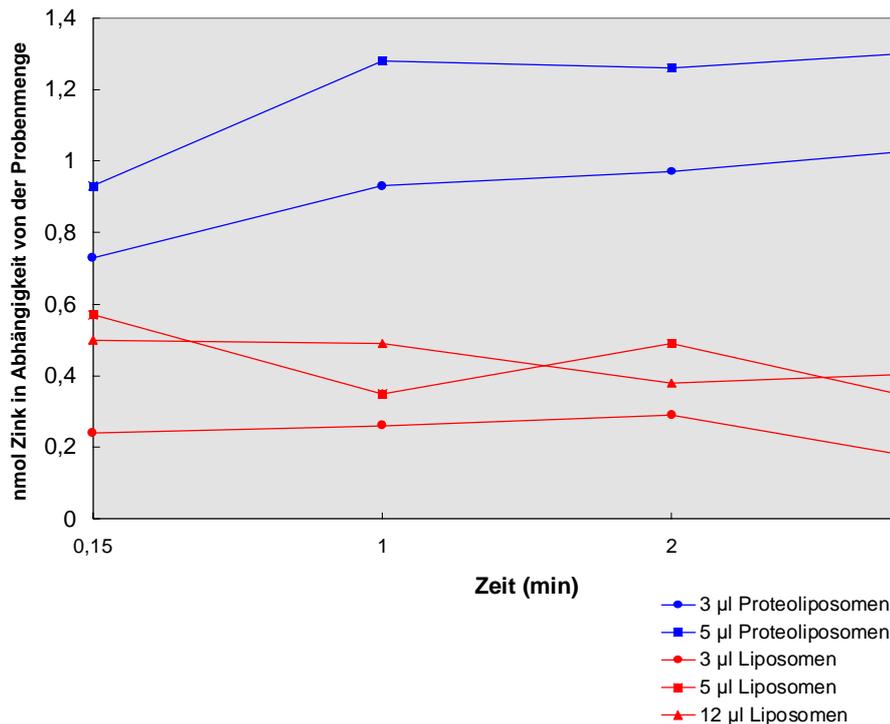


Abb. 19: Aufnahme von $^{65}\text{Zn}^{2+}$ in Proteoliposomen (■, ●) und Liposomen (●, ▲, ■). Dargestellt ist die Zinkaufnahme in Abhängigkeit von der eingesetzten Probenmenge.

Um einen genügend starken Protonengradienten zu erzeugen, wurden die Proteoliposomen und Liposomen mit einem 0.5 M NH_4Cl -Puffer (pH 7.0) geladen. Die Proteoliposomen und Liposomen wurden in einem osmolaren Cholinchlorid-Puffer verdünnt. Die Zugabe von 1 mM $^{65}\text{Zn}^{2+}$ erfolgte nach 1 min (Abb. 20). Es wurde eine schnelle Akkumulation der Radioaktivität innerhalb der Proteoliposomen beobachtet. Die Liposomen, die hier als Kontrolle dienten, akkumulierten weniger als 17% der Radioaktivität, die von den Proteoliposomen aufgenommen worden war (Abb. 20).

Die Geschwindigkeit der Zinkaufnahme war um das Zweifache erhöht, wenn als Substratkonzentration 3 mM Zink statt 1 mM Zink eingesetzt wurde. Mit weniger als 0.5 mM wurde nahezu keine Aufnahme gemessen (Abb. 21). Die Geschwindigkeit des CzcA vermittelten Zinktransports konnte als sigmoidale Sättigungskurve (Abb. 24, blaue Kurve) dargestellt werden. Ein V_{\max} -Wert von 385 sec^{-1} (Tab. 9) wurde aus den Geschwindigkeiten, gemessen bei den Einsatz von 10 mM Zink und 5 mM Zink, berechnet. Diese Geschwindigkeiten wurde

genutzt, um ein Hill-Diagramm (Abb. 25) zu erstellen, aus dem sich eine Kooperativitätskonstante von $n = 2$ und ein K_{50} -Wert von 6.6 mM (Tab. 9) ergab.

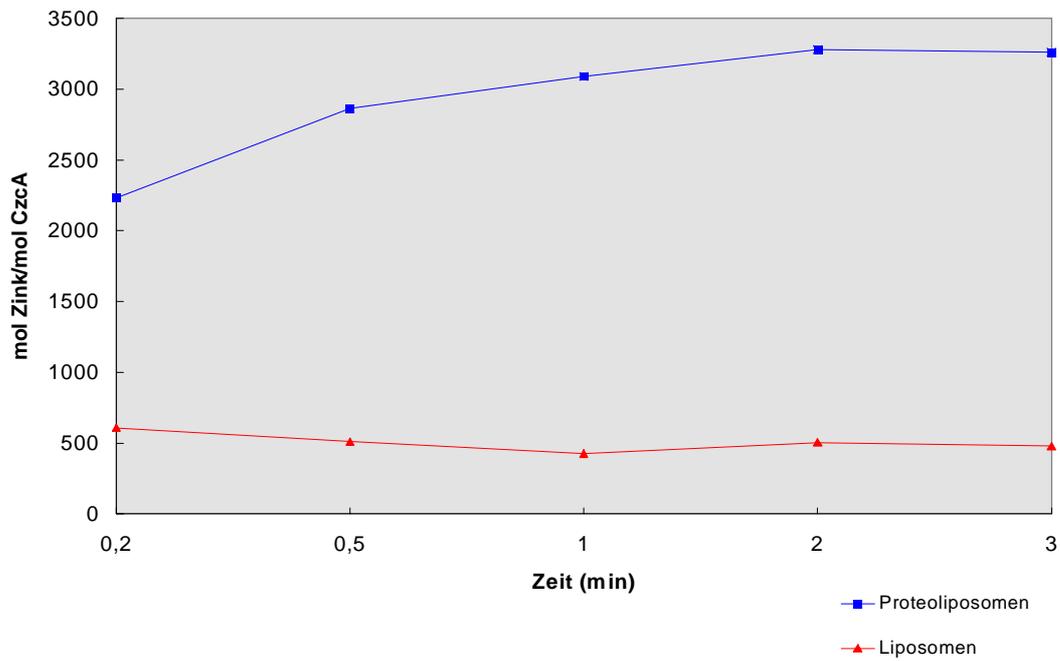
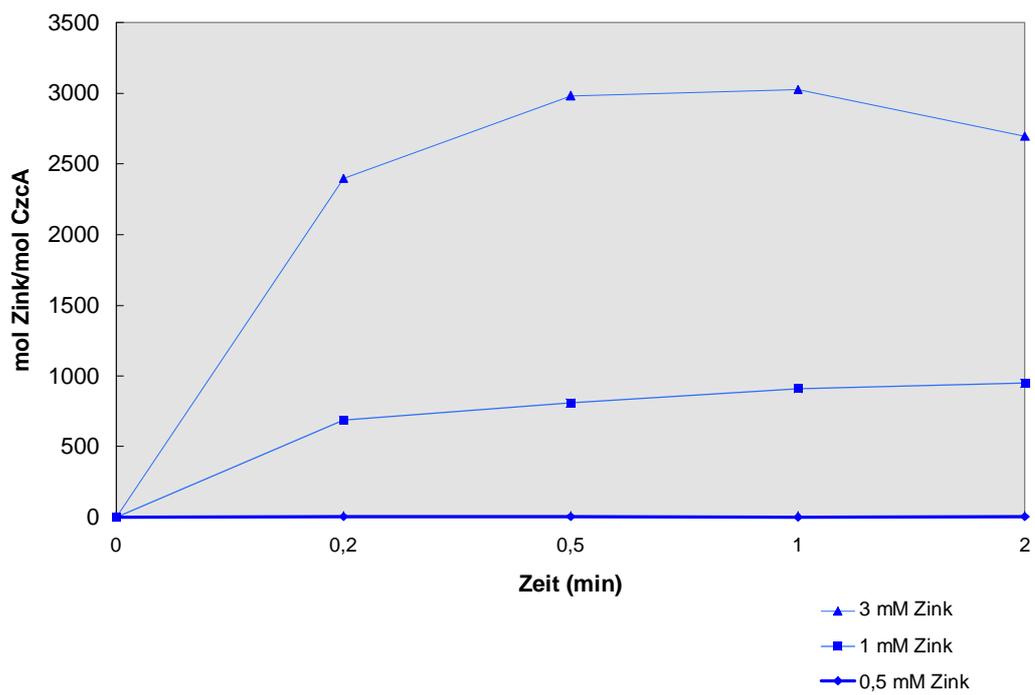


Abb. 20: Aufnahme von 3 mM ⁶⁵Zn²⁺ in Proteoliposomen (■) und Liposomen (▲), die mit 0.5 M NH₄Cl (pH 7.0) vorgeladen und in 0.5 M Cholinchlorid-Puffer (pH 9.0) verdünnt worden waren.



Legende siehe umseitig.

Abb. 21: Aufnahme von $^{65}\text{Zn}^{2+}$ in Proteoliposomen, die mit 0.5 M NH_4Cl (pH 7.0) vorgeladen und in 0.5 M Cholinchlorid-Puffer (pH 9.0) verdünnt worden waren. Dargestellt ist die Zinkaufnahme in Abhängigkeit von der eingesetzten Zinkkonzentration (0.5 mM (◆), 1 mM (■) und 3 mM (▲) Zink).

Der von CzcA vermittelte Kobalttransport war langsamer als der mit Zink gemessene. Es wurden für eine signifikante Transportmessung mehr Protein (Proteoliposomen) und höhere Kobaltkonzentrationen, hier 10 mM, (Abb. 22) eingesetzt. Die erhaltene Substratsättigungskurve des CzcA vermittelten Kobalttransports war wiederum sigmoidal (Abb. 22, rote Kurve). Die gemessene Geschwindigkeit für die Kobaltaufnahme bei 50 mM wurde für ein Hill-Diagramm (Abb. 25) herangezogen, aus dem sich eine Kooperativitätskonstante von $n = 2$ und ein K_{50} -Wert von 18.5 mM ergab (Tab. 9).

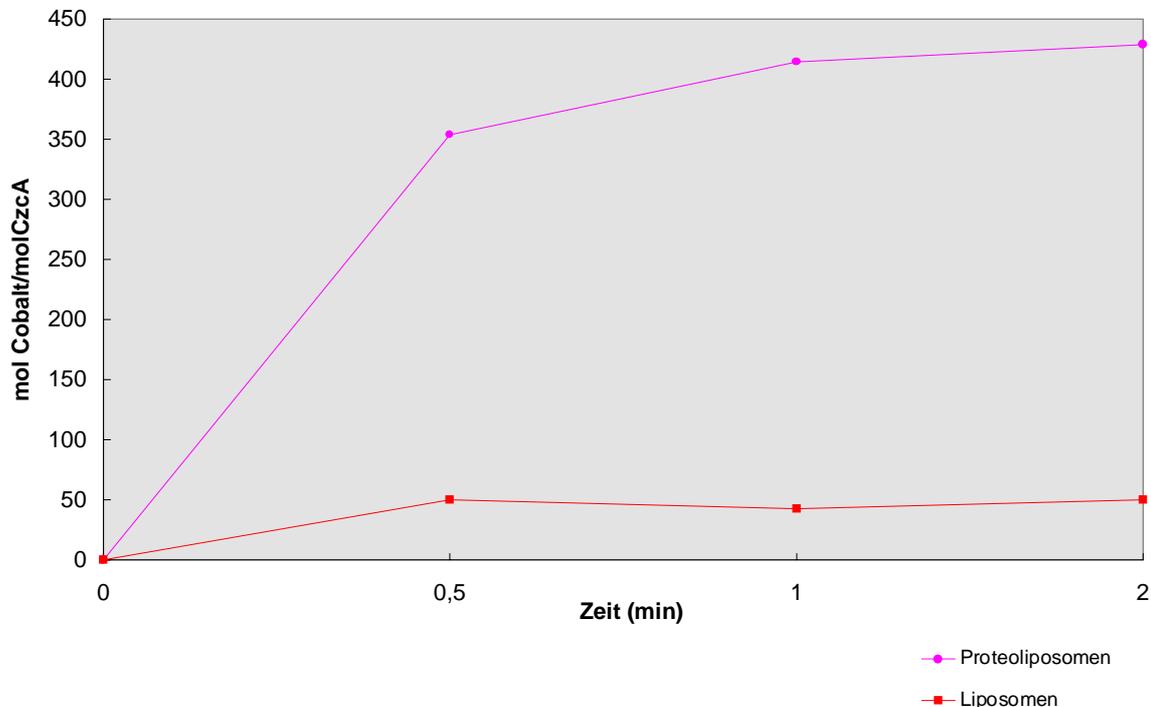


Abb. 22: Aufnahme von 10 mM $^{57}\text{Co}^{2+}$ in Proteoliposomen (●), die mit 0.5 M NH_4Cl (pH 7.0) vorgeladen und in 0.5 M Cholinchlorid-Puffer (pH 9.0) verdünnt worden waren; als Kontrolle dienten Liposomen (■).

Der CzcA vermittelte Cadmiumtransport war noch langsamer als die Kobaltaufnahme (Abb. 23). Bei Cadmiumkonzentrationen niedriger als 1 mM und höher als 5 mM konnte keine Aufnahme gemessen werden. In diesen kleinen Substratkonzentrationsbereich (24, türkise

Kurve) war das abgeleitete Lineweaver-Burk-Diagramm linear und ergab einen V_{\max} -Wert von 28 sec^{-1} und einen K_M von 7.7 mM (Tab. 9).

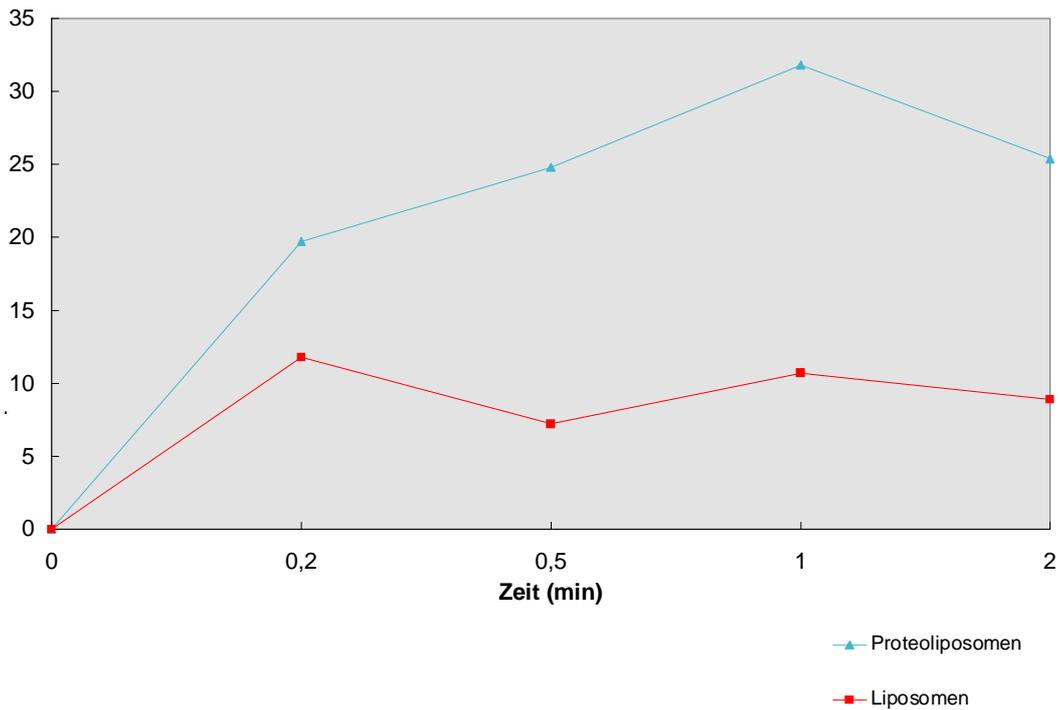


Abb. 23: Aufnahme von $1 \text{ mM } ^{109}\text{Cd}^{2+}$ in Proteoliposomen (\blacktriangle), die mit $0.5 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ (pH 7.0) vorgeladen und in $0.5 \text{ M Cholinchlorid-Puffer}$ (pH 9.0) verdünnt worden waren; als Kontrolle dienten Liposomen (\blacksquare).

Tab. 9: Kooperativitätskonstanten (n), K_M und V_{\max} -Werte für die unterschiedlichen Metalle

Metallion	n	K_M/K_{50} [mM]	V_{\max} [1/sec]
Zn^{2+}	1.96	6.6	385
Co^{2+}	1.91	18.5	100
Cd^{2+}	(1)	7.7	28

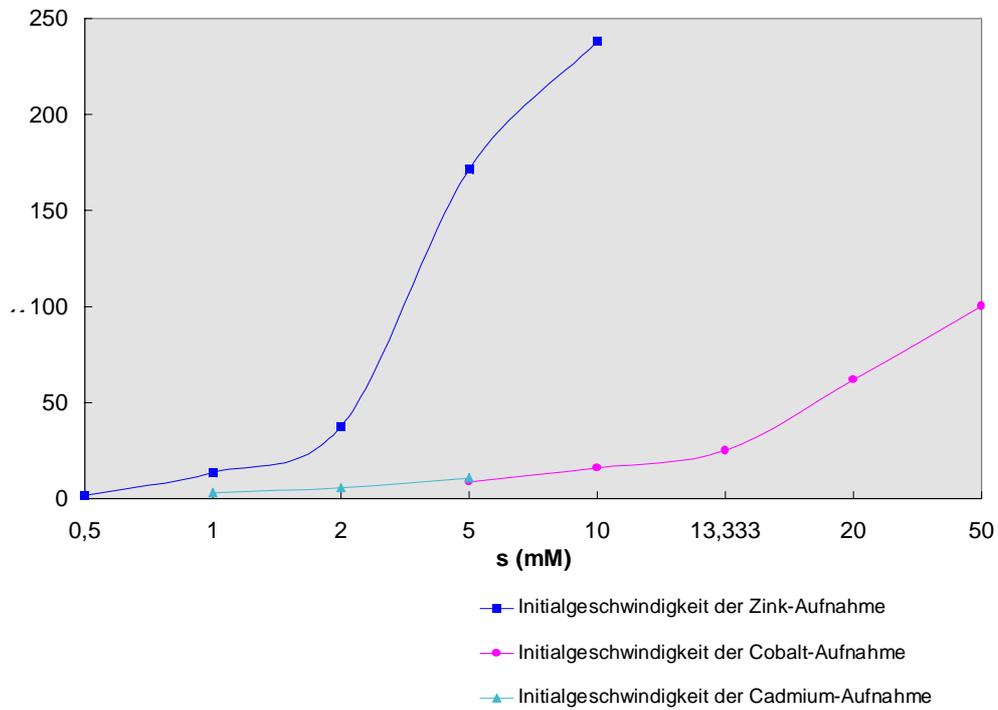


Abb. 24: Substratsättigungskurven. Die Initialgeschwindigkeit der Zink- (■) , Cobalt- (●) und Cadmium-Aufnahme (▲) in CzcA-Proteoliposomen wurde bestimmt und gegen die Substratkonzentration aufgetragen.

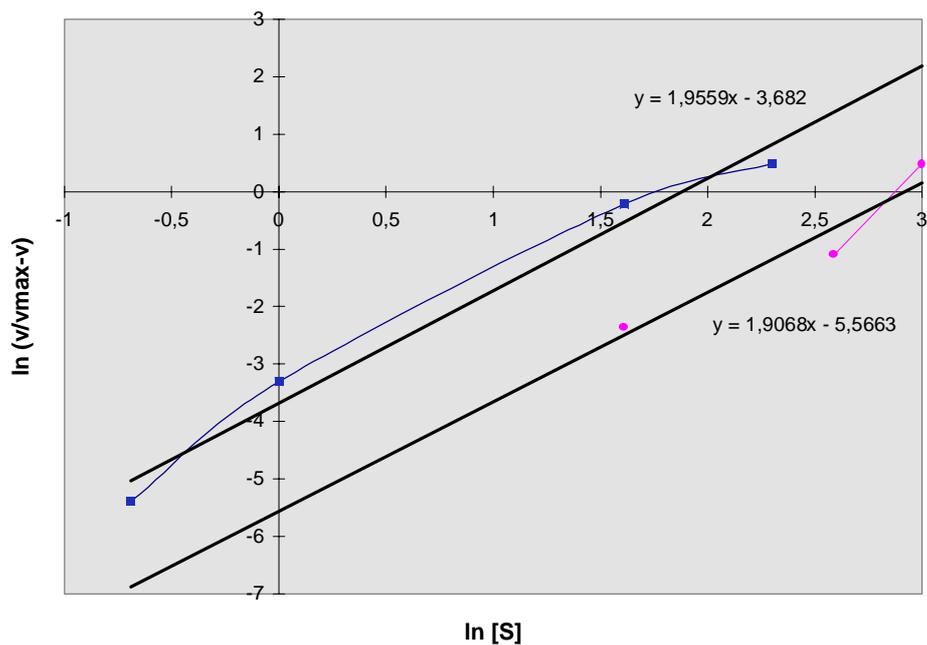


Abb.: 25 Hill-Diagramm berechnet für die Initialgeschwindigkeiten der Zink (■)- und der Cobalt (●)-Aufnahme.

Die Proteine, die die mutierten Aspartat-Reste, CzcA-D402N (pECD 557) und CzcA-D408N (pECD 558) (Goldberg *et al.*, 1999), enthielten, wurden auf die selbe Weise wie das WT-CzcA-Protein gereinigt, in Detergenz destabilisierte Liposomen rekonstituiert und mit 0.5 M NH_4Cl vorgeladen. Die unterschiedlichen Proteoliposomen, hergestellt mit WT-CzcA-Protein und den mutierten Proteinen CzcA-D402N und CzcA-D408N, wurden in Cholinchlorid-Puffer verdünnt. Die Zugabe von 1 mM $^{65}\text{Zn}^{2+}$ erfolgte nach 1 min (Abb. 26). Es wurde eine schnelle Protonen unabhängige Akkumulation der Radioaktivität innerhalb der Proteoliposomen beobachtet. Jedoch war auch zu sehen, daß die mutierten Proteine nicht mehr in der Lage waren den langsameren Proton/Zink-Antiport durchzuführen.

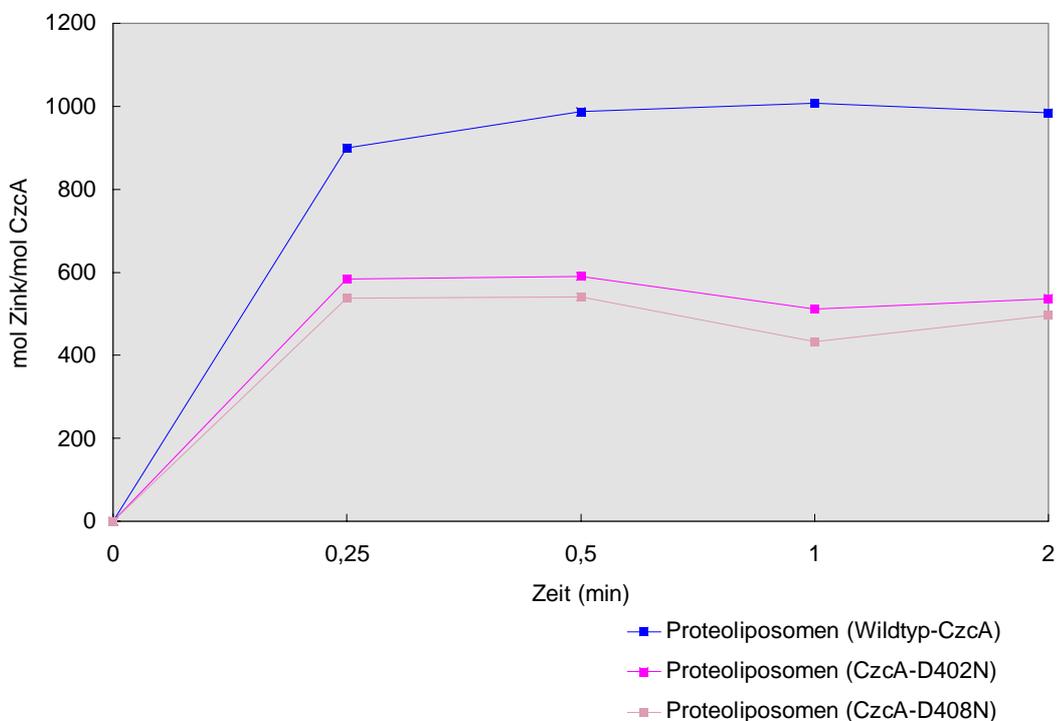


Abb. 26: Aufnahme von 1 mM $^{65}\text{Zn}^{2+}$ in Proteoliposomen, die mit 0.5 M NH_4Cl (pH 7.0) vorgeladen und in 0.5 M Cholinchlorid-Puffer pH 9 verdünnt worden waren. Eingesetzt wurden Proteoliposomen, die mit WT CzcA (■), mutierten CzcA [Asp402Asn (■); Asp408Asn (■)] generiert wurden.

4 Diskussion

Für die Aufnahme von Nährstoffen, den Export von toxischen Substanzen und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase stehen den bakteriellen und eukaryotischen Zellen eine Vielzahl von Transportsystemen zur Verfügung. Nach Transportmechanismus und Aufbau werden Transporter in verschiedene Familien und Superfamilien eingeteilt (Griffith *et al.*, 1992; Saier, 1994). Durch computergestützte Analysen konnten hohe Konservierungen nicht nur innerhalb der Sequenzen von bakteriellen Transportern aufgezeigt werden, sondern auch große Übereinstimmungen mit Proteinen aus höheren Eukaryonten dargestellt werden (Nikaido & Saier, 1992). Somit führt die Kenntnis bakterieller Systeme auch zu einem Verständnis von Transportvorgängen in komplexen eukaryotischen Zellen.

Die Transportsysteme von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien unterscheiden sich grundsätzlich voneinander. Gram-positive Bakterien transportieren die für die Bakterienzelle toxischen Substanzen mittels Effluxpumpen unter Energieverbrauch über die Cytoplasmamembran nach außen. Solche Systeme wären für Gram-negative Bakterien nicht effizient, da der Rückstrom aus dem Periplasma in die Zelle nicht gedrosselt werden könnte (Nikaido, 1996). Gram-negative Bakterien besitzen Cytoplasmamembran und äußere Membran, ihre Transportsysteme sind gekennzeichnet durch membrandurchspannende Kanäle, die in der äußeren Membran durch β -Faltblattstrukturen gebildet werden, während in der Cytoplasmamembran transmembrane α -Helices gefunden werden (Nikaido & Saier, 1992).

Im Zusammenhang mit der Ausbildung von Schwermetallresistenzen und dem Efflux toxischer Substanzen werden sogenannte "Multi-Drug Resistance-Pumps" (MDR-Pumpen) beschrieben, die unter anderem zu den Superfamilien der ABC-Transporter und den protonengetriebenen Transportern gezählt werden. Zur Gruppe der protonengetriebenen Efflux-Systeme gehören die MFS-Transporter (major facilitator superfamily), SMR-Transporter (small multidrug resistance) und die RND-Transporter (resistance, nodulation, cell division) (Paulsen *et al.* 1996). Das Substratspektrum dieser MDR-Pumpen ist groß und zum Teil von klinischer Bedeutung, so transportiert z.B. das MsrA-Protein aus *Staphylococcus epidermis*, ein Mitglied der ABC-Typ-Familie, Erythromycin (Ross *et al.*, 1990). Das ArcB-Protein aus *Salmonella typhimurium*, ein Vertreter der RND-Typ-Familie, ist in der Lage β -Lactam Antibiotika mit lipophilen Seitenketten zu transportieren (Nikaido *et al.*, 1998). Substrate wie CCCP und Thiolactomycin werden von dem EmrB-Protein aus *E.coli*, einem Mitglied der MFS-Typ-Familie, transportiert (Lewis, 1994) und das Smr-Protein aus *Staphylococcus*

aureus, ein Vertreter der SMR-Typ-Familie, ist verantwortlich für den Transport von Tetraphenylphosphonium, Ethidium und Methylviologen (Grinius & Goldberg, 1994).

Das CzcA-Protein aus *Ralstonia spec.* CH34 (vorher: *Alcaligenes eutrophus*, Stamm CH34) wurde in die Familie der RND-Proteine eingeordnet (Saier *et al.*, 1994). Durch computergestützte Sequenzanalysen und -vergleiche, die ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung von Struktur, Funktion und Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Proteinen sind, wurden der RND-Superfamilie mittlerweile sieben Familien untergeordnet (Tsai-Tien Tseng *et al.*, 1999). Diese sieben Familien sind wie folgt beschrieben: 1. Die Schwermetall Efflux-Familie [heavy metal efflux family (HME)], vertreten in Gram-negativen Bakterien. 2. Die hydrophobe/amphiphile Efflux 1-Familie (HAE1), vertreten in Gram-negativen Bakterien. 3. Die Familie der exportierenden Bakterien von Nodulations-Faktoren [the nodulation factor exporter (NFE) family], vertreten in Gram-negativen Bakterien. 4. Den SecDF Protein-Sekretionsapparat bildende Familie (SecDF), vertreten in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien und in Archae-Bakterien. 5. Die hydrophobe/amphiphile Efflux 2-Familie (HAE2), vertreten in Gram-positiven Bakterien. 6. Die eukaryotische Sterol Homöostase Familie (ESH). 7. Die hydrophobe/amphiphile Efflux 3-Familie (HAE3), vertreten in Archae-Bakterien und Spirochaeten.

Tabelle 10 (entnommen der Arbeit von Tsai-Tien Tseng *et al.*, 1999) soll an dieser Stelle noch einmal repräsentative Mitglieder dieser aufgeführten Familien und deren zugeordneten Funktionen kurz auflisten, um die universelle Verbreitung dieser Proteine in den unterschiedlichsten Organismen aufzuzeigen.

Tabelle 10: Repräsentative RND-Proteine

Familie	Abkürzung der Proteinnamen	Funktion der Proteine	Größe der Proteine in AS	Putative TMSs	Organismus
1.	CzcA Aeu	Co ²⁺ -Zn ²⁺ -Cd ²⁺ -Exporter	1.063		12 <i>Ralstonia spec.</i> CH34

Fortsetzung
Tabelle 10:

2.	AcrF Eco	Acriflavinresistenz vermittelndes Protein-F	1.034	12 <i>Escherichia coli</i>
2.	AcrB Eco	Acriflavinresistenz vermittelndes Protein-B	1.049	13 <i>Escherichia coli</i>
3.	NolGHI Rme	Lipopolysaccharid Exporter	946 (277+215+435)	10 <i>Rhizobium meliloti</i>
4.	SecDF Eco	Typ II des Protein Sekretionssystems bestehend aus Sec D und Sec F	938 (615+323)	10 <i>Escherichia coli</i>
4.	SecDF Rca	Typ II des Protein Sekretionssystems bestehend aus Sec D und Sec F	887 (554+333)	10 <i>Rhodobacter capsulatus</i>
5.	ActII3 Sco	Actinorhodin-Transport assoziiertes Protein II-3	711	12 <i>Streptomyces coelicolor</i>
6.	YMP Sce	YPL006w Membranprotein	1.170	13 <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
6.	NPC Hsa	Niemann-Pick C-Krankheit involviertes Protein 1	1.278	14 <i>Homo sapiens</i>
6.	Ptc Dme	"Patched" Morphogen Rezeptor	1.286	12 <i>Drosophila melanogaster</i>
6.	SCAP Cgr	SREBP Spaltung aktivierendes Protein	1.276	8 <i>Cricetulus griseus</i>
7.	ORF Afu	Gen AF1229 Protein	750	11 <i>Archeoglobus fulgidus</i>
7.	ORF Mja	Gen MJ1562 Protein	388	6 <i>Methanococcus jannaschii</i>

Zur Familie der Schwermetalltransporter (HME family), dessen repräsentativer Vertreter das CzcA-Protein aus *Ralstonia spec.* CH34 (Nies *et al.*, 1989) ist, gehören laut Tsai-Tien Tseng *et al.*, 1999 das CnrA-Protein aus *Ralstonia spec.* (vorher: *Alcaligenes eutrophus*) (Liesegang *et al.*, 1993), das NccA-Protein aus *Ralstonia spec.* (vorher: *Alcaligenes xylosooxidans*) (Schmidt & Schlegel, 1994). Als weitere Mitglieder wurden in die HME-Familie die offenen Leserahmen von: Orf 1, Orf 2, Orf 3 und Orf 4 aus *Aquifex aeolicus* aufgenommen, des weiteren die offenen Leserahmen von: Orf2 und Orf 3 aus *Helicobacter pylori*, sowie Orf 4 und Orf 5 aus *Synechocystis spec.*, sie wurden ebenfalls alle als Kationen-Efflux-Systeme beschrieben. Für die aufgelisteten Schwermetalltransporter vom RND-Typ wird angenommen, daß sie als protonenabhängige Carrier funktionieren.

Während die Mehrzahl der cytoplasmatischen und sekretierten Proteine monomer bleibt, existieren nahezu alle bisher untersuchten Membranproteine in Form nicht kovalenter, homo- beziehungsweise heterooligomerer Komplexe (Langosch, 1999). Aber auch die Gene der RND-Proteine aus Gram-negativen Bakterien werden oft in Assoziation mit den Genen der MFP-Proteine (membrane fusion protein) gefunden (Dinh *et al.*, 1994; Saier *et al.*, 1994). Es wurde postuliert, daß die MFP-Proteine den periplasmatischen Raum durchspannen und mit beiden Membranen interagieren (Dinh *et al.*, 1994). Die Gruppe der MFP-Proteine ist sehr divergent und zeichnet sich kaum durch konservierte Regionen aus. Zum Teil interagieren RND-Proteine und MFP-Proteine mit einer dritten Proteinfamilie, den OMF-Proteinen (outer membran factor) (Dong & Mergeay, 1994). Mittels des postulierten Komplexes aus RND-, MFP- und OMF-Protein würde ein Transport über Cytoplasmamembran, Periplasma und äußere Membran, ein sogenannter "transenvelope transport", möglich sein. Paulsen *et al.*, 1997 beschrieben für folgende RND-Proteine die Assoziation mit MFP- und OMF-Proteinen: CzcA aus *Ralstonia spec.* CH34; CnrA, einem Cobalt-Nickel-Transporter, aus *Ralstonia spec.*; HelA, das möglicherweise in eine Virulenz-Kaskade involviert ist, aus *Legionella pneumophila*; NccA, einem Nickel-Cobalt-Cadmium-Transporter aus *Ralstonia spec.*; MtrD, einem "multidrug exporter", aus *Neisseria gonorrhoe* und dem MexB-Protein einem "multidrug exporter", aus *Pseudomonas aeruginosa*.

Computergestützte topologische Vorhersagen für das CzcA-Protein beruhen auf der Auswertung von Hydropathie-Analysen nach Kyte & Doolittle, 1982. In Abbildung 27 ist der Hydropathie-Plot für das CzcA-Protein gezeigt.

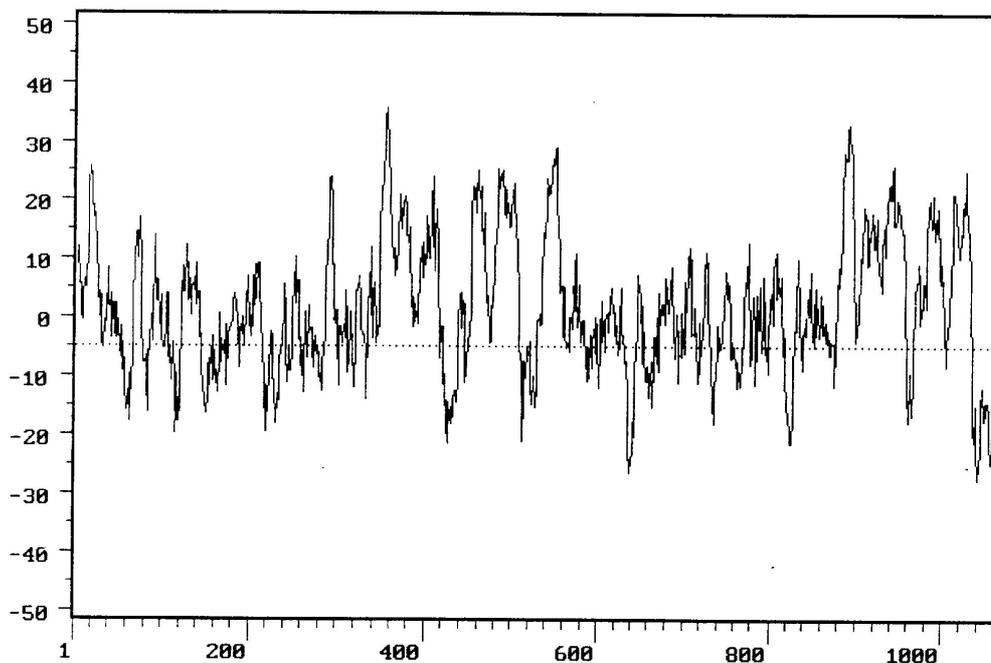


Abbildung 27: Hydropathie-Plot des CzcA-Proteins (berechnet nach Kyte & Doolittle, 1982).

Auf der Abzisse sind die Aminosäurepositionen aufgetragen, auf der Koordinate die dazugehörigen Hydropathiewerte. Positive Werte kennzeichnen hydrophobe, negative Werte hydrophile Bereiche des Proteins.

Das CzcA-Protein besteht aus 1063 Aminosäuren und die vorhergesagte Struktur (Goldberg *et al.*, 1999) sieht folgende Anordnung voraus: N-Terminus, woran sich die transmembrane Helix I (TMH I) anschließt, die von der periplasmatischen Domäne I abgelöst wird. Danach folgen die TMHs II bis VII, unterbrochen von der periplasmatischen Domäne II, fügen sich die TMHs VIII bis XII an. Das Ende des Proteins bildet ein cytoplasmatischer C-Terminus. Die Topologie der großen hydrophilen Domänen und der Termini sind durch Proteinfusionen mit alkalischer Phosphatase verifiziert worden (Goldberg *et al.*, 1999). Diese Anordnung paßt zu dem Modell eines "6+6-Spanner Transporter" (Nikaido & Saier, 1992). Ein Sequenzvergleich zwischen der ersten und der zweiten Hälfte des Proteins legt die Vermutung nahe, daß das Protein im Laufe der Evolution durch eine intragene Duplikation entstanden ist (Saier, 1994). Im Falle der RND-Proteine könnten zwei unabhängige Kanäle über große periplasmatische Domänen verbunden sein. Das Modell der Zweikanalpumpe, wobei beide Kanäle unterschiedliche Funktionen haben, soll später in der Ergebnisdiskussion der

Transportmessungen, die mit den mutierten Proteinen erzielt wurden, noch einmal herangezogen werden. Funktionell und strukturell wichtige Regionen werden mittels Sequenzvergleichen identifiziert. Regionen, wie z.B. Substratbindestellen, sind oft sehr konserviert, wie auch die transmembranen Helices der Transportproteine. In Abbildung 28 ist das Modell eines RND-Proteins dargestellt (Paulsen *et al.*, 1996).

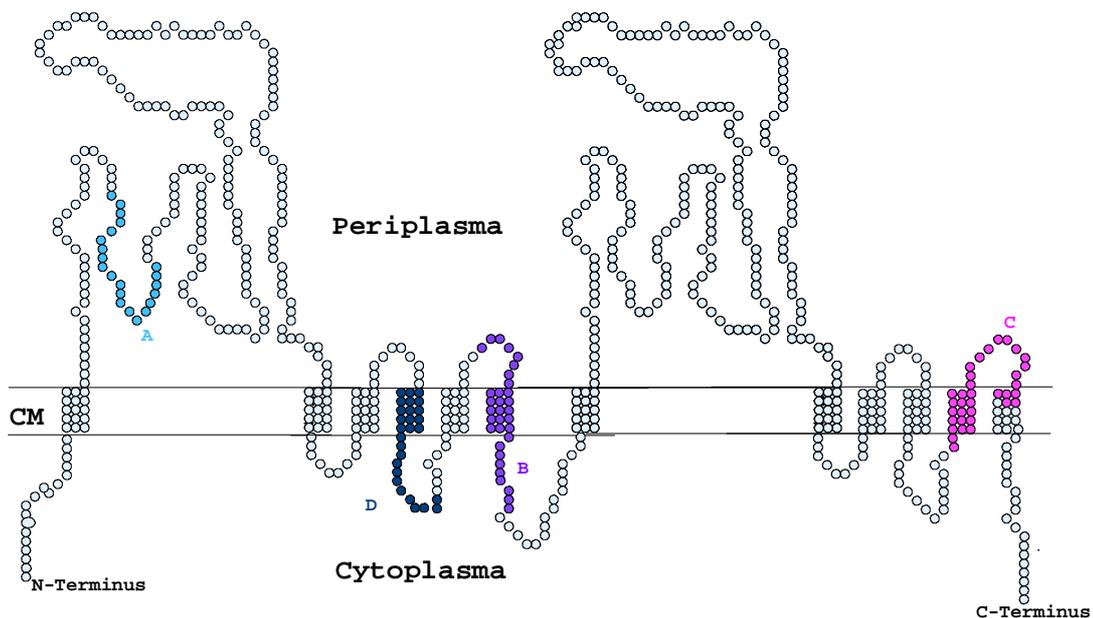


Abb.28: Schematisches Modell eines RND-Proteins in der Cytoplasmamembran (CM) (nach Paulsen *et al.*, 1996). Die Lage der konservierten Motive A (hellblau), B (lila), C (pink) und D (dunkelblau) sind eingezeichnet.

Da für den postulierten CzcCBA-Komplex bereits ein schwermetallabhängiger Protonentransport mittels Fluoreszenz-Quenching-Assays gemessen werden konnte (Nies, 1995), sollte in dieser Arbeit durch die Reinigung und Rekonstitution von CzcA der direkte Nachweis für die Funktion als Protonen/Kationen-Antiporter erbracht werden.

Um die Protonen/Kationen-Antiporter-Funktion nachweisen zu können, wurde das CzcA-Protein in Detergenz destabilisierte Liposomen rekonstituiert. Durch Anlegen eines Protonengradienten durch Inkubation mit Tris-Puffer pH 5 bzw. mit NH_4Cl und

anschließender Zugabe radioaktiver Metalle wurde die Aufnahme von Zink, Cobalt und Cadmium in die Proteoliposomen bzw. Liposomen, die hier als Kontrolle dienten, bestimmt. Die Zugabe von 1 mM $^{65}\text{Zn}^{2+}$ erfolgte nach 1 min. Das Ergebnis war eine schnelle Akkumulation der Radioaktivität innerhalb der Proteoliposomen. Das Höchstmaß an akkumulierter Radioaktivität wurde nach ca. 1 min erreicht. Die Liposomen, die hier als Kontrolle dienten, und die die gleiche Konzentration an Phospholipiden wie die Proteoliposomen enthielten, akkumulierten weniger als 17% der Radioaktivität, die in den Proteoliposomen gemessen worden war (Abb.20). Um sicherzustellen, daß es sich bei diesem Ergebnis um eine Metallaufnahme im Falle der Proteoliposomen und um eine unspezifische Adsorption im Falle der Liposomen handelte, wurde ein "Verdrängungsversuch" mit nicht radioaktivem Zink durchgeführt. Zu sehen war, daß das von den Liposomen gebundene radioaktive Zink durch das nicht radioaktive Zink austauschbar war, hingegen war bei den Proteoliposomen noch eine zusätzliche Steigerung der Metallaufnahme zu beobachten (Abb. 18). Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, daß im Fall der Liposomen das radioaktive Zink nur an die Phosphatgruppen der Phospholipide gebunden hatte und somit in den weiteren Versuchen als Kontrolle dienen konnte.

Eine weiterer Beweis für eine protonengetriebene Metallaufnahme ist der Zusammenbruch des Protonengradienten unter Einsatz von Entkopplern und die damit verbundene Aufnahmehemmung. In dieser Arbeit wurden FCCP und CCCP als Entkoppler eingesetzt. Entkoppler sind schwache Säuren, die Protonen durch Membranen befördern und so die PMF zerstören. Die CzcA-abhängige Zinkaufnahme in NH_4^+ -geladene Proteoliposomen konnte teilweise mit 100 μM FCCP oder 500 μM CCCP gehemmt werden (Daten hier nicht gezeigt); es konnte die Aufnahme von $^{65}\text{Zn}^{2+}$ in mit Tris-Puffer pH 5.0 vorgeladene Proteoliposomen um ca. 50% gehemmt werden, wenn eine Zugabe von 100 μM FCCP erfolgte (Abb. 18). Diese Entkopplerkonzentrationen liegen jedoch um ca. das 10fache höher als die in der Literatur verwendeten FCCP bzw. CCCP-Konzentrationen von 10- 20 μM . Entkoppler werden zumeist in zellulären oder vesikulären Systemen unter physiologischen Bedingungen eingesetzt. Sie interagieren mit Komponenten der ATP-Synthase und ermöglichen dadurch den freien Protonenrückfluß ohne ATP-Synthase (Hatefi, 1985). Die in diesem Experiment benötigten hohen Entkoppler-Konzentrationen könnten die Folge der hier eingesetzten hohen Membrankonzentrationen sein.

Um zu beweisen, daß in allen Versuchen die Metalle in die Proteoliposomen transportiert worden waren und nicht etwa an den negativen Phosphatgruppen der Phospholipide

adsorbierten, wurde ein Wettbewerbsversuch mit nicht radioaktivem Zink durchgeführt (Abbildung 18). Zu sehen war, daß die Menge an gebundenem Zink im Falle der Proteoliposomen leicht stieg, während die Menge an gebundenem Zink im Falle der Liposomen sich verringerte. Dieses Ergebnis ließ den Schluß zu, daß die Metalle in die Proteoliposomen transportiert wurden und somit der Aktivitätsnachweis für CzcA und CzcA (Asp402Asn / Asp408Asn) erbracht wurde. Diffusion der Metalle in die Proteoliposomen kann ausgeschlossen werden, da laut Kalkulationen, zu denen das erste Fick'sche Gesetz herangezogen wurde, die Diffusion von Zn^{2+} durch CzcA zu langsam verlaufen würde, um die beobachteten Wechselzahlen von CzcA zu erklären.

Ein weiteres Kriterium, das es zu überprüfen galt, war die Abhängigkeit der Metallaufnahme von der Substratkonzentration, da bei einem echten Transport ab einer bestimmten Konzentration der zu transportierenden Substanz eine Sättigung eintritt. Der Carrier verhält sich wie ein Enzym nach dem Michaelis-Menten-Schema, nur daß das Substrat nicht chemisch umgesetzt, sondern lokal versetzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, daß die Geschwindigkeit der Zinkaufnahme um das Zweifache erhöht war, wenn als Substratkonzentration 3 mM Zink anstatt 1 mM Zink eingesetzt wurde. Mit weniger als 0.5 mM Zink wurde nahezu keine Aufnahme gemessen (Abb. 21). Wenn Zinkkonzentrationen höher als 10 mM eingesetzt wurden, ergab sich keine signifikante Steigerung der gemessenen Zinkaufnahme, was wahrscheinlich auf einen toxischen Effekt des Zink's auf die Integrität der Proteoliposomen schließen läßt.

Der für den Zinktransport in die Proteoliposomen ermittelte K_{50} -Wert lag bei 6.6 mM und die berechnete Kooperativitätskonstante (n) wies einen Wert von 1.96 auf. Die für den Zinktransport in die Vesikel (Nies, 1995) erhaltenen Werte hingegen lagen bei 6.75 ± 2.74 mM für den K_{50} -Wert und 1.95 ± 0.08 für die Kooperativitätskonstante. Daraus könnte gefolgert werden, daß CzcA allein die Substratspezifität und die Kooperativität bestimmt, d.h. daß zwei Protonen pro Zn^{2+} transportiert werden. Es könnte jedoch auch bedeuten, daß die beiden Komplexkomponenten CzcC und CzcB, sowie der Ladungsgradient (ψ) den K_{50} -Wert beeinflussen können, jedoch nicht die Kooperativitätskonstante. Ebenfalls kann argumentiert werden, daß CzcC und CzcB, sowie der Ladungsgradient (ψ) für einen effektiven Antiport notwendig sind. Dieses Argument wird unterstützt, wenn der K_{50} -Wert, der für Cobalttransport in die Proteoliposomen ermittelt wurde, in Vergleich zu dem aus den Vesikeltransport erhaltenen Wert gesetzt wird, denn der erstere lag bei 18.5 mM, wohingegen der zweite bei 5.8 mM lag. Der erhaltene K_{50} -Wert von 7.7 mM für den Cadmiumtransport in die

Proteoliposomen muß hinterfragt werden, da er in einen nur sehr kleinen Substratbereich gemessen wurde und diese Messung somit nicht zu einem vertrauenswürdigen Ergebnis führt. Der ermittelte K_m -Wert von 6.6 mM für den durch das CzcA-Protein vermittelten Zinktransport liegt um den Faktor 1000 höher als der K_m -Wert der Zn (II) translozierenden P-typ ATPase, der bei 9 μ M liegt (Rensing *et al.*, 1997b). Da die Affinität zum transportierten Substrat im Falle von CzcA nicht sehr hoch ist, ist zu postulieren, daß dieses Effluxsystem nur arbeitet, wenn die intrazelluläre Zinkkonzentration in den millimolaren Bereich ansteigt. Demnach ist weiterhin zu folgern, daß es in *Ralstonia spec.* ein sehr sensitives Regulationssystem geben muß, damit die Metallhomöostase nicht beeinträchtigt wird.

Wenn man davon ausgeht, daß CzcB und CzcC für einen effizienten Efflux der Schwermetalle Zn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} essentiell sind, schließt sich die Frage nach Ihrer Struktur und Funktion an. CzcB gehört zu der Familie der Membranfusionsproteine (Dinh *et al.*, 1994), die mit RND-, sowie ABC-Transportern interagieren können. Bei allen bisher untersuchten Mitgliedern der MFP-Familie konnte eine gemeinsame Struktur festgestellt werden. Die Proteine beginnen mit einer kurzen hydrophilen Region am N-Terminus, worauf sich ein ca. 20 AS langer, hydrophober Bereich anschließt. Diese Domäne dient wahrscheinlich der Verankerung in der Cytoplasmamembran und ist lediglich strukturell konserviert. Es folgt eine Region von mittlerer Hydrophobizität von ca. 60 AS Größe, die unter Umständen der Interaktion mit dem Transporter dient und relativ gut konserviert ist. Danach schließt sich eine α -helicale, hydrophile Region an, die das Periplasma durchqueren soll. Darauf folgt eine Region, die hoch konserviert ist und der Interaktion mit Bestandteilen der äußeren Membran dienen soll. Diese Region ist relativ hydrophob und weist überwiegend β -Faltblattstrukturen auf. Die α -helicale Region, die bei dem Membranfusionsprotein HlyD als *coiled-coil* Strukturen beschrieben wurde (Pimenta *et al.*, 1996) könnte somit den Abstand zwischen der inneren und äußeren Membran variieren. HlyD interagiert mit HlyB, einem ABC-Transporter, der als Exporter für Hämolyisin fungiert. Auch CzcB bietet die nötigen strukturellen Voraussetzungen, um als MFP-Protein mit beiden Membranen in Kontakt zu stehen (Rensing *et al.*, 1997a). Und in Analogie zu dem Membranfusionsprotein CvaA aus *E.coli*, das mit dem 'outer membrane protein' TolC interagiert (Hwang *et al.*, 1997) und zusammen mit dem CvaB-Protein, einem ABC-Transporter, am Export von Coicin V beteiligt ist, könnte auch CzcB einen Kontakt zu einem Protein der äußeren Membran herstellen. Als Funktion für TolC wurde postuliert, daß es als Kanal für das AcrAB Efflux System dienen könnte (Lewis, 1994 und Ma *et al.*, 1994) und Fralick (1996) erbrachte Evidenzen, daß TolC in den Efflux-Prozess involviert ist. Für

CzcB wird eine Funktion im Zusammenhang mit der Freisetzung des Zn^{2+} von dem CzcA-Protein, eine Art 'Verhinderung des Kationenrückstaus', diskutiert (Goldberg *et al.*, 1999).

Desweiteren bleibt die Frage nach der Aufgabe des CzcC-Proteins. Es besitzt Homologien zur OMF-Familie (Outer Membran Factor), von denen angenommen wird, daß sie mit der äußeren Membran assoziiert sind (Dong & Mergeay, 1994). Ein multiples Alignment aller bekannten OMF-Proteine zeigte, daß diese Proteine recht hohe Sequenz-Divergenzen aufweisen (Paulsen *et al.*, 1997). Es wurden keine konservierten Reste innerhalb der Protein-Familie gefunden; die größten Divergenzen wurden jedoch in den N- und C-Terminalen Regionen der Proteine detektiert. Durch Auswertung aller Hydropathie-Plots wurde festgestellt, daß alle OMF-Proteine eine N-Terminale Signalsequenz aufweisen. Für CzcC wurde ebenfalls eine Signalsequenz nachgewiesen (Rensing, 1997a). Dem Signalpeptid folgt ein sehr hydrophiler Bereich von ca. 40 AS-Resten. Sekundäre Strukturvorhersagen für die OMF-Proteine weisen darauf hin, daß die Proteine zum größten Teil aus β -Strukturen bestehen. Die hydrophoben 'Peaks' stimmen im allgemeinen mit den Regionen, die eine höhere Konservierung aufweisen, überein und könnten so den transmembranen β -Strukturen entsprechen. Deletionsmutanten zeigten, daß sich das Resistenzverhalten von Stämmen, die das CzcA-Protein allein exprimierten, von denen, die CzcC und CzcA exprimierten, nicht unterschied (Rensing *et al.*, 1997a). Aus dieser Physiologiestudie konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das CzcB-Protein für einen effektiven Effluxprozess unbedingt notwendig war. Da der CzcAB-Komplex ohne CzcC lediglich gegenüber Zn^{2+} -Ionen eine starke Steigerung der Resistenz zeigte, jedoch nicht gegenüber Co^{2+} und Cd^{2+} , wurde postuliert, daß das CzcC-Protein modifizierend auf die Substratspezifität wirken könnte (Rensing *et al.*, 1997a). Eine weitere mögliche Funktion für CzcC wäre vielleicht eine Beteiligung am generellen Transport der Kationen über das Periplasma hinweg. Für diese These sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig.

Zudem deuteten die Ergebnisse der *czcCB*-Deletionen, beide Gene sind im *czc*-Operon vor dem *czcA*-Gen angeordnet (Nies *et al.*, 1989), darauf hin, daß CzcA allein in der Lage sei, den Transport von Zink und Cobalt über die Cytoplasmamembran hinweg zu katalysieren (Rensing *et al.*, 1997a). In dieser Arbeit konnte diese These durch die aktive Rekonstitution des CzcA-Proteins in Detergenz destabilisierte Liposomen und der nachfolgenden radioaktiven Aufnahmemessungen bewiesen werden.

Weiterer Klärungsbedarf bestand bei der Beschreibung der primären Metallbindestelle des Czc-Efflux-Komplexes, sowie bei der Frage nach den am Protonentransport beteiligten Aminosäuren. Metalle sind sehr einfache Liganden, die minimale Ansprüche an die Bindestelle aufweisen. In Proteinen sind Metallionen für eine Vielzahl von Funktionen zuständig, z.B. für die nucleophile Katalyse der Carboanhydrase, den Elektronentransfer in Cytochromen und die Strukturstabilisierung von Zinkfingern (Lippard & Berg, 1994). Für die Bindung der Metallionen ist eine korrekte Positionierung von zwei bis vier Aminosäureseitenketten ausreichend (Regan, 1995). Unter physiologischen Bedingungen binden die Übergangsmetalle, wie z.B. Zn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} , an die Imidazol- und Thiolgruppen von Histidin- und Cysteinresten. Durch Glutathion werden im Cytoplasma Bedingungen eingestellt, so daß Cysteine auch an der Proteinoberfläche reduziert vorliegen können. Auch Aspartat- und Glutamatreste können unter bestimmten Bedingungen zur Metallbindung beitragen.

Sehr bekannte Metall-Bindemotive sind z.B. die hochkonservierten Cystein- Histidin- Sequenzen (Cys- $X_{2,4}$ -Cys- X_3 -Phe- X_5 -Leu- X_2 -His- $X_{3,4}$ -His) der Zinkfinger-Proteine, an denen die Bindung von Zn^{2+} erfolgt (Berg, 1990), und die Cystein-Bindemotive der P-Typ-ATPase CadA, einem Schwermetalltransporter. Für CadA konnte nachgewiesen werden, daß nach Austausch der beschriebenen Cysteine keine Bindung des Cadmiums mehr erfolgt (Solioz & Vulpe, 1996). Weiterhin können Methionin-Histidin-Regionen als Metall-Bindemotive fungieren. Jedoch können durch die Tertiärstruktur der Proteine bedingt in der Sequenz weit entfernt liegende Aminosäurereste zu einem Bindemotiv zusammentreten.

Da das CzcB-Protein eine histidinreiche Region mit zwei zueinander homologen Motiven von jeweils vier Histidinresten enthält, wurde postuliert, daß diese Region für die primäre Metallbindung verantwortlich sei (Nies & Silver, 1995). Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden die beschriebenen Histidine ausgetauscht, doch das Ergebnis zeigte, daß diese Region weder für die Metallbindung noch für den Transportweg essentiell ist (Rensing *et al.*, 1997a). Das CzcA-Protein besitzt einen geringen Anteil an Histidinen und Cysteinen; damit war es bei den Überlegungen zur Metallbindestelle zunächst in den Hintergrund getreten (Nies, 1992). Doch im konservierten Motiv D und der daran anschließenden 'loop'-Region zwischen Helix vier und fünf (Abbildung 28) befindet sich folgendes Cystein-Histidin-Motiv: Cys₄₁₇- X_5 -His₄₂₃- X_3 -His₄₂₇-His₄₂₈- X_9 -Phe-His₄₃₉. Dieses Motiv wurde mittels zielgerichteter Mutagenese verändert (Goldberg *et al.*, 1999). Es wurden Einzelmutanten hergestellt, indem der Cysteinrest 417 gegen Serin und die Histidinreste 423, 427 und 439 gegen Arginin ausgetauscht wurden. Die einzige Mutante, die einen Effekt auf die Ausbildung der

Schwermetallresistenz zeigte, trug den Austausch zu Arginin 439. Leider wurden in dieser Arbeit keine CzcA-Strep-tag-Proteine mit oben genannten Aminosäure-Austauschen hergestellt. Auch die Reinigung und Rekonstitution eines Proteins mit einem doppelten Aminosäure-Austausch, z.B. mit $\text{Cys}_{417} \rightarrow \text{Ser}_{417} / \text{His}_{423} \rightarrow \text{Arg}_{423}$ oder $\text{His}_{423} \rightarrow \text{Arg}_{423} / \text{His}_{427} \rightarrow \text{Arg}_{427}$, wäre sehr aufschlußreich gewesen, denn es wäre voreilig anzunehmen, daß die Aminosäuren 417, 423 und 427 nicht an der Metallbindung sind. Die Untersuchungen von Klemba & Regan (1995) unterstützen dieses Argument sehr deutlich, denn sie führten Untersuchungen an einer artifiziellen tetraedrischen $\text{Cys}_2\text{-His}_2$ -Bindestelle bezüglich deren Affinität zu den Metallen Cobalt, Zink und Cadmium durch. Alle vier komplexierenden Reste wurden einzeln mutagenisiert. Das Ergebnis dieser Mutationen war, daß in drei von vier Fällen die tetraedrische Bindungsstruktur erhalten blieb, der fehlende Ligand wurde durch das Lösungsmittel ersetzt. Auch der Einfluß der Mutationen auf die Metallaffinitäten war im Fall von Zink und Cadmium vernachlässigbar. Nur die Bindung von Cobalt war signifikant schlechter. Selbst bei einigen Doppelmутanten konnte die tetraedrische Bindungsstruktur noch aufrechterhalten werden.

Im Falle von CzcA hätten Metall-Transportmessungen mit Proteoliposomen, das CzcA-Protein enthaltend, das in der putativen Metallbindungsdomäne mutiert ist, die Argumentation um die Metallbindungsstelle unterstützen bzw. widerlegen können.

Wie transportieren Membranproteine Protonen durch die Membran? Protonen bewegen sich in sehr kleinen "Sprüngen", kürzer als 1 Angström, und erfordern die Rotationsbewegungen vieler Donor und Akzeptorgruppen, um einen kontinuierlichen Prozess zu gewährleisten. Diese Protonenbewegungen müssen sehr gut "geleitet" werden (Williams, 1995). Die Untersuchungen zur Protonentranslokation an der lichtabhängigen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin sind weit fortgeschritten. Bakteriorhodopsin ist in der Zellmembran von *Halobacterium halobium* lokalisiert, und pumpt Protonen aus dem Zellinneren nach außen. Ortsgerichtete Mutagenese Experimente haben zur Identifizierung von Aminosäuren geführt, die an der Protonentranslokation beteiligt sind (Krebs & Khorana, 1993). Es handelt sich dabei um zwei in einer transmembranen Helix gelegene Aspartatreste. Die negativ geladenen Carboxylgruppen dienen als Protonen-Akzeptoren und -Donatoren. So bilden diese beiden Aminosäuren ein Ladungs-Relais-System für den Transport von Protonen durch die Zellmembran. Bei den Lactose Transportproteinen, dem lacY Genprodukt aus *E. coli* und dem lacS Genprodukt aus *Streptococcus thermophilus*, sind ebenfalls Regionen beschrieben worden, die für die Protonentranslokation verantwortlich sind. Für LacY wurde schon in

früheren Arbeiten ein Ladungs-Relais-Mechanismus postuliert (Püttner *et al.*, 1986, 1989; Carrasco *et al.*, 1986; Menick *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1989), welcher als Analogie auf einen Protonen Transport über einen Asparaginsäure-, Histidin- und Serin-Rest in Proteasen vom Serin-Typ beruht (Kraut, 1977). Es wurde angenommen, daß im Falle von LacY die Aminosäuren Glu₃₂₅, His₃₂₂ und Arg₃₀₂ beteiligt sind; Glu₃₂₅ und Arg₃₀₂ würden die Imidazol-Gruppe von His₃₂₂ polarisieren, so daß dessen Fähigkeit als "Protonen- Shuttle" zu fungieren verstärkt würde. Aufgrund von ortsgerichteten Mutagenesen schlugen Poolman *et al.* (1995) für das LacS-Protein das Motiv Lys₃₇₃-X-X-His₃₇₆-X-X-Glu₃₇₉ als dasjenige vor, das einen Teil des Protonentranslokationsweges ausmachen könnte.

Für die Cytochrom C Oxidase aus *Parracoccus denitrificans* postulierten Iwata *et al.* (1995) einen "Histidin-Zyklus-Shuttle-Mechanismus", indem der Histidinrest 325 einen Zyklus zwischen den Stadien Imidazolat-, Imidazol- und Imidazolium-Form durchläuft, um zwei Protonen aufzunehmen und sie wieder abzugeben.

Im bakteriellen Reaktionszentrum von *Rhodobakter capsulatus* befindet sich der Aminosäurerest M43Asp, wobei M hier eine transmembrane Polypeptidkette bezeichnet, in einer Schlüsselposition, die die Reaktionswege für die Übertragung des ersten und des zweiten Protons auf Q_B verbinden kann (Mikosovska *et al.*, 1998). Für den mitochondrialen Phosphat-Carrier wurde ein Protonentransport über zwei Glutaminsäurereste und ein Histidin postuliert (Phelps *et al.*, 1996).

Das Motiv D (Abbildung 28) enthält die vierte Helix des N-terminalen transmembranen Kanals von CzcA. Dieser Kanal ist besonders zwischen den Schwermetalltransportern CzcA, CnrA und NccA hoch konserviert und wurde als Protonenkanal postuliert, während der zweite Kanal den Metallionentransport übernehmen könnte (Nies & Silver, 1995). Im Membrandurchgang befinden sich zwei Aspartatreste. Der Aspartatrest 408 ist in allen RND-Proteinen konserviert, Aspartat 402 innerhalb der Gruppe der Schwermetall-Transporter (Abbildung 29). Die Positionierung von negativ geladenen Seitenketten in dieser hydrophoben Region läßt auf einen funktionellen Zusammenhang schließen. Ein weiterer auffälliger Aminosäurerest im Motiv D ist der Glutaminsäurerest 415, der in allen RND-Proteinen konserviert ist (Abbildung 29). Die Aminosäure befindet sich wahrscheinlich auf der cytoplasmatischen Seite der vierten transmembranen Helix von CzcA.

Die Anordnung der drei konservierten Aminosäuren Asp402, Asp408 und Glu415 innerhalb der Schwermetalltransporter läßt einen analogen Vergleich zum Aufbau des Protonenkanals im

Bakteriorhodopsin zu. Den Untersuchungen von Richter *et al.* (1996) zufolge wird eine Interaktion von Aspartat 85 und Glutaminsäure 204 beim Protonentransport im Bakteriorhodopsin angenommen. Es wird angenommen, daß die Dissoziation eines Proton von Glutaminsäure 204 mit der Freisetzung des Protons in den extrazellulären Raum einhergeht.

A		B	
	* *		*
NccA Axy (424)	ALDFGLIIDGAVIIVENS	(992)	EAVIEGAMERVRPVLMTALVASLGFVPMATA
CnrA Reu (423)	ALDFGLIIDGAVIIVENS	(991)	AAVIEGAMERVRPVLMTALVASLGFVPMATA
CzcA Reu (400)	ALDFGLIIDGAVIIVENC	(966)	SAVRVGALTRLRPVLM TALVASLGFVPMATA
HelA Lpn (397)	ALDFGLIIVDGAVIIVENC	(967)	DAVLQGSALARLRPVLMTALVASLGFVPMALA
Orf2 Aae (394)	AIGIGMFVDDSSVIVVENV	(946)	EAVKRAAILRIRPILITAITTLIGLIPLLVI
Orf2 Hpy (393)	VLAIGMLIDSAVVVVENA	(946)	ECVLLGAKRRLRPVLM TACTAGLGLPLLS
Orf4 Ssp (401)	VVAIGSVVDDSIIVDMENC	(956)	ETIFKGSMERVNAIILMTALTSALGMLPLATA
Orf3 Aae (393)	ALAIGTMVDDAAIVLVENI	(975)	EAIYKGAVKRIRPKFMTFGAILIGLPIMLG
Ybd Eco (397)	AIAVVGAMVDDAIVMIENA	(971)	EALYHGAVLRVRPKAMTVAVIAGLLPILWG
Orf3 Hpy (392)	AIAIGAMVDDAIVMVENA	(958)	EAIMHGAVLRVRPKLMTFFSILASLIPIMYS
MexB Pae (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(960)	EAAIEACRMRLRPVMTSLAFILGVVPLAIS
AcrB Eco (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(962)	EATLDAVRMRLRPILMTSLAFILGVMPPLVIS
AcrF Eco (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(962)	EATLMAVRMRLRPILMTSLAFILGVPLAIS
TtgB Ppu (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(959)	DAAEACRMRLRPIMTSLAFILGVVPLTIA
YhiV Eco (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(960)	EAIIEAARMRLRPILMTSLAFILGVPLVIS
AcrD Eco (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(959)	EATLHACRQRLRPILMTSLAFIFGVLPMAT
Orf Ppu (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(962)	KAAIEAAKRLRPILMTSLAFTFVGLPMAIA
AmrB Bps (398)	VLAIGILVDDAIVVVENV	(955)	DAALEAARLRRLRPVMTSLAFGVGVPLAFA
IfeB Atu (399)	VLAIGLLVDDAIVVVENV	(962)	EAVCQAARLRFRLPILMTSLAFGLGVIPLVIS
MtrD Ngo (397)	ILVIGIVVDDAIVVVENV	(969)	EAALEAARLRFRLPIMTSPAFILGVVPLYIA
MexD Pae (401)	VLAIGILVDDAIVVVENV	(957)	DAAEAARLRFRLPIMTSMAFILGVIPLALA
CeoB Bce (402)	VLAIGIVVDDAIVVVENV	(968)	EAAIEASRLRLRPILMTSIAFIMGVPLVTS
MexF Pae (402)	VLAIGIVVDDAIVVVENV	(972)	AAVLEACRLRLRPILMTSIAFIMGVPLVIS
Orf1 Ssp (401)	TLATGLVDDAIIIVVEIQ	(960)	KAALEASKDRLRPILMTALSTLFGIFPLAIA
Orf2 Ssp (409)	ILATGLVDDGILVVEAI	(981)	QAAAFAAKERMRPILMTAISGLVGFVPLVIA
Orf Hin (397)	ILATGLVDDAIVVLENI	(948)	EAITHAAKVRLRPILMTTAAAVAGLEPLLYA
YegN Eco (402)	TIATGFVDDAIVVLENI	(955)	EAIYQACLLRFRPILMTTLAALLGALPLMLS
Yeg0 Eco (393)	TIATGFVDDAIVVLENI	(941)	EAIYQACLLRFRPIMMTTLAALFGALPLVLS
Orf1 Aae (386)	AVAVGIVVDDAIVVMESI	(928)	EAILEARRELRRLRPILMTTITVVSALLPVALG
Orf1 Hpy (384)	TLAIGIIVDDAIVVLENI	(943)	EAILFAGKTRLRPILMTTIAMVCGMLPLALA
Orf Bbu (400)	ALGIGMVVDCSIVVIDNI	(961)	EAIIESCRSRLRPILMSSLTSTIGLIPMAFS
OrfS Ssp (407)	ALGVGIVVDNSIVMLETI	(978)	AAILRAAPQRLRPILMTTITTVLGMFPLALG
Orf Bsu (438)	TVATGRVVDDSIIVVLENI	(984)	EALLEAGSTRRLRPILMTAIAITIGALPLALG
No1 Rme (325)	SLSIGILIDDTIVVRENI	(833)	QSLADAGAVRLRPVMTTLLAMIFGMLPTALG
Orf3 Ssp (343)	ALIEGIVVDDAIVDVENI	(829)	EALLQTGHIRLRPILMTTSSSTILGMLPLALG
RagC Bja (393)	ALAVGILVDDSTVVIENI	(976)	QAALSAGRTRIRPVLKTAAMIVGMIIPMAIG
Orf4 Aae (412)	IFSIGILVDDAIVVLENI	(997)	VAVVEAGVIRTRPILLTAAAVIIGAVVIIIFD
Consensus	--AIG--VDDAIVVVEN-		EA---A---RLRPILMT--A---G-FP----

Abbildung 29: Consensussequenzen aus RND-Proteinen (aus Tseng *et al.*, 1999).

Die beiden Aspartatreste 402 und 408 wurden jeweils gegen ein Arginin und der Glutaminsäurerest 415 wurde gegen Glutamin und Aspartat ausgetauscht (Goldberg *et al.*, 1999). Das Ergebnis der Aspartat-Austausche war ein vollständiger Resistenzverlust der untersuchten Mutanten. Die so hergestellten Mutanten-Stämme von *Ralstonia spec.* CH34 wurden auf MIC-Platten (minimale Inhibitor Konzentration) und in Flüssigkultur untersucht. Der Resistenzverlust ließ auf einen Aktivitätsverlust des CzcA-Proteins schließen und somit deutete der Verlust der beiden Carboxylgruppen auf deren essentielle Funktion im Protein hin. Der Aminosäureaustausch Glu415Gln führte zur Sensivität gegenüber Cobalt, Zink und Cadmium. Das CzcA-Protein hatte seine Aktivität vollständig verloren. Demgegenüber bewirkte der Austausch Glu415Asp keine Verminderung der Resistenz im Vergleich zum Wildtyp. Bei Gegenwart von toxischen Konzentrationen an Cobalt, Zink und Cadmium zeigte die Mutante ein gegenüber dem Wildtyp verlangsamtes Wachstum. Dies deutete darauf hin, daß bereits eine kleine Änderung der Position der Carboxylgruppe in der Aminosäureposition 415 des CzcA-Proteins die Effizienz des Schwermetalltransports herabsetzte.

In dieser Arbeit wurden CzcA-Strep-tag-Proteine mit oben genannten AS-Austauschen hergestellt. Leider konnten die in der Aminosäureposition 415 (Glu415Asp und Glu415Gln) mutierten Proteine nicht gereinigt werden, da mit den entsprechenden Plasmiden transformierte *E.coli*-Zellen auch bei mehrmaligen Versuchen nicht wuchsen (Zellen flockten aus). Dagegen konnten die in den Aspartatresten 402 und 408 mutierten Proteine wie das Wildtyp-Protein gereinigt und in Detergenz destabilisierte Liposomen rekonstituiert werden. Anschließend wurden mit den Proteoliposomen radioaktive Aufnahmemessungen durchgeführt (Abbildung 26). Das Ergebnis dieses Versuches zeigte, daß die mutierten Proteine sowie das Wildtyp-Protein zwar in der Lage waren in den ersten 15 Sekunden protonenunabhängig Zink zu akkumulieren (Abbildung 26); jedoch akkumulierten die Proteoliposomen mit den beiden Mutanten-Proteinen nur noch ca. die Hälfte des radioaktiven Zinks. Eine Erklärung für dieses Ergebnis wäre, daß die mutierten Proteine im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nicht mehr in der Lage waren den langsamer katalysierten Protonen/Zink-Antiport durchzuführen. Diese Annahme würde sich auch mit den ermittelten physiologischen Daten decken (Goldberg *et al.*, 1999), da ein CzcA-Protein, das nicht mehr in der Lage ist den Protonen/Zink-Antiport zu katalysieren, die Zelle nicht mehr vor toxische Zinkkonzentrationen bewahren kann.

Die Ergebnisse dieses Versuches (siehe Abbildung 26) weisen darauf hin, daß beide Kanäle, die sich anhand der computergestützten Strukturvorhersagen ableiten lassen, unterschiedliche Funktionen haben. Der TMH II-VII-Kanal enthält die hoch konservierten DDE-Reste, welche

für die *in vivo* Funktion von CzcA und für den Protonen-Kationen-Antiport *in vitro* essentiell sind, jedoch nicht für die Aufnahme von Kationen in die Proteoliposomen. Das DDE-Motiv könnte in der Lage sein, wie vorhergehend schon beschrieben, ein Ladungs-Relais-System zu formieren (Kaback *et al.*, 1997). Der zweite Kanal, bestehend aus den TMHs VIII bis XII, könnte der Kationen Kanal sein. Zwei Kanäle könnten für die CzcA-Funktion erforderlich sein, da die Protonen als Ladung transportiert werden, wohingegen die Kationen als 'Teilchen' transportiert werden. Somit ist das derzeit beste Modell, um die Funktion von CzcA zu beschreiben, eine Zweikanalpumpe (Nies & Silver, 1995).

Wie könnte der Ablauf des Protonen-Kationen-Antiports erfolgen? Wenn das Zn^{2+} durch den Kationenkanal transportiert worden ist, muß es von den negativen Ladungen, welche für den Transport des Zn^{2+} notwendig sind, entfernt werden. Wie vorhergehend schon diskutiert, könnte CzcB für eine effektive Freisetzung des Zn^{2+} von CzcA verantwortlich sein. Um Zink-Efflux mit Protonen-Influx zu verbinden und um einen weiteren katalytischen Zyklus zu ermöglichen, müssen die Protonen, die für die Freisetzung des Zn^{2+} benötigt werden, in das Cytoplasma transportiert werden. Der Protonen-Influx jedoch muß sehr genau kontrolliert werden, um eine Entkopplung des Membranpotentials zu verhindern. Seit ein Protonen/Kationen-Verhältnis von 2:1 für den Metall-Kationen-Efflux in CzcCB₂A-enthaltenden Vesikeln beobachtet wurde (Nies, 1995), war es ersichtlich, daß das DDE-Motiv, welches nur in Transportern divalenter Kationen konserviert ist (Abbildung 29), für den Transport von mehr als einem Proton essentiell sein könnte. Denn ein Verhältnis von weniger als zwei Protonen pro Zn^{2+} würde ein Membranpotential invers zur PMF generieren, was schließlich den Zink-Efflux verhindern würde.

Wie transportieren die anderen RND-Proteine ihre Substrate? Überraschender Weise enthalten die Acr-ähnlichen RND-Proteine ebenfalls ein konserviertes DDE-Motiv, jeweils in der Region nach der TMH IV, jedoch ist im Gegensatz zu CzcA nicht D402 konserviert, sondern ein weiterer Asp-Rest in der Position D409 (bezogen auf CzcA). In CzcA sollten D402, D408 und E415 direkt untereinander liegen, wobei sich jeweils zwei Umdrehungen in der Helix zwischen den den jeweiligen Aminosäureresten befinden. In den Acr-ähnlichen Proteinen würde der Asp-Rest in Position 409 in eine völlig andere Richtung ragen. Wie sie ihre Substanzen, zu denen β -Lactam-Verbindungen zählen, transportieren ist unklar. Vorgeschlagen wurde ein energieabhängiger Efflux. Zudem wurde in neueren Arbeiten postuliert, daß Verbindungen mit ausgeprägten hydrophoben Seitenketten partiell in den cytosolischen Bilayer inserieren und

dann mittels einen spontanen "Flip-Flop"-Mechanismus in die äußere Schicht des Bilayers transportiert und so dem Efflux-Protein "zugänglich" gemacht werden (Nikaido *et al.*, 1998).

Zusammenfassung

Die *czc*-Determinante vermittelt dem *Ralstonia spec.*-Stamm CH34 Resistenz gegenüber Cobalt, Zink und Cadmium. Das CzcA-Protein ist der zentrale Kationen-Protonen-Antiporter des CzcCBA-Efflux-Komplexes und gehört zur Familie der RND-Proteine. In dieser Arbeit wurde das CzcA-Protein gereinigt und anschließend Untersuchungen zur Transportaktivität von CzcA durchgeführt.

1. Nach Testen verschiedener Expressionssysteme wurde das *czcA*-Gen in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und das CzcA-Protein erfolgreich exprimiert.
2. Das überexprimierte CzcA-Strep-tag-Fusionsprotein wurde mittels Affinitätschromatographie an Strep-Tactin Sepharose gereinigt und anschließend aktiv in in Detergenz destabilisierte Liposomen rekonstituiert.
3. Das native CzcA-Protein aus *Ralstonia spec.* CH34 konnte mittels CzcA-Antikörpern über Westenblot nachgewiesen werden.
4. Die Geschwindigkeit des CzcA vermittelten Zink und Cobalt-Transports konnte jeweils als sigmoidale Substratsättigungskurve dargestellt werden. Für den Zink-Transport wurde ein V_{\max} -Wert von 385 sec^{-1} , eine Kooperativitätskonstante von $n = 2$ und ein K_m -Wert von 6.6 mM ermittelt. Für den Cobalt-Transport wurde ein V_{\max} -Wert von 100 sec^{-1} , eine Kooperativitätskonstante von $n = 2$ und ein K_m -Wert von 18.5 mM ermittelt. Für den Cadmium-Transport ergab sich ein V_{\max} -Wert von 28 sec^{-1} , eine Kooperativitätskonstante von $n = 1$ und ein K_m -Wert von 7.7 mM .
5. Die mutierten Proteine -CzcA-D402N und CzcA-D408N- wurden ebenfalls rekonstituiert. Hier wurde eine schnelle protonenunabhängige Akkumulation der Radioaktivität innerhalb der Proteoliposomen beobachtet. Jedoch waren die mutierten Proteine nicht mehr in der Lage den langsameren Protonen/Zink-Antiport durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith and K. Struhl. 1993. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York.

Bensadown, A., D. Weinstein. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. 70: 241-250

Berg, J. M. 1990. Zinc fingers and other metal-binding domains. J. Biol. Chem. 265: 6513-6516.

Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russel-Jones and E. C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. Anal. Biochem. 136: 175-179

Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short. 1987. XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* Strain with β -Galactosidase selection. Bio-Techniques. 5: 376-378.

Carrasco, N., L. M. Antes, M. S. Poonian, and H. R. Kaback. 1986. Lac permease of *Escherichia coli*: histidine-322 and glutamic acid-325 may components of a charge relay system. Biochemistry. 25: 4486-4488.

Casey, R. P., B. H. Ariano and A. Azzi. 1982. Studies on the transmembrane orientation of the cytochrome c oxidase in phospholipid vesicles. Eur. J. Biochem. 122: 313-318

Chowdhury, K. 1991. One step „miniprep“ method for the isolation of plasmid-DNA. Nucl. Acids. Res. 19: 2792

Cooper, T. G. 1981. Biochemische Arbeitsmethoden, 126-156. Walter de Gruyter, Berlin.

Dinh, T., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr. 1994. A family of extracytoplasmatic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 3825-3831.

Dong, Q., and M. Mergeay. 1994. Czc/Cnr-efflux: a three component chemiosmotic antiport pathway with a 12 transmembrane-helix protein. *Mol. Microbiol.* 14: 185-187.

Duplay, P., H. Bedulle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin and M. Hofnung. 1984. Sequences of the *malE* gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 259:10606-10613.

Fralick, J. A. 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 5803-5805.

Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke, and D. H. Nies. 1999. *J. Biol. Chem.* 274 (37): 26065-26070.

Griffith, J.K., M. E. Baker, C. A. Rouch, M. G. P. Page, R. A. Skurray, I. T. Paulsen, K. F. Chater, S. A. Baldwin, and P. J. F. Henderson. 1992. Membran transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4: 684-659.

Grinius, L. L., and E. B. Goldberg. 1994. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J. Biol. Chem.* 269: 29998-30004.

Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye. 1987. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67:21-30

Gupta, A., B.A. Whitton, A. P. Morby, J. W. Huckle and N. J. Robinson. 1992. Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC 6301 selected for tolerance to cadmium. *Proc. Roy. Soc. London B* 248: 273-281

-
- Gupta, A., A. P. Morby, J. S. Turner, B. A. Whitton and N. J. Robinson. 1993** Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1). *Mol. Microbiol* 7: 189-195.
- Hagting, A. 1997.** Amplified expression, purification and functional reconstitution of dipeptide and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *Eur. J. Biochem.* 247 (2): 581-587.
- Hanada, K., I. Yamamoto and Y. Anraku. 1988.** Purification and reconstitution of *Escherichia coli* proline carrier using a specifically cleavable fusion protein. *J. Biol. Chem.* 263: 7181-7185.
- Harris, E. L. V., S. Angal (eds.) (1989).** Protein purification methods- a practical approach. IRL Press, Oxford.
- Hatefi, Y. 1985.** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1025-1069.
- Hess, H. H., J. E. Lees. 1978.** Water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal. Biochem.* 85: 295-300.
- Hjelmeland, L.M. 1990a.** Removal of detergents from membrane proteins. *Meth. Enzymol.* 182: 277-282.
- Holmgren, A. 1989.** Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966
- Hwang J., X. Zhong, and P. C. Tai. 1997.** Interactions of Dedicated Export Membrane Proteins of the Colicin V Secretion System: CvaA, a Member of the Membrane Fusion Protein Family, Interacts with CvaB and TolC. *J. Bacteriol.* 179: 6264-6270.
- Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig, and H. Michel. 1995.** Structure at 2.8 Angström resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature.* 376: 660-669.
- von Jagow, G. and H. Schaeffer. 1994.** A practical guide to membrane protein purification. Academic Press, Inc. 1994.

-
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Langosch, D. 1999.** Molekulare Erkennung zwischen membranständigen Proteindomänen- struktur- und zellbiologische Aspekte. *Biospektrum*. 2/1999.
- Lee, J. A., I. B. Püttner, and H. R. Kaback. 1989.** Effect of distance and orientation between arginine-302, histidine-322, and glutamate-325 on the activity of lac permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 28: 2540-2544.
- Lippard, S. und J. M. Berg. 1994.** Bioanorganische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin. Oxford.
- Lowry, O. H., A. L. Farr, R. J. Randall. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Jung, H., S. Tebbe, R. Schmid, and K. Jung. 1998.** Unidirectional Reconstitution and Characterization of Purified Na⁺/Proline Transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37: 11083-11088.
- Kaback, H. R., J. Voss, and J. Wu. 1997.** Helix packing in polytopic membrane proteins: the lactose permease of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 537-542.
- Klemba, M., and L. Regan. 1995.** characterization of Metal binding by a Designed Protein: Single Ligand Substitutions at a Tetrahedral Cys₂His₂ Site. *Biochemistry*. 34: 10094-10100.
- Knol, J. 1996.** Unidirectional reconstitution into detergent-destabilized liposomes of the purified lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 271 (26): 15358-15366.
- Kraut, J. 1977.** Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46. 331-358.

- Krebs, M. P., and H. G. Khorana. 1993.** Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. *J. Bacteriol.* 175: 1555-1560.
- Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982.** A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lewis, K. 1994.** Multidrug resistance pumps in bacteria: Variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19: 119-123.
- Liesegang H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, and H. G. Schlegel. 1993.** Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 176: 7046-7054.
- Ma, D., D. N. Cook, E. Hearst, and H. Nikaido. 1994.** Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 2: 489-493.
- Maina, C. V., P. D. Riggs, A. G. Grandea, B. E. Slatko, L. S. Moran, J. A. Taliamoto, L. A. Mc Reynolds and C. Guan. 1988.** A Vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from, maltose binding protein. *Gene* 74: 365-373.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970.** Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162.
- Menick, D. R., N. Carrasco, L. Antes, L. Patel, and H. R. Kaback. 1987.** Lac permease of *Escherichia coli*: arginine-302 as a component of the postulated proton relay. *Biochemistry.* 26: 6638-6644.
- Mergeay, M., C. Houba and J. Gerits. 1978.** Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt and zinc ions: Evidence from curing in *Pseudomonas*. *Arch. Int. Phys. Biochem.* 86: 440-441.
- Mergeay, M., D. H. Nies, H.-G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles and F. van Gijsegem. 1985.** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162: 328-334.

Miksovská, J., M. Valerio-Lepiniec, M. Schiffer, D. K. Hanson, and P. Sebban. 1998. In Bacterial Reaction Centers, a Key Residue Suppresses Mutational Blockage of Two Different Proton Transfer Steps. *Biochemistry*. 37: 2077-2083.

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

Nies, D. H., A. Nies, L. Chu, and S. Silver. 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 7351-7355.

Nies, D. H., and S. Silver. 1989a. Plasmid-determined Inducible Efflux is Responsible for Resistance to Cadmium, Zinc, and Cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171: 896-900.

Nies, D. H. and S. Silver. 1989b, Metal ion uptake by a plasmid free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J. Bacteriol.* 177: 4073-4075.

Nies, D. H. 1992. Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc, and Nickel in Microbes. *Plasmid* 27: 17-28.

Nies, D. H. 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 2707-2712.

Nies, D.H., and S. Silver. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Industr. Microbiol.* 14: 186-199.

Nikaido, H. and M. H. Saier, Jr.. 1992. Transport Proteins in Bacteria: Common Themes in Their Design. *Science*. 258: 936-942.

Nikaido, H. 1996. Multidrug Efflux Pumps of Gram-negative Bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853-5859.

- Nikaido, H., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg. 1998.** Multidrug Efflux Pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* Excretes Only Those β -Lactam Antibiotics Containing Lipophilic Side Chains. *J. Bacteriol.* 180: 4686-4692.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996.** Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Micrbiol. Rev.:* 575-608.
- Paulsen, I. T., and M. H. Saier. 1997.** A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 156: 99-103.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, M. H. Saier, Jr.. 1997.** A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 156: 1-8.
- Pfennig, N. 1974.** *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.*100: 197-206.
- Phelps, A., C. Briggs, L. Mincone, and H. Wohlrab. 1996.** Mitochondrial Phosphate Transport Protein. Replacements of Glutamic, Aspartic, and Histidine Residues Affect Transport and Protein Conformation and Point to a Coupled Proton Transport Path. *Biochemistry.* 35: 10757-10762.
- Pimenta, A., M. Blight, D. Clarke and I. B. Holland. 1996.** The Gram-negative cell envelope „springs“ to life: coiled-coil trans-envelope proteins. *Mol. Microbiol.* 19: 643-645.
- Poolman, B., J. Knol, and J. S. Lolkema. 1995.** Kinetic Analysis of Lactose and Proton Coupling in Glu³⁷⁹ Mutants of the Lactose Transport Protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 270: 12995-13003.
- Püttner, I. B., H. K. Sarkar, M. S. Poonian, and H. R. Kaback. 1986.** Lac permease of *Escherichia coli*: histidine-265 and histidine-322 play different roles in lactose/H⁺ symport. *Biochemistry.* 25: 4483-4485.

-
- Püttner, I. B., H. K. Sarkar, E. Padan, J. S. Lolkema, and H. R. Kaback. 1989.** Characterization of site directed mutants in the lac permease of *Escherichia coli*. 1. Replacement of histidine residues. *Biochemistry*. 28: 2525-2533.
- Racker, E. 1979.** Reconstitution of membrane processes. *Methods Enzymol.* 55, 699-711.
- Regan, L. 1995.** Protein design: novel metal binding sites. *TIBS*. 20: 280-284.
- Reidlinger, J. and V. Müller. 1994.** Purification of ATPsynthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na (+)-translocating F1FO-type enzyme. *Eur. J. Biochem.* 226 (3): 1079.
- Rensing, C., T. Pribyl and D. H. Nies. 1997.** New functions for the three subunits of the CzcABC cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* 179: 6871-6879.
- Rensing, C., B. Mitra and B. P. Rosen. 1997.** The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. USA.* 94: 14326-14331.
- Richter, H.-T., L. S. Brown, R. Needleman, and J. K. Lanyi. 1996.** A Linkage of the pK_a's of asp-85 and glu-204 Forms Part of the Reprotonation Switch of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*. 35<. 4054-4062.
- Rosen, B. P. 1986.** Ion extrusion systems in *Escherichia Coli*. *Methods Enzymol.* 125: 328-336.
- Rosen, B. P., U. Weigel, C. Karkaria, and P. Gangola. 1988.** Molecular characterization of an anion pump. The *arsA*-Gene product is an arsenite (antimonat)-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* 263: 3067-3070.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg, and J. C. Wootton. 1990.** Inducible erythromycin resistance in *staphylococci* is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 4 (7): 1207-1214.

Saier, M. H. Jr. 1994. Computer Aided Analyses of Transport Protein Sequences: Gleaning Evidence concerning Function, Structure, Biogenesis, and Evolution. *Microbiol. Rev.*: 71-93.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

Scharf, C., S. Riethdorf, H. Ernst, S. Engelmann, U. Völker and M: Hecker. 1998. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 1869-1877.

Schmidt, T., and H. G. Schlegel. 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* 176: 7045-7054.

Schmitt, J., H. Hess and G. Stunneberg. 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports* 18: 223-230.

Schuldiner, S., H. Rottenberg and A. Avron. 1972. Determination of Δ pH in chloroplasts. 2. Fluorescent amines as a probe for the determination of Δ pH in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 25: 64-70.

Silver, S. and T. K. Misra. 1988. Plasmid mediated heavy metal resistances. *Ann. rev. Microbiol.* 42. 717-743.

Silver, S. and M. Walderhaug. 1992. Gene Regulation of Plasmid- and Chromosome Determined Inorganic Transport in Bacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 195-228.

Silver, S. 1998. Genes for all metals-a bacterial view of the Periodic Table The 1996 Thom Award Lecture. *J. Industr. Microbiol.* 20: 1-12

Skerra, A. 1994. Use of tetracycline promoter for tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151: 131-135.

-
- Smith, R. L., L. J. Thompson and M. E. Maguire. 1995.** Cloning and characterization of *mgtE*, a putative new class of Mg^{2+} transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol* 177: 1233-1238.
- Solioz, M. and C. Vulpe. 1996.** CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *TIBS*. 21: 237-241.
- Spector, A., G. Z. Yan, R. R.C. Huang, M: J: McDermott, P. R. C. Gascoyne, and V. Pigiet. 1988.** The effect of H_2O_2 upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 263: 4984-4990.
- Tao, T., P. F. Grulich, L. M. Kucharski, R. L. Smith and M. E. Maguire. 1998.** Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: biphasic magnesium and time dependence of the trans-cription of *mgtA* and *mgtCB* loci. *Microbiology* 144, 655-664.
- 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. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, im Druck.
- Turner, J. S. and N. J. Robinson. 1995.** Cyanobacterial metallothioneines biochemistry and molecular genetics. *J. Industr. Microbiol.* 14: 119-125.
- Tynecka, Z., Z. Goz, and J. Zajac. 1981.** Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 147: 313-319.
- Voss, S. and A. Skerra. 1997.** Mutagenesis of a flexible loop in strepavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10:975-982.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969.** The reliability of the molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- Wessel, D. and V.J. Flügge. 1984.** A method for the quantitative recovery of protein in dilute

solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.

Wiemann, S., T. Rupp, J. Zimmermann, H. Voss, C. Schwager, and W. Ansorge. 1994. Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7-DNA polymerase and internal labeling with Fluorescein-15-d-ATP. *Bio Techniques* 18: 688-697

Williams, R. J. P. 1995. Purpose of proton pathways. *Nature.* 376: 643.

Lebenslauf

Persönliches:

Martina Goldberg
geboren am 23.12.1966 in Göttingen
verheiratet, 1 Kind

Schule:

1.8.1973 bis 15.6.1977 Besuch der Grundschule Dransfeld
2.8.1977 bis 28.5.1986 Besuch des Grotefend Gymnasiums in Hann. Münden
Abschluß: Abitur am 28.5.1986.

Freiwilliges Soziales Jahr:

1.8.1986 bis 31.7.1987 beim Diakonischen Werk der Ev.-luth. Landeskirche Hannovers

Studium:

WS 1987/88 bis SS 1989 Studium der Biologie/Diplom an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Diplomvorprüfung am 19.9.1989
WS 1989/90 bis zum 04.05.1994 Studium der Biologie. Diplom an der Georg-August-Universität in Göttingen
Abschluß: Diplom am 04.05.1994 (Prädikat: Gut)

Berufstätigkeit:

14.10.1991 bis 06.04.1992 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen
01.06.1994 bis 31.12.1995 angestellt an der FU Berlin als wissenschaftliche Mitarbeiterin.
ab 01.01.1996 angestellt an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Fachbereich: Mikrobiologie) als wissenschaftliche Mitarbeiterin.
01.11.98 bis 31.12.98 angestellt am Biozentrum der MLU Halle-Wittenberg in der Projektstelle des SFB 363 "Molekulare Zellbiologie pflanzlicher Systeme" als wissenschaftliche Mitarbeiterin.
1.01.99 bis 30.06.99 angestellt an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Fachbereich: Mikrobiologie) als wissenschaftliche Mitarbeiterin.

Halle, den 20.09.1999

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), September 1999

Martina Goldberg

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. H. Nies für die Überlassung des interessanten Themas, das andauernde Interesse am Fortgang der Arbeit und die stets gewährte Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Frau Grit Schleuder und Frau Ute Lindenstrauß gilt mein Dank für die zuverlässige Durchführung der Sequenzierarbeiten und Primersynthese.

Bei Herrn Dr. Peter Rücknagel möchte ich mich die Durchführung der N-terminalen Aminosäurebestimmung bedanken.

Ganz sehr möchte ich mich bei Frau Susanne Juhnke für Ihre hervorragende Diplomarbeit bedanken, die einen wichtigen Beitrag zum Gelingen der vorliegenden Arbeit leistete.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Tanja und Susi, die mir viel Trost spendeten, wenn ein Experiment nicht gelungen war. Es gab viel zu trösten!

Danken möchte ich auch Ute und Matthias aus dem Labor 311 für ihre vielen wichtigen Tips rund um die Proteinreinigung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft bei der fachlichen und praktischen Unterstützung der Laborarbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, vor allem Prof. Dr. J. R. Andreesen, möchte ich dafür danken, daß sie stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die Unterstützung einer ganz besonderen Art danken! Reiner für seine unermeßliche Geduld und Nils dafür, daß er so viel Freude und Schwung in den Fortgang der Arbeit gebracht hat. Meinen Eltern möchte ich danken, daß sie mir so viel Raum und Mut im Leben gegeben haben.