

Topologie des CzcCBA-Efflux-Komplexes aus *Ralstonia metallidurans* CH34

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Herrn Thomas Pribyl

geboren am 6. März 1971 in Eilenburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. H. Nies, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. R. B. Klösgen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. M. Ehrmann, School of Biosciences, Cardiff University (Wales)

Verteidigung am 19. April 2001 in Halle an der Saale

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	7
1. Bakterienstämme und Plasmide	7
2. Kultivierungsbedingungen	12
2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien	12
2.2. Nährmedien und Zusätze für Hefen (Stratagene GmbH, Heidelberg)	15
2.3. Anzucht und Zellernte	16
2.4. Stammhaltung	17
2.5. Reinheitskontrolle	17
3. Molekulargenetische Arbeiten	18
3.1. Isolierung von DNA	18
3.1.1. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994)	18
3.1.2. Minipräparation von Plasmid-DNA (verändert nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	18
3.1.3. Präparative Plasmidisolierung	19
3.1.4. Plasmidisolierung mittels <i>QIAprep Spin</i> Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)	19
3.1.5. Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)	19
3.2. Standard-DNA-Techniken	20
3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	20
3.2.2. DNA-Größenstandards	20
3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung	21
3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	21
3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Phenol-Extraktion und Fällung	21
3.2.6. Reinigung von DNA durch Mikrodialyse	21
3.2.7. Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels <i>QIAquick PCR Purification Kit</i> (QIAGEN GmbH, Hilden)	22
3.2.8. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> (QIAGEN GmbH, Hilden)	22
3.2.9. Dephosphorylierung von Vektor-DNA	22
3.2.10. Ligation von DNA-Fragmenten	22
3.2.11. Ligation von DNA mit dem <i>Rapid DNA Ligation Kit</i> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	22
3.2.12. Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	23
3.2.13. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	23
3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.3.1. Auswahl der <i>Primer</i>	24
3.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27

3.3.3. Reinigung von PCR-Produkten.....	28
3.4. DNA-Sequenzierung	29
3.4.1. Sequenzierung mit dem <i>SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™</i> [Epicentre Technologies, Madison (USA)]	29
3.4.2. Sequenzierung unter Verwendung des <i>dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits</i> (Perkin-Elmer, Weiterstadt) am <i>ABI377</i> Vers. 4.0	29
3.4.3. Sequenzierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des <i>AutoRead™ Sequencing Kits</i> (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg)	30
3.4.4. Das Sequenziergel	31
3.4.5. Auswertung von Sequenzdaten	31
4. Versuche zum Zellwachstums	32
4.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien	32
4.1.1. Das <i>Klett-Summerson-Colorimeter</i> [Klett MFG Co., New York (USA)].....	32
4.1.2. Zellanzucht von <i>R. metallidurans</i> -Stämmen bei Wachstumsversuchen.....	32
4.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Schwermetallsalzen	33
5. Enzymologische Methoden	33
5.1. Untersuchungen zur Topologie und zur Lokalisation der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes mittels Translationsfusionen mit Reporterproteinen unter Kontrolle des T7-Promotors (nach Rensing <i>et al.</i> , 1997a).....	33
5.1.1. Zellanzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen für Enzymtests	33
5.1.2. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität von Fusionsproteinen permeabilisierter Zellen (verändert nach Miller, 1972; Ullmann, 1984)	34
5.1.3. Bestimmung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität von Fusionsproteinen permeabilisierter Zellen (verändert nach Manoil, 1991)	35
6. Proteinchemische Methoden	36
6.1. Analytische T7-Expression und radioaktive Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin (Tabor & Richardson, 1985; Tabor, 1990).....	36
6.2. Fraktionierung ganzer Zellen in ihre Kompartimente zur Untersuchung der Lokalisation der radioaktiv markierten Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes	37
6.2.1. T7-Expression und radioaktive Markierung der Proteine im präparativen Maßstab (Tabor & Richardson, 1985; Tabor, 1990).....	37
6.2.2. Präparation der Periplasma-Fraktion (in Anlehnung an <i>The QIAexpressionist</i> ; QIAGEN GmbH, Hilden).....	37
6.2.3. Ultraschallaufschluß und Präparation der Cytoplasma-Fraktion und der unlöslichen Protein-Fraktion (in Anlehnung an <i>The QIAexpressionist</i> ; QIAGEN GmbH, Hilden).....	38
6.2.4. Präparation der Membranen und isopyknische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zur Trennung von Cytoplasmamembran und Äußerer Membran (verändert nach de Maagd & Lugtenberg, 1986; Osborn <i>et al.</i> , 1972; Ishidate <i>et al.</i> , 1986)	38
6.3. Präparation von nativen Membranprotein-Komplexen für die <i>Blue Native Gradienten-PAGE</i> (verändert nach Schägger & von Jagow, 1991).....	39
6.3.1. Zellernte, Zellaufschluß und Präparation der Membran-Fraktion.....	39
6.3.2. Solubilisierung der Proteine der Membran-Fraktion	40
6.4. Analytisches <i>In vivo-Crosslinking</i> von radioaktiv markierten bzw. nichtmarkierten Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes mit Formaldehyd (verändert nach Prossnitz <i>et al.</i> , 1988 ; Skare <i>et al.</i> , 1993)	40
6.4.1. Zellanzucht von <i>E. coli</i> und <i>R. metallidurans</i> für <i>In vivo-Crosslinking</i>	41
6.4.2. <i>Crosslinking</i> in intakten Zellen.....	41

6.5. Reinigung von CzcB- <i>Strep-tag II</i> [®] -haltigen Proteinkomplexen über ein kombiniertes T7-Expressions- und <i>Strep-tag II</i> [®] -Reinigungssystem	41
6.5.1. Anzucht und Ernte der <i>E. coli</i> -Zellen	42
6.5.2. <i>In vivo</i> -Crosslinking und Solubilisierung der Proteine aus präparierten Membranen.....	42
6.5.3. Affinitätschromatographie an <i>StrepTactin</i> [®] -Sephrose (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)	42
6.6. Proteinbestimmung von Membranproteinen (verändert nach Lowry <i>et al.</i> , 1951)	43
6.7. Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel & Flügge, 1984)	43
6.8. TCA-Fällung von Proteinen	44
6.9. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	44
6.9.1. Denaturierende PAGE	44
6.9.2. Native PAGE	46
6.10. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)	48
6.10.1. Proteintransfer mit dem <i>Semi-dry</i> -Blot (verändert nach Kyhse-Andersen, 1984).....	48
6.10.2. Transfer von Proteinen mit dem Tank-Blot	48
6.10.3. <i>Strep-tag II</i> [®] Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)	49
6.10.4. Proteinnachweis durch Immunopräzipitation auf PVDF-Membranen (Blake <i>et al.</i> , 1984)	49
6.11. Färbung und Trocknung von PAA-Gelen.....	51
6.11.1. Coomassie-Färbung von Proteinen (verändert nach Weber & Osborn, 1969).....	51
6.11.2. Silberfärbung (Rabilloud <i>et al.</i> , 1988; Nesterenko <i>et al.</i> , 1994).....	51
6.11.3. Spezifischer Nachweis von Proteinen mittels Aktivitäts-Färbung in Nativen PAA-Gelen	52
6.11.4. Trocknung von PAA-Gelen	52
6.12. Autoradiographie mit PAA-Gelen	52
6.12.1. Direkte Autoradiographie	52
6.12.2. Fluorographie (Szintillationsautographie) mit PPO (Bonner & Laskey, 1974)	52
7. Das <i>Sos Recruitment</i> -System, ein alternatives <i>Yeast Two-Hybrid</i> -System (<i>CytoTrap</i> TM ; Stratagene GmbH, Heidelberg).....	53
7.1. Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> cdc25H-Zellen.....	53
7.2. Transformation von <i>S. cerevisiae</i> cdc25H und Testung der Protein-Interaktion.....	54
III. ERGEBNISSE	55
1. Untersuchungen zu Membran-Topologie und subzellulärer Lokalisation der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes mittels Translationsfusionen mit Reporterproteinen.....	55
1.1. Entwicklung verschiedener Reporterplasmid-Sets für den Einsatz in Topologie-Untersuchungen	55
1.1.1. Das Reporterplasmid-Set 1 – korrespondierende ' <i>blaM</i> -, ' <i>lacZ</i> - und ' <i>phoA</i> -Fusionsvektoren auf Basis von pBR322	56
1.1.2. Korrespondierende ' <i>blaM</i> - und ' <i>phoA</i> -Reporterplasmide des Sets 2 als Resultat der Weiterentwicklung von Set 1	59
1.1.3. Set 3 - korrespondierende ' <i>lacZ</i> - und ' <i>phoA</i> -Reporterplasmide auf Basis von pGEM [®] -T Easy [Promega, Madison (USA)].....	59
1.2. Große Bereiche von CzcC liegen im Periplasma.....	61
1.2.1. Vorhersagen zur Topologie von CzcC und Auswahl der Fusionspositionen	62
1.2.2. Subzelluläre Sensoren mit komplementären Eigenschaften? CzcC-Hybridproteine gleicher Position haben ähnlich hohe Aktivitäten.....	63
1.2.3. Das Expressionsniveau der CzcC-Fusionen ist recht unterschiedlich.....	64

1.2.4. Die CzcC'-PhoA-Fusionsproteine sind im Nativen Gel enzymatisch aktiv	65
1.3. CzcB erstreckt sich über den periplasmatischen Raum	65
1.3.1. Vorhersagen zur Struktur von CzcB und Auswahl der Fusionspositionen.....	66
1.3.2. Lassen die Aktivitäten der CzcB-Hybridproteine auf periplasmatische Lokalisation schließen?	67
1.3.3. Die CzcB-Hybridproteine werden nicht gleichmäßig exprimiert bzw. sind unterschiedlich stabil.....	68
1.4. Die beiden großen hydrophilen Domänen der zentralen Pumpe CzcA liegen auf der periplasmatischen Seite der Membran	69
1.4.1. Ein Dutzend TMS? Vorhersagen zur Struktur von CzcA und Auswahl der Fusionspositionen... ..	69
1.4.2. Die Termini von CzcA liegen im Cytoplasma, die großen hydrophilen Domänen im Periplasma.....	70
1.4.3. Fast alle CzcA'-PhoA-Fusionsproteine sind im Westernblot nachweisbar, wobei kürzere meist besser exprimiert werden und stabiler sind als längere	72
1.4.4. Die T7-RNA-Polymerase bewirkt eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität, der T7-Promotor von pECD623 ist also intakt	74
1.4.5. Haben durch PCR generierte, zufällige Mutationen entscheidenden Einfluß auf Enzymaktivität und Expression der Fusionen? Aussagen zur Anfälligkeit der Topologie-Untersuchungen gegenüber Punktmutationen im charakterisierten Protein	75
1.4.6. Die Sequenz von <i>czcA</i> weicht von der unter EMBL X98451 veröffentlichten ab	77
2. Untersuchungen zur Lokalisation der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes nach Fraktionierung von Zellen in die Kompartimente	78
2.1. CzcC und CzcB sind zumindest an Membranen assoziiert - Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen mit den Komponenten CzcC bzw. CzcB	78
2.2. Trennung der Membranen von <i>E. coli</i> -Zellen mit den Proteinen CzcC bzw. CzcB mittels isopyknischer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	79
2.2.1. CzcC reichert sich in Membran-Fractionen ungewöhnlich hoher Dichte an.....	79
2.2.2. Auch CzcB ist in Membran-Fractionen ungewöhnlich hoher Dichte angereichert	80
3. Wie interagieren die Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes? Das <i>CytoTrap</i> TM <i>Yeast Two-Hybrid</i> -System (Stratagene GmbH, Heidelberg).....	81
3.1. Im <i>Yeast Two-Hybrid</i> -Assay in der Hefemutante <i>S. cerevisiae cdc25H</i> sind keine Interaktionen der Efflux-Komponenten nachweisbar	82
3.2. Die hSos-Fusionen werden in <i>S. cerevisiae cdc25H</i> nicht exprimiert	83
4. <i>Blue Native PAGE</i> – Versuch der nativen Isolierung des kompletten Czc-Efflux-Komplexes	84
4.1. Die Komponenten CzcB und CzcA sind im Solubilisat	84
4.2. Nur die Einzelkomponenten CzcB und CzcA sind nach <i>Blue Native PAGE</i> mit Antikörpern detektierbar.....	85
5. Ein für CzcB spezifischer Proteinkomplex ist nach <i>In vivo-Crosslinking</i> mit Formaldehyd nachweisbar ..	86
5.1. Bei <i>In vivo-Crosslinking</i> mit 0.1 % (v/v) Formaldehyd ist ein ca. 220 kDa großer CzcB- <i>Strep-tag II</i> [®] -Komplex nachweisbar	86
5.2. Die <i>Crosslinking</i> -Verknüpfung kann durch Erhitzen aufgelöst werden.....	87
5.3. Der gereinigte CzcB- <i>Strep-tag II</i> [®] -Komplex entspricht wahrscheinlich einem Homooligomer.....	88
IV. DISKUSSION	90
1. <i>Targeting</i> und Translokation von Proteinen in Bakterien	90
2. Reporter-gen-Fusionen zur Aufklärung der Membran-Topologie und subzellulären Lokalisation von Proteinen	94
3. Merkmale der Reporterplasmid-Sets und Nachweis der Funktion	97

4. CzcC, die OMF-Komponente des CzcCBA-Efflux-Komplexes.....	100
5. Das MFP CzcB als Untereinheit im CzcCBA-Efflux-Komplex	106
6. Der RND-Transporter CzcA - zentrale Komponente im CzcCBA-Efflux-System.....	112
7. Der CzcCBA-Membranprotein-Komplex - ein Drei-Komponenten-Efflux-System.....	121
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	128
VI. LITERATUR.....	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP-Binding Cassette Transporter</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
ATPase	Adenosintriophosphatase
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger AS-Rest
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> (Familie von Transportproteinen)
CP	Cytoplasma
CPM	Cytoplasmamembran
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CY5	Fluoresceinmarkierung
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRR	<i>Downstream Regulatory Region</i> (Regulatorgen-Region, stromabwärts)
DSG	Disuccinimidylglutarat
DSP	Dithiobis-(succinimidylpropionat) (auch Lomant's Reagenz genannt)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fluoresceinmarkierung
G	Guanin

GSP	<i>General Secretary Pathway</i> (genereller Sekretionsweg für Proteine)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
I _{max}	maximale Stromstärke
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
LB	Luria-Bertani Medium
LiOAc	Lithiumacetat
MCS	<i>Multi Cloning Site</i>
MFP	<i>Membran Fusion Protein</i> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min	Minute
mRNA	<i>messengerRNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
Mtt	<i>Membrane Targeting and Translocation-System</i>
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger AS-Rest
NA	Nähragar
NB	Nährbouillon
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OEP	<i>Outer Membrane Efflux Proteins</i> (Proteinfamilie)
OM	<i>Outer Membrane</i> (äußere Membran)
OMF	<i>Outer Membrane Factor</i> (Proteinfamilie)
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PEP	<i>Periplasmic Efflux Proteins</i> (Proteinfamilie)
PMF	<i>Protonen Motive Force</i> (protonenmotorische Kraft)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
PP	Periplasma
PPO	2,5-Diphenyloxazol (Szintillator)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)

RBS	Ribosomenbindestelle
RGR	Regulatorgen-Region
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RND	<i>Resistance, Nodulation, Cell Division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>Rotations Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rpr	M 13 <i>Reverse Primer</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	<i>Signal Anchor</i> (topogenes Signal)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGR	Strukturgen-Region
spez.	spezifisch
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i> (Signalerkennungspartikel)
SRS	<i>Sos Recruitment-System</i> (alternatives <i>Yeast Two-Hybrid-System</i>)
ST	<i>Stop Transfer</i> (topogenes Signal)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TAT	<i>Twin-Arginine Translocation-System</i> (Weg des Proteinexports)
TBE	Tris-Borat/EDTA
TC-System	<i>Transporter Classification-System</i> (Klassifizierung von Transportern)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-HCl/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TG	Trockengewicht
TMS	transmembranes Segment
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U _{max}	maximale Spannung
-UL	ohne Uracil und Leucin
upr	M 13 <i>Universal Primer</i>
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Regulatorgen-Region, stromaufwärts)
UV	ultraviolett
Vers.	Version (des Computerprogramms)
VIS	<i>Visible</i> (sichtbares Licht)

Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
X-P	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (auch BCIP genannt)
z. B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

I. EINLEITUNG

Eine wichtige Voraussetzung für Leben ist die Schaffung von wäßrigen Reaktionsräumen für den Stoffwechsel. Die dafür notwendige Abgrenzung von der Umwelt muß aber gleichzeitig den ständigen Stoff- und Energieaustausch sowie die Kommunikation mit der Umgebung ermöglichen.

Die lebende Zelle hat dieses Problem mit biologischen Membranen gelöst, die eine hydrophobe, selektiv permeable Barriere für Stoffe darstellen (Nikaido & Saier, 1992). Viele Verbindungen hydrophiler bzw. geladener Natur können diese Barriere nicht ohne weiteres überwinden. Zu diesem Zweck sind spezielle Proteine in der Membran lokalisiert, die selektiv den Transport von Substraten katalysieren (Nikaido & Saier, 1992). Transporter durchspannen die Membran oft mehrmals und schaffen durch Bildung von Kanal- bzw. Tunnelstrukturen die für die Membranpassage des Substrates notwendige Umgebung (Dalbey *et al.*, 2000). Bei aktivem Transport gegen Konzentrationsgradienten sind sie zugleich für die Kopplung der Energieumwandlung mit dem Transportprozeß verantwortlich (Nikaido & Saier, 1992). In bezug auf die Transportrichtung kann zwischen Influx und Efflux unterschieden werden. Influx-Systeme katalysieren den Einstrom von Substraten in die Zelle, Efflux-Systeme den Ausstrom aus der Zelle. Auch wenn die Zahl von verschiedenen Transportsystemen sehr hoch ist, in einer Bakterienzelle kodieren z. B. ca. 10 % der Gene für Transportproteine (Driessen *et al.*, 2000; Paulsen *et al.*, 1998), ähneln sich doch die Mechanismen des Transports und eine Gruppierung in wenigen Klassen ist möglich (Nikaido & Saier, 1992; Paulsen *et al.*, 1998; Saier, 2000b). Für Saier (2000b) ist es sogar sehr wahrscheinlich, daß sich alle Transporter-Familien im Verlaufe der Evolution aus kurzen Polypeptiden mit transmembranen Segmenten (TMS) durch Duplikationsereignisse entwickelt haben. Eine umfassende und systematische Übersicht über die aktuell mehr als 250 Familien der Transportproteine gibt M. H. Saier, Jr. mit dem *Transporter Classification System* (TC-System; Paulsen *et al.*, 1998; Saier, 2000a) auf seiner *Homepage* (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/titlepage2.html>).

Ein Prozeß, bei dem die Bedeutung aber auch die Komplexität von Transportprozessen besonders deutlich wird, ist das System der Schwermetall-Homöostase von Bakterien. Vor allem divalente Schwermetall-Kationen sollen bei der Betrachtung hier im Vordergrund stehen.

Als Spurenelemente sind Schwermetall-Kationen wie z. B. Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} und Ni^{2+} von essentieller Bedeutung für die Bakterienzelle. Aufgrund ihrer Fähigkeit Komplexverbindungen zu bilden, sind sie als Cofaktoren in aktiven Zentren Bestandteile von Enzymen oder an der Ausbildung bestimmter Struktur motive beteiligt, die für die Funktion der Proteine bedeutsam sind (Nies, 1992a; Nies, 1999). Bei erhöhten Konzentrationen dieser Schwermetall-Ionen in der Zelle wird ihre Fähigkeit zur Komplexbildung aber zum Problem.

Unspezifische Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen von Aminosäureresten in Proteinen, wie der Imidazol-Gruppe von His-Resten oder der Sulfhydryl-Gruppe von Cys-Resten (Westenberg & Guerinot, 1997), als auch der Austausch von physiologischen Metall-Cofaktoren sind Ursachen der toxischen Wirkung. Einige divalente Schwermetall-Kationen wie Cd^{2+} und Hg^{2+} sind so toxisch, daß ihnen keine nennenswerte physiologische Funktion zukommen kann (Nies, 1999).

Eine Sonderstellung unter den genannten Kationen nehmen die hochtoxischen Quecksilber-Ionen (Hg^{2+}) ein. Sie werden über spezifische Aufnahmesysteme ins Cytoplasma transportiert und von MerA, einer Quecksilber-Reduktase, in elementares Quecksilber (Hg^0) überführt, das ungehindert aus der Zelle diffundieren kann (Schiering *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991; Hobman & Brown, 1996; Wilson *et al.*, 2000).

Die anderen genannten divalenten Schwermetall-Kationen gelangen unter normalen Bedingungen im allgemeinen über konstitutiv exprimierte, schnelle und unspezifische Influx-Systeme mit einem breiten Spektrum transportierter Ionen in die Bakterienzelle (Nies, 1992a). Das CorA-System für die Aufnahme von Mg^{2+} ist das bedeutendste bekannte System dieser Art (Hmiel *et al.*, 1986; Kehres *et al.*, 1998; Smith & Maguire, 1995; Smith & Maguire, 1998; Snavelly *et al.*, 1989).

Bei Mangel an essentiellen Schwermetall-Kationen können zusätzlich hochaffine, spezifische Aufnahmesysteme induziert werden (Westenberg & Guerinot, 1997; Nies, 1999). ABC-Transporter (*ATP-Binding Cassette Transporter*; Higgins, 1992; Nikaido & Hall, 1998) wie das ZnuABC-System (Patzer & Hantke, 1998) und das Nik-System (Navarro *et al.*, 1993; Eitinger & Mandrand-Berthelot, 2000) zum Influx von Zn^{2+} bzw. Ni^{2+} sind dafür Beispiele. Auch P-Typ-ATPasen (Lutsenko & Kaplan, 1995) wie MgtA und MgtB, die unter Mg^{2+} -Mangel-Bedingungen induziert werden (Snavelly *et al.*, 1991), transportieren mit hoher Affinität verschiedene Schwermetall-Kationen in die Bakterienzelle (Snavelly *et al.*, 1989). Beide Familien von Transportproteinen sind primäre Transporter, die durch ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie für den Transportvorgang nutzen (Driessen *et al.*, 2000). Die HoxN-Typ-Permeasen (Eitinger & Mandrand-Berthelot, 2000), chemiosmotisch getriebene Influx-Systeme, vermitteln ebenfalls die spezifische Aufnahme von Schwermetall-Kationen wie Ni^{2+} und Co^{2+} (Eitinger & Friedrich, 1991; Komeda *et al.*, 1997).

Bei Konfrontation der Bakterienzelle mit hohen Konzentrationen an Schwermetall-Kationen in der Umgebung ergibt sich eine andersgeartete Streßsituation, die Nies (1999) als *open gate* bezeichnet. Das Bakterium kann den unkontrollierten Influx der Schwermetall-Kationen über das konstitutiv exprimierte CorA-System nicht verhindern, so daß hohe, toxische Konzentrationen dieser Ionen im Cytoplasma akkumuliert werden.

Wie reagieren Bakterien nun in dieser Situation? Zum einen können die Kationen durch Bindung an Sulfhydryl-Gruppen von Cys-reichen Polypeptiden, den Metallothioneinen (Olafson *et al.*, 1988; Shi *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1992; Turner & Robinson, 1995), in der Zelle komplexiert und so die intrazelluläre Konzentration verfügbarer Schwermetall-Kationen

verringert werden. Neuere Untersuchungen zur Komplexierung von Zn^{2+} und Cd^{2+} durch prokaryotische Metallothioneine haben gezeigt, daß auch die Imidazol-Gruppen von His-Resten daran beteiligt sind (Daniels *et al.*, 1998). Auch der Export von Glutathion ins Medium zum Komplexieren der Schwermetall-Kationen außerhalb der Zelle wurde beschrieben (Owens & Hartman, 1986a; Owens & Hartman, 1986b). Durch intrazellulär gebildete Schwermetall-Glutathion-Komplexe wird allerdings ein beträchtlicher oxidativer Streß auf die Zelle ausgeübt (Nies; 1999), obwohl eine zentrale protektive Funktion von Glutathion ebenfalls diskutiert wird (Hultberg, 1998).

Zum anderen gibt es eine weitere bedeutende Strategie der Bakterienzelle zur Aufrechterhaltung der Schwermetall-Homöostase. Die Metall-Kationen können durch aktiven Efflux aus der Zelle gepumpt werden (Silver & Phung, 1996). Dadurch wird der Akkumulation entgegengewirkt und die Konzentration an Schwermetall-Kationen in der Zelle auf ein Gleichgewichtsniveau eingestellt. Hier sind wieder durch ATP-Hydrolyse getriebene P-Typ-ATPasen, speziell die Klasse der P1-Typ-ATPasen (Lutsenko & Kaplan, 1995) zu nennen, die auch als CPx-Typ-ATPasen (Solioz & Vulpe, 1996) bzw. *Soft-Metal-Ion*-transportierende ATPasen (Rensing *et al.*, 1997b; Rensing *et al.*, 1999) bezeichnet werden. Bedeutende Vertreter dieser Transporterfamilie sind CadA (Nucifora *et al.*, 1989) und ZntA (Rensing *et al.*, 1997b; Sharma *et al.*, 2000). Chemiosmotisch angetriebene Transporter der CDF-Proteinfamilie (*Cation Diffusion Facilitator*; Nies & Silver, 1995; Paulsen & Saier, 1997) wie z. B. CzcD (Nies, 1992b; Anton *et al.*, 1999) sind ebenfalls an der Schwermetall-Homöostase beteiligte Efflux-Systeme. Durch *PMF*-getriebene Kationen/Protonen-Antiporter (Nies, 1995) der RND-Superfamilie (*Resistance, Nodulation, Cell Division*; Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1999) stellen eine weitere Gruppe von Efflux-Systemen für Schwermetall-Kationen dar. RND-Proteine bilden zusammen mit Proteinen der MFP- (*Membrane Fusion Protein*; Dinh *et al.*, 1994; Saier *et al.*, 1994) und der OMF-Familie (*Outer Membrane Factor*; Dong & Mergeay, 1994; Paulsen *et al.*, 1997) einen Membranprotein-Komplex, der den Efflux vermittelt. Als Beispiele seien das CnrCBA-Efflux-System (Sensfuss & Schlegel, 1988) und das später noch genauer vorzustellende CzcCBA-Efflux-System (Nies *et al.*, 1989; Nies & Silver, 1989) genannt.

Häufig nutzen Bakterien Kombinationen der genannten Mechanismen zur Entgiftung von Schwermetall-Kationen (Nies, 1999). Interessanterweise zeigen z. B. Untersuchungen von Sharma *et al.* (2000), daß die ATPase-Aktivität von ZntA durch verschiedene Schwermetall-Glutathion-Komplexe gegenüber den Schwermetall-Kationen deutlich gesteigert wird. Vermutlich stellen diese Komplexe das native Substrat für den Transport *in vivo* dar.

Da Schwermetall-Kationen nicht nach Bedarf synthetisiert und abgebaut werden können und eine Speicherung in der Bakterienzelle energieaufwendig und die Speicherkapazität zudem begrenzt ist, ist Schwermetall-Metabolismus letztlich Transport-Metabolismus (Nies, 1999).

Ralstonia metallidurans CH34 (früher als *Alcaligenes eutrophus* CH34 bezeichnet; Brim *et al.*, 1999; Goris *et al.*, 2001; Mergeay, 2000) ist ein mit einem solchen Netzwerk von Schwermetall-Homöostase-Mechanismen ausgestatteter Organismus. Das stäbchenförmige, Gram-negative Boden- und Wasserbakterium, das in einer belgischen Zinkhütte isoliert wurde (Mergeay *et al.*, 1978), besitzt mehrere Systeme zur Bewältigung von Schwermetallstress. Mindestens acht Resistenz- bzw. Homöostase-Determinanten befinden sich auf den beiden Megaplasmiden pMOL28 und pMOL30 und dem bakteriellen Chromosom.

Von pMOL28 (180 kb; Taghavi *et al.*, 1997), dem kleineren Megaplasmid, werden eine Quecksilber-Resistenz (*mer*-Determinante; Diels *et al.*, 1985), die Chromat-Resistenz (*chr*-Determinante; Nies, A. *et al.*, 1989; Nies *et al.*, 1990; Peitzsch, 1999) sowie die Resistenz gegen Co^{2+} und Ni^{2+} (*cnr*-Determinante; Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993) kodiert. Auf pMOL30 (238 kb; Mergeay *et al.*, 1985), dem größeren Megaplasmid, liegen genetische Determinanten für Resistenzen gegen Co^{2+} -, Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen (*czc*, Abb. 1; Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989), Pb^{2+} -Ionen (*pbr*; Corbisier *et al.*, 1999), Kupfer-Ionen (*cop*; Dressler *et al.*, 1991) und Hg^{2+} -Ionen (*mer*; Diels *et al.*, 1985). Eine weitere Resistenz-Determinante gegen Hg^{2+} -Ionen befindet sich auf dem Bakterienchromosom (Dressler *et al.*, 1991).

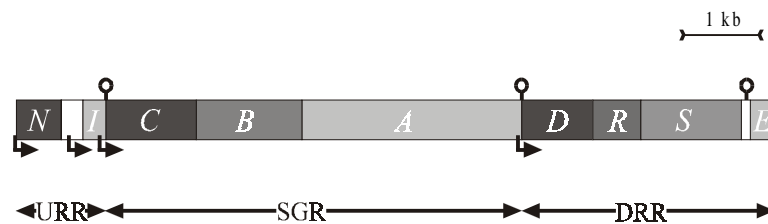


Abb. 1: Struktur der *czc*-Schwermetall-Homöostase-Determinante von *R. metallidurans* CH34

Die *czc*-Determinante für Resistenz gegen Co^{2+} -, Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen kann in drei Regionen unterteilt werden. Die Strukturgen-Region (SGR) umfaßt die Gene *czcC*, *czcB* und *czcA* für die Komponenten des CzcCBA-Efflux-Komplexes. Die Gene *czcN* und *czcI* bilden die *Upstream Regulatory Region* (URR). Die *Downstream Regulatory Region* (DRR) besteht aus den Genen *czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE* mit regulatorischen Funktionen. Die Pfeile unterhalb der Determinante markieren die Positionen der *czc*-Promotoren *czcNp*, *czcIp*, *czcCp* und *czcDp* (von links nach rechts) mit Transkriptionsrichtung. Die Terminatorstrukturen *czcIt*, *czcAt* und *czcSt* (von links nach rechts) werden durch Symbole (♀) oberhalb der Determinante gekennzeichnet. Die Abbildung wurde verändert nach Nies (2000) gestaltet.

Die Strukturgen-Region (SGR) der *czc*-Determinante kodiert für einen induzierbaren, chemiosmotisch getriebenen CzcCBA-Efflux-Komplex, bestehend aus dem RND-Protein CzcA (Goldberg *et al.*, 1999), dem MFP CzcB (Rensing *et al.*, 1997a) und dem OMF CzcC (Diels *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 1997a). Mindestens sechs Gene, die für Proteine mit regulatorischer Funktion kodieren, flankieren die SGR und werden in der gleichen Orientierung wie das Strukturgen-Operon *czcCBA* transkribiert (Grosse *et al.*, 1999). Die *Upstream Regulatory Region* (URR), stromaufwärts der SGR, besteht aus den Genen *czcN* und *czcI*. Den Genprodukten CzcN und CzcI konnten bisher noch keine genauen Funktionen

zugeordnet werden. Die stromabwärts der SGR gelegene *Downstream Regulatory Region* (DRR) mit den Genen *czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE* kodiert zum einen die chemiosmotisch getriebene Homöostase-Efflux-Pumpe CzcD, ein CDF-Protein (Anton *et al.*, 1999). Zum anderen werden CzcR und CzcS kodiert, die ein Zwei-Komponenten-System aus Histidin-Sensor-Kinase und *Response*-Regulator bilden (van der Lelie *et al.*, 1997). Dem ebenfalls in der DRR kodierten und periplasmatisch lokalisierten Protein CzcE, das Homologie zu CopH aufweist (Mergeay, 2000), konnte zwar noch keine Funktion zugeordnet werden, ein Einfluß auf die *czc*-vermittelte Resistenz ist aber nachweisbar (Anton, persönliche Mitteilung).

Als mit den Arbeiten zur Topologie des CzcCBA-Efflux-Systems begonnen wurde, wurden in der Literatur zwei unterschiedliche Hypothesen zur Lokalisation der Komponenten und zur Struktur des Membranprotein-Komplexes diskutiert (Abb. 2). Einerseits wurde der Transport der Schwermetall-Kationen vom Cytoplasma über beide Membranen direkt ins Außenmedium diskutiert (*Transenvelope Transport*; Saier *et al.*, 1994; Pimenta *et al.*, 1996). In diesem Modell, das auf Proteinsequenz-Vergleichen basierte, waren große Teile des Efflux-Komplexes extracytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 2A.; Dong & Mergeay, 1994; Diels *et al.*, 1995; Silver & Phung, 1996). Andererseits wurde von einem strikt auf die Passage der Cytoplasmamembran begrenzten Transportvorgang ausgegangen. Demzufolge sollten sich alle hydrophilen Bereiche des Komplexes im Cytoplasma befinden (Abb. 2B.; Nies, 1992a; Nies & Silver, 1995).

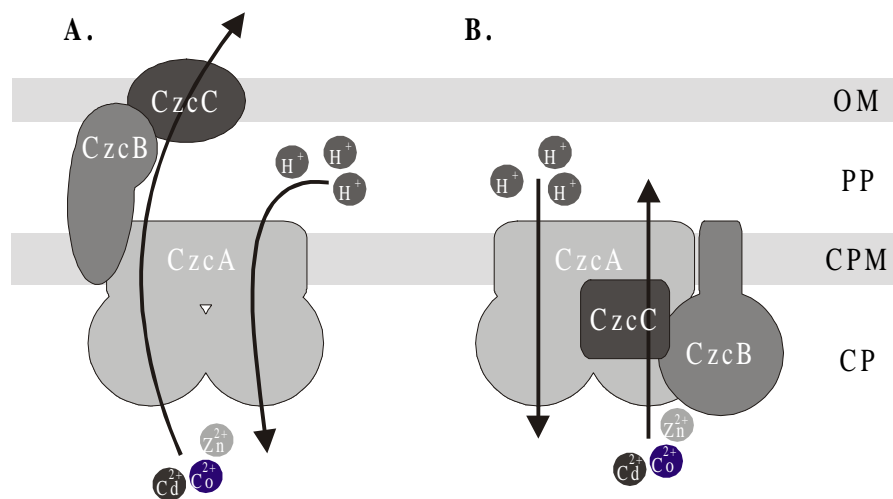


Abb. 2: Verschiedene Strukturmodelle für den Czc-Efflux-Komplex im Vergleich

Dargestellt sind die von der SGR der *czc*-Determinante kodierten Proteine CzcC, CzcB und CzcA. In beiden Modellen werden die Schwermetall-Kationen Co^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} im Antiport gegen Protonen aus dem Cytoplasma (CP) transportiert.

Im Modell **A.** (nach Diels *et al.*, 1995) erfolgt der Transport über die gesamte Zellhülle direkt ins Medium. CzcB ist in der Cytoplasmamembran (CPM) verankert, durchspannt das Periplasma (PP) und kontaktiert CzcC in der äußeren Membran (OM). CzcC vermittelt die Passage der Schwermetall-Kationen durch die äußere Membran.

Im Modell **B.** (nach Nies & Silver, 1995) sind CzcC und die hydrophilen Bereiche von CzcB im Cytoplasma lokalisiert. Ihnen kommen Funktionen bei der Substratbindung (CzcB) und der Erweiterung der Substratspezifität (CzcC) zu.

Mit dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Architektur des Czc-Efflux-Komplexes geleistet werden. In diesem Zusammenhang galt es, verschiedene Fragen in bezug auf die Einzelkomponenten zu klären. In welchem Kompartiment befinden sich die Komponenten CzcC und CzcB? Wie ist die Topologie des integralen Membranproteins CzcA? Sind die großen, hydrophilen Domänen von CzcA im Cytoplasma lokalisiert? Besitzen CzcC und CzcB auch transmembrane Segmente (TMS)? Sind eventuell noch andere Komponenten am Komplex beteiligt? Außerdem sollten Aussagen zu den Interaktionen zwischen den Untereinheiten und zur Zahl der Kopien einer Untereinheit im Komplex getroffen werden. Dies sollte Rückschlüsse auf das stöchiometrische Verhältnis der Komponenten im Komplex ermöglichen. Größe und Struktur des gesamten Komplexes sollten näher charakterisiert werden.

Um die genannten Ziele zu erreichen, wurden Lokalisationsstudien, Untersuchungen mit Reporter-Gen-Fusionen, Interaktionsstudien mit dem *Yeast Two-Hybrid-System*, *Blue Native PAGE* und *In vivo-Crosslinking* durchgeführt.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Ralstonia metallidurans</i>			
AE104	plasmidfrei	chromosomale Hg ²⁺ -Resistenz (<i>mer</i>)	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE128	pMOL30	CobB ^r , Zin ^r , Cad ^r (<i>czc</i>); <i>mer</i> ; <i>cop</i> ; <i>pbr</i>	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
cdc25H	plasmidfrei	Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3 112</i> , <i>cdc25-2</i> , Gal ⁺	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>			
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987; Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue MRF'	plasmidfrei	Δ (<i>mcrA</i>)183, Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn5 (Kan ^r)]	Jerpseth <i>et al.</i> , 1993; Stratagene GmbH, Heidelberg
Kan			
XL2-Blue	plasmidfrei	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r), Amy, Cam ^r]	Stratagene GmbH, Heidelberg
JM83	plasmidfrei	<i>ara</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (Str ^r), ϕ 80, <i>lacZΔM15</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
K12 GM2163	plasmidfrei	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>mcrA</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>supE44</i> , <i>hisG4</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL136</i> (Str ^r), <i>xyl-5</i> , <i>dam13::Tn9</i> (Cam ^r), <i>dcm-6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> (r _k ⁻ m _k ⁺); Stamm ohne Dam-Methylase	NewEngland BioLabs GmbH, Schwalbach
	pUC19	<i>lacPOZ'</i> (Amp ^r)	Vieira & Messing, 1982

			Fortsetzung Tab. 1
Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
K38	pGP1-2	HfrC, λ , <i>thi-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thr-1</i> , <i>supE44</i> , <i>tonA21</i> ; Wildtyp; T7-Expressionsstamm (Kan ^r)	Appleyard, 1954; Tabor <i>et al.</i> , 1985
	pT7-5	T7-Expressionsplasmid (Amp ^r)	Tabor, 1990
	pECD110	<i>czcCBAD</i> ' kloniert in pT7-5	Nies <i>et al.</i> , 1989
	pECD119	<i>czcCB</i> ' kloniert in pT7-5	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD125	<i>czcCBA</i> ' kloniert in pT7-5	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD130	<i>czcB</i> kloniert in pT7-5	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD133	<i>czcCAD</i> '; Mutation in <i>ApaI</i> -Schnittstelle von pECD110, Leserasterverschiebung in <i>czcB</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD134	<i>czcBAD</i> '; Mutation in <i>XhoI</i> -Schnittstelle von pECD110, Leserasterverschiebung in <i>czcC</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pBR322	Klonierungsvektor (Amp ^r , Tet ^r)	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
	pMC1871	Vektor für ' <i>lacZ</i> -Fusionen; trägt ' <i>lacZ</i> -Gen ohne Promotor und RBS	Shapira <i>et al.</i> , 1983
	pECD280	pECD110-Derivat mit <i>czcCB68</i> -' <i>phoA</i> , miniTn5- <i>phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pRME1	trägt Kan ^r -Kassette	Gielow <i>et al.</i> , 1991
	CC118	pGP1-2	<i>araD139</i> , (<i>ara-leu</i>)7697, <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>rpsE</i> , <i>phoA20</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>thi</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am); Stamm zur T7-Expression von Reporterfusionen (Kan ^r)
pECD499		pBR322-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>p_{T7*}</i> (Tet ^r)	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
pECD500		pBR322-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>phoA</i> unter Kontrolle von <i>p_{T7*}</i> (Tet ^r)	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
pECD501		pBR322-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>blaM</i> unter Kontrolle von <i>p_{T7*}</i> (Tet ^r)	diese Arbeit
pECD502		' <i>blaM</i> '-' <i>lacZ</i> '; verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD499 (Tet ^r); cytoplasmatische LacZ-Kontrolle	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
pECD503		' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> '; verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD500 (Tet ^r); cytoplasmatische PhoA-Kontrolle	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
pECD504		pECD499-Derivat mit <i>czcC20</i> -' <i>lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
pECD505		pECD499-Derivat mit <i>czcC28</i> -' <i>lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a

Fortsetzung Tab. 1

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
	pECD506	pECD499-Derivat mit <i>czcC93-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD507	pECD499-Derivat mit <i>czcC158-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD508	pECD499-Derivat mit <i>czcC223-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD509	pECD499-Derivat mit <i>czcC288-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD510	pECD499-Derivat mit <i>czcC353-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD511	pECD499-Derivat mit <i>czcC417-lacZ</i> ; komplettes <i>czcC</i> -Gen mit <i>'lacZ</i> fusioniert	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD512	pECD499-Derivat mit <i>czcCB38-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD513	pECD499-Derivat mit <i>czcCB283-lacZ</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD514	pECD499-Derivat mit <i>czcCB520-lacZ</i> ; komplettes <i>czcB</i> -Gen mit <i>'lacZ</i> fusioniert	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD515	pECD500-Derivat mit <i>czcC20-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD516	pECD500-Derivat mit <i>czcC28-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD517	pECD500-Derivat mit <i>czcC93-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD518	pECD500-Derivat mit <i>czcC158-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD519	pECD500-Derivat mit <i>czcC223-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD520	pECD500-Derivat mit <i>czcC288-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD521	pECD500-Derivat mit <i>czcC353-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD522	pECD500-Derivat mit <i>czcC417-phoA</i> ; komplettes <i>czcC</i> -Gen mit <i>'phoA</i> fusioniert	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD523	pECD500-Derivat mit <i>czcCB38-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD524	pECD500-Derivat mit <i>czcCB283-phoA</i>	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD525	pECD500-Derivat mit <i>czcCB520-phoA</i> ; komplettes <i>czcB</i> -Gen mit <i>'phoA</i> fusioniert	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD620	pECD499-Derivat mit <i>czcA334-lacZ</i>	diese Arbeit
	pECD621	pECD499-Derivat mit <i>czcA1063-lacZ</i> ; komplettes <i>czcA</i> -Gen mit <i>'lacZ</i> fusioniert	diese Arbeit
	pECD622	pBR322-Derivat für Translationsfusionen mit <i>'blaM</i> unter Kontrolle von p_{T7} (Tet^r , Kan^r); Weiterentwicklung von pECD501	diese Arbeit
	pECD623	pBR322-Derivat für Translationsfusionen mit <i>'phoA</i> unter Kontrolle von p_{T7} (Tet^r , Kan^r); Weiterentwicklung von pECD500	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD624	pECD623-Derivat mit <i>czcA33-phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD625	pECD623-Derivat mit <i>czcA64-phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999

Fortsetzung Tab. 1

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
	pECD626	pECD623-Derivat mit <i>czcA192</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD627	pECD623-Derivat mit <i>czcA345</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD628	pECD623-Derivat mit <i>czcA366</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD629	pECD623-Derivat mit <i>czcA390</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD630	pECD623-Derivat mit <i>czcA419</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD631	pECD623-Derivat mit <i>czcA449</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD632	pECD623-Derivat mit <i>czcA510</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD633	pECD623-Derivat mit <i>czcA532</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD634	pECD623-Derivat mit <i>czcA557</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD635	pECD623-Derivat mit <i>czcA880</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pGEM [®] -T Easy	<i>lacPOZ</i> '; Klonierungsvektor für PCR-Produkte (Amp ^r)	Promega, Madison (USA)
	pECD636	pGEM [®] -T Easy-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>p_{T7}</i> (Amp ^r , Kan ^r);	diese Arbeit
	pECD637	pGEM [®] -T Easy-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>phoA</i> unter Kontrolle von <i>p_{T7}</i> (Amp ^r , Kan ^r);	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD618	' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> ; verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD637 (Amp ^r); cytoplasmatische PhoA-Kontrolle	diese Arbeit
	pECD619	' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> ; verkürztes <i>blaM</i> mit Signalsequenz in pECD637 (Amp ^r); periplasmatische PhoA-Kontrolle	diese Arbeit
	pECD638	pECD637-Derivat mit <i>czcA13</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD639	pECD637-Derivat mit <i>czcA334</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD640	pECD637-Derivat mit <i>czcA366</i> -' <i>phoA</i>	diese Arbeit
	pECD641	pECD637-Derivat mit <i>czcA390</i> -' <i>phoA</i>	diese Arbeit
	pECD642	pECD637-Derivat mit <i>czcA475</i> -' <i>phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD643	pECD637-Derivat mit <i>czcA673</i> -' <i>phoA</i>	diese Arbeit
	pECD644	pECD637-Derivat mit <i>czcA673</i> -' <i>phoA</i> *; kodiert K633R/ D637G-Doppelmutante der Fusion	diese Arbeit
	pECD645	pECD637-Derivat mit <i>czcA830</i> -' <i>phoA</i>	diese Arbeit
	pECD646	pECD637-Derivat mit <i>czcA904</i> -' <i>phoA</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
	pECD647	pECD637-Derivat mit <i>czcA904</i> - <i>'phoA</i> *; kodiert S7G-Mutante der Fusion	diese Arbeit
	pECD664	pECD637-Derivat mit <i>czcA927</i> - <i>'phoA</i>	diese Arbeit
	pECD665	pECD637-Derivat mit <i>czcA927</i> - <i>'phoA</i> *; kodiert I853T-Mutante der Fusion	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD666	pECD637-Derivat mit <i>czcA958</i> - <i>'phoA</i>	diese Arbeit
	pECD667	pECD637-Derivat mit <i>czcA980</i> - <i>'phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD668	pECD637-Derivat mit <i>czcA1008</i> - <i>'phoA</i>	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD669	pECD637-Derivat mit <i>czcA1038</i> - <i>'phoA</i>	diese Arbeit
	pECD670	pECD637-Derivat mit <i>czcA1038</i> - <i>'phoA</i> *; kodiert L896S/ P995L-Doppelmutante der Fusion	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD671	pECD637-Derivat mit <i>czcA1038</i> - <i>'phoA</i> *; kodiert A898T-Mutante der Fusion	diese Arbeit
	pECD672	pECD637-Derivat mit <i>czcA1060</i> - <i>'phoA</i>	diese Arbeit
	pECD673	pECD637-Derivat mit <i>czcA1063</i> - <i>'phoA</i> ; komplettes <i>czcA</i> -Gen mit <i>'phoA</i> fusioniert	diese Arbeit
	pECD559	<i>czcA</i> als <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment in pASK-IBA3 (Amp ^r)	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD684	<i>czcB</i> als <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment in pASK-IBA3 (Amp ^r)	Legatzki, persönliche Mitteilung
	pECD674	pECD110-Derivat mit <i>czcCBA-Strep-tag II</i> [®]	diese Arbeit
	pECD675	pECD674-Derivat mit <i>czcCB-Strep-tag II</i> [®]	diese Arbeit
	pSos	ColE1, 2 μ ori, <i>leu2</i> , <i>p_{ADH1}</i> , <i>hSos'</i> (Amp ^r); <i>E.coli</i> -Hefe- <i>Shuttle</i> -Vektor	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pSos MAFB	pSos-Derivat mit <i>hSos'</i> - <i>mafB</i> ; Positiv-Kontrolle	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pSos Coll	pSos-Derivat mit <i>hSos'</i> - <i>'coll</i> ; AS-Reste 148-357 der Murin 72 kDa Typ IV-Collagenase kodiert	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pECD676	pSos-Derivat mit <i>hSos'</i> - <i>'czcC</i> ; <i>'czcC</i> ohne Signalsequenz	diese Arbeit
	pECD677	pSos-Derivat mit <i>hSos'</i> - <i>'czcB</i> ; <i>'czcB</i> ohne TMS-kodierende Region	diese Arbeit
	pECD678	pSos-Derivat mit <i>hSos'</i> - <i>'czcAI</i> '; <i>'czcAI</i> ' große periplasmatische Domäne I kodierende Region	diese Arbeit

			Fortsetzung Tab. 1
Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
	pECD679	pSos-Derivat mit <i>hSos</i> '-' <i>czcAII</i> '; ' <i>czcAII</i> ' große periplasmatische Domäne II kodierende Region	diese Arbeit
	pMyr	ColE1, 2 μ ori, <i>ura3</i> , <i>p_{GAL1}</i> , <i>myr</i> (Cam ^r); <i>E. coli</i> -Hefe- <i>Shuttle</i> -Vektor	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pMyr MAFB	pMyr-Derivat mit <i>myr-mafB</i> ; Positiv-Kontrolle	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pMyr Lamin C	pMyr-Derivat mit <i>myr</i> '-' <i>hLaminC</i> '; AS-Reste 67-230 von hLamin C kodiert	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pECD680	pMyr-Derivat mit <i>myr</i> '-' <i>czcC</i> '; ' <i>czcC</i> ohne Signalsequenz	diese Arbeit
	pECD681	pMyr-Derivat mit <i>myr</i> '-' <i>czcB</i> '; ' <i>czcB</i> ohne TMS-kodierende Region	diese Arbeit
	pECD682	pMyr-Derivat mit <i>myr</i> '-' <i>czcAI</i> '; ' <i>czcAI</i> ' große periplasmatische Domäne I kodierende Region	diese Arbeit
	pECD683	pMyr-Derivat mit <i>myr</i> '-' <i>czcAII</i> '; ' <i>czcAII</i> ' große periplasmatische Domäne II kodierende Region	diese Arbeit

2. Kultivierungsbedingungen

2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien

A.) Nährbouillon I (SIFIN GmbH, Berlin)

25 g Nährbouillon I
ad 1 l H₂O bidest.

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

B.) Nähragar (SIFIN GmbH, Berlin)

36.5 g Nähragar I bzw. 26 g Nähragar II
ad 1 l H₂O bidest.

Dieses Festmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

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

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1 l H₂O bidest.

Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

D.) M9-Minimalmedium bzw. M19-Glucose-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

5x M9-Puffer:

64 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O (0.25 M)
15 g KH₂PO₄ (0.1 M)
2.5 g NaCl (0.05 M)
5.0 g NH₄Cl (0.1 M)
ad 1 l H₂O bidest.

M19-Glucose-Minimalmedium:

0.2 l 5x M9 Puffer
4 ml 0.5 M MgSO₄
1 ml 0.1 M CaCl₂
20 ml 20 % (w/v) Glucose
1 ml Thiamin (20 mg/ml)
10 ml von den 1 % (w/v) AS-Stammlösungen (18 Aminosäuren, außer Cys und Met)
ad 1 l H₂O bidest.

Die Stammlösungen von MgSO₄, CaCl₂ und Glucose wurden separat autoklaviert und die Aminosäure-Stammlösungen sterilfiltriert.

E.) Spurenelementlösung SL6 (10x) (Pfennig, 1974)

900 ml H₂O bidest.
0.1 g ZnSO₄ x 7 H₂O
0.03 g MnCl₂ x 4 H₂O
0.3 g H₃BO₃
0.2 g CoCl₂ x 6 H₂O
0.01 g CuCl₂ x 2 H₂O
0.188 g NiCl₂ x 6 H₂O
0.03 g Na₂MoO₄ x 2 H₂O
ad 1 l H₂O bidest.

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

Komponente A (20x):

800 ml H₂O bidest.
 121.1 g Tris-HCl
 HCl ad pH 7.0
 93.6 g NaCl
 29.8 g KCl
 21.4 g NH₄Cl
 4.0 g MgCl₂ x 6 H₂O
 0.60 g CaCl₂ x 2 H₂O
 0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat
 2 ml Spurenelementlösung SL6 (10x) (Pfennig, 1974)
 ad 1 l H₂O bidest.

Komponente B (20x):

900 ml H₂O bidest.
 19.5 g Na₂SO₄ x 10 H₂O
 4.6 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
 ad 1 l H₂O bidest.

Für die Anzucht von *R. metallidurans* wurden die Komponenten A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und auf einfache Konzentration verdünnt. Als Kohlenstoffquelle wurden 0.2 % (w/v) Natriumgluconat zugesetzt.

Für Tris-Minimal-Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 1.5 % (w/v) und bei Zugabe von Metallsalzen 2 % (w/v) *Bacto*[®]-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt.

G.) Medienzusätze

• **Schwermetallsalze**

Es wurden 1 M bzw. 0.1 M wäßrige Stammlösungen der Schwermetallsalze ZnCl₂, CoCl₂ und CdCl₂ verwendet. Die Lösungen wurden in sterilem Medium auf Endkonzentration verdünnt.

• **Antibiotika**

Die Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte nach Ausubel *et al.* (1993). Die Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt und den sterilen Medien in den entsprechenden Endkonzentrationen zugesetzt (Tab. 2).

Tab. 2: Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 g/l H ₂ O bidest.	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H ₂ O bidest.	25 mg/l (<i>E. coli</i>)
Tetracyclin	12.5 g/l 50 % (v/v) Ethanol	12.5 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l 96 % (v/v) Ethanol	20 mg/l
Streptomycin	10 g/l H ₂ O bidest.	10 mg/l
Rifampicin	20 g/l Methanol	200 mg/l

• **Weitere Medienzusätze**

Als weitere Zusätze in den Nährmedien dienten der künstliche Induktor IPTG, sowie die chromogenen Substrate X-Gal und X-P.

Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. IPTG lag als wäßrige Stammlösung von 20 % (w/v) vor und wurde in einer Endkonzentration von 40 mg/l den sterilen Medien zugesetzt. Von X-Gal und X-P wurden jeweils Stammlösungen von 5 % (w/v) in DMF hergestellt. Die Endkonzentration im Medium betrug 50 mg/l.

2.2. Nährmedien und Zusätze für Hefen (Stratagene GmbH, Heidelberg)

A.) YPAD-Medium-Agar

- 1 % (w/v) Hefeextrakt
- 2 % (w/v) *Bacto*[®]-Pepton
- 2 % (w/v) Glucose
- 2 % (w/v) *Bacto*[®]-Agar
- 40 mg Adenin-Sulfat
- ad 1 l H₂O bidest.

Nach dem Autoklavieren und Gießen der Platten wurden diese drei Tage bei RT getrocknet. Für YPAD-Flüssigmedium wurde Medium ohne *Bacto*[®]-Agar zubereitet.

B.) 10x Dropout-Lösung

- | | |
|----------------------------------|-----------------------|
| 300 mg L-Isoleucin | 200 mg L-Methionin |
| 1500 mg L-Valin | 500 mg L-Phenylalanin |
| 200 mg L-Adenin-Hemisulfat | 2000 mg L-Threonin |
| 500 mg L-Arginin-HCl | 500 mg L-Tyrosin |
| 200 mg L-Histidin HCl Monohydrat | 1000 mg L-Glutamat |
| 500 mg L-Lysin HCl | 1000 mg L-Aspartat |
| 400 mg L-Serin | |
| ad 1 l H ₂ O bidest. | |

Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

C.) Synthetisches Glucose Minimalmedium [SD/Glucose (-UL)]

- 1.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 5 g Ammonium-Sulfat
- 20 g Glucose
- ad 900 ml H₂O bidest.

Nach 15 min Autoklavierung und Abkühlung auf ca. 55 °C wurden 100 ml sterilfiltrierte 10x *Dropout*-Lösung zugegeben.

D.) Synthetisches Galaktose Minimalmedium [SD/Galaktose (-UL)]

- 1.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 5 g Ammonium-Sulfat
- 20 g Galaktose
- 10 g Raffinose
- ad 900 ml H₂O bidest.

Nach 15 min Autoklavierung und Abkühlung auf ca. 55 °C wurden 100 ml sterilfiltrierte 10x *Dropout*-Lösung zugegeben.

Zur Herstellung von *SD/Dropout*-Agarplatten wurde den Medien 1.7 % (w/v) Bacto[®]-Agar zugesetzt. Diese Minimalmedien dienen der Zellanzucht von *S. cerevisiae*-Stämmen mit den Plasmiden pSos und pMyr (und deren Derivaten).

2.3. Anzucht und Zellernte

R. metallidurans

Die Anzucht von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Medium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 0.2 % (w/v) Natriumgluconat zugesetzt wurde.

Als Kulturgefäße für die Anzuchten aller Stämme dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß maximal 1:5 betrug. Die Zugabe von Schwermetallsalzen erfolgte in den beschriebenen Konzentrationen. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C (Brutraum) auf einem Rotationsschüttler (*HI*, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 150 rpm angezogen. Für Wachstumsversuche erfolgte die Zellanzucht in einem Wasserbadschüttler (*Gyrotory G76*, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey) bei 30 °C und 140 rpm. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung mit einem *Klett-Summerson-Colorimeter* (Klett MFG Co., USA) in Kletteinheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30 °C für 1-5 Tage inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder durch Zentrifugation in der *Universal 30 RF*-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) bei 4 °C, 5000 rpm und 10 min, in der Sigma-Laborzentrifuge (*Sigma 2K15*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei 4 °C und 12000 rpm oder durch 30 s Zentrifugation in der Sigma Tischzentrifuge.

E. coli

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in NB- oder LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C oder 37 °C (Brutraum) in schräg eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (*HS500*, IKA Labortechnik) oder auf einem Rotationsschüttler (*HI*, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (*Ultrospec II*, LKB Biochrom Ltd., England) oder mit dem *Klett-Summerson-Colorimeter* (Klett MFG Co., USA) in Kletteinheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder in der Hettich-Zentrifuge, in der Sigma-Laborzentrifuge oder in der Sigma-Tischzentrifuge wie für *R. metallidurans* beschrieben.

2.4. Stammhaltung

Die Kultivierung von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten, wobei den plasmidtragenden Stämmen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so daß zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand.

E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar- bzw. NA-Platten mit Antibiotikum kultiviert. Die Stämme wurden alle vier Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 30 °C bzw. 37 °C wurden alle Platten im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

Außerdem wurden von Stämmen mit neu konstruierten Plasmiden Glyzerinkulturen angelegt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet, mit Glyzerin [Endkonzentration 20 % (v/v)] versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.5. Reinheitskontrolle

Die Überprüfung der Reinheit der Kulturen erfolgte regelmäßig durch Vereinzelungsausstriche auf den entsprechenden Agarplatten, wobei eine einheitliche Koloniemorphologie als Reinheitskriterium galt.

3. Molekulargenetische Arbeiten

3.1. Isolierung von DNA

Um einen Abbau der DNA durch DNasen zu verhindern, wurden die verwendeten Geräte und Materialien entweder durch Hitze sterilisiert oder bei Hitzeelastizität mit 70 %igem (v/v) Ethanol behandelt bzw. sterilfiltriert.

3.1.1. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Aufgrund des geringen Aufwandes konnte so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach geprüft und eine Vorauswahl getroffen werden.

Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 50 µl 1:1 (v/v) Phenol/Chloroform sowie 10 µl 5x Stopp-Mix [40 % (v/v) Glycerol; 0.1 % (w/v) SDS; 0.1 M EDTA; 0.2 % (w/v) BPB] zugegeben. Nach kräftigem Mischen mittels *Vortex Shaker* [*Vortex Genie2TM*, Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz)] und Zentrifugation für 3 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden ca. 25 µl der wäßrigen Oberphase im 0.6-1 %igen (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt.

3.1.2. Minipräparation von Plasmid-DNA (verändert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Diese Methode diente zur schnellen Analyse von Plasmid-DNA. Die Qualität der präparierten DNA war für Restriktionsanalysen und PCR ausreichend.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 3 ml NB mit Antibiotika über Nacht. Die Übernachtskultur wurde in Eppendorf-Gefäßen in einer Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Lösung I [50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA] vollständig resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung II [0.2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS]. Es wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III [5 M Kaliumacetat, pH 4.8] zugesetzt, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (12000 rpm, 4 °C, 10 min) wurde das weiße Präzipitat sedimentiert und mittels sterilem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform [1:1 (v/v)] extrahiert, und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde zur Fällung der DNA mit 2.5 Vol. 96 %igem Ethanol versetzt und intensiv gemischt. Die Fällung erfolgte 5 min bei RT. Im Anschluß wurde für 20 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, im Vakuum (*SpeedVac[®] SVC 100*, Savant) getrocknet und in 20 µl RNaseA-Lösung (20 µg/ml) aufgenommen. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.3. Präparative Plasmidisolierung

Zur Präparation größerer Mengen von Plasmiden geringerer Kopienzahl diente die hier beschriebene Maxipräparation.

Eine 200 ml-Übernachtskultur wurde in sterile Greiner-Gefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation (4 °C; 5000 rpm; 10 min) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml Lösung I [50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA] und 100 µl Lysozym-Lösung [10 mg/ml Lysozym in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)] vollständig resuspendiert. Nach 5 min bei RT wurden 12 ml Lösung II [0.2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS] zugesetzt. Nach weiteren 10 min bei RT wurden 9 ml Lösung III [5 M Kaliumacetat, pH 4.8] zum Ansatz gegeben und das Lysat 10 min auf Eis inkubiert. Das weiße Präzipitat wurde durch Zentrifugation (4 °C; 5000 rpm; 20 min) pelletiert. Der Überstand wurde einer RNase-Behandlung (RNase 50 µg/ml; 1 h; 37 °C) unterzogen. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 Vol. Phenol/Chloroform [1:1(v/v)] versetzt und kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde 15 min lang bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Oberphase wurde zur Abtrennung von Phenolresten mit 1 Vol. Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (4 °C; 5000 rpm; 15 min). Zur Fällung der DNA wurde die Oberphase mit 2.5 Vol. 96 %igem Ethanol versetzt und bei -20 °C 1 h inkubiert. Die Sedimentation der DNA erfolgte durch Zentrifugation (4 °C; 5000 rpm; 30 min) und das Pellet wurde mit 0.5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Es wurde wieder zentrifugiert (4 °C; 5000 rpm; 15 min), das gewaschene Pellet im Vakuum getrocknet und in 100 µl TE-Puffer oder sterilem H₂O bidest. aufgenommen.

3.1.4. Plasmidisolierung mittels *QIAprep Spin Säulen* (QIAGEN GmbH, Hilden)

Diese Methode diente der Gewinnung sehr reiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silicagel-Membran gebunden (Vogelstein & Gillespie, 1979) und anschließend mit H₂O bidest. eluiert. Es war keine Fällung der DNA nötig.

Bis zu 10 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 12000 rpm pelletiert (*Sigma 112*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die anschließende Präparation der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.5. Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)

Diese Plasmidisolierung beruhte auf einer alkalischen Lyse der Zellen und der Bindung der DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule. Mit der Methode konnte sehr reine, kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA unter Vermeidung der Verwendung von Phenol gewonnen werden.

Mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Mini Kit* konnten kleinere Mengen von Plasmiden geringerer Kopienzahl zur Analyse gewonnen werden. Es wurden 10 ml *E. coli*-Übernachtskultur

aufgearbeitet, und die Lösungen nach Anweisung des QIAGEN-Protokoll für Mini-Präparation mit QIAGEN-tip 20 eingesetzt. Die Säulen konnten mehrmals (ca. 3x) verwendet werden, wenn sie wieder äquilibriert wurden.

Für eine ebenfalls durchführbare präparative Plasmidisolierung wurde das *Midi Plasmid Purification Protocol* (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet.

3.2. Standard-DNA-Techniken

3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (*Easy Cast™ Elektrophoresis System*). Dabei variierte die Gelkonzentration je nach Fragmentgröße von 0.6-2 % (w/v).

Als Elektrophorese-Puffer wurde 1x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, pH 8.0; 1 mM EDTA] eingesetzt. Die Agarose wurde dem Puffer zugegeben und in der Mikrowelle (Bosch Hausgeräte) gelöst. Dann wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid (0.5 g/l) zugesetzt und das Gel gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Vol. 5x Stopp-Lösung [40 % (v/v) Glycerol; 0.1 % (w/v) SDS; 0.1 M EDTA; 0.2 % (w/v) BPB] versetzt. Die aufgetragene Probenmenge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-10 µl (analytische Gele) bzw. 20-40 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–120 V und I_{\max} (*PHERO-stab. 300*, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen) bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Die Gele wurden mit dem UV-Transilluminator (Appligene, Illkirch) betrachtet und mittels *Image-Master* (Pharmacia, Freiburg) dokumentiert.

3.2.2. DNA-Größenstandards

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe von *EcoRI/BamHI* geschnittener Plasmid-DNA pES1 (Szomolanyi *et al.*, 1980), *HindIII* geschnittener λ -DNA sowie *PstI* geschnittener λ -DNA.

Das Plasmid pES1 hatte eine Größe von ca. 12.8 kb. Nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* traten 11 Fragmente auf, deren Größen bei ca. 4000, 2500, 1700, 1300, 800, 660, 600, 510, 375, 230 und 140 bp lagen.

Bei der Restriktion von DNA des Phagen λ (Gesamtgröße 48.5 kb) mit *HindIII* entstanden 8 Fragmente mit Größen von 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 und 139 bp und bei Restriktion mit *PstI* entstanden 29 Fragmente, wobei die 15 größten 14655, 11497, 5077, 4749, 4503, 2838, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1033, 805 und 514 bp groß sind.

3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität von mit Ethidiumbromid markierten DNA-Proben mit Standards (DNA bekannter Konzentration) im Agarose-Gel. Dies war vor allem bei anschließender Sequenzierung der DNA wichtig. Die Konzentrationsbestimmung für Ligationen erfolgte durch direkten Vergleich der miteinander zu ligierenden Fragmente.

3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl (analytisch) und 50-200 µl (präparativ). Maximal 0.1 Vol. des Gesamtansatzes waren dabei Enzymlösung. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die meist 10x konzentriert waren und auf 1x Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Definiert ist 1 U eines Enzyms als die Aktivität, die 1 µg DNA in 1 h bei 37 °C spaltet.

Nach Überprüfung der vollständigen Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Enzyme durch Hitze (10 min bei 70 °C) inaktiviert.

3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Phenol-Extraktion und Fällung

Zur Entfernung von Proteinen wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)] extrahiert und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde mit 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) oder 5 M NaCl-Lösung versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2.5 Vol. eiskaltem 96 %igem (v/v) Ethanol für 1 h bei -20 °C. Nach einer Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für 15 min wurde die DNA mit 0.5 ml 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut kurz zentrifugiert. Die Trocknung des Sediments erfolgte im Vakuum (*SpeedVac*[®] *SVC 100*, Savant). Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA] oder sterilem H₂O bidest. aufgenommen.

3.2.6. Reinigung von DNA durch Mikrodialyse

Um die DNA-Lösung zu entsalzen oder den Puffer zu wechseln wurde eine Mikrodialyse durchgeführt. Dazu wurden ca. 25 ml steriles H₂O bidest. in eine Petrischale gefüllt und ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0.025 µm (Millipore GmbH, Eschborn) auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die DNA-Probe wurde auf den Filter aufgetropft und nach ca. 30 min wieder abgenommen.

3.2.7. Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden)

Diese Reinigungsmethode basierte auf der Eigenschaft der DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Membran zu adsorbieren (Vogelstein & Gillespie, 1979), während Verunreinigungen (z. B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution der DNA mittels sterilem H₂O bidest. (niedrige Salzkonzentration).

Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen und die DNA mit 50 µl sterilem H₂O bidest. eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

3.2.8. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden)

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurde entsprechende Fragmente aus dem Gel geschnitten. Zur Isolation der DNA aus den Agarose-Gelstücken kam das Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) zur Anwendung.

3.2.9. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Unterbindung einer Autoligation von linearisierter Vektor-DNA konnte der Vektor vor einer Ligation mit DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert werden. Dies erfolgte im Restriktionsansatz des Vektors durch Zugabe von 1 U Alkalische Phosphatase ca. 1 h vor Ende des Verdaus bei 37 °C.

3.2.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Vektor- und Fragment-DNA wurden ungefähr im Verhältnis 1:2 eingesetzt, mit sterilem H₂O bidest. versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 1-2 µl 10x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Für die Ligation von PCR-Produkten in pGEM[®]-T Easy wurde 0.5 µl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits [Promega, Madison (USA)] verwendet. Die Ligation wurden über Nacht (z. B. pGEM[®]-T Easy) bzw. für mehrere Tage bei 4 °C inkubiert.

3.2.11. Ligation von DNA mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Mit dieser Variante der Ligation konnte innerhalb kürzester Zeit ein DNA-Fragment mit einem Vektor ligiert werden. Dabei wurden Vektor- und Fragment-DNA mit 2 µl 5x DNA-

Verdünnungspuffer versetzt (10 µl Endvolumen) und mit 10 µl 2x T4-DNA-Ligationspuffer gemischt, 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz konnte dann sofort transformiert werden.

Die Transformationsausbeute war bei dieser schnellen, aber ineffizienteren Variante der Ligation niedriger als bei der normalen Ligation.

3.2.12. Transformation nach der CaCl₂-Methode

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel & Higa, 1970). Die Transformation selbst wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. Mit dieser Kultur wurde eine 50 ml-Hauptkultur 1-2 %ig beimpft und bei 37 °C bis zu einem OD₆₀₀ = 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, vorgekühltes Greiner-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm und 4 °C in der *Universal RF* (Hettich GmbH, Tuttlingen). Das Pellet wurde vorsichtig in ca. 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis gestellt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80 °C gelagert.

Je 100-200 µl CaCl₂-kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der DNA (z. B. Ligation) vorsichtig gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock von 1 min bei 42 °C wurden die Ansätze sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0.3-0.5 ml NB oder LB-Medium und Inkubation für 30-45 min bei 37 °C bzw. 30 °C wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.

3.2.13. Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Transformanden wurden auf NA-Platten mit IPTG und X-Gal unter Zusatz von Antibiotikum selektiert. Rekombinante Klone konnten durch Test auf α-Komplementation identifiziert werden. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α-Komplementation der β-Galaktosidase durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal zugrunde. Rekombinante Klone bildeten demzufolge weiße Kolonien.

3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1. Auswahl der *Primer*

Die Ableitung der *Primer* (Tab. 3) erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms *OLIGO* aus bekannten Sequenzen.

Einige *Primer* (GA-Serie) wurden am DNA-Syntheseapparat *Gene Assembler Plus* (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg) nach der Phosphoramiditmethode synthetisiert.

Ansonsten wurden die Oligonukleotid-*Primer* von verschiedenen Anbietern (Gibco BRL, Eggenstein; Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H₂O bidest. gelöst (Stammlösung mit 100 pmol/μl) und auf eine Endkonzentration von ca. 10 pmol/μl in der Arbeitslösung verdünnt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten *Primer*

Name/Orientierung	Sequenz 5'->3' ^{a)}	Bemerkungen
Reporterplasmid-Set 1		
T7- <i>XhoI</i> -Linker 1 (GA621)	← AAT TGC TCG AGT CTC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAC	direkt mit pBR322 ligiert; trägt <i>p_{T7}</i> ; zerstört <i>EcoRI</i> - Schnittstelle
T7- <i>XhoI</i> -Linker 2 (GA622)	→ AAT TGT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC TCG AGC	
<i>KpnI</i> -Linker	← TCG ACG GTA CCG →	ohne PCR mit pBR322- Derivat ligiert; zerstört <i>XhoI</i> -Schnittstelle
' <i>lacZ</i> - <i>KpnI</i> - <i>XbaI</i> - Start	→ AAA GGT ACC TCT AGA GGT CCT CCC GTC GTT TTA CAA CGT	PCR mit GA630, ' <i>lacZ</i> -Start und pMC1871 als <i>Template</i>
' <i>lacZ</i> - <i>PstI</i> -Ende (GA630)	← AAA CTG CAG TTA TTT TTG ACA CCA GAC C	
' <i>phoA</i> - <i>KpnI</i> - <i>XbaI</i> - Start	→ AAA GGT ACC TCT AGA GGT CCT CCT GTT CTG GAA AAC CGG	PCR mit ' <i>phoA</i> -Ende, ' <i>phoA</i> -Start und pECD280 als <i>Template</i>
' <i>phoA</i> - <i>PstI</i> -Ende	← AAA CTG CAG TTA TTT CAG CCC CAG AGC	
' <i>blaM</i> '- <i>KpnI</i> - <i>XbaI</i> - Start	→ AAA GGT ACC TCT AGA GGT CCT CAC CCA GAA ACG CTG GTG	PCR mit GA624, ' <i>blaM</i> '- Start und pBR322 als <i>Template</i>
' <i>blaM</i> '- <i>PstI</i> -Ende (GA624)	← TGC TGC AGG CAT CGT GGT	
Reporterplasmid-Set 2		
T7-MCS-Linker I	← CTC GAG GGC CCA ATT GAC TAG TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA CGT AC	direkt mit pECD500 und pECD501 ligiert; trägt MCS und <i>p_{T7}</i> ; zerstört <i>KpnI</i> - Schnittstelle
T7-MCS-Linker II	→ GTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACT AGT CAA TTG GGC CCT CGA GGT AC	
Kan ^r - <i>KpnI</i> -Start	→ AAA GGT ACC CTG ATC CTT CAA CTC AGC	PCR mit Kan ^r - <i>KpnI</i> -Start, Kan ^r - <i>XbaI</i> -Ende und pRME1 als <i>Template</i>
Kan ^r - <i>XbaI</i> -Ende	← AAA TCT AGA TGT TAC AAC CAA TTA ACC	

Name/Orientierung	Sequenz 5'->3' ^{a)}	Bemerkungen
<i>czcC'</i> - <i>'lacZ</i> , - <i>'phoA</i> -Fusionen		
<i>czcC-KpnI</i> -Start (GA871)	→ AAA <u>GGT ACC</u> T ₁₂₁₁ TC TCC TGG TCA CAT ACC	
<i>czcC20-XbaI</i> -Ende (GA872)	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₁₃₀₁ GC AAA GTT TGG GCT GAG	
<i>czcC28-XbaI</i> -Ende (GA873)	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₁₃₂₅ GT GCC GGT GTC AGA TTG	
<i>czcC93-XbaI</i> -Ende (GA874)	← AAA <u>TCT AGA</u> T ₁₅₁₇ TT CCG CGT GTC CTC GAC	
<i>czcC158-XbaI</i> - Ende (GA875)	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₁₇₁₅ GT TGC CAG CTT GAC GCG	jeweils PCR mit GA871, GA87.. und pECD110 als <i>Template</i>
<i>czcC223-XbaI</i> - Ende (GA876)	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₁₉₁₀ AA CTG CGG CGA TGC ATT	
<i>czcC288-XbaI</i> - Ende (GA877)	← AAA <u>TCT AGA</u> T ₂₁₀₅ TC TGT ATC TCG CTT GGC	
<i>czcC353-XbaI</i> - Ende (GA878)	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₂₃₀₀ GT TTG TGC CGA GGC GCG	
<i>czcC417-XbaI</i> - Ende (GA879)	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₂₄₉₂ CG TCC CAG AAT GCG ATC	
<i>czcCB'</i> - <i>'lacZ</i> , - <i>'phoA</i> -Fusionen		
<i>czcCB38-XbaI</i> - Ende (GA964)	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₂₆₂₆ CC ACC CTG CTC TTC CGG	
<i>czcCB283-XbaI</i> - Ende (GA965)	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₃₃₆₁ TT CTT CTC GCG GTC ATA	jeweils PCR mit GA871, GA96.. und pECD110 als <i>Template</i>
<i>czcCB520-XbaI</i> - Ende (GA966)	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₄₀₇₂ TG GCC GTG TTC GGC GCT	
Kontrollplasmide		
<i>blaM'-KpnI</i> -Start (GA917)	→ AAA <u>GGT ACC</u> TGA AAA AGG AAG AGT ATG	
<i>'blaM'-KpnI</i> -Start (GA918)	→ AAA <u>GGT ACC</u> TGA AAA AGG AAG AGT ATG CTG GTG AAA GTA AAA GAT	jeweils PCR mit GA91..., GA919 und pBR322 als <i>Template</i>
<i>blaM'-XbaI</i> -Ende (GA919)	← AAA <u>TCT AGA</u> TCC TGC AAC TTT ATC CGC	
<i>czcA'</i> - <i>'lacZ</i> , - <i>'phoA</i> -Fusionen		
<i>czcA-KpnI</i> -Start (GA967)	→ AAA <u>GGT ACC</u> A ₄₀₅₅ GC GCC GAA CAC GGC CAT	
<i>czcA13-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> T ₄₁₃₀ CG CTG CTG GAT GGC GAA	
<i>czcA33-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> T ₄₁₉₀ CG GTT GTA GCT GAA AAT	jeweils PCR mit GA967, <i>czcA...</i> - <i>XbaI</i> -Ende und pECD110 als <i>Template</i>
<i>czcA64-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₄₂₈₃ CG CTG TTC GGT TTC GAG	
<i>czcA192-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₄₆₆₇ TT GTT GAA ACC ACC GAT	
<i>czcA334-XbaI</i> -Ende (GA968)	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₅₀₉₃ CG TGT CCG GTC GTA TAC	
<i>czcA345-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₅₁₂₆ TT CTT GAC GGT CGC AAT	

Name/Orientierung	Sequenz 5' -> 3' ^{a)}	Bemerkungen
<i>czcA366-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₅₁₈₉ CG GAT GTT ACC CAG GAA	
<i>czcA390-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₅₂₆₁ TT GTA GTT CAC CAT CCC	
<i>czcA419-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₅₃₄₈ CT CAC ACA GTT TTC GAC	
<i>czcA449-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₅₄₃₈ CG CGC CTC CTT CGC TGC	
<i>czcA475-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₅₅₁₆ TT GCC TTC CAC CCC CGT	
<i>czcA510-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₅₆₂₁ CG TTC GCC GAT GAA CAA	
<i>czcA532-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₅₆₈₇ TT TTC CAG CAG CGG CTC	
<i>czcA557-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₅₇₆₂ CG GGC CGC AAT GGC CAC	
<i>czcA673-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₆₁₁₀ CG CAG CTG GAT CGG TTG	
<i>czcA830-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₆₅₈₁ CG GCG CTT GCC GTT CTC	
(GA969)		jeweils PCR mit GA967,
<i>czcA880-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₆₇₃₁ CG GGT GGT GGC GGA CTG	<i>czcA</i>'- <i>XbaI</i> -Ende und
<i>czcA904-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> C ₆₈₀₃ TT GAT GTT GTT GAA CAT	pECD110 als <i>Template</i>
<i>czcA927-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₆₈₇₂ CG TAT CCA CAG GGC AAG	
<i>czcA958-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> T ₆₉₆₅ CG GAT AAA CGA CAG CAT	
<i>czcA980-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₇₀₃₁ CG CAG TCG CGT CAG GGC	
<i>czcA1008-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> A ₇₁₁₅ CG TTG CAC CTC AGC GCC	
<i>czcA1038-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₇₂₀₅ CG GTG AGC AAG TCG ATA	
<i>czcA1060-XbaI</i> -Ende	← AAA <u>TCT AGA</u> G ₇₂₇₁ CG GCC TTG ATC CGG TTG	
<i>czcA1063-XbaI</i> -Ende (GA970)	AAA <u>TCT AGA</u> T ₇₂₈₀ GC AGG CTG GCG GCC TTG	
<i>Yeast Two-Hybrid</i>		
' <i>czcC</i> - <i>EcoRI</i> - <i>NcoI</i> -Start	→ <u>GAA TTC T₁₃₂₆CC ATG GTG CCC GTC TTC</u>	PCR mit ' <i>czcC</i> -Start, ' <i>czcC</i> -Ende und pECD110 als <i>Template</i>
' <i>czcC</i> - <i>SallI</i> -Ende	← <u>GT CGA C₂₄₇₁GT GGT CGC CGC CTG ATA</u>	
' <i>czcB</i> - <i>EcoRI</i> - <i>NcoI</i> -Start	→ <u>GAA TTC TCC ATG G₂₆₆₆GC AAG CAG GCG GCG GAA</u>	PCR mit ' <i>czcB</i> -Start, ' <i>czcB</i> -Ende und pECD110 als <i>Template</i>
' <i>czcB</i> - <i>NotI</i> - <i>XhoI</i> -Ende	← <u>G CGG CCG CCT CGA G₄₀₆₆TG TTC GGC GCT GGA TTT</u>	
' <i>czcAI</i> '- <i>EcoRI</i> - <i>NcoI</i> -Start	→ <u>GAA TTC TCC ATG₄₂₀₅ GTC CCT GAC ATT ACC AA</u>	PCR mit ' <i>czcAI</i> '-Start, ' <i>czcAI</i> '-Ende und pECD110 als <i>Template</i>
' <i>czcAI</i> '- <i>NotI</i> - <i>XhoI</i> -Ende	← <u>G CGG CCG CCT CGA G₅₀₉₉AC CAG ACG TGT CCG GTC</u>	
' <i>czcAII</i> '- <i>EcoRI</i> - <i>NcoI</i> -Start	→ <u>GAA TTC TCC ATG G₅₇₇₂AG TTC ATC CCC AAT CTG</u>	PCR mit ' <i>czcAII</i> '-Start, ' <i>czcAII</i> '-Ende und pECD110 als <i>Template</i>
' <i>czcAII</i> '- <i>NotI</i> - <i>XhoI</i> -Ende	← <u>G CGG CCG CCT CGA G₆₇₃₁CG GGT GGT GGC GGA CTG</u>	

Fortsetzung Tab. 3

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3' ^{a)} Position	Bemerkungen
<i>Primer für Sequenzierungen</i>		
pSos-Primer	→ GCA GCA GGA GCC AAG GAA AAT	Sequenzier-Primer (ABI) für pSos- und pMyr-Konstrukte
pMyr-Primer	→ AAC GTC AAG GAG AAA AAA CCC CG	
F-pBR322-Primer (GA617)	→ F-ATA AAC TAC CGC ATT AAA GC	Fluorescein-markierte Sequenzier-Primer (ALF) für Reportergenfusionen in Set 1 und Set 2 (pBR322-Derivate)
F-pBR322-Primer (GA799)	→ F-AAG CCT ATG CCT ACA GCA TCC	
F-phoA-Primer (GA954)	← F-CGC TAA GAG AAT CAC GCA GA	Fluorescein-markierte Sequenzier-Primer (ALF) für 'phoA-, 'blaM- bzw. 'lacZ- Fusionen
F-lacZ-Primer (GA955)	← F-GCC TCT TCG CTA TTA CGC CA	
F-blaM-Primer (GA956)	← F-GGG GCG AAA ACT CTC AAG GA	
Cy5-phoA-Primer	← Cy5-ATC GCT AAG AGA ATC ACG CAG A	Cy5-markierte Sequenzier-Primer (ALF) für 'phoA- bzw. 'lacZ- Fusionen
Cy5-lacZ-Primer	← Cy5-CTT TCC GGC ACC GCT TCT GG	
Rpr	→ CAG GAA ACA GCT ATG AC	Reverse und Universal Sequenzier-Primer (ABI)
Upr	← CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	
Cy5-Rpr	→ Cy5-CAG GAA ACA GCT ATG AC	Cy5-markierte Reverse und Universal Sequenzier-Primer (ALF) für pUC- und pGEM®-T-Easy-Konstrukte
Cy5-Upr	← Cy5-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	
F-czcCB-Primer	→ F-T ₂₄₁₂ TC CAG GCA CGC ATC CGC TA	Fluorescein-markierter Sequenzier-Primer (ALF) für <i>czcB</i> - Fusionen; bindet in <i>czcC</i>

a) Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die teilweise neu eingeführt wurden, sind unterstrichen dargestellt. Tiefergestellte Ziffern kennzeichnen die Basenposition in der Sequenz der *czc*-Determinante (EMBL-Datenbank: X98451).

3.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von Transformanden (Kolonie-PCR).

Für präparative Zwecke wurde eine Polymerase mit 3'-5'-*proof-reading*-Aktivität [*Pwo* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)] oder das *Taq/Pwo*-Gemisch [*Expand™ Long Template PCR System* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)] eingesetzt. In diesem Fall diente gereinigte DNA als *Template* für die Reaktion.

Zur Analyse wurde *Taq*-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Es wurden entweder frisches Koloniematerial (Kolonie-PCR) oder gereinigtes Plasmid als *Template* verwendet. Die Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher vom Agar in steriles

H₂O bidest. überführt. Dabei konnten nach Bedarf Poole von maximal 10 verschiedenen Klonen gebildet werden. Nach Zellaufschluß durch Erhitzen für ca. 3 min auf 96 °C und anschließender Zentrifugation konnte der Überstand als *Template* eingesetzt werden und ersetzte im Ansatz das sonst eingesetzte DNA-*Template* und das Wasser. Für analytische Zwecke waren Reaktionsansätze von 25 µl Gesamtvolumen ausreichend.

Reaktionsansatz: 5 µl 10x PCR-Puffer
 3-6 µl 25 mM Mg²⁺-Stammlösung
 1 µl 20 mM dNTP-Mix
 2 µl *Primer* 1 (10 pmol/µl)
 2 µl *Primer* 2 (10 pmol/µl)
 1 µl *Template*-DNA (ca. 100 ng/µl)
 ad 50 µl steriles H₂O bidest.

Der Zusatz von Mg²⁺-Stammlösung erübrigte sich bei Verwendung von 10x PCR-Puffern mit Mg²⁺. Der Ansatz wurde gemischt und nach kurzer Zentrifugation zum Schutz vor Verdunstung mit einem Tropfen Mineralöl (ca. 30 µl) überschichtet.

Die Ansätze wurden im *Trio*- bzw. *Uno*-Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen) plaziert und als *Hot-Start*-Reaktionen mit folgendem Programm betrieben:

- | | | | |
|----|---|----------|---------------------------------|
| 1. | 5 min | 96 °C | <i>Hot-Start</i> |
| | Zugabe von 0.3-2 U Polymerase (Mineralölschicht mit Pipettenspitze durchstoßen) | | |
| 2. | 15 s | 96 °C | Denaturierung |
| 3. | 30 s | x °C | <i>Annealing</i> |
| 4. | 1 min/kb | 68/72 °C | <i>Extension (Pwo/Taq)</i> |
| | Schritte 2 bis 4: 20-30 Zyklen | | |
| 5. | 3 min | 68/72 °C | Nachsynthese (<i>Pwo/Taq</i>) |
| 6. | Pause | 4 °C | |

Das Protokoll wurde dem jeweiligen *Primer*-Paar (*Annealing*-Temperatur), dem *Template* (*Extension*-Zeit) sowie der verwendeten Polymerase (*Extension*-Temperatur: 68/72 °C) angepaßt. Beim Einsatz von *Pwo* bzw. *Pwo/Taq*-Gemischen wurde in der zweiten Hälfte der Zyklen die *Extension*-Zeit je Zyklus um 5-10 s erhöht. Bei der Synthese kleiner PCR-Produkte von bis zu 300 bp Länge wurde auf den Schritt *Extension* verzichtet (Zwei-Schritt-PCR).

3.3.3. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem *QIAquick PCR Purification Protocol* (QIAGEN GmbH, Hilden) oder dem *Wizard™ PCR Preps DNA Purification System* [Promega, Madison (USA)].

3.4. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurden durch enzymatische Synthese unterschiedlich lange, markierte, komplementäre Kopien des zu sequenzierenden Matrizenstranges erstellt. Durch den zufälligen Einbau eines ddNTPs wurde die Synthese an dieser Stelle abgebrochen.

3.4.1. Sequenzierung mit dem *SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™* [Epicentre Technologies, Madison (USA)]

Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von Cy5-markierten *Primern* (Tab. 3).

Zuerst wurde auf Eis ein *Premix* pipettiert:

- 7.2 µl *SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer*
- 2.0 µl Cy5-markierter *Primer* (2 pmol)
- x µl *Template-DNA* (250 fmol)
- ad 16 µl steriles H₂O bidest.
- 1.0 µl *SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase* (5 U/µl)

Der *Premix* wurde gemischt und auf Eis gelagert. Vier 0.5 µl-PCR-Gefäße wurden mit A, C, G und T beschriftet. Dann wurden je 2 µl *SequiTherm EXCEL II Long-Read Termination Mix* A, C, G, T in die entsprechenden Ansätze pipettiert und je 4 µl *Premix* hinzugegeben.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem *Uno*-Thermoblock mit Deckelheizung (Biometra GmbH, Göttingen) nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

- | | | | |
|-------------------|-------|-----------|------------------|
| 1. | 5 min | 95 °C | Denaturierung |
| 2. | 30 s | 95 °C | Denaturierung |
| 3. | 15 s | 50 °C | <i>Annealing</i> |
| 4. | 60 s | 70 °C | <i>Extension</i> |
| Schritte 2 bis 4: | | 30 Zyklen | |
| 5. | Pause | 4 °C | |

Nach Abschluß der Sequenzierung wurde jeder Reaktion 3 µl Stopp-Lösung (5 mg Dextranblau/ml 95 % Formamid) zugesetzt. Bis zur Auftragung auf das Sequenziergel erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

3.4.2. Sequenzierung unter Verwendung des *dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits* (Perkin-Elmer, Weiterstadt) am *ABI377 Vers. 4.0*

Für die im *Trio*-Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführte Reaktion wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

- 2 µl Plasmid-DNA (0.5 µg)
- 1 µl *Primer* (ca. 10 pmol)
- 2 µl *ABI-Sequencing-Mix*
- ad 10 µl H₂O bidest.

Die Ansätze wurden zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet und die Polymerase-Reaktion gestartet:

- | | | | |
|-------------------|-------|-----------|---|
| 1. | 1 min | 95 °C | Denaturierung |
| 2. | 30 s | 95 °C | Denaturierung |
| 3. | 30 s | 46-60 °C | <i>Annealing</i> (je nach <i>Primer</i>) |
| 4. | 2 min | 60 °C | <i>Extension</i> |
| Schritte 2 bis 4: | | 33 Zyklen | |
| 5. | Pause | 4 °C | |

Nach Ende des Programms wurde die wäßrige Unterphase abgenommen und restliches Mineralöl durch Adhäsion an einen schräg gelegten Streifen Parafilm entfernt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl 96 % (v/v) Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (RT, 14000 rpm, 20 min) und Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Es war bei -20 °C einige Tage stabil. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 4 µl Gelpuffer (Gemisch aus 5 Vol. Formamid und 1 Vol. 25 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen und 2 min bei 90 °C denaturiert. Die Auftrennung der Sequenzierungen erfolgte auf einem Gel am ABI377.

3.4.3. Sequenzierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des *AutoRead™ Sequencing Kits* (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg)

10 µl *Template*-DNA (ca. 5-10 µg) wurden mit 2 µl des Fluorescein-markierten *Primers* (ca. 4-6 pmol) und 1.5 µl einer 1 M Natronlauge versetzt. Der Ansatz wurde leicht gemischt, kurz zentrifugiert und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf 37 °C erfolgte die Zugabe von 1.5 µl 1 M HCl und von 2 µl *Annealing Buffer*. Dann wurde der Ansatz erst 10 min bei 37 °C und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 1 µl *Extension Buffer* und 3.5 µl DMSO.

In Vorbereitung der Sequenzreaktion wurden je 2.5 µl der Nukleotidgemische für die vier unterschiedlichen Reaktionen (A-, C-, G-, bzw. T-Mix) in vier Fächer einer Mikrotiterplatte gegeben. Die T7-DNA-Polymerase wurde auf 3-4 U/µl in *Enzyme Dilution Buffer* verdünnt. Dem *Annealing*-Ansatz wurden dann 2 µl der verdünnten Enzymlösung zugesetzt. Je 4.5 µl dieses Gemisches wurden in die auf 37 °C vorgewärmten Nukleotidgemische gegeben. Die folgende Inkubation der vier Ansätze von 5 min bei 37 °C wurde durch Zugabe von je 5 µl Stopp-Lösung beendet. Nach einer Denaturierung der Proben ca. 2-3 min bei 90 °C und einer Abkühlung auf Eis konnte die Auftragung von 4-6 µl je Reaktion auf das denaturierende Sequenziergel erfolgen.

3.4.4. Das Sequenziergel

Die Sequenzreaktionen (von 3.4.1. und 3.4.3.) wurden am *Automated Laser Fluorescent A.L.F.TM DNA-Sequencer* (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg) in einem denaturierenden 7 %igem Harnstoff-PAA-Gel in 1x TBE als Laufpuffer [10x TBE: 0.89 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.89 M Borsäure; 20 mM EDTA] aufgetrennt.

Das verwendete Gel hatte folgende Zusammensetzung:

18.9 g	Harnstoff, <i>A.L.F. grade</i> (Pharmacia, Freiburg)
5.5 ml	<i>Long Ranger Gel Solution 50 %</i> [FMC BioProducts, Rockland (USA)]
5.0 ml	10x TBE-Puffer
ad 45 ml	H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde durch einen Filter der Porengröße 0.2 µm vakuumfiltriert und entgast. Nach Zugabe von 225 µl 10 % (w/v) APS und 22.5 µl TEMED wurde das Gel gegossen. Die Polymerisation dauerte ca. 1h.

Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben 3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Folgende Bedingungen galten während des Laufes:

Vorlaufzeit:	30 min
Laufzeit:	600 min
	800 V, 45 mA, 30 W, 45 °C

3.4.5. Auswertung von Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des *A.L.F.TM-Manager* Vers. 2.5 bzw. des *A.L.F.winTM-Manager* Vers. 1.10 (Pharmacia, Freiburg). Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Programmen *Clone Manager* Vers. 4.0 [Scientific & Educational Software (USA)] und *DNASIS* Vers. 5.0 ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken *EMBL* und *SWISS-PROT* enthaltenen DNA- und Protein-Sequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information (NCBI)* im Internet bereitgestellten Programm *Basic Logic Alignment Search Tool - BLAST* (Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem im Internet verfügbaren Programm *Clustal W* Vers. 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) vom *European Biotechnology Institut (EBI)* erstellt. Die Bestimmung von Sequenz-Motiven in Proteinen, die Errechnung von Molekulargewichten anhand der Aminosäuresequenzen und die Erstellung von Hydrophathie-Plots erfolgte mit den Internet-Programmen *Simple Modular Architecture Research Tool - SMART* Vers. 3.1 (Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000), *Scan Prosite* (Hofmann *et al.*, 1999), *Profile Scan*, *Compute pI/Mw ExPASy* (Wilkins *et al.*, 1998) und *ProtScale* (Kyte & Doolittle, 1982) des *ExPASy Molecular Biology Server* [Institut für Bioinformatik, Genf (Schweiz)]. Mit dem Programm *PHDseq* Vers. 1.96 (Rost & Sander, 1993) wurde die Sekundärstruktur von Proteinen vorhergesagt.

Vorhersagen zur Membrantopologie wurden mit den Programmen *SOAP* (Kyte & Doolittle, 1982; Klein *et al.*, 1985), *Helixmem* (Eisenberg *et al.*, 1984) und *RaoArgos* (Rao & Argos, 1986) des *PC/GENE[®] Software Package* [Intelligenetics Inc. (USA)] erstellt. Des Weiteren wurde die im Internet über den *Expasy Molecular Biology Server* [Institut für Bioinformatik, Genf (Schweiz)] verfügbare Software *Toppred* Vers. 2.0 (von Heijne, 1992), *TMAP* Ausgabe 52 (Persson & Argos, 1994; Persson & Argos, 1996), *TMHMM* Vers. 1.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998), *SOSUI* Vers. 1.0 (Hirokawa *et al.*, 1998), *HMMTOP* Vers. 1.1 (Tusnády & Simon, 1998), *DAS* (Cserzo M. *et al.*, 1997), *Tmpred* (Hofmann & Stoffel, 1993) und *PHDhtm* Vers. 1.96 (Rost *et al.*, 1995; Rost *et al.*, 1996) zur Vorhersage der Topologie genutzt.

4. Versuche zum Zellwachstums

4.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien

4.1.1. Das *Klett-Summerson-Colorimeter* [Klett MFG Co., New York (USA)]

Das Gerät diente der Messung der Optischen Dichte wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Es wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, der im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) die größte Lichtausbeute liefert. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde unbeimpftes Medium (Nullwert) verwendet. Aus den erhaltenen Klett-Einheiten (KE) konnte unter Verwendung eines auf einer Eichkurve basierenden Programms das Zelltrockengewicht bzw. die Konzentration der Zellsuspension ermittelt werden (Schwuchow, 1995).

Der Vorteil dieser Methode bestand darin, daß durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Kultivierung der Bakterien keine Probennahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

4.1.2. Zellanzucht von *R. metallidurans*-Stämmen bei Wachstumsversuchen

Die Versuche wurden in Tris-gepuffertem Minimalmedium mit 0.2 % (w/v) Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle und $ZnCl_2$ unterschiedlicher Konzentration durchgeführt.

Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und im Inkubationsschüttler bei 30 °C und 140 rpm bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert (ca. 48 h). Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten 100 ml-Erlenmeyerkolben.

Für die Anzucht der Hauptkultur wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 20 ml Tris-Minimalmedium [0.2 % (w/v) Natriumgluconat, $ZnCl_2$] mit der entsprechenden Vorkultur ca. 1 %ig beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 30 °C unter

ständigem Schütteln in einem *Gyrotory*-Wasserbad oder im 30 °C Brutraum inkubiert. Das Zellwachstum wurde mit dem *Klett-Summerson-Colorimeter* verfolgt.

4.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Schwermetallsalzen

Als MIC wird die niedrigste Metallkonzentration bezeichnet, bei der ein Stamm kein Wachstum mehr zeigt.

Die Ermittlung der MIC erfolgte bei *R. metallidurans*-Stämmen auf Tris-Minimal-Agar (Mergeay *et al.*, 1985). Es wurden Platten mit steigender Konzentration an Schwermetallsalzen gegossen. Die Stämme wurden Vorkulturen entnommen, auf den Platten in Sektoren ausgestrichen und bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert.

Bei *E. coli*-Stämmen wurde die MIC auf LB-Agarplatten unterschiedlicher Metallkonzentrationen bestimmt (Rensing *et al.*, 1997b). Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 30/37 °C.

5. Enzymologische Methoden

5.1. Untersuchungen zur Topologie und zur Lokalisation der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes mittels Translationsfusionen mit Reporterproteinen unter Kontrolle des T7-Promotors (nach Rensing *et al.*, 1997a)

Als Reporterproteine genutzte Enzyme wie die β -Galaktosidase und die Alkalische Phosphatase zeichneten sich dadurch aus, daß ihre enzymatische Aktivität ein bestimmtes Milieu erforderte, das nur in für sie spezifischen Kompartimenten der Zelle gegeben war. Diesen Aspekt nutzte diese Methode, indem man im Reporterprotein vorhandene native Signale für Transport oder Lokalisation deletierte und es dann mit dem zu untersuchenden Protein fusionierte. Die Enzymaktivität des Reporters war somit ausschließlich abhängig von den topologischen Signalen in der vorgeschalteten Sequenz des zu untersuchenden Proteins.

5.1.1. Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen für Enzymtests

Vorkulturen der *E. coli* CC118(pGP1-2)-Stämme mit den für die Reporterfusionen kodierenden Plasmiden wurden über Nacht bei 30 °C in LB-Medium mit Antibiotika (je nach Derivat Kan/Amp oder Kan/Tet) unter Schütteln angezogen. Mit den Vorkulturen wurden 20 ml-Hauptkulturen 2-3 %ig beimpft und ca. 2 h bei 30 °C in einem *Gyrotory*-Wasserbad oder im Brutraum schüttelnd inkubiert. Durch Hitzeinduktion bei 42°C für 20 min wurde die Expression der von pGP1-2 kodierten T7-RNA-Polymerase ermöglicht, die dann ihrerseits die Expression des unter T7-Kontrolle stehenden Fusionsproteins initiierte. Nach weiterem Wachstum von 1 h bei 37 °C bis zu einer Optischen Dichte von ca. 100 KE erfolgte

unmittelbar vor der Ernte der Kulturen die genaue Bestimmung der individuellen Zelldichte mit dem *Klett-Summerson-Colorimeter*, die für die spätere Berechnung der spezifischen Enzymaktivität notwendig war.

5.1.2. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität von Fusionsproteinen permeabilisierter Zellen (verändert nach Miller, 1972; Ullmann, 1984)

Die untersuchten Proteine bzw. Proteinabschnitte wurden C-terminal mit der β -Galaktosidase (LacZ) fusioniert. Für die Enzymaktivität der β -Galaktosidase war das Verbleiben im Cytoplasma notwendig. Eine aktive β -Galaktosidase-Domäne lag im Fusionsprotein also nur vor, wenn kein Transport des untersuchten Proteins im Bereich der Fusionsposition erfolgte.

Für den Enzymtest wurden 1 ml Hauptkultur (siehe 5.1.1.) in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, und die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 4 °C, 12000 rpm) in der *Sigma 2K15* (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Das Pellet wurde in 950 μ l Z-Puffer [0.6 M Na_2HPO_4 ; 0.4 M NaH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 0.5 M Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50 μ l Permeabilisierungspuffer [0.25 % (w/v) CTAB; 0.5 % (w/v) Natriumdesoxycholat] permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Substratlösung [0.4 % (w/v) ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz kurz gemischt und bis zur Gelbfärbung bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des Substrates ONPG zu o-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt und die Reaktionszeit notiert. Natriumcarbonat erhöhte den pH-Wert im Reaktionsansatz auf 11, wodurch die β -Galaktosidase inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde ca. 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (*UVIKON 922*, Kontron Instruments GmbH, Neufahrn) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Mit Hilfe der Extinktion (E_{420}) und der Reaktionszeit (Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion) konnte die Enzymaktivität (in U/ml Kultur) nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = 355.6 * E_{420} / \text{Reaktionszeit}$$

Dabei ist hier 1 U als Substratumsatz in nmol pro min bei 30 °C definiert. Der Faktor 355.6 setzt sich zusammen aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von o-Nitrophenol ($\epsilon = 4500 \text{ l/mol*cm}$), der Schichtdicke der Küvette ($d = 1 \text{ cm}$), dem Korrekturfaktor von eingesetztem Kulturvolumen (1 ml) zum Volumen des Reaktionsansatzes (1.6 ml) von 1.6 und dem Umrechnungsfaktor 10^6 für die Einheit nmol pro min.

Die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase (in U/mg Zelltrockengewicht) wurde durch Division der errechneten Aktivität durch die Zelltrockenmasse von 1 ml Kultur bestimmt, dabei wurde die Zelltrockenmasse aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet.

5.1.3. Bestimmung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität von Fusionsproteinen permeabilisierter Zellen (verändert nach Manoil, 1991)

Die untersuchten Proteine bzw. Proteinabschnitte wurden C-terminal mit der Alkalischen Phosphatase ohne native Signalsequenz ('PhoA) fusioniert. Für die Enzymaktivität von 'PhoA war der Transport ins Periplasma notwendig. Eine aktive Alkalische-Phosphatase-Domäne lag im Fusionsprotein also nur vor, wenn die Translokation des untersuchten Proteins im Bereich der Fusionsposition ins Periplasma erfolgte.

Es wurden 1 ml Hauptkultur (5.1.1.) in ein Eppendorf-Gefäß überführt, und die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 4 °C, 12000 rpm) in der *Sigma 2K15* (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 0.5 ml Waschpuffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM MgSO₄ und 1 mM Jodacetamid (Derman & Beckwith, 1995; nach dem Autoklavieren zugegeben)] resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 1 ml Assay-Puffer [1 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mM ZnCl₂ und 1 mM Jodacetamid (nach dem Autoklavieren zugegeben)] resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 50 μ l 0.1 % (w/v) SDS und 50 μ l Chloroform permeabilisiert. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz 5 min bei 37 °C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l Substratlösung [1 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.4 % (w/v) para-Nitrophenylphosphat (PNPP), frisch hergestellt] und kurzem Mischen gestartet. Die Zeit bis zur Gelbfärbung der Probe durch Nitrophenolbildung bei 37 °C im Wasserbad wurde bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von 120 μ l Stopp-Mix [1 M KH₂PO₄ (5 Teile); 0.5 M EDTA, pH 8.0 (1 Teil)] und Inkubation auf Eis beendet. Die Zellen wurden 4 min bei 4 °C und 12000 rpm pelletiert, der Überstand vorsichtig in eine Küvette gegossen und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (*UVIKON 922*, Kontron Instruments GmbH, Neufahrn) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Die Bestimmung der Enzymaktivität (in U/ml Kultur) erfolgte mit Hilfe der Extinktion (E_{420}) und der Reaktionszeit (Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion) nach folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = 72.1 * E_{420} / \text{Reaktionszeit}$$

Dabei ist hier 1 U als nmol gebildetes p-Nitrophenol pro min bei 37 °C definiert. Der Faktor 72.1 setzt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol ($\epsilon = 18300 \text{ l/mol*cm}$), der Schichtdicke der Küvette ($d = 1 \text{ cm}$), dem Korrekturfaktor von

eingesetztem Kulturvolumen (1 ml) zum Volumen des Reaktionsansatzes (1.32 ml) von 1.32 und dem Umrechnungsfaktor 10^6 für die Einheit nmol pro min zusammen.

Die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase (in U/mg Zelltrockengewicht) wurde durch Division der errechneten Aktivität durch die Zelltrockenmasse von 1 ml Kultur bestimmt. Die Zelltrockenmasse wurde aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet.

6. Proteinchemische Methoden

6.1. Analytische T7-Expression und radioaktive Markierung von Proteinen mit [35 S]-Methionin (Tabor & Richardson, 1985; Tabor, 1990)

Die Anzucht der Vorkulturen von *E. coli* K38(pGP1-2) mit verschiedenen Konstrukten erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 30 °C in LB-Medium mit Antibiotika (je nach Plasmid Kan/Amp oder Kan/Tet). Die 15 ml-Hauptkultur wurde 2-3 %ig aus der Übernachtskultur beimpft. Das Wachstum der Hauptkulturen wurde bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von ca. 75 KE verfolgt und die Zelltrockenmasse aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet. Anschließend wurden 0.5 ml Hauptkultur [ca. 100 µg Zellen bei 75 KE] 1 min bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen zentrifugiert. Bei abweichender Zelldichte wurden äquivalente Zellmengen eingesetzt. Das Pellet wurde mit 2x 0.5 ml M9-Puffer [0.25 M Na_2HPO_4 ; 0.1 M KH_2PO_4 ; 0.05 M NaCl; 0.1 M NH_4Cl] gewaschen und anschließend in 1 ml M19-Medium [2 mM MgSO_4 ; 0.1 mM CaCl_2 ; 0.4 % (w/v) Glucose; Thiamin (20 µg/ml); 0.01 % (w/v) jeder Aminosäure (außer Met und Cys) in M9-Puffer] resuspendiert.

Die Kulturen wurden auf einem Schüttler (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) 2 h bei 30 °C inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Hitzeinduktion bei 42 °C für 20 min zur Dereprimierung der von pGP1-2 kodierten T7-RNA-Polymerase. Durch Zugabe von 10 µl Rifampicin [20 mg/ml Methanol] wurden prokaryotische RNA-Polymerasen inaktiviert, so daß lediglich Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors standen, durch die verbliebene T7-RNA-Polymerase transkribiert werden konnten. Die Zellen wurden weitere 10 min bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurden die Kulturen auf 30 °C abgekühlt und weitere 20 min geschüttelt.

Es wurden 5 µCi [35 S]-Methionin pro Ansatz für eine Markierung der Proteine eingesetzt. Um einen effektiven Einbau des radioaktiv markierten Methionins zu gewährleisten, wurden die Kulturen 5 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (4 °C; 12000 rpm; 1 min) in der Sigma-Tischzentrifuge. Zum Zellaufschluß wurde das Pellet in 40 µl 1x *Cracking*-Puffer [1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2 mM EDTA; 0.01 % (w/v) BPB; 10 % (w/v) Saccharose] aufgenommen und

anschließend 3-5 min auf 95 °C erhitzt. Eine Zelltrümmersedimentation wurde 1 min bei 4 °C und 12000 rpm durchgeführt.

Es wurden 15 µl Überstand auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und die Proteine wie unter 6.9.1. aufgetrennt. Es schloß sich eine unter 6.12. beschriebene Autoradiographie an.

6.2. Fraktionierung ganzer Zellen in ihre Kompartimente zur Untersuchung der Lokalisation der radioaktiv markierten Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes

Nach heterologer Expression der Efflux-Komponenten in *E. coli* K38(pGP1-2) und radioaktiver Markierung schloß sich eine Auftrennung der Zellen in ihre Kompartimente an. Neben Periplasma und Cytoplasma als hydrophile Kompartimente wurden auch die Membranen präpariert. Die Membranfraktion wurde mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation in Cytoplasmamembran und Äußere Membran getrennt. Die Proben wurden in linearen SDS-PAA-Gelen (12.5 %ig) aufgetrennt (6.9.1.) und mittels Fluorographie detektiert (6.12.2.).

6.2.1. T7-Expression und radioaktive Markierung der Proteine im präparativen Maßstab (Tabor & Richardson, 1985; Tabor, 1990)

Das Vorgehen entsprach dem unter 6.1. beschriebenen Protokoll mit folgenden Änderungen: Es wurde die komplette Hauptkultur [ca. 3 mg Zellen bei 75 KE; äquivalente Zellmengen eingesetzt] in sterile Greiner-Gefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation in der *Universal RF* (4 °C; 4500 rpm; 10 min; Hettich GmbH, Tuttlingen) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 2x 5 ml M9-Puffer gewaschen und anschließend in 20 ml M19-Medium resuspendiert. Nach der Hitzeinduktion wurden 0.2 ml Rifampicin [20 mg/ml Methanol] zugegeben. Die Markierung der Proteine erfolgte mit 50 µCi [³⁵S]-Methionin. Die Kultur wurde anschließend geteilt. In der Sigma-Tischzentrifuge (4 °C; 12000 rpm; 1 min) wurden die Zellen von 1.5 ml Kultur im Eppendorf-Gefäß sedimentiert und einem osmotischen Schock (6.2.2.) unterzogen. Die restliche Kultur wurde in der Hettich-Zentrifuge (4 °C; 4500 rpm; 10 min) geerntet und nach 6.2.3. weiterbehandelt.

6.2.2. Präparation der Periplasma-Fraktion (in Anlehnung an *The QIAexpressionist*; QIAGEN GmbH, Hilden)

Das Periplasma wurde mittels osmotischen Schock isoliert.

Das Zellpellet (6.2.1.) wurde in 0.2 ml Puffer [30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 20 % (w/v) Saccharose] resuspendiert und der Ansatz 5-10 min bei RT auf einem Schüttler (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C; 9000 rpm; 10 min) in der Kühlzentrifuge *5417 R* (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) sedimentiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde

in 0.2 ml 5 mM MgSO₄ resuspendiert und der Ansatz 10 min auf Eis geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (4 °C; 9000 rpm; 10 min) entsprach der Überstand dem periplasmatischen Extrakt. Die Proteine wurden wie unter 6.7. gefällt und in 15 µl 1x *Cracking*-Puffer [1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2 mM EDTA; 0.01 % (w/v) BPB; 10 % (w/v) Saccharose] aufgenommen.

6.2.3. Ultraschallaufschluß und Präparation der Cytoplasma-Fraktion und der unlöslichen Protein-Fraktion (in Anlehnung an *The QIAexpressionist*; QIAGEN GmbH, Hilden)

Die Zellen (6.2.1.) wurden in 0.9 ml Ultraschall-Puffer [50 mM Natriumphosphat, pH 7.8; 0.3 M NaCl; 10 µg/ml DNase I; 1 mM PMSF] aufgenommen und der Ansatz auf Ethanol/Trockeneis eingefroren und in kaltem Wasser wieder aufgetaut. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW 60) 90 s bei maximaler Leistung (60 W) und 50 % Zyklus unter Kühlung aufgeschlossen. Für die unter 6.2.4. beschriebene Trennung der Membranen wurden 0.8 ml Lysat entnommen. Die restlichen 0.1 ml Lysat wurden in der Kühlzentrifuge *5417 R* (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) zentrifugiert (4 °C; 10000 rpm; 20 min). Der Überstand entsprach der löslichen Fraktion (Cytoplasma), das Pellet der unlöslichen Protein-Fraktion (Membranen und Zelltrümmer). Die Cytoplasma-Proteine wurden wie unter 6.7. gefällt. Beide Proteinpellets wurden in 15 µl 1x *Cracking*-Puffer resuspendiert.

6.2.4. Präparation der Membranen und isopyknische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zur Trennung von Cytoplasmamembran und Äußerer Membran (verändert nach de Maagd & Lugtenberg, 1986; Osborn *et al.*, 1972; Ishidate *et al.*, 1986)

Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die 0.8 ml Lysat (6.2.3.) in der Kühlzentrifuge *5417 R* (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) zentrifugiert (4 °C; 10000 rpm; 10 min). Der Überstand (Rohextrakt) wurde anschließend 1 h bei 100000x g und 4 °C zur Präparation der Membranen ultrazentrifugiert [33000 rpm, *SW 55 Ti*-Rotor, Ultrazentrifuge *L8-60M*; Beckman Instruments, Inc. (USA)]. Das Membranpellet wurde in 0.2-0.3 ml Saccharose-Lösung [30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 25 % (w/w) Saccharose] resuspendiert und vorsichtig auf einen frisch geschichteten diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten folgender Zusammensetzung aufgetragen:

	oben	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	unten
Saccharose % (w/w):	25	30	35	40	45	50	55	60									
Volumen der Schicht (in ml):	0.59	0.78	0.78	0.78	0.59	0.59	0.19	0.19									
Gesamtvolumen (in ml):	4.5																

Die unterschiedlich konzentrierten Saccharose-Lösungen wurden aus einer Saccharose-Stammlösung [30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 66 % (w/w) Saccharose] und 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) hergestellt.

Anschließend wurde 17 h im *SW 55 Ti*-Rotor bei ca. 58000x g (25000 rpm) und 4 °C ultrazentrifugiert. Nach dieser Zeit war die Isopyknie erreicht. Die Probenpartikel waren in den Gradienten gewandert und hatten entsprechend ihrer Dichte unterschiedliche Positionen im Gradienten angenommen. Die Partikeldichte korrelierte nach der Zentrifugation mit der Dichte der umgebenden Saccharose-Lösung.

Die Fraktionierung des Gradienten bei gleichzeitiger Aufzeichnung von $A_{280\text{ nm}}$ erfolgte bei 4 °C mit dem *HiLoadTM*-System, bestehend aus Steuereinheit *GP-10*, Peristaltikpumpe *P-1*, *Uvicord S II* und Fraktionssammler *RediFrac* (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg). Die Aufzeichnung des Gradientenprofils erfolgte mit dem Flachbrettschreiber *REC 101* derselben Firma. Mit einer speziell dafür angefertigten Apparatur wurden ca. 10 Fraktionen von 0.5 ml Volumen bei einem Fluß von 0.5 ml/min gesammelt. Begonnen wurde das Abpumpen des Gradienten mit der dichtesten Fraktion vom Boden des Röhrchens her.

Die Proteine der Fraktionen wurden gefällt (6.7.) und in 15 µl 1x *Cracking*-Puffer resuspendiert.

6.3. Präparation von nativen Membranprotein-Komplexen für die *Blue Native Gradienten-PAGE* (verändert nach Schägger & von Jagow, 1991)

Nach Induktion des Efflux-Komplexes in *R. metallidurans* AE128 mit 0.5 mM ZnCl₂ wurden die Membranen präpariert. Die mit DNase I behandelten Membranen wurden anschließend zur Solubilisierung der Membranproteine mit N-Laurylsarcosin eingesetzt. Dem Nachweis der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes im Solubilisat mittels Westernblot nach SDS-PAGE schloß sich ein Westernblot nach *Blue Native-PAGE* zum Nachweis des Proteinkomplexes im Solubilisat an. Bei der Präparation der Proteinkomplexe wurde BisTris-Puffer verwendet.

6.3.1. Zellernte, Zellaufschluß und Präparation der Membran-Fraktion

Die Anzucht der *R. metallidurans*-Stämme erfolgte wie unter 4.1.2. beschrieben, induziert mit 0.5 mM ZnCl₂. Die Zellernte erfolgte am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (ca. >200 KE). Zur Berechnung des Trockengewichts (TG) wurde die Optische Dichte der Kultur in KE bestimmt. Die Zellen wurden bei 4500x g, 4 °C und 15 min entweder in der *Hettich Universal RF* bei 5000 rpm (Hettich GmbH, Tuttlingen) oder bei 6000 rpm im *GS3*-Rotor der *Sorvall RC 5B plus* (Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) sedimentiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte auf Eis in BisTris-Membranpuffer (10 mM BisTris-HCl,

pH 7.0; 5 mM MgCl₂) mit 0.5-1 mM PMSF (100 mM Stammlösung in Isopropanol) und 20-100 µg/ml DNase I (10 mg/ml). Die Zellsuspension (ca. 0.3 g Zellen pro ml Puffer) wurde in der vorgekühlten Minizelle einer *French*-Presse (Aminco, SLM Instruments, Inc., USA) bei 2000 psi (140 kg/cm²) in 2-3 Passagen aufgeschlossen. Alternativ wurde für kleine Zellmengen (ca. 30 mg Zellen pro ml Puffer) der Aufschluß mit Ultraschall ca. 10 min bei maximaler Leistung (60 W) und 50 % Zyklus (Uniequip Laborgerätebau UW 60) angewandt. Nach der Sedimentation der Zelltrümmer 10 min bei 4 °C und 10000 rpm in der Kühlzentrifuge *5417 R* (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) wurde der Überstand (Rohextrakt) zur Präparation der Membranen 1 h bei 200000x g ultrazentrifugiert [45000 rpm, *SW 55 Ti*-Rotor, Ultrazentrifuge *L8-60M*; Beckman Instruments, Inc. (USA)]. Die Rohmembranen wurden wieder in BisTris-Membranpuffer mit 0.5-1 mM PMSF und 20-100 µg/ml DNase I aufgenommen und 1 h bei RT inkubiert. Die extensive DNase I-Behandlung war nötig, um ein Verstopfen der Poren des Sammelgels durch DNA zu verhindern. Durch erneute Ultrazentrifugation 30 min bei 100000x g im *SW 55 Ti*-Rotor (33000 rpm) wurden die Membranen sedimentiert.

6.3.2. Solubilisierung der Proteine der Membran-Fraktion

Die Membranen (6.3.1.) wurden in BisTris-Solubilisierungspuffer (50 mM BisTris-HCl, pH 7.0; 0.5 M 6-Aminocapronsäure) aufgenommen und der Proteingehalt bestimmt (6.6.). Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte mit 2 % (w/v) N-Laurylsarcosin als Detergenz im Puffer 1 h unter Rühren auf Eis. Durch Ultrazentrifugation 20 min bei 100000x g im *SW 55 Ti*-Rotor (33000 rpm) wurden die Membranen sedimentiert. Der Proteingehalt im Überstand (Solubilisat) wurde bestimmt (6.6.).

6.4. Analytisches *In vivo*-Crosslinking von radioaktiv markierten bzw. nichtmarkierten Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes mit Formaldehyd (verändert nach Prossnitz *et al.*, 1988 ; Skare *et al.*, 1993)

Nach Induktion des Efflux-Komplexes in *R. metallidurans* AE128 mit 0.3 mM ZnCl₂ oder nach heterologer T7-Expression der Efflux-Komponenten in *E. coli* K38(pGP1-2) mit optionaler radioaktiver Markierung wurde ein *In vivo*-Crosslinking in intakten Zellen mit Formaldehyd durchgeführt. Formaldehyd führte durch Reaktion mit Arg-, His-, Lys-, Trp- und Tyr-Resten zur Ausbildung von Methylenbrücken verschiedener Länge zwischen den Untereinheiten eines Proteinkomplexes. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und in linearen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt (6.9.1.) und mittels Westernblot (6.10.) bzw. Fluorographie (6.12.2.) detektiert. Die Proben wurden vor Auftragung auf die Gele nur bei gewünschter Aufspaltung der Verknüpfungen erhitzt.

6.4.1. Zellanzucht von *E. coli* und *R. metallidurans* für *In vivo*-Crosslinking

Die Anzucht von *E. coli* K38(pGP1-2) mit verschiedenen Konstrukten erfolgte wie unter 6.1. mit den hier genannten Änderungen. Das Wachstum vor Hitzeinduktion bei 30 °C erfolgte bis ca. 90 KE. Nach Hitzeinduktion wuchsen die Kulturen bis ca. 250 KE bei 37 °C (ca. 2 h).

Bei radioaktiver Markierung der Proteine in *E. coli* K38(pGP1-2) wurde ein Protokoll ähnlich dem unter 6.2.1. angewandt.

R. metallidurans-Stämme wurden wie unter 4.1.2. mit 0.3 mM ZnCl₂ induziert angezogen. Die Zellernte erfolgte am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (ca. >200 KE).

6.4.2. Crosslinking in intakten Zellen

Es wurden jeweils ca. 1 mg Zellen durch Zentrifugation [12000 rpm; 4 °C; 1 min] für die Kontrolle ohne Formaldehyd und Ansätze mit 0.1, 0.5 und 1 % (v/v) Formaldehyd geerntet und die Zellpellets in 0.5 ml eiskaltem 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8) gewaschen. Die Zellen (1 mg) wurden in ca. 1.36 ml desselben Puffers mit Formaldehyd resuspendiert (Zelldichte von ca. 250 KE eingestellt) und ohne Schütteln ca. 2 h bei RT inkubiert.

Alternativ wurden die Kulturen komplett sedimentiert [12000 rpm; 4 °C; 1 min] und in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8) gewaschen. Die Pellets wurden im selben Puffer mit 1 % (v/v) Formaldehyd resuspendiert (Zelldichte von ca. 250 KE eingestellt) und ohne Schütteln ebenfalls bis zu 2 h bei RT inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten (0, 30, 60, 90 und 120 min) wurden Aliquote abgenommen und sofort geerntet.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation [12000 rpm; 4 °C; 1 min] und die Zellpellets wurden zum Abstoppen der Vernetzungsreaktion in 0.5 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8) gewaschen. Die Zellen wurden in 1x *Cracking*-Puffer [50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 2 mM EDTA; 0.01 % (w/v) BPB; 10 % (w/v) Saccharose] aufgenommen und nach Ultraschallaufschluß (6.2.3.) aufgeteilt. Durch Erwärmen der Zellsuspension 20 min auf 50 °C blieben Verknüpfungen erhalten, durch Erhitzen 20 min auf 96 °C wurden sie zerstört. Ca. 100 µg lysierte Zellen wurden auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen.

6.5. Reinigung von CzcB-*Strep-tag II*[®]-haltigen Proteinkomplexen über ein kombiniertes T7-Expressions- und *Strep-tag II*[®]-Reinigungssystem

Der T7-Expression des Proteinkomplexes mit C-terminal an CzcB fusioniertem *Strep-tag II*[®] in *E. coli* K38(pGP1-2) folgte ein *In vivo*-Crosslinking in intakten Zellen mit Formaldehyd. Es wurden die Membranen präpariert, die Membranproteine solubilisiert und der Proteinkomplex durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proben wurden in linearen SDS-PAA-Gelen bzw. Gradienten-SDS-PAA-Gelen aufgetrennt (6.9.1.) und mittels Silberfärbung

(6.11.2.) oder *Strep-tag II*[®] Detektion nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (6.10.3.) analysiert.

6.5.1. Anzucht und Ernte der *E. coli*-Zellen

Die Anzucht von *E. coli* K38(pGP1-2/pECD675) erfolgte wie unter 6.4.1. ohne radioaktive Markierung mit dem Unterschied, daß mehrere 20 ml-Hauptkulturen parallel angezogen wurden (statt einer großen Hauptkultur). Zur Ernte wurden die Kulturen vereinigt und in der *Hettich Universal 30 RF* (Hettich GmbH, Tuttlingen) sedimentiert [10 min; 4500 rpm; 4 °C].

6.5.2. *In vivo*-Crosslinking und Solubilisierung der Proteine aus präparierten Membranen

Für das *In vivo*-Crosslinking wurden die Zellen (6.5.1.) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8) gewaschen. Die Pellets wurden im selben Puffer mit 0.1 % (v/v) Formaldehyd resuspendiert (Zelldichte von ca. 250 KE eingestellt) und ohne Schütteln 2 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in der *Hettich Universal 30 RF* (Hettich GmbH, Tuttlingen) sedimentiert [10 min; 4500 rpm; 4 °C] und in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8) gewaschen.

Das Pellet wurde in Puffer W [0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA] mit 10 µg/ml DNase I und 0.5-1 mM PMSF (ca. 30 mg Zellen pro ml Puffer) resuspendiert und die Zellen mit Ultraschall ca. 10 min bei maximaler Leistung (60 W) und 50 % Zyklus aufgeschlossen (Uniequip Laborgerätebau UW 60). Nach Sedimentation der Zelltrümmer 10 min bei 4 °C und 10000 rpm in der Kühlzentrifuge *5417 R* (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) wurde der Überstand (Rohextrakt) zur Präparation der Membranen 1 h bei 100000x g ultrazentrifugiert [33000 rpm, SW 55 Ti-Rotor, Ultrazentrifuge *L8-60M*; Beckman Instruments, Inc. (USA)].

Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte wie unter 6.3.2. in Puffer W mit 2 % (w/v) N-Laurylsarcosin.

6.5.3. Affinitätschromatographie an *StrepTactin*[®]-Sephrose (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Das Solubilisat (6.5.2.) wurde direkt auf die mit Puffer W [0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA] mit 2 % (w/v) N-Laurylsarcosin äquilibrierte *StrepTactin*[®]-Sephrose-Säule (0.1 ml) gegeben, wobei unter Schwerkraftfluß gearbeitet wurde. Die Säule wurde mit ca. 6 Bettvolumen Puffer W (mit Detergenz) gewaschen und anschließend mit ca. 6 Bettvolumen Puffer E [0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 2.5 mM Desthiobiotin] eluiert. Die Regeneration der Säule wurde mit Puffer R [0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 1 mM HABA] durchgeführt.

6.6. Proteinbestimmung von Membranproteinen (verändert nach Lowry *et al.*, 1951)

Um die Konzentration membranassoziierter Proteine in Lösungen zu bestimmen, wurde eine modifizierte Lowry-Methode angewandt (Lowry *et al.*, 1951; Bensadoun & Weinstein, 1976; Hess & Lees, 1978). Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

1. 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (frisch hergestellt)
2. 24 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
3. 0.8 M NaOH
4. Reagenz A: 0.2 g Dinatrium-Tartrat
10 g Na₂CO₃
68 ml 0.8 M NaOH
ad 100 ml H₂O bidest.
5. Reagenz B: 2 g Dinatrium-Tartrat
1 g CuSO₄
12.5 ml 0.8 M NaOH
ad 100 ml H₂O bidest. (lichtgeschützt aufbewahrt)
6. Mix: 25 Vol. Reagenz A und 2 Vol. Reagenz B
7. Reagenz C: 1 Vol. Folin Ciocalteu Reagenz mit 2 Vol. H₂O bidest.

Der Reagenzmix und Reagenz C wurden jeweils vor Versuchsbeginn frisch angesetzt.

Die Proben wurden mit Puffer auf 600 µl verdünnt, mit 10 µl 1% (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und nach Durchmischung 15 min bei RT inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 200 µl 24% (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation 7 min bei 4°C und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge wurden die Überstände sorgfältig entfernt und die Sedimente mit 450 µl Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente suspendiert waren, wurde den Proben 2x 300 µl Reagenz C zugesetzt, wobei jeweils sofort gemischt wurde. Die Proben wurden 30-60 min lichtgeschützt inkubiert, bevor die Extinktion bei 750 nm gegen einen Nullwert gemessen wurde. Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve im Bereich von 5-60 µg Protein pro Ansatz mit BSA aufgenommen.

6.7. Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel & Flügge, 1984)

Die Chloroform-Methanol-Fällung wurde angewandt, um Proteine aus verdünnten Lösungen für die Auftragung auf die SDS-PAGE aufzukonzentrieren.

Dazu wurden bis zu 400 µl Proteinprobe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt, mit H₂O bidest. auf 900 µl aufgefüllt, erneut gemischt und 2 min in einer Tischzentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 300 µl Methanol wurde wieder kräftig geschüttelt und erneut für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und im entsprechenden Volumen H₂O bidest. und Probenpuffer aufgenommen.

6.8. TCA-Fällung von Proteinen

Die TCA-Fällung wurde angewandt, um Proteine in Lösungen aufzukonzentrieren.

Es wurden ca. 600 µl Proteinprobe mit 200 µl 24% (w/v) TCA-Lösung versetzt [Endkonzentration ca. 3-6% (w/v) TCA], gemischt und 7 min bei 4°C und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden sorgfältig entfernt und das Proteinpellet zur Beseitigung von TCA-Resten 2-3x mit absolutem Ethanol gewaschen und abschließend im Vakuum (*SpeedVac*[®] *SVC 100*, Savant) getrocknet.

6.9. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE wurden mit dem *Minigel*-System (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Dabei wurden Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm verwendet. Die Größe der Gele betrug 8.5 x 7.5 x 0.1 cm. Sowohl die *Twin*- als auch die *Single*-Kammer kamen zum Einsatz.

6.9.1. Denaturierende PAGE

6.9.1.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden vor der Auftragung auf ein SDS-PAA-Gel mit 0.5 Vol. 3x *Cracking*-Puffer [180 mM Tris-HCl, pH 6.8; 3 % (w/v) SDS; 30 % (v/v) Glycerin; 0.03 % (w/v) BPB; 3 % (v/v) β-Mercaptoethanol] gemischt und optional 3-5 min bei 96 °C denaturiert. Da Membranproteine bei Temperaturen über 50 °C zur Aggregation neigen, wurden entsprechende Proben mit 3x *Cracking*-Puffer versetzt und für 20 min bei 40-45 °C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben auf das Gel mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton).

6.9.1.2. Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE

Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurden Größenstandards eingesetzt.

Der *Prestained Protein Marker, Broad Range* (#7708S) mit 8 Proteinen der Größen 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5 und 6.5 kDa und der *Protein Marker, Broad Range* (#7702) mit 13 Proteinen von 212, 158, 116, 97.2, 66.4, 55.6, 42.7, 36.5, 26.6, 20, 14.3, 6.5, 3.4 und 2.3 kDa wurden verwendet (New England Biolabs GmbH, Schwalbach).

Des weiteren wurden die Marker *MW-SDS-200* mit 6 Proteinen der Größen 205, 116, 97.4, 66, 45 und 29 kDa und *MW-SDS-70* mit 6 Proteinen der Größen 66, 45, 34.7, 24, 18.4 und 14.3 kDa eingesetzt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen).

Als weiterer Größenstandard wurde der *Prestained Protein Marker* mit 6 Proteinen der Größen 122, 86, 49.5, 35.2, 25.8 und 22 kDa genutzt (MBI Fermentas, St. Leon Rot).

6.9.1.3. Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung von Proteinen wurden lineare SDS-PAA-Gele (Laemmli, 1970) verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine kamen 7.5, 10 oder 12.5 %ige Gele zum Einsatz.

Trenngele:	7.5 %	10 %	12.5 %
30 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid			
Stammlösung (in ml)	1.5	2.0	2.5
1.88 M Tris-HCl, pH 8.8 (in ml)	1.2	1.2	1.2
H ₂ O bidest. (in ml)	2.1	1.6	1.1
0.5 % (w/v) SDS (in ml)	1.2	1.2	1.2
TEMED (in µl)	5	5	5
10 % (w/v) APS (in µl)	30	30	30

Nach Mischung wurden 6 ml Trenngel zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um eine planare Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml H₂O bidest. überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser wieder entfernt und 1.5 ml Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das ein Kamm zur Formung der Geltaschen eingesetzt wurde.

Sammelgel:	5 %
30 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid	
Stammlösung (in ml)	0.248
0.625 M Tris-HCl, pH 8.8 (in ml)	0.3
H ₂ O bidest. (in ml)	0.65
0.5 % (w/v) SDS (in ml)	0.3
TEMED (in µl)	1.5
10 % (w/v) APS (in µl)	7.5

Der Elektrodenpuffer [2.5 mM Tris-HCl, pH 8.3; 0.2 M Glycin; 0.1 % (w/v) SDS] wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben. Das Gel wurde (ohne *Spacer*) mittels Klemmen in der Kammer befestigt und der Kamm unter Puffer entnommen.

Die Elektrophorese wurde bei U_{\max} und zunächst 10 mA pro Gel durchgeführt. Nach 15 min wurde die Stromstärke auf ca. 25 mA pro Gel erhöht.

6.9.1.4. Gradienten-SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Gradienten-Gele zeichneten sich durch eine kontinuierliche Zunahme der PAA-Konzentration vom Sammelgel bis zum Ende des Trenngels aus. So wurde sichergestellt, daß kleinere Proteine nicht aus dem Gel liefen und sehr große Proteine zumindest ins Trenngel liefen. Mit

Gradienten-Gelen konnte die gesamte Bandbreite eines Proteinspektrums aufgetrennt und dargestellt werden.

Trenngele (leichte und schwere Lösung):	leicht	schwer
	7.5 %	20 %
30 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid		
Stammlösung (in ml)	0.75	2.0
1.88 M Tris-HCl, pH 8.8 (in ml)	0.6	0.6
H ₂ O bidest. (in ml)	1.05	0.145
Glyzerin (in ml)	----	0.24
20 % (w/v) SDS (in µl)	15	15
TEMED (in µl)	2	2
10 % (w/v) APS (in µl)	10	10

Die beiden Gellösungen (je 3 ml, ohne APS und TEMED) wurden in die Kammern eines Gradientenmischers gegeben, wobei die vordere Kammer mit 20 %iger Gellösung befüllt wurde. Vorher war der Verbindungskanal mit der 7.5 %igen Gellösung geflutet worden. Nach Zugabe von je 2 µl TEMED und 10 µl 10 % (w/v) APS wurde der Kanal geöffnet und das Gelmaterial unter Rühren mittels einer Miniperistaltikpumpe [2232 *Microperpex S*, LKB Bromma (Pharmacia, Freiburg)] mit Stufe 21 zwischen die präparierten Glasplatten gepumpt. Das Trenngel wurde abschließend mit 1 ml H₂O bidest. überschichtet, das nach Polymerisation des Acrylamids wieder entfernt wurde. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 6.9.1.3.

6.9.2. Native PAGE

6.9.2.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden vor der Auftragung auf ein Gel mit 0.1 Vol. 10x Beschwerungslösung [40 % (w/v) Saccharose; 0.05 % (w/v) BPB] versetzt und mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufgetragen.

Für die *Blue Native* PAGE wurden die Proben zusätzlich mit 0.05 Vol. Probenpuffer (50 mM BisTris-HCl, pH 7.0; 0.5 M 6-Aminocapronsäure; 5 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G-250) gemischt.

6.9.2.2. Molekulargewichtsmarker für Native PAGE

Bei der Nativen PAGE kam der *HMW Native* (66-669 kDa) mit 5 Proteinen der Größen 669, 440, 232, 140 und 66 kDa zum Einsatz (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg).

6.9.2.3. Native Gradienten-PAGE

Die native Auftrennung von Proteinen, z. B. für eine anschließende Aktivitäts-Färbung, konnte mit dieser PAGE bewerkstelligt werden.

Gelzusammensetzung:	Sammelgel	Trenngele	
40 % (w/v) Acrylamid/	4%	4%	20%
Bisacrylamid 29:1 (in ml)	0.15	0.3	1.5
2.5 M Tris-HCl, pH 8.5 (in ml)	0.15	0.3	0.3
Glyzerin (in ml)	----	----	0.24
H ₂ O bidest. (in ml)	1.2	2.4	0.46
TEMED (in µl)	2	2	2
10 % (w/v) APS (in µl)	10	10	10

Mit dem Trenngel wurde wie unter 6.9.1.4. und dem Sammelgel wie unter 6.9.1.3. verfahren. Als Elektrodenpuffer diente 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) mit 0.1 M Glycin. Die Elektrophorese wurde bei 100 V und I_{\max} im Kühlraum über Nacht durchgeführt.

6.9.2.4. Blue Native Gradienten-PAGE (verändert nach Schägger & von Jagow, 1991)

Zur nativen Auftrennung solubilisierter Membranproteine und ganzer Proteinkomplexe von ca. 100-1000 kDa Größe fand diese Methode Anwendung. Sowohl bei der Präparation der Proteinkomplexe als auch bei der PAGE selbst wurde BisTris-Puffer verwendet. Zur besseren Solubilisierung der Membranproteine wurde 6-Aminocaprinsäure zugesetzt. Coomassie Blue G führte zur Erhöhung der elektrischen Mobilität der Komplexe und damit zur Verbesserung der Auftrennung im Gel.

Gelzusammensetzung:	Sammelgel	Trenngele	
40 % (w/v) Acrylamid/	4%	5%	13%
Bisacrylamid 29:1 (in ml)	0.15	0.375	0.974
150 mM BisTris-HCl, pH 7.0;			
1.5 M 6-Aminocaprinsäure (in ml)	0.5	1.0	1.0
Glyzerin (in ml)	----	----	0.24
H ₂ O bidest. (in ml)	0.84	1.62	0.77
TEMED (in µl)	2	2	2
10 % (w/v) APS (in µl)	10	10	10

Das Trenngel wurde wie unter 6.9.1.4. mit Gradientenmischer und Pumpe zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Mit dem Sammelgel wurde wie unter 6.9.1.3. verfahren. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Kathodenpuffer [15 mM BisTris-HCl, pH 7.0; 50 mM Tricin; 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250], der später mit farblosen Kathodenpuffer auf 0.002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 verdünnt wurde, und Anodenpuffer [50 mM BisTris-HCl, pH 7.0]

wurden in die entsprechenden Kammern gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100 V und I_{\max} im Kühlraum durchgeführt und dauerte ca. 3-4 h.

6.10. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)

Der Transfer der Proteine aus PAA-Gelen erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Eschwege).

6.10.1. Proteintransfer mit dem *Semi-dry-Blot* (verändert nach Kyhse-Andersen, 1984)

Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol, H₂O bidest. und 10 min in Anodenpuffer II [25 mM Tris-HCl, pH 10.4; 10 % (v/v) Methanol] geschwenkt. Es wurden 6 Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier [Whatman Ltd., Maidstone (England)] auf Gelgröße zugeschnitten und drei mit Kathodenpuffer [25 mM Tris-HCl, pH 9.4; 40 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol], zwei mit Anodenpuffer I [0.3 mM Tris-HCl, pH 10.4; 10 % (v/v) Methanol] und eine Lage mit Anodenpuffer II getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung beim Transfer störender Salze in Kathodenpuffer geschwenkt. In der Blotapparatur (Biometra GmbH, Göttingen) wurden zwei Lagen *Whatman*-Papier (in Anodenpuffer I getränkt), eine Lage *Whatman*-Papier, die Membran (beides in Anodenpuffer II getränkt), das Gel und drei Lagen *Whatman*-Papier (in Kathodenpuffer getränkt), luftblasenfrei übereinandergelegt und Spannung angelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte im Kühlraum bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm² Gelfläche) für 30 min bis zu 1 h.

Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Effizienz des Blots mit Coomassie gefärbt. Die Membran wurde luftgetrocknet, die Spur mit dem Protein-Marker abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung mit 0.1 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250 gelöst in 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure für 2 min unterzogen. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes mit 33 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure.

6.10.2. Transfer von Proteinen mit dem Tank-Blot

Native PAA-Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst zur Denaturierung der Proteine in SDS-PAGE-Elektrodenpuffer [2.5 mM Tris-HCl, pH 8.3; 0.2 M Glycin; 0.1 % (w/v) SDS] geschwenkt. Anschließend wurden sie genau wie SDS-PAA-Gele behandelt.

Das PAA-Gel wurde nach dem Lauf in vorgekühltem Transferpuffer [0.01 M CAPS, pH 11.0; 10 % (v/v) Methanol in H₂O bidest.] geschwenkt, um die beim Transfer auf die Membran störenden Salze zu entfernen. Es wurden 16 Lagen *Whatman-3MM*-Papier auf Gelgröße zugeschnitten und mit gekühltem Transferpuffer getränkt. Eine PVDF-Membran (in Gelgröße) wurde nacheinander für jeweils 1 min in Methanol, H₂O bidest. und Transferpuffer äquilibriert. Nach Aufbau des Blots, bei dem das Gel und die Membran zwischen je 8 Lagen

Whatman-3MM-Papier und je einem Fiberkissen gelagert wurden, erfolgte der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran bei 100 V und 250-350 mA ca. 90 min im Kühlraum. Zur besseren Ableitung der entstehenden Wärme wurde mit einem Magnetrührer eine permanente Durchmischung des Puffers sichergestellt. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran luftgetrocknet, die Spur mit dem Protein-Marker abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung mit 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure für 2 min unterzogen. Das Gel wurde zur Überprüfung der Blot-Effizienz Coomassie gefärbt.

6.10.3. *Strep-tag II*[®] Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Der spezifische Nachweis *Strep-tag II*[®]-haltiger Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mit einem *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat.

Die Blot-Membran wurde in 15 ml Inkubationspuffer SI 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Es wurden 3.7 µl *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat zum Ansatz pipettiert und weitere 30 min bei RT geschüttelt. Die Membran wurde mit H₂O bidest. abgespült und nach 2x 2 min Waschen mit Puffer W [0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA] wieder mit H₂O bidest. 2min gespült. Es wurden 15 ml Peroxidase-Reaktionspuffer ER auf die Membran gegeben und 0.1 ml 3 % (w/v) 4-Chlornaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol) sowie 15 µl Peroxidase-Substrat [30 % (v/v) H₂O₂] hinzupipettiert und bis zu 30 min zur Färbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O bidest. gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

6.10.4. Proteinnachweis durch Immunopräzipitation auf PVDF-Membranen (Blake *et al.*, 1984)

Der spezifische Nachweis beruht auf der Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzymaktivität (Alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase) ermöglichte den Nachweis der gebildeten Antigen/IgG-AK/Anti-IgG-AK-Komplexe durch eine Farb- oder Lichtreaktion (Lichtemission mit Röntgenfilm detektiert).

Alle Schritte wurden bei RT unter Schütteln durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Die PVDF-Membran mit transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht in Blockierungspuffer [PBS (4 mM KH₂PO₄; 16 mM Na₂HPO₄; 115 mM NaCl) und 5 % (w/v) *Glücksklee*-Magermilchpulver] inkubiert. Nach dem Waschen der Membran 3x 5 min in PBS-Tween [0.1 % (v/v) Tween 20 in PBS] folgte eine Inkubation der Membran in PBS-Tween mit dem gegen das nachzuweisende Antigen-Protein gerichteten primären Antikörper für 1 h, wobei sich die Konzentration des Antikörpers nach seiner Spezifität richtete. Es wurden je nach Antikörper Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:50000 eingesetzt (Tab. 4).

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran 3x 10 min in PBS-Tween und 5 min in PBS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde die Membran mit einem Anti-IgG-AK (Tab. 4) für 1 h inkubiert, der in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den folgenden Waschschritten (3x 10 min in PBS-Tween und 5 min in PBS-Puffer) schloß sich der Nachweis der gebildeten Immunokomplexe an.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten polyklonalen Antikörper mit Verdünnungen

Bezeichnung	Antikörper-Typ	Antigen	Verdünnung
primäre Antikörper			
Anti-CzcA-AK	Kaninchen-IgG	CzcA	1:2500
Anti-CzcB-AK	Kaninchen-IgG	CzcB	1:50000
Anti-CzcC-AK	Kaninchen-IgG	CzcC	1:1000
Anti-LacZ-AK	Maus-IgG	β -Galaktosidase	1:2000
Anti-PhoA-AK	Maus-IgG	Alkalische Phosphatase	1:5000
sekundäre Antikörper			
Anti-Kaninchen-IgG-AK (Alkalische Phosphatase-Konjugat)	Maus-IgG	Kaninchen-IgG	1:50000
Anti-Maus-IgG-AK (Peroxidase-Konjugat)	Schaf-IgG	Maus-IgG	1:1000

a) Farbreaktion für Alkalische Phosphatase-Konjugate

Bei der Nachweisreaktion wurde die PVDF-Membran bis zu 30 min in 20 ml Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.8; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) mit 60 μ l 5 % (w/v) X-P in DMF und 10 μ l 7.5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) DMF bis zur Violettfärbung der Immunokomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O bidest. gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

b) Lichtreaktion für Peroxidase-Konjugate

Zum Nachweis wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 10 ml frische Detektionslösung I [0.1 M Tris-HCl, pH 8.5; 5.5 mM H₂O₂] und frische Detektionslösung II [0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 2.5 mM Luminol (Stammlösung in DMSO), 0.4 mM p-Cumarsäure (Stammlösung in DMSO)] gegeben, durch Schwenken gemischt und ca. 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Detektionslösung abgossen, die feuchte Membran in eine aufgeschnittene Plastetüte gepackt und ein Röntgenfilm [*HyperfilmTM ECLTM* von Amersham Life Science, Little Chalfont (England)] 30 s bis 2 min exponiert.

Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm ca. 30-90 s entwickelt, kurz in einem Wasserbad abgespült, für 3-6 min fixiert und abschließend 10 min in Wasser gespült.

c) Farbreaktion für Peroxidase-Konjugate

Diese Detektionsmethode wurde in Anlehnung an den Nachweis *Strep-tag II*[®]-haltiger Proteine (6.10.3.) durchgeführt.

Die Blot-Membran wurde in 20 ml frisch hergestellter Reaktionslösung [0.1 M Tris-HCl, pH 8.5; 8.8 mM H₂O₂; 0.02 % (w/v) 4-Chlornaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol)] bis zu 30 min zur Färbung der Immunokomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O bidest. gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

6.11. Färbung und Trocknung von PAA-Gelen

6.11.1. Coomassie-Färbung von Proteinen (verändert nach Weber & Osborn, 1969)

PAA-Gele mit aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht in Coomassie-Färbelösung [0.06 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 0.06 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärbelösung [33 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure]. Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O bidest. aufbewahrt.

Zur Färbung von Protein-Markern auf PVDF-Membranen wurden die entsprechenden Spuren 1 min in Färbelösung inkubiert, anschließend ebenfalls unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt und luftgetrocknet.

6.11.2. Silberfärbung (Rabilloud *et al.*, 1988; Nesterenko *et al.*, 1994)

Nach der Elektrophorese wurde das PAA-Gel in 50 ml Fixierlösung [50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Ethanol in H₂O bidest.] für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Gel 1 min in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und 2 min in 50 ml Vorbehandlungslösung [1.6 mM Na₂S₂O₃ in H₂O bidest.] inkubiert. Vor der Imprägnierung des Gels für 20 min (100 mg AgNO₃, 250 µl 37 % (v/v) HCHO in 50 ml H₂O bidest.) wurde es 3x 20 s in H₂O bidest. gewaschen. An einen erneuten kurzen Waschschrift mit H₂O bidest. schloß sich die Entwicklung (3 g Na₂CO₃, 0.5 mg Na₂S₂O₃ und 35 µl HCHO in 50 ml H₂O bidest.) an. Die Färbereaktion wurde durch 2x 2 min Behandlung mit H₂O bidest. und 10 min in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure bei gewünschter Intensität der Proteinbanden gestoppt. Das Gel wurde abschließend 20 min in H₂O bidest. gewaschen und konnte dann aufbewahrt oder getrocknet werden.

6.11.3. Spezifischer Nachweis von Proteinen mittels Aktivitäts-Färbung in Nativen PAA-Gelen

Da enzymatische Aktivität die native Konformation eines Proteins zur Voraussetzung hat, wurde eine Native PAGE wie unter 6.9.2.3. durchgeführt.

Die Gele wurden über Nacht bei RT in 50 ml β -Galaktosidase-Reaktionspuffer [50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0] oder 50 ml Alkalische Phosphatase-Reaktionspuffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mM ZnCl_2] inkubiert. Als Substrate wurden X-Gal bzw. X-P [je 50 $\mu\text{g/ml}$ im Reaktionspuffer] eingesetzt. Bei Umsetzung der Substrate durch aktive Proteine kam es in deren Umgebung zu einer Blaufärbung durch Bildung eines Indigo-Farbstoffes.

6.11.4. Trocknung von PAA-Gelen

Zur Aufbewahrung wurden die PAA-Gele mittels Vakuuvorrichtung getrocknet. Die Gele wurden 15 min in Geltrocknungslösung [3 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) Methanol] inkubiert. Für die Trocknung wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Geltrocknungslösung benetzte Folien gelegt. Nach Anlegen des Vakuums wurde der Geltrockner (*Gel Slab Drier GSD-4*, Pharmacia, Freiburg) 75 min auf 60 °C erhitzt. Die Gele verblieben bis zur vollständigen Abkühlung (ca. 20 min) unter Vakuum.

6.12. Autoradiographie mit PAA-Gelen

Die Autoradiographie diente der Detektion radioaktiv markierter Proteine nach Auftrennung im SDS-PAA-Gel. Es kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz, die direkte Autoradiographie und die Fluorographie (indirekte Autoradiographie).

Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm ca. 30-90 s entwickelt, kurz in einem Wasserbad abgespült, für 3-6 min fixiert und abschließend 10 min in Wasser gespült.

6.12.1. Direkte Autoradiographie

Zur Detektion der mit [^{35}S]-Met markierten Proteine wurden die getrockneten Gele bei -80 °C bis zu 72 h auf einem *direct type*-Röntgenfilm exponiert. Dieser Röntgenfilmtyp zeichnete sich durch hohe Sensitivität gegenüber radioaktiver Strahlung aus. Außerdem wurde die zur Geltrocknung verwendete *Saran*[®]-Folie (Dow Chemical, USA) entfernt. Dies führte bei schwachen β -Strahlern (wie z. B. [^{35}S]) zu einer signifikanten Verbesserung der Ausbeute an Radioaktivität.

6.12.2. Fluorographie (Szintillationsautographie) mit PPO (Bonner & Laskey, 1974)

Diese Methode beruhte auf der Umwandlung der radioaktiven Strahlung schwacher β -Strahler (wie [^{35}S]) in blaues Licht, das besser mit einem Röntgenfilm detektiert werden konnte. Dabei wurde der Szintillator PPO [in DMSO; *Rotifluoroszinti*[®]D (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)

in unmittelbare Nähe der Strahlenquelle ins Gel gebracht und dort zur Emission von Licht angeregt.

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese oder nach der Färbung 2x 30 min in je 50 ml DMSO inkubiert. Dies diente dem Austausch des Wassers im Gel gegen DMSO, da PPO nicht in Wasser löslich war. Es folgte eine Inkubation des Geles von ca. 3 h in 20-30 ml *Rotifluoroszint*[®]D, an die sich eine Inkubation von ca. 1h in 50 ml H₂O bidest. anschloß. Das Gel wurde getrocknet (6.11.4.), die zur Geltrocknung verwendete *Saran*[®]-Folie (Dow Chemical, USA) entfernt und bis zu 72 h bei -80 °C auf einem *screen type*-Röntgenfilm [*Hyperfilm*TM *ECL*TM von Amersham Life Science, Little Chalfont (England)] exponiert.

7. Das *Sos Recruitment*-System, ein alternatives *Yeast Two-Hybrid*-System (*CytoTrap*TM; Stratagene GmbH, Heidelberg)

Das *Sos Recruitment*-System (SRS) diente zur Untersuchung der *in vivo* Interaktion von zwei Proteinen in der Hefe *S. cerevisiae* cdc25H. Es handelte sich hierbei um ein alternatives *Yeast Two-Hybrid*-System, mit dem auch Membranproteine charakterisiert werden konnten.

Ein zu untersuchendes Protein wurde hierbei mit dem Protein hSos, einem Protein der RAS-Hitzestreß-Antwort, fusioniert und diente als *Bait* (Beute). Das andere Protein wurde mit einem Myristylierungssignal, das zur Membranverankerung führte, fusioniert und diente als *Target* (Ziel).

Interagierten die Fusionen miteinander, kam es zur Membranassoziation von hSos. Dieses aktivierte den GDP/GTP-Austausch am Protein RAS und löste eine Signalkaskade aus, die es der Hefemutante cdc25H ermöglichte, bei 37 °C zu wachsen.

7.1. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* cdc25H-Zellen

Es wurden mehrere 100 ml-Kulturen von *S. cerevisiae* cdc25H in YPAD-Medium in separaten 250 ml Erlenmeyer-Kolben inokuliert und für etwa 48 Stunden bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.7 geschüttelt.

Zur Kontrolle wurden jeweils 75 µl Kultur auf eine YPAD-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C für ca. 4 Tage inkubiert. Maximal 30 Kolonien sollten gewachsen sein, da sonst die Anzahl von Revertanten bzw. anderer Hefe-Stämme in der Kultur zu hoch war.

Die Kulturen wurden bei 4000 rpm und 4 °C 10 min in der *Universal RF* zentrifugiert (Hettich GmbH, Tuttlingen) und in 100 ml H₂O bidest. resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, in 50 ml sterilem LiSORB [100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 1 M Sorbitol] resuspendiert und bei RT für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2600 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und in 0.5 ml LiSORB aufgenommen. Es wurden 1 ml Heringsspermien-DNA-Lösung [400 µl Heringsspermien-DNA (20 mg/ml) und 600 µl LiSORB], 9 ml PEG/LiOAc-Lösung [10 mM Tris-HCl, pH 8.0;

1 mM EDTA, pH 8.0; 100 mM LiOAc, pH 7.5; 400 g/l PEG 3350] und 880 μ l DMSO zugegeben und jeweils gemischt. Die kompetenten Zellen wurden zu Aliquoten von je 1 ml bei -80 °C eingefroren.

7.2. Transformation von *S. cerevisiae* cdc25H und Testung der Protein-Interaktion

Zu 100 μ l kompetenten Hefe-Zellen wurden je 0.3 μ g der Plasmide pSos und pMyr (bzw. deren Derivate) pipettiert. Nach Zugabe von 2 μ l β -Mercaptoethanol wurde der Ansatz gemischt und 30 min bei RT unter gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und 5 min auf Eis gestellt. Der gesamte Ansatz wurde auf SD/Glucose (-UL) Agarplatten ausplattiert und bei RT (ca. 25 °C) 4-6 Tage inkubiert.

Von jeder Transformation wurden mindestens drei Kolonien gepickt und in H₂O bidest. resuspendiert. Es wurden jeweils 10 μ l Zellsuspension auf zwei SD/Glucose (-UL) Agarplatten und zwei SD/Galaktose (-UL) Agarplatten aufgetropft und je eine Platte pro Sorte bei 37 °C und bei RT (ca. 25 °C) 5 Tage inkubiert. Galaktose induzierte das auf pMyr unter Kontrolle eines GAL1-Promotor kodierte, myristylierte Fusionsprotein. Nur bei Interaktion mit dem hSos-Fusionsprotein kam es zur Koloniebildung auf SD/Galaktose (-UL) Agarplatten bei 37 °C.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zu Membran-Topologie und subzellulärer Lokalisation der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes mittels Translationsfusionen mit Reporterproteinen

1.1. Entwicklung verschiedener Reporterplasmid-Sets für den Einsatz in Topologie-Untersuchungen

Zur Untersuchung von Topologie bzw. Lokalisation der einzelnen Komponenten des Czc-Efflux-Systems war es notwendig, Reporterplasmide für gezielte Translationsfusionen zu entwickeln, da erste Reporter-gen-Fusionen der *czc*-Gene, die nach dem Zufallsprinzip über Transposons und Exonuklease-Behandlung generiert wurden, zu widersprüchlichen Ergebnissen führten (Rensing *et al.*, 1997a). Durch eine Amplifizierung der Genabschnitte über PCR konnten Fusionen auch abseits von *hot spots* an gewünschter Stelle im Gen hergestellt werden.

Ausgangspunkt für die Konstruktion der Vektoren war pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977), das Ergebnis war das Reporterplasmid-Set 1 (1.1.1.). Die Weiterentwicklung und Verbesserung der Plasmide durch Veränderungen in der Promotorregion, Einbau einer Kan^r-Kassette zur einfacheren Selektion von Genfusionen und die Einführung einer *Multi Cloning Site* (MCS), die den Einsatzbereich der Vektoren auf ein breiteres Spektrum von Genen erweiterte, führte zum Set 2 (1.1.2.). Die Umstellung des Systems auf pGEM[®]-T Easy [Promega, Madison (USA)], einem Vektor höherer Kopienzahl und damit Gendosis, hatte Plasmid-Set 3 zur Folge (1.1.3.).

Die Teile eines Sets waren zueinander kompatibel, d. h. klonierte Genabschnitte, die für C-terminal verkürzte Teile des zu untersuchenden Proteins kodierten, konnten zwischen den Vektoren einfach transferiert werden. Dieser Prozeß wird als *Fusion Switching* bezeichnet (Manoil, 1990; Manoil, 1991). Für eine Fusionsposition war es über '*blaM*-, '*lacZ*- und '*phoA*-Fusionen also möglich, drei unabhängige Aussagen zu treffen, die eine eindeutigere Bestimmung der Topologie erlauben sollten. Von Vorteil sollten dabei auch die komplementären Eigenschaften der Reporterproteine sein (Manoil, 1990). Alkalische Phosphatase (Produkt des *phoA*-Gens) und β -Laktamase (Produkt des *blaM*-Gens) erlangten nur durch Translokation ins Periplasma enzymatische Aktivität, β -Galaktosidase (Produkt von *lacZ*) war dagegen ein nur im Cytoplasma aktives Enzym.

Durch die Wahl von *KpnI* und *XbaI* als Schnittstellen war die Klonierung eines Genfragmentes in Vektoren aller drei Sets möglich. Folglich war ein Vergleich von mit unterschiedlichen Reporterplasmid-Sets gewonnenen Daten möglich.

1.1.1. Das Reporterplasmid-Set 1 – korrespondierende *'blaM*-, *'lacZ*- und *'phoA*-Fusionsvektoren auf Basis von pBR322

Zur Konstruktion der Fusionsvektoren des Sets 1 (Abb. 3) wurde auf dem Plasmid pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) mit Hilfe der T7-*XhoI*-Linker 1 und 2 und des *KpnI*-Linkers (Tab. 3) ein T7-Promotor (p_{T7}) eingeführt und die *EcoRI*-Schnittstelle von pBR322 in eine *KpnI*-Schnittstelle umgewandelt. Nach *KpnI*/*PstI*-Verdau stand das resultierende Derivat von pBR322 für den Einbau der Reporter-gen-Kassetten bereit.

Das *lacZ*-Gen von pMC1871 (Shapira *et al.*, 1983) wurde mittels PCR (Primer *'lacZ-KpnI-XbaI*-Start und *'lacZ-PstI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI-XbaI-lacZ-PstI*-Fragment amplifiziert und in das pBR322-Derivat eingebaut. Daraus resultierte der *'lacZ*-Fusionsvektor pECD499.

Für den korrespondierenden *'phoA*-Translationsfusionsvektor pECD500 wurde das *phoA*-Gen von pECD280 (Rensing *et al.*, 1997a) mittels PCR (Primer *'phoA-KpnI-XbaI*-Start und *'phoA-PstI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI-XbaI-phoA-PstI*-Fragment amplifiziert und in das pBR322-Derivat eingebaut.

Zur Konstruktion des *'blaM*-Fusionsvektors pECD501 wurde der vordere Teil des *blaM*-Gens von pBR322 mittels PCR (Primer *'blaM-KpnI-XbaI*-Start und *'blaM-PstI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI-XbaI-blaM-PstI*-Fragment amplifiziert und in das pBR322-Derivat kloniert.

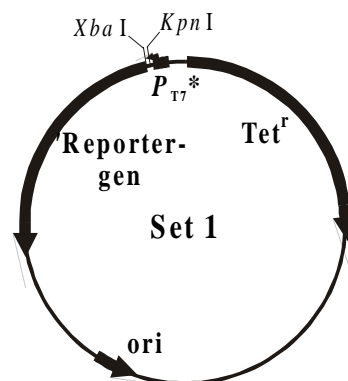


Abb. 3: Schematische Karte der Fusionsvektoren des Reporterplasmid-Sets 1

Die Plasmide (pECD499 mit *'lacZ*, pECD500 mit *'phoA* und pECD501 mit *'blaM*) bestehen aus der Origin-Region (*ori*) und der Tet-Resistenz (*Tet^r*) von pBR322, sowie dem eingeführten *'Reporter-gen* [ohne Ribosomenbindestelle (RBS), Startcodon und Signalsequenz], dem ein T7-Promotor (p_{T7^*}) vorgeschaltet ist. Über die Schnittstellen *KpnI* und *XbaI* ist die Fusionierung von Genfragmenten (mit RBS und Startcodon) mit dem *'Reporter-gen* möglich. Die resultierenden Translationsfusionen werden vom T7-Promotor aus transkribiert.

Die Funktionsfähigkeit des Plasmid-Sets sollte mit Hilfe von Kontrollplasmiden, die für Fusionsproteine bekannter Lokalisation kodierten, nachgewiesen werden. Dazu wurde ein großer Teil des *blaM*-Gens von pBR322 (mit RBS und Startcodon, aber ohne Signalsequenz) mittels PCR (Primer *'blaM-KpnI*-Start und *blaM-XbaI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI-blaM-XbaI*-Fragment amplifiziert und in die Vektoren pECD499 und pECD500 kloniert. Die resultierenden Plasmide pECD502 und pECD503 kodierten cytoplasmatisch lokalisierte Fusionsproteine mit β -Galaktosidase- bzw. Alkalischer Phosphatase-Domäne. Bei den

Enzymtests in *E. coli* CC118(pGP1-2) zeigten die Fusionen 'BlaM'-'LacZ (pECD502) bzw. 'BlaM'-'PhoA (pECD503) deutlich differierende spezifische Enzymaktivitäten (Tab. 5).

Tab. 5: spezifische Aktivitäten der cytoplasmatischen Kontrollfusionen

Plasmid	relevanter Genotyp	spez. Aktivität [U/mg TG]	Bemerkungen
pECD499	'lacZ	0.75± 0.29	keine Fusion
pECD502	'blaM'-'lacZ	31.51± 3.25	cytoplasmatische Kontrolle
pECD500	'phoA	0.21± 0.09	keine Fusion
pECD503	'blaM'-'phoA	0.24± 0.06	cytoplasmatische Kontrolle

Die enzymatischen Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit Kontroll-Hybridproteinen cytoplasmatischer Lokalisation sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min) und mit den Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Vektoren verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (\pm Standardabweichungen).

Während die Aktivität der β -Galaktosidase bei Fusion mit der β -Laktamase ohne Signalsequenz ca. 42x Basisniveau des Reporterplasmids pECD499 betrug, blieb die Alkalische Phosphatase-Aktivität ungefähr auf Basisniveau von pECD500, da aufgrund der fehlenden Signalsequenz keine Translokation der PhoA-Reporterdomäne in das Periplasma erfolgte und eine enzymatisch inaktive Fusion vorlag.

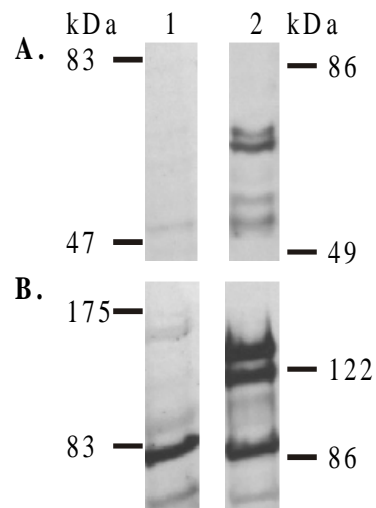


Abb. 4: Westernblot der Kontrollfusionen mit polyklonalen Anti-PhoA-AK bzw. Anti-LacZ-AK

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den Kontrollplasmiden wurden präpariert, in einer SDS-PAGE (7.5 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Antikörpern (**A.** Anti-PhoA-AK; **B.** Anti-LacZ-AK) inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren **1** und **2** ist wie folgt (in Klammern theoretische Molekulargewichte der Proteine): Spur **1** - 'phoA'-Vektor pECD500 (**A.**) und 'lacZ'-Vektor pECD499 (**B.**); Spur **2** - 'BlaM'-'PhoA (ca. 68 kDa; pECD503; cytoplasmatische Kontrolle; **A.**) -'LacZ (ca. 137 kDa; pECD502; cytoplasmatische Kontrolle; **B.**)

Im Westernblot wurde gezeigt, daß die Expression der beiden Kontrollfusionen erfolgte, wobei jeweils auch abgespaltene Reporterprotein-Domäne erkennbar war (Abb. 4). Die mit Anti-LacZ-AK feststellbare Bande (ca. 85 kDa) war für abgespaltene β -Galaktosidase-Domäne zu klein und war auch im Rohextrakt von *E. coli* CC118(pGP1-2, pECD499) nachweisbar. Um die mögliche Expression einer verkürzten β -Galaktosidase von pECD499 aus zu untersuchen, wurden die Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2, pECD499) und CC118(pGP1-2, pECD500) im SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Anti-LacZ-AK inkubiert. Auch in *E. coli* CC118(pGP1-2) mit dem 'phoA-Vektor pECD500 war ein Protein gleicher Größe detektierbar (Ergebnis nicht gezeigt). Es lag also eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem Protein von *E. coli* CC118 vor. Im Rohextrakt von *E. coli* CC118(pGP1-2, pECD500) konnte keine Alkalische Phosphatase detektiert werden. Die beiden Vektoren (ohne Translationsfusion) führten zu keiner nachweisbaren Expression der Reporterproteine.

Mit den Vektoren des Sets wurden die Komponenten des Efflux-Komplexes CzcC (1.2.) und CzcB (1.3.) untersucht (Rensing *et al.*, 1997a). Zwei β -Galaktosidase-Fusionen von CzcA wurden ebenfalls mit dem Vektor pECD499 generiert (1.4.). Auch die Membranproteine CzcD (Anton, 1997; Anton *et al.*, 1999) und ChrA (Koch, 1997; Nies *et al.*, 1998) wurden mit dem Set 1 topologisch charakterisiert.

Innerhalb des verwendeten T7-Promotors (p_{T7^*}) konnte durch Sequenzierung eine Punktmutation festgestellt werden, die in allen drei Reporterplasmiden vorhanden war (Abb. 5).

-17		-5		+1		+6
p_{T7}	:	TAA TAC GAC TCA	C TA	TAG	GGA	GA
p_{T7}^*	:	TAA TAC GAC TCA	A TA	TAG	GGA	GA

Abb. 5: Vergleich des Consensus-T7-Promotors (p_{T7}) mit dem verwendeten, mutierten Promotor (p_{T7}^*)

Dargestellt ist die komplette Promotor-Region von Position -17, über den Transkriptionsstartpunkt +1 bis zur Position +6. Die Transversion der Pyrimidinbase C zur Purinbase A im verwendeten Promotor (p_{T7}^*) ist hervorgehoben (**fett**).

Die Transversion (C->A) an Position -5 im T7-Promotor hatte zur Folge, daß der mutierte Promotor nur noch über 0.5 % der Transkriptionseffizienz des Wildtyp-Promotors verfügte, und somit zwar nicht inaktiviert aber drastisch *down* mutiert war (Ikeda *et al.*, 1992). Die 2-Aminogruppe des Guanins (G), das komplementär zum Cytosin (C) an Position -5 war, wurde von Li *et al.* (1996) als eine primäre Kontaktstelle der T7-RNA-Polymerase mit ihrem Promotor ermittelt.

Da bei einer Expression des Fusionsproteins CzcD175-'LacZ mit und ohne T7-RNA-Polymerase fast identische spezifische β -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen wurden (Anton, 1997), konnte davon ausgegangen werden, daß die Expression hauptsächlich durch einen

anderen Promotor erfolgte, der vor der Reporter-Region der pBR322-Derivate lag. Es handelte sich dabei wahrscheinlich um den Promotor P1 auf pBR322 (Stüber & Bujard, 1981; Brosius *et al.*, 1982).

1.1.2. Korrespondierende 'blaM- und 'phoA-Reporterplasmide des Sets 2 als Resultat der Weiterentwicklung von Set 1

Die unter 1.1.1. genannten Gründe machten die Weiterentwicklung der Reporterplasmide des Sets 1 notwendig. In die Vektoren pECD500 und pECD501 wurde über die T7-MCS-Linker I und II (Tab. 3) ein neuer T7-Promotor (p_{T7}) eingebaut und gleichzeitig eine MCS mit mehreren Schnittstellen geschaffen. Die Kan^r-Kassette von pRME1 (Gielow *et al.*, 1991) wurde komplett mit RBS und Promotor mittels PCR (Primer Kan^r-KpnI-Start und Kan^r-XbaI-Ende; Tab. 3) als KpnI-Kan^r-XbaI-Fragment amplifiziert und in die beiden Vektoren kloniert. Ergebnis waren die Fusionsvektoren pECD622 ('blaM) und pECD623 ('phoA) (Abb. 6).

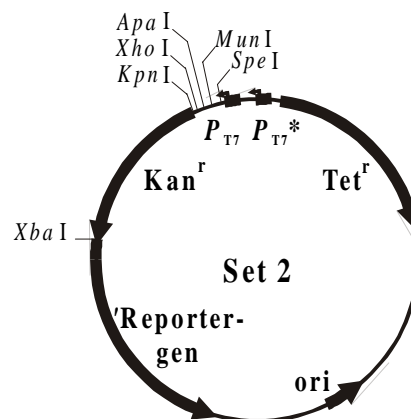


Abb. 6: Schematische Karte der Fusionsvektoren des Reporterplasmid-Sets 2

Die Plasmide (pECD622 mit 'blaM und pECD623 mit 'phoA) sind Weiterentwicklungen von pECD501 und pECD500 (Abb. 3). Zusätzlich tragen sie einen intakten T7-Promotor (p_{T7}) mit MCS und verfügen über eine Kan^r-Kassette, die der einfacheren Selektion von Translationsfusionen dient. Über die Schnittstellen der MCS und XbaI ist die Fusionierung von Genfragmenten (mit RBS und Startcodon) mit dem 'Reporter-Gen durch Austausch gegen die Kan^r-Kassette möglich. Die resultierenden Translationsfusionen werden vom T7-Promotor aus transkribiert.

Eine Substitutionsklonierung von Fragmenten des zu untersuchenden Genes gegen die Kan^r-Kassette der Reporterplasmide ermöglichte eine einfache Identifizierung von Translationsfusionen über ihre Kanamycin-Sensitivität.

Mit dem 'phoA-Vektor pECD623 wurde die topologische Charakterisierung der zentralen Untereinheit des Czc-Efflux-Komplexes CzcA begonnen (1.4.; Goldberg *et al.*, 1999).

1.1.3. Set 3 - korrespondierende 'lacZ- und 'phoA-Reporterplasmide auf Basis von pGEM[®]-T Easy [Promega, Madison (USA)]

Die Umstellung von pBR322 als Basis für die Reporterplasmide auf pGEM[®]-T Easy führte zu Plasmid-Set 3 (Abb. 7). Für Set 3 wurde pGEM[®]-T Easy mit seinen Vorteilen (einfache

Handhabbarkeit und hohe Kopienzahl) und die bewährten Reporter-Module miteinander kombiniert.

Bei der Konstruktion wurde zunächst eine *KpnI*-Schnittstelle stromabwärts vom T7-Promotor auf pGEM[®]-T Easy eingeführt. Dies geschah durch Verwendung eines Derivates, das ein Fragment mit flankierender *KpnI*-Schnittstelle an gewünschter Seite trug. Nach Doppelverdau mit *KpnI* und *PstI* erfolgte der Austausch des Fragmentes gegen das ebenso geschnittene Kan^r-*lacZ*-Modul eines pECD499-Derivates bzw. das Kan^r-*phoA*-Modul von pECD623. Ergebnis waren die Fusionsvektoren pECD636 (*lacZ*) bzw. pECD637 (*phoA*).

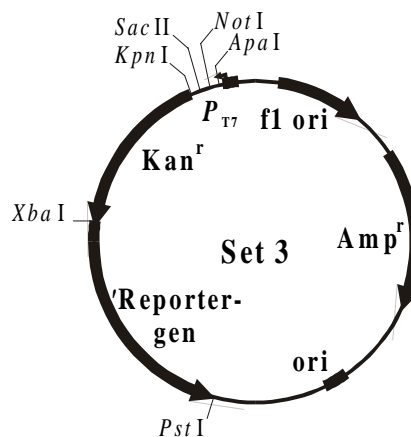


Abb. 7: Schematische Karte der Fusionsvektoren des Sets 3

Die Plasmide des Sets (pECD636 mit *lacZ* und pECD637 mit *phoA*) basieren auf dem pGEM[®]-T Easy-Vektor [T7-Promotor (p_{T7}), Origin-Region (ori), Phage f1-Region (f1 ori), Amp-Resistenz (Amp^r)]. Zusätzlich verfügen sie über ein Kan^r-Reporter-Gen-Modul zum Generieren und einfachen Selektieren von Translationsfusionen. Über die Schnittstellen der MCS und *XbaI* ist die Fusionierung von Genfragmenten (mit RBS und Startcodon) mit dem Reporter-Gen durch Austausch gegen die Kan^r-Kassette möglich. Die resultierenden Translationsfusionen werden vom T7-Promotor aus transkribiert.

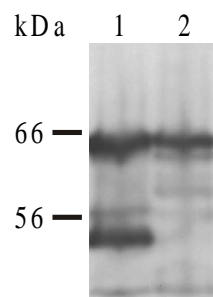
Der Nachweis der Funktionsfähigkeit von pECD637 wurde wieder über Kontrollplasmide, die für Fusionsproteine bekannter Lokalisation kodierten, geführt. Zur Konstruktion von Plasmid pECD618, das für das cytoplasmatisch lokalisierte Hybridprotein 'BlaM'-PhoA kodiert, wurde das *KpnI*-*blaM*-*XbaI*-Fragment aus pECD503 verwendet. Für ein weiteres Kontrollplasmid wurde der komplette vordere Teil des *blaM*-Gens von pBR322 (mit RBS, Startcodon und Signalsequenz) mittels PCR (Primer *blaM*'-*KpnI*-Start und *blaM*'-*XbaI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI*-*blaM*'-*XbaI*-Fragment amplifiziert und in das Reporterplasmid pECD637 kloniert. Das resultierende Plasmid pECD619 kodiert ein transloziertes, periplasmatisch lokalisiertes Fusionsprotein mit Alkalischer Phosphatase-Domäne (BlaM'-PhoA). Beim Enzymtest in *E. coli* CC118(pGP1-2) zeigten die Kontrollfusionen spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivitäten auf unterschiedlichem Niveau (Tab. 6). Die Aktivität der ins Periplasma translozierten Fusion BlaM'-PhoA (β -Laktamase mit Signalsequenz) war ca. 27x höher als die der Fusion 'BlaM'-PhoA (β -Laktamase ohne Signalsequenz). Das Reporter-Gen-Meßsystem auf Basis von pGEM[®]-T Easy funktionierte demzufolge.

Tab. 6: spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivitäten der Kontrollfusionen

Plasmid	relevanter Genotyp	spez. Aktivität [U/mg TG]	Bemerkungen
pECD618	' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i>	2.28± 1.55	cytoplasmatische Kontrolle
pECD619	<i>blaM</i> '-' <i>phoA</i>	60.62± 19.47	periplasmatische Kontrolle

Die enzymatischen Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Kontroll-Hybridproteinen unterschiedlicher Lokalisation sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min). Dargestellt sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (± Standardabweichungen).

Beide Kontrollfusionen wurden in vergleichbaren Mengen exprimiert, wobei aber bei der periplasmatischen Kontrolle zusätzlich ein Abbauprodukt erkennbar war, daß der abgespaltenen PhoA-Domäne entsprach (Abb. 8).

**Abb. 8: Westernblot der Kontrollfusionen mit polyklonalen Anti-PhoA-AK**

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den Kontrollplasmiden wurden präpariert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Anti-PhoA-AK inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren **1** und **2** ist wie folgt (in Klammern theoretische Molekulargewichte der Proteine): Spur **1** - *BlaM*'-'*PhoA* (ca. 71 kDa; periplasmatische Kontrolle); Spur **2** - '*BlaM*'-'*PhoA* (ca. 68 kDa; cytoplasmatische Kontrolle)

Mit dem '*phoA*-Translationsfusionsvektor pECD637 wurde die topologische Charakterisierung des CzcA-Proteins vollendet (1.4.; Goldberg *et al.*, 1999). Weiterhin wurden die von der RGR der *czc*-Determinante kodierte Proteine CzcI und CzcE mit dem Set 3 untersucht (Anton, persönliche Mitteilung). Von Grass (2000) wurden mit pECD637 Untersuchungen zur Topologie der Regulatoren CnrY und CnrX durchgeführt (Grass *et al.*, 2000). Bei Untersuchungen zur Lokalisation von YlcC, einem kleinen von der *ybd*-Region kodierte Protein, kam ebenfalls Set 3 zum Einsatz (Franke, persönliche Mitteilung).

1.2. Große Bereiche von CzcC liegen im Periplasma

Mit einer Serie von Translationsfusionen in den Vektoren des Sets 1 sollte festgestellt werden, ob CzcC im Cytoplasma oder Periplasma lokalisiert ist bzw. ob das Protein in der Cytoplasmamembran verankert ist oder eine auch vorstellbare polytopische Membranarchitektur hat. Diese Untersuchungen sollten Informationen zur Positionierung von

CzcC im Czc-Efflux-Komplex liefern und zeigen, ob der Komplex nur auf die innere Membran beschränkt ist oder ob er sich auch über den periplasmatischen Raum erstreckt.

1.2.1. Vorhersagen zur Topologie von CzcC und Auswahl der Fusionspositionen

Ausgehend von der Primärstruktur des Proteins wurden verschiedene Programme genutzt, um ein Hydropathie-Profil zu erstellen und Vorhersagen zur Sekundärstruktur bzw. Topologie zu treffen. Die in den *in silico*-Untersuchungen erhaltenen Informationen bildeten die Grundlage für die Wahl der Fusionspositionen bzw. beim Design der einzelnen *Primer* (Abb. 9).

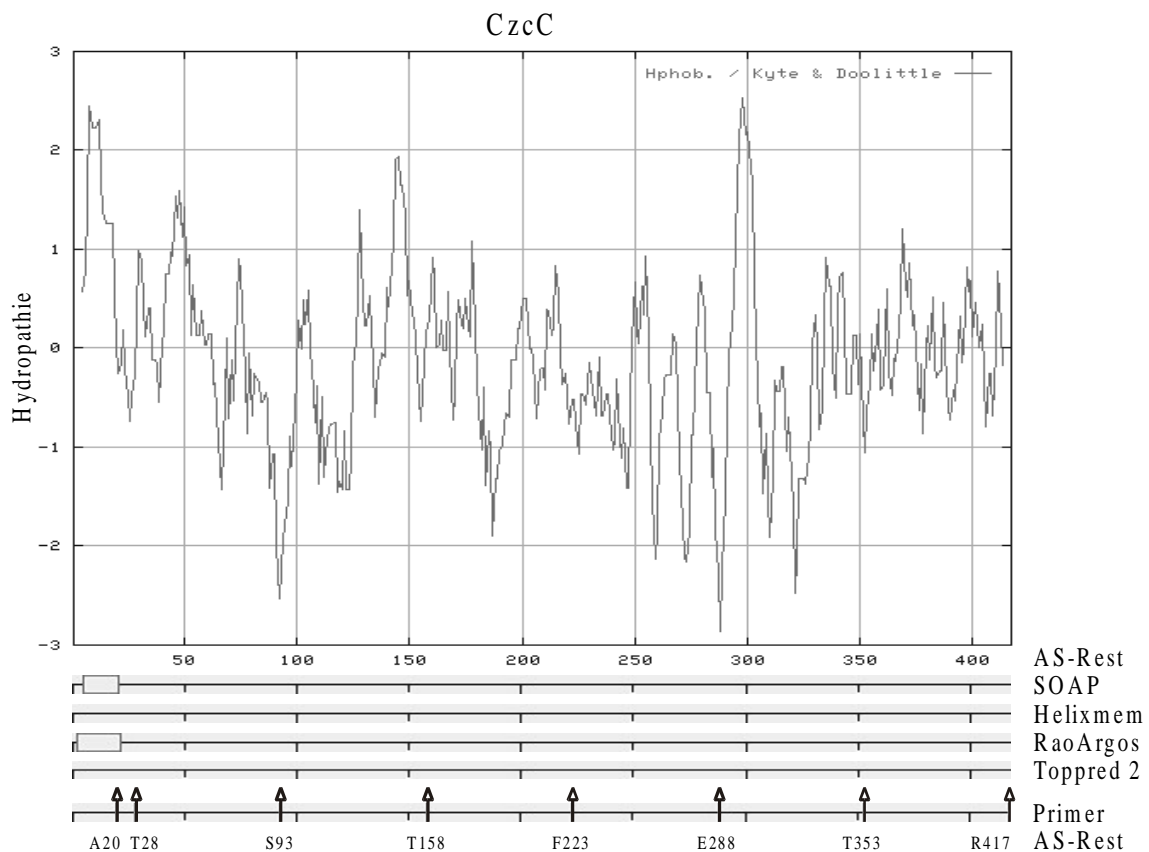


Abb. 9: Hydropathie-Plot, Vorhersagen zur Topologie und gewählte Fusionspositionen von CzcC in der Übersicht

Im Plot ist die Hydropathie an den verschiedenen Positionen (AS-Reste) im CzcC-Protein dargestellt (*Protscale*). Hydrophobe Regionen haben positive Werte, hydrophile Regionen negative Werte. Verschiedene Topologievorhersagen (*SOAP*, *Helixmem*, *RaoArgos* und *Toppred* Vers. 2.0) sind dazu maßstabsgetreu aufgetragen, wobei α -helikale Membrandurchgänge (TMS) durch Rechtecke repräsentiert werden (Referenzen im Text bzw. siehe II.3.4.5.). Die abgeleiteten Positionen der *Primer* für die Translationsfusionen werden durch Pfeile symbolisiert und mit dem Ein-Buchstaben-Code sowie der Nummer des AS-Restes bezeichnet.

Die von den Programmen *SOAP* (Kyte & Doolittle, 1982; Klein *et al.*, 1985) und *RaoArgos* (Rao & Argos, 1986) als TMS vorhergesagte hydrophobe Region am N-Terminus von CzcC wurde z. B. von *SignalP* (Nielsen *et al.*, 1997) als Signalpeptid deklariert (Ergebnis nicht gezeigt). Um eine eventuell vorhandene Spaltstelle der Signalpeptidase lokalisieren zu können, wurden die beiden ersten Fusionspositionen (A20 und T28) kurz hintereinander

gewählt. Alle weiteren Positionen folgten im Abstand von ca. 65 Aminosäuren bis zum C-Terminus.

1.2.2. Subzelluläre Sensoren mit komplementären Eigenschaften? CzcC-Hybridproteine gleicher Position haben ähnlich hohe Aktivitäten

Es wurde mit den Vektoren pECD499 (*'lacZ*) und pECD500 (*'phoA*) des Sets 1 (1.1.1.) gearbeitet. Die entsprechenden Genabschnitte von *czcC* auf pECD110 (Nies *et al.*, 1989) wurden mit PCR (Primer *czcC-KpnI*-Start und verschiedene *czcC...-XbaI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI-czcC'-XbaI*-Fragmente mit nativer RBS amplifiziert und in die genannten Fusionsvektoren kloniert. Nach Überprüfung der korrekten Translationsfusionierung durch Sequenzierung der DNA erfolgte die Ermittlung der spezifischen Aktivitäten der CzcC-Hybridproteine im PhoA- bzw. LacZ-Aktivitätstest in *E. coli* CC118(pGP1-2) (Tab. 7).

Tab. 7: spezifische PhoA- bzw. LacZ-Aktivitäten der CzcC-Fusionsproteine

Plasmid	relevanter Genotyp mit Fusionsposition	spez. Aktivität [U/mg TG]	LacZ-/PhoA-Aktivität	Bemerkungen
pECD504	<i>czcC20-'lacZ</i>	28.16± 6.27	16.6	sehr hohe LacZ-Aktivität
pECD515	<i>czcC20-'phoA</i>	1.70± 0.09		
pECD505	<i>czcC28-'lacZ</i>	7.75± 2.93	4.7	
pECD516	<i>czcC28-'phoA</i>	1.62± 0.13		
pECD506	<i>czcC93-'lacZ</i>	14.45± 3.41	2.9	
pECD517	<i>czcC93-'phoA</i>	5.00± 0.71		
pECD507	<i>czcC158-'lacZ</i>	3.17± 0.66	1.9	beide Aktivitäten gering
pECD518	<i>czcC158-'phoA</i>	1.65± 0.10		
pECD508	<i>czcC223-'lacZ</i>	18.12± 9.55	3.6	
pECD519	<i>czcC223-'phoA</i>	4.97± 0.27		
pECD509	<i>czcC288-'lacZ</i>	24.98± 8.21	2.2	beide Aktivitäten hoch
pECD520	<i>czcC288-'phoA</i>	11.27± 2.12		
pECD510	<i>czcC353-'lacZ</i>	10.99± 4.03	2.4	
pECD521	<i>czcC353-'phoA</i>	4.64± 0.43		
pECD511	<i>czcC417-'lacZ</i>	6.39± 3.24	2.6	<i>czcC</i> komplett fusioniert
pECD522	<i>czcC417-'phoA</i>	2.45± 0.17		

Die spezifischen Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Hybridproteinen sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min). Es sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (± Standardabweichungen) dargestellt. Zusammengehörende LacZ- und PhoA-Aktivitäten derselben Fusionsposition sind untereinander angegeben, wobei die LacZ-Werte grau unterlegt sind.

Es konnte eine eindeutige Korrelation zwischen LacZ- und PhoA-Aktivität an derselben Fusionsposition festgestellt werden. Die Aktivitäten verhielten sich nicht reziprok zueinander (z. B. hohe LacZ-Aktivität und geringe PhoA-Aktivität), sondern eine hohe LacZ-Aktivität korrelierte mit einer hohen PhoA-Aktivität. Dies wird durch das Aktivitäts-Verhältnis in Tab. 7 verdeutlicht, das an den unterschiedlichen Positionen bis auf Position A20 immer vergleichbar war. CzcC20-'LacZ hatte eine auffallend hohe LacZ-Aktivität bzw. je nach Betrachtungsweise CzcC20-'PhoA eine geringe PhoA-Aktivität. Eine Erklärung hierfür könnte ein in den Fusionen an Position A20 unvollständiges Exportsignal oder eine fehlende Spaltstelle der Signalpeptidase sein. In den Fusionen an Position T28 war das Exportsignal komplett bzw. die Spaltstelle vorhanden. Die insgesamt recht hohen PhoA-Aktivitäten der CzcC'-'PhoA-Fusionsproteine deuteten auf eine periplasmatische Lokalisation großer Teile des CzcC-Proteins hin, da ein Translokationssignal in CzcC dafür zwingend notwendig war.

1.2.3. Das Expressionsniveau der CzcC-Fusionen ist recht unterschiedlich

Zum Beweis, daß die spezifischen Reporterenzym-Aktivitäten in *E. coli* CC118(pGP1-2) auf möglichst stabile und vergleichbar exprimierte CzcC'-'LacZ- bzw. CzcC'-'PhoA-Hybridproteine zurückzuführen waren, erfolgte der Nachweis der Fusionen mit Antikörpern gegen ihre Reporter-Domänen (Anti-LacZ-AK und Anti-PhoA-AK; Tab. 4) (Abb. 10).

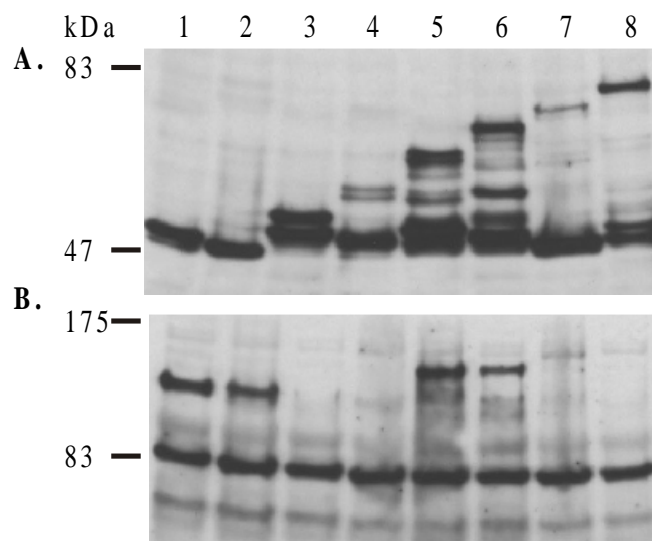


Abb. 10: Westernblot der CzcC-Hybridproteine mit polyklonalen Anti-PhoA-AK bzw. Anti-LacZ-AK

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den Fusionsproteinen (**A.** CzcC'-'PhoA; **B.** CzcC'-'LacZ) wurden präpariert, in einer SDS-PAGE (7.5 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Antikörpern (**A.** Anti-PhoA-AK; **B.** Anti-LacZ-AK) inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren **1-8** ist wie folgt (in Klammern theoretische Molekulargewichte der Proteine): Spur **1** - CzcC20-'PhoA (ca. 49 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 118 kDa; **B.**); Spur **2** - CzcC28-'PhoA (ca. 50 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 119 kDa; **B.**); Spur **3** - CzcC93-'PhoA (ca. 57 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 126 kDa; **B.**); Spur **4** - CzcC158-'PhoA (ca. 64 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 133 kDa; **B.**); Spur **5** - CzcC223-'PhoA (ca. 70 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 139 kDa; **B.**); Spur **6** - CzcC288-'PhoA (ca. 77 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 147 kDa; **B.**); Spur **7** - CzcC353-'PhoA (ca. 85 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 154 kDa; **B.**); Spur **8** - CzcC417-'PhoA (ca. 92 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 161 kDa; **B.**)

Dazu wurden Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den induzierten Fusionen in linearen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Fusionsproteine über Westernblot nachgewiesen.

Alle CzcC'-PhoA-Fusionsproteine (mit Abbauprodukten bis hin zur abgespaltenen PhoA-Domäne) waren im Westernblot nachweisbar. Bei den CzcC'-LacZ-Fusionen war das Bild etwas differenzierter. Es konnten nicht alle Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die identifizierbaren Hybridproteine waren aber stabil, da keine abgespaltene β -Galaktosidase-Domäne feststellbar war. Das bei ca. 85 kDa erhaltene Signal entsprach der unter 1.1.1. beschriebenen Kreuzreaktion des Anti-LacZ-AK mit einem Protein von *E. coli* CC118.

1.2.4. Die CzcC'-PhoA-Fusionsproteine sind im Nativen Gel enzymatisch aktiv

Um nicht nur die Existenz der Fusionsproteine zu zeigen, sondern auch einen Beweis der an sie gekoppelten enzymatischen Aktivität zu erbringen, wurden die Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit induzierten CzcC'-PhoA-Fusionen mittels Nativer PAGE und anschließender Aktivitätsfärbung für Alkalische Phosphatase analysiert (Abb. 11). Die Intensitäten der Blaufärbung korrelierten eindeutig mit den in Tab. 7 angegebenen Werten für die spezifischen PhoA-Aktivitäten der CzcC-Fusionsproteine.

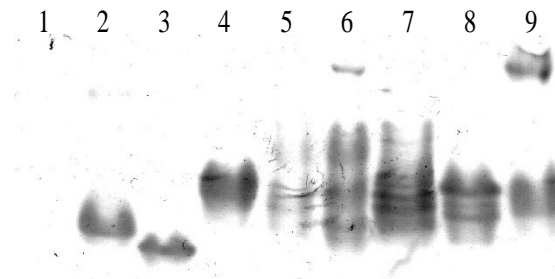


Abb. 11: Alkalische Phosphatase-Aktivitätsfärbung der CzcC'-PhoA-Hybridproteine nach Nativer PAGE

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den Fusionsproteinen (CzcC'-PhoA) wurden präpariert, in einer Nativen Gradienten-PAGE (4-20 %iges Gel) aufgetrennt, und mit dem Substrat X-P inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren **1-9** ist wie folgt (in Klammern theoretische Molekulargewichte der Proteine): Spur **1** – *phoA*-Vektor pECD500; Spur **2** – CzcC20'-PhoA (ca. 49 kDa); Spur **3** – CzcC28'-PhoA (ca. 50 kDa); Spur **4** – CzcC93'-PhoA (ca. 57 kDa); Spur **5** – CzcC158'-PhoA (ca. 64 kDa); Spur **6** – CzcC223'-PhoA (ca. 70 kDa); Spur **7** – CzcC288'-PhoA (ca. 77 kDa); Spur **8** – CzcC353'-PhoA (ca. 85 kDa); Spur **9** – CzcC417'-PhoA (ca. 92 kDa)

1.3. CzcB erstreckt sich über den periplasmatischen Raum

Wo liegen die hydrophilen Bereiche von CzcB? Auf diese Frage galt es, eine Antwort zu finden. Deshalb wurde eine Serie von Translationsfusionen mit dem Reporterplasmid-Set 1 generiert. Es sollte auch geklärt werden, ob das Protein nur an die Membran assoziiert oder durch ein TMS fest in ihr verankert ist und ob es eventuell polytopisch strukturiert ist.

1.3.1. Vorhersagen zur Struktur von CzcB und Auswahl der Fusionspositionen

Mit Hilfe verschiedener Programme wurden Vorhersagen zur Sekundärstruktur bzw. Membran-Topologie von CzcB getroffen und ein Hydropathie-Profil erstellt. Die Auswahl der Fusionspositionen und das *Primer*-Design erfolgten auf Grundlage der Computermodelle (Abb. 12).

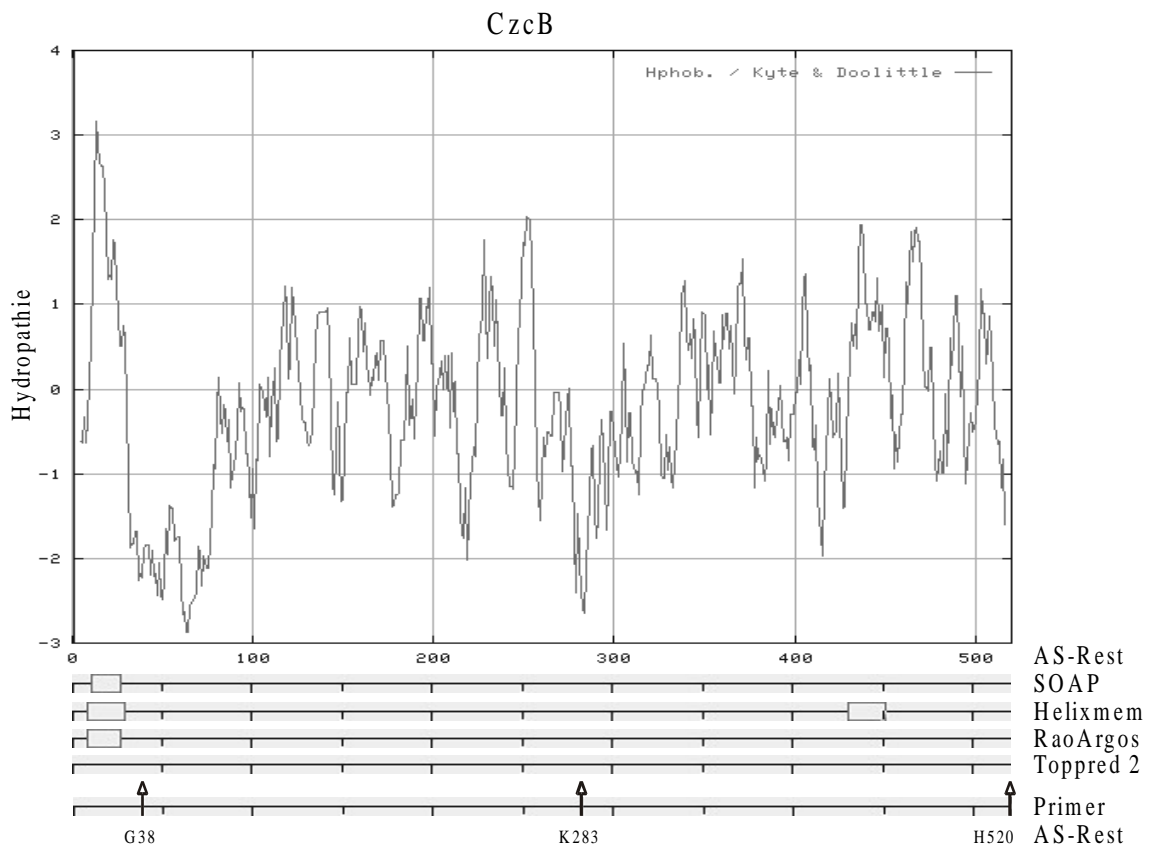


Abb. 12: Hydropathie-Plot, Vorhersagen zur Topologie und gewählte Fusionspositionen von CzcB in der Übersicht

Im Plot ist die Hydropathie an den verschiedenen Positionen (AS-Reste) im CzcB-Protein dargestellt (*ProtScale*). Hydrophobe Regionen haben positive Werte, hydrophile Regionen negative Werte. Verschiedene Topologievorhersagen (*SOAP*, *Helixmem*, *RaoArgos* und *Toppred* Vers. 2.0) sind dazu maßstabsgetreu aufgetragen, wobei α -helikale Membrandurchgänge (TMS) durch Rechtecke repräsentiert werden (Referenzen im Text bzw. siehe II.3.4.5.). Die abgeleiteten Positionen der *Primer* für die Translationsfusionen werden durch Pfeile symbolisiert und mit dem Ein-Buchstaben-Code sowie der Nummer des AS-Restes bezeichnet.

Während *Toppred 2* (von Heijne, 1992) kein TMS in der Struktur von CzcB prognostizieren konnte, wurden durch *Helixmem* (Eisenberg *et al.*, 1984) zwei TMS vorhergesagt. Die Fusion nach Aminosäurerest G38 wurde im hydrophilen Bereich direkt nach der putativen TMS 1 gesetzt. Die Fusionspositionen K283 und H520 befanden sich in hydrophilen Regionen in der Mitte bzw. am C-Terminus der Proteinsequenz.

1.3.2. Lassen die Aktivitäten der CzcB-Hybridproteine auf periplasmatische Lokalisation schließen?

Wie schon bei CzcC wurden die Vektoren pECD499 (*'lacZ*) und pECD500 (*'phoA*) des Sets 1 (1.1.1.) für die Konstruktion der Reporter-gen-Fusionen genutzt. Die entsprechenden Abschnitte von *czcB* mit nativer RBS wurden zusammen mit dem kompletten *czcC*-Gen auf pECD110 (Nies *et al.*, 1989) mittels PCR (*Primer czcC-KpnI*-Start und verschiedene *czcCB...-XbaI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI-czcCB'-XbaI*-Fragmente amplifiziert und in die Fusionsvektoren kloniert. Nach Sequenzierung der DNA im Bereich der Fusionsregion wurden die spezifischen PhoA- bzw. LacZ-Aktivitäten der CzcB-Hybridproteine in *E. coli* CC118(pGP1-2) getestet (Tab. 8).

Tab. 8: spezifische PhoA- bzw. LacZ-Aktivitäten der CzcB-Fusionsproteine

Plasmid	relevanter Genotyp mit Fusionsposition	spez. Aktivität [U/mg TG]	LacZ-/PhoA-Aktivität	Bemerkungen
pECD512	<i>czcCB38-lacZ</i>	1.38± 0.25	0.4	relativ hohe PhoA-Aktivität
pECD523	<i>czcCB38-phoA</i>	3.60± 0.17		
pECD513	<i>czcCB283-lacZ</i>	3.81± 1.14	9.3	beide Aktivitäten gering
pECD524	<i>czcCB283-phoA</i>	0.41± 0.07		
pECD514	<i>czcCB520-lacZ</i>	19.89± 6.20	10.8	<i>CB</i> komplett, hohe LacZ-Aktivität
pECD525	<i>czcCB520-phoA</i>	1.85± 0.04		

Die spezifischen Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Hybridproteinen sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min). Es sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (\pm Standardabweichungen) dargestellt. Zusammengehörende LacZ- und PhoA-Aktivitäten derselben Fusionsposition sind untereinander angegeben, wobei die LacZ-Werte grau unterlegt sind.

Das Verhältnis von LacZ-/PhoA-Aktivität stieg mit zunehmender Länge der Fusionen deutlich an. Während die Fusionen an Position G38 eindeutig auf periplasmatische Lokalisation hindeuteten, war die Interpretation für die beiden anderen Positionen komplizierter. Die Fusionen nach K283 lieferten jeweils geringe Aktivitäten, was möglicherweise Instabilität indizierte. Fusionen am C-Terminus (Position H520) hatten höhere Aktivitäten. Da Fusionen mit Alkalischer Phosphatase als deutlich weniger von Artefakten belastet galten und somit stärker bei der Beurteilung der Lokalisation derselben Position zu gewichten waren, wurde eine Lokalisation des C-Terminus im Periplasma angenommen, denn für PhoA-Aktivität war Translokation unabdingbar.

1.3.3. Die CzcB-Hybridproteine werden nicht gleichmäßig exprimiert bzw. sind unterschiedlich stabil

Um die Existenz der CzcB'-'LacZ- bzw. CzcB'-'PhoA-Fusionsproteine in *E. coli* CC118(pGP1-2) nachzuweisen, wurden die Rohextrakte mit induzierten Fusionen in linearen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Fusionsproteine über Westernblot nachgewiesen (Abb. 13).

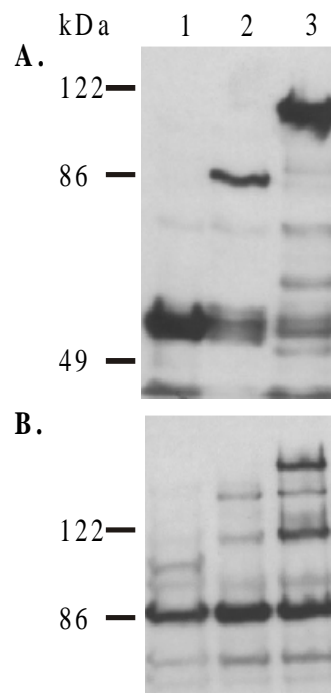


Abb. 13: Westernblot der CzcB-Hybridproteine mit polyklonalen Anti-PhoA-AK bzw. Anti-LacZ-AK

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den Fusionsproteinen (**A.** CzcB'-'PhoA; **B.** CzcB'-'LacZ) wurden präpariert, in einer SDS-PAGE (7.5 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Antikörpern (**A.** Anti-PhoA-AK; **B.** Anti-LacZ-AK) inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren **1-3** ist wie folgt (in Klammern theoretische Molekulargewichte der Proteine): Spur **1** – CzcB38-'PhoA (ca. 51 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 120 kDa; **B.**); Spur **2** – CzcB283-'PhoA (ca. 76 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 145 kDa; **B.**); Spur **3** – CzcB520-'PhoA (ca. 102 kDa; **A.**) -'LacZ (ca. 171 kDa; **B.**)

Die CzcB'-'PhoA-Fusionsproteine waren gut im Westernblot detektierbar. Sie waren stabil, da Abbauprodukte nur in geringem Maße erkennbar waren. CzcB283-'PhoA wurde deutlich schwächer als die beiden anderen CzcB'-'PhoA-Fusionen exprimiert.

Bei den CzcB'-'LacZ-Fusionen wurde die Fusion nach H520 am besten exprimiert, die Fusion nach K283 ergab deutlich schwächere Signale. Beiden Fusionen konnte auch eine jeweils abgespaltene β -Galaktosidase-Domäne zugeordnet werden. Das Signal von CzcB38-'LacZ war von der Größe her etwas klein (unterhalb der β -Galaktosidase-Domäne), war aber erkennbar. Die Bande bei ca. 85 kDa, die eine Kreuzreaktion des Anti-LacZ-AK mit einem Protein von *E. coli* CC118 darstellte (1.1.1.), war ebenfalls nachweisbar.

1.4. Die beiden großen hydrophilen Domänen der zentralen Pumpe CzcA liegen auf der periplasmatischen Seite der Membran

Um die Funktion des Czc-Efflux-Komplexes verstehen zu können, mußte zunächst die Struktur genauer analysiert werden. Dabei stand die Hauptkomponente des Komplexes, CzcA, im Mittelpunkt des Interesses. Die Zahl der TMS und die Orientierung der hydrophilen Domänen bezogen auf die Cytoplasmamembran des unbestritten polytopischen Membranproteins sollten mit Hilfe von Translationsfusionen mit den Reporterplasmiden der verschiedenen Sets untersucht werden.

1.4.1. Ein Dutzend TMS? Vorhersagen zur Struktur von CzcA und Auswahl der Fusionspositionen

Unter Nutzung umfangreicher Software zur Vorhersage der Membran-Topologie von Proteinen wurden von der Primärsequenz Modelle für die Struktur des Membranproteins CzcA abgeleitet. Außerdem wurde das Hydrophathie-Profil des Proteins aufgetragen. Sowohl Hydrophathie-Profil als auch die Strukturmodelle wurden beim Design der *Primer* an den Fusionspositionen berücksichtigt (Abb. 14).

Insgesamt waren die Prognosen der verschiedenen Programme für CzcA im Vergleich zu denen für verwandte Transportproteine (z. B. MexB und MexD) sehr ähnlich. Die Unterschiede lagen mehr in Details, wie den Start- und Endpunkten der TMS. Die Programme *PHDhtm* (Rost *et al.*, 1995), *SOSUI* (Hirokawa *et al.*, 1998) und *TMAP* (Persson & Argos, 1994) prognostizierten elf TMS, *SOAP* (Kyte & Doolittle, 1982; Klein *et al.*, 1985), *HMMTOP* (Tusnády & Simon, 1998) und *TMHMM* (Sonnhammer *et al.*, 1998) sagten zwölf TMS voraus und *DAS* (Cserzo *et al.*, 1997), *Tmpred* (Hofmann & Stoffel, 1993), *Helixmem* (Eisenberg *et al.*, 1984) und *Toppred 2* (von Heijne, 1992) plädierten für 13 TMS. Etwas abwegig erschien die Prognose von *RaoArgos* (Rao & Argos, 1986) für die Struktur von CzcA mit sieben TMS, wobei deutlich erkennbar war, daß die Software in Regionen hoher Hydrophobie nicht zur Auflösung einzelner TMS in der Lage war.

Es wurden 25 Fusionspositionen ausgewählt. Alle, mit Ausnahme der C-terminalen Position A1063, wurden so gesetzt, daß positiv geladene Aminosäurereste wie Arg und Lys die letzte Aminosäure bildeten. So wurde sichergestellt, daß für die Lokalisation kleiner hydrophiler Loops möglicherweise essentielle topologische Signale noch vorhanden waren.

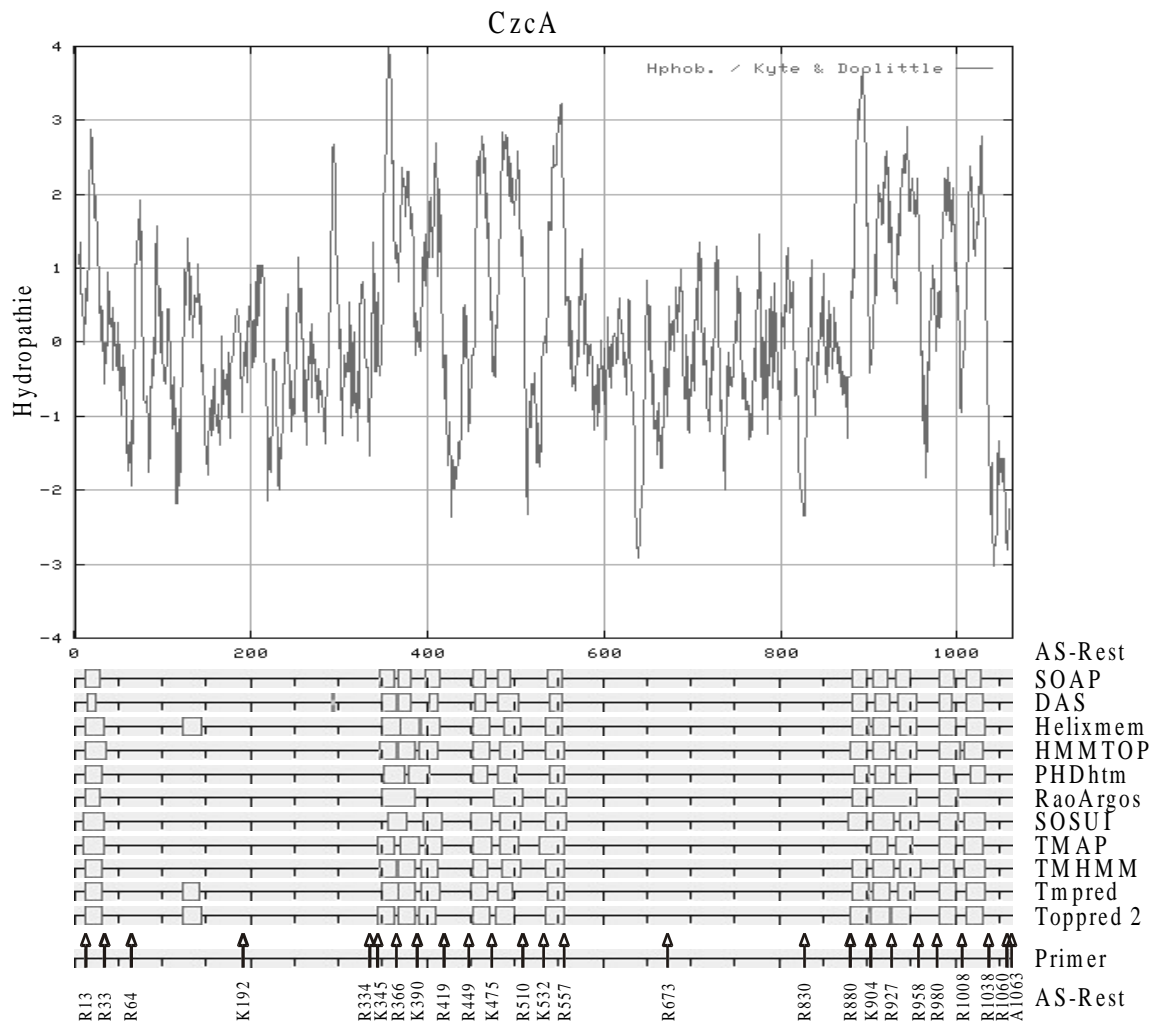


Abb. 14: Hydropathie-Plot, Vorhersagen zur Topologie und gewählte Fusionspositionen von CzcA in der Übersicht

Im Plot ist die Hydropathie an den verschiedenen Positionen (AS-Reste) im CzcA-Protein dargestellt (*ProtScale*). Hydrophobe Regionen haben positive Werte, hydrophile Regionen negative Werte. Verschiedene Topologievorhersagen (*SOAP*, *DAS*, *Helixmem*, *HMMTOP*, *PHDhtm*, *RaoArgos*, *SOSUI*, *TMAP*, *TMHMM*, *Tmpred* und *Toppred* Vers. 2.0) sind dazu maßstabsgetreu aufgetragen, wobei α -helikale Membrandurchgänge (TMS) durch Rechtecke repräsentiert werden (Referenzen im Text bzw. siehe II.3.4.5.). Die abgeleiteten Positionen der *Primer* für die Translationsfusionen werden durch Pfeile symbolisiert und mit dem Einbuchstaben-Code sowie der Nummer des AS-Restes bezeichnet.

1.4.2. Die Termini von CzcA liegen im Cytoplasma, die großen hydrophilen Domänen im Periplasma

Folgende Reporterplasmide kamen bei den Untersuchungen zum Einsatz: pECD623 (*phoA*-Vektor des Sets 2), pECD637 (*phoA*-Vektor des Sets 3) und pECD499 (*lacZ*-Vektor des Sets 1). Die entsprechenden Abschnitte von *czcA* auf pECD110 (Nies *et al.*, 1989) wurden mittels PCR (*Primer czcA-KpnI*-Start und verschiedene *czcA*...-*XbaI*-Ende; Tab. 3) als *KpnI*-*czcA*'-*XbaI*-Fragmente mit nativer RBS amplifiziert und in die Fusionsvektoren kloniert. Nach Sequenzierung der DNA im Bereich der Fusionsregion wurden die spezifischen *PhoA*- bzw. *LacZ*-Aktivitäten der CzcA-Fusionsproteine in *E. coli* CC118(pGP1-2) ermittelt (Tab. 9).

Tab. 9: spezifische PhoA- bzw. LacZ-Aktivitäten der CzcA-Fusionen

Plasmid	Set	relevanter Genotyp mit Fusionsposition	spez. Aktivität [U/mg TG]	LacZ-/PhoA-Aktivität	Bemerkungen
pECD638	3	<i>czcA13-'phoA</i>	0.29± 0.10		Aktivität gering
pECD624	2	<i>czcA33-'phoA</i>	3.33± 0.87		
pECD625	2	<i>czcA64-'phoA</i>	3.55± 0.95		
pECD626	2	<i>czcA192-'phoA</i>	4.86± 0.81		hohe PhoA-
pECD620	1	<i>czcA334-'lacZ</i>	1.04± 0.51	0.2	Aktivitäten
pECD639	3	<i>czcA334-'phoA</i>	5.92± 1.81		
pECD627	2	<i>czcA345-'phoA</i>	5.15± 1.19		
pECD628	2	<i>czcA366-'phoA</i>	0.51± 0.01		Aktivitätsniveau
pECD640	3		0.84± 0.01		vergleichbar
pECD629	2	<i>czcA390-'phoA</i>	3.34± 0.45		Aktivitätsniveau
pECD641	3		7.43± 0.69		vergleichbar
pECD630	2	<i>czcA419-'phoA</i>	3.09± 0.71		
pECD631	2	<i>czcA449-'phoA</i>	0.42± 0.05		
pECD642	3	<i>czcA475-'phoA</i>	0.45± 0.12		
pECD632	2	<i>czcA510-'phoA</i>	0.42± 0.07		
pECD633	2	<i>czcA532-'phoA</i>	0.35± 0.05		
pECD634	2	<i>czcA557-'phoA</i>	0.51± 0.04		
pECD643	3	<i>czcA673-'phoA</i>	4.19± 0.65		
pECD645	3	<i>czcA830-'phoA</i>	8.84± 0.06		hohe PhoA-
pECD635	2	<i>czcA880-'phoA</i>	1.27± 0.27		Aktivitäten
pECD646	3	<i>czcA904-'phoA</i>	3.22± 0.08		
pECD664	3	<i>czcA927-'phoA</i>	0.54± 0.09		
pECD666	3	<i>czcA958-'phoA</i>	0.44± 0.09		
pECD667	3	<i>czcA980-'phoA</i>	0.20± 0.10		
pECD668	3	<i>czcA1008-'phoA</i>	2.85± 1.51		
pECD669	3	<i>czcA1038-'phoA</i>	0.35± 0.07		geringe PhoA-
pECD672	3	<i>czcA1060-'phoA</i>	0.39± 0.13		Aktivitäten
pECD621	1	<i>czcA1063-'lacZ</i>	1.51± 0.51	5.4	A komplett, beide
pECD673	3	<i>czcA1063-'phoA</i>	0.28± 0.07		Aktivitäten gering

Die spezifischen Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Hybridproteinen sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min). Es sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (\pm Standardabweichungen) dargestellt. Zusammengehörende LacZ- und PhoA-Aktivitäten derselben Fusionsposition sind untereinander angegeben, wobei die LacZ-Werte grau unterlegt sind.

Die direkt am N-Terminus von CzcA gelegene Fusionsposition R13 lieferte bei Fusion mit Alkalischer Phosphatase eine geringe Enzymaktivität. Fusionsproteine, die sich von Positionen nach dem TMS 1 ableiteten (R33, R64, K192, R334 und K345) hatten dann hohe PhoA-Aktivitäten. Die Daten bewiesen, daß die erste große hydrophile Region nicht durch ein weiteres TMS, wie von verschiedenen Programmen prognostiziert, unterbrochen wurde, sondern die große periplasmatische Domäne I bildete. Demzufolge war der N-Terminus von CzcA im Cytoplasma lokalisiert. Hybridproteine, die von Positionen in der zweiten großen hydrophilen Region in der Proteinsequenz abstammten (R673, R830 und zumindest R880) wiesen mit ihren hohen PhoA-Aktivitäten auf periplasmatische Lokalisation hin (große periplasmatische Domäne II). Fusionen an Positionen am C-Terminus (R1038, R1060 und A1063) zeigten stets geringe PhoA-Aktivität und deuteten damit cytoplasmatische Lokalisation an.

In den hydrophoben Regionen zwischen den großen periplasmatischen Domänen I und II und dem C-Terminus gestaltete sich die Auflösung der einzelnen TMS etwas schwieriger. PhoA-Fusionen an den Positionen R366, R449, K475, R510, K532 und R557 hatten geringe Enzymaktivitäten. Genauso verhielten sich die Fusionen an den Positionen R927, R958 und R980. Höhere PhoA-Aktivitäten zeigten hingegen Hybridproteine, die sich von den Positionen K390 und R419 sowie K904 und R1008 ableiteten.

Die Enzymaktivitäten von CzcA366-'PhoA bzw. CzcA390-'PhoA bewiesen, daß das Aktivitätsniveau von Fusionen, die von den unterschiedlichen 'phoA-Vektoren der Sets 2 und 3 kodiert wurden, vergleichbar war, wenn auch aufgrund des Gendosiseffektes die vom pGEM[®]-T Easy-Derivat pECD637 (Set 3) kodierten Fusionsproteine zu etwas höheren Werten führten.

1.4.3. Fast alle CzcA'-PhoA-Fusionsproteine sind im Westernblot nachweisbar, wobei kürzere meist besser exprimiert werden und stabiler sind als längere

Zur Sicherstellung, daß die an permeabilisierten Zellen gemessenen spezifischen PhoA-Aktivitäten auf möglichst vergleichbar exprimierte und stabile CzcA'-PhoA-Fusionsproteine in *E. coli* CC118(pGP1-2) zurückzuführen waren, wurden die Rohextrakte mit induzierten Fusionen in linearen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Fusionsproteine im Westernblot nachgewiesen (Abb. 15a und b).

Die Fusionen CzcA33-'PhoA, CzcA64-'PhoA, CzcA192-'PhoA, CzcA334-'PhoA und CzcA345-'PhoA wurden sehr stark exprimiert und waren relativ stabil. Beim Fusionsprotein CzcA13-'PhoA fiel die Unterscheidung zwischen Fusion und abgespaltener PhoA-Domäne schwer, die große Differenz zur nächstgrößeren Fusion CzcA33-'PhoA deutete aber eher auf eine abgespaltene Reporter-Domäne hin. CzcA366-'PhoA wurde sowohl von pECD628 als auch von pECD640 aus sehr schwach exprimiert. Das Hybridprotein CzcA390-'PhoA wurde hingegen sowohl von pECD629 als auch von pECD641 aus äußerst gut exprimiert, der Anteil

abgespaltener PhoA-Domäne war jedoch ebenfalls recht hoch. Ähnlich war das Bild bei der Fusion CzcA419-'PhoA. Sehr schwach wurden CzcA449-'PhoA und CzcA475-'PhoA exprimiert. Die folgenden Fusionsproteine CzcA510-'PhoA, CzcA532-'PhoA und CzcA557-'PhoA wurden wieder deutlich stärker exprimiert (Abb. 15a).

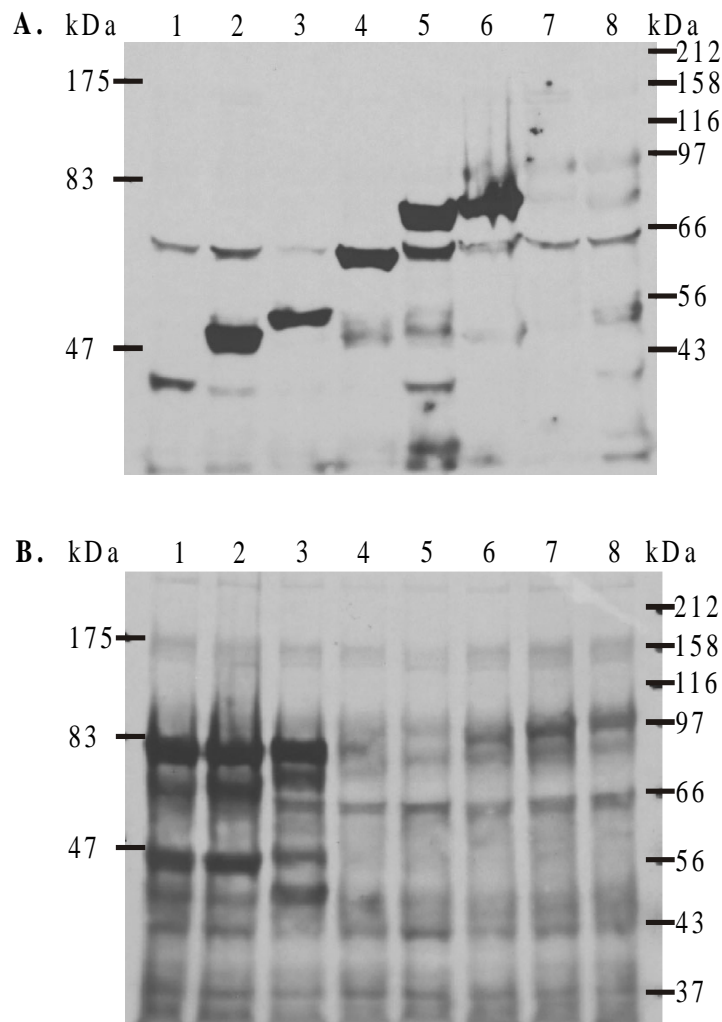


Abb. 15a: Westernblot der kürzeren CzcA'-PhoA-Hybridproteine mit polyklonalen Anti-PhoA-AK

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den CzcA'-PhoA-Fusionsproteinen wurden präpariert, in linearer SDS-PAGE (7.5 %ige Gele) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Anti-PhoA-AK inkubiert. Die theoretischen Molekulargewichte der Fusionsproteine sind jeweils in Klammern angegeben.

A. Die Auftragung in den Spuren 1-8 ist wie folgt: Spur 1 – CzcA13-'PhoA (ca. 49 kDa); Spur 2 – CzcA33-'PhoA (ca. 51 kDa); Spur 3 – CzcA64-'PhoA (ca. 54 kDa); Spur 4 – CzcA192-'PhoA (ca. 68 kDa); Spur 5 – CzcA334-'PhoA (ca. 84 kDa); Spur 6 – CzcA345-'PhoA (ca. 85 kDa); Spur 7 – CzcA366-'PhoA (ca. 87 kDa; pECD628); Spur 8 – CzcA366-'PhoA (ca. 87 kDa; pECD640)

B. Die Auftragung in den Spuren 1-8 ist wie folgt: Spur 1 – CzcA390-'PhoA (ca. 90 kDa; pECD629); Spur 2 – CzcA390-'PhoA (ca. 90 kDa; pECD641); Spur 3 – CzcA419-'PhoA (ca. 93 kDa); Spur 4 – CzcA449-'PhoA (ca. 96 kDa); Spur 5 – CzcA475-'PhoA (ca. 99 kDa); Spur 6 – CzcA510-'PhoA (ca. 103 kDa); Spur 7 – CzcA532-'PhoA (ca. 106 kDa); Spur 8 – CzcA557-'PhoA (ca. 108 kDa)

Die Fusion CzcA673-'PhoA wurde stark exprimiert. Die Expression von CzcA830-'PhoA war extrem hoch, der Anteil abgespaltener Reporter-Domäne aber ebenfalls groß. Die

Fusionen CzcA880-'PhoA, CzcA904-'PhoA, CzcA927-'PhoA, CzcA958-'PhoA und CzcA980-'PhoA wurden durchschnittlich exprimiert und nur bei CzcA904-'PhoA waren Abbauprodukte in größerem Umfang feststellbar. Die einzige Fusion, deren Existenz nicht im Westernblot nachweisbar war, war CzcA1008-'PhoA. Es konnte lediglich in hohem Maße abgespaltene PhoA-Domäne detektiert werden, was auf eine zwar gut exprimierte, aber extrem instabile Fusion schließen ließ. Die C-terminalen Fusionsproteine CzcA1060-'PhoA und CzcA1063-'PhoA waren inklusive Abbauprodukten sehr gut nachweisbar, während CzcA1038-'PhoA etwas schwächer exprimiert wurde. Die bei den Hybridproteinen CzcA958-'PhoA, CzcA980-'PhoA, CzcA1038-'PhoA, CzcA1060-'PhoA und CzcA1063-'PhoA erkennbaren Banden oberhalb von 200 kDa stellten wahrscheinlich Aggregationsprodukte dar (Abb. 15b).

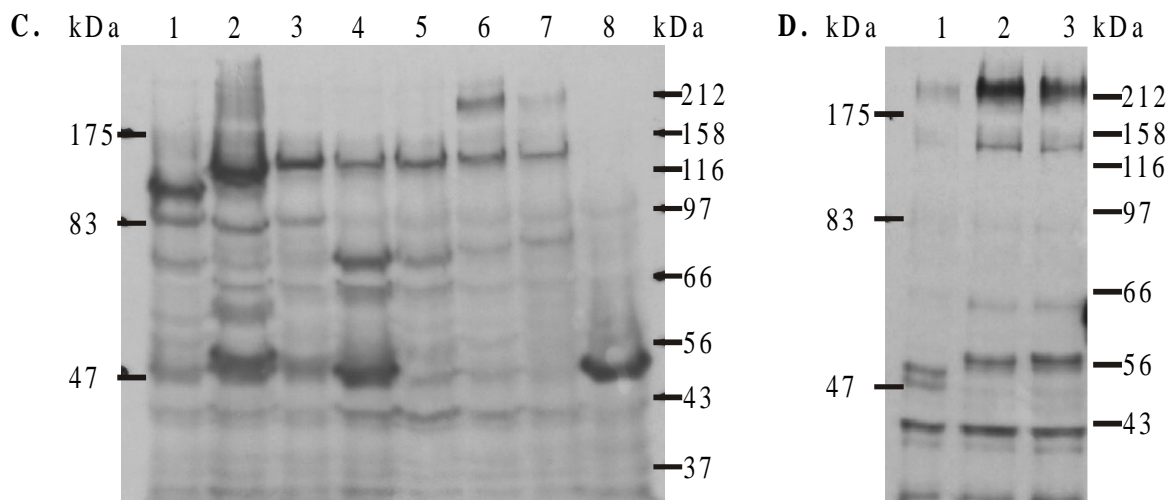


Abb. 15b: Westernblot der längeren CzcA-'PhoA-Hybridproteine mit polyklonalen Anti-PhoA-AK

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den CzcA-'PhoA-Fusionsproteinen wurden präpariert, in linearer SDS-PAGE (7.5 %ige Gele) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Anti-PhoA-AK inkubiert. Die theoretischen Molekulargewichte der Fusionsproteine sind jeweils in Klammern angegeben.

C. Die Auftragung in den Spuren **1-8** ist wie folgt: Spur **1** – CzcA673-'PhoA (ca. 121 kDa); Spur **2** – CzcA830-'PhoA (ca. 138 kDa); Spur **3** – CzcA880-'PhoA (ca. 143 kDa); Spur **4** – CzcA904-'PhoA (ca. 146 kDa); Spur **5** – CzcA927-'PhoA (ca. 148 kDa); Spur **6** – CzcA958-'PhoA (ca. 151 kDa); Spur **7** – CzcA980-'PhoA (ca. 154 kDa); Spur **8** – CzcA1008-'PhoA (ca. 157 kDa)

D. Die Auftragung in den Spuren **1-3** ist wie folgt: Spur **1** – CzcA1038-'PhoA (ca. 160 kDa); Spur **2** – CzcA1060-'PhoA (ca. 162 kDa); Spur **3** – CzcA1063-'PhoA (ca. 163 kDa)

1.4.4. Die T7-RNA-Polymerase bewirkt eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität, der T7-Promotor von pECD623 ist also intakt

War der T7-Promotor auf dem 'phoA-Vektor pECD623 (Set 2) für die Expression der PhoA-Fusionen von CzcA überhaupt von Bedeutung? Oder war vielmehr, wie schon bei den Vektoren des Sets 1, hauptsächlich der Promotor P1 (Stüber & Bujard, 1981; Brosius *et al.*, 1982) der pBR322-Derivate für die gemessene Enzymaktivität verantwortlich. Zur Überprüfung der Transkriptionseffizienz des T7-Promotors (p_{T7}) auf pECD623 erfolgte ein

Vergleich der Reporterenzym-Aktivitäten der Fusionen CzcA33-'PhoA, CzcA192-'PhoA und CzcA532-'PhoA in *E. coli* CC118(pGP1-2) mit T7-RNA-Polymerase und in *E. coli* CC118 ohne das Enzym (Tab. 10). Die Untersuchungen zeigten, daß der T7-Promotor der Derivate des 'phoA-Vektors pECD623 intakt war. Für die Identifizierung von periplasmatisch lokalisierten PhoA-Fusionen mit hoher Aktivität war das Vorhandensein von T7-Promotor und T7-RNA-Polymerase sogar von zentraler Bedeutung.

Tab. 10: Vergleich der spezifischen PhoA-Aktivitäten von CzcA-Fusionen in An- bzw. Abwesenheit der T7-RNA-Polymerase von pGP1-2

Plasmid	Set	relevanter Genotyp mit Fusionsposition	pGP1-2	spez. Aktivität [U/mg TG]	Aktivitäts-Verhältnis	Bemerkungen
pECD624	2	<i>czcA33</i> -' <i>phoA</i>	-	0.57± 0.01	0.17	siehe Tab. 9
			+	3.33± 0.87		
pECD626	2	<i>czcA192</i> -' <i>phoA</i>	-	0.70± 0.01	0.14	siehe Tab. 9
			+	4.86± 0.81		
pECD633	2	<i>czcA532</i> -' <i>phoA</i>	-	0.54± 0.01	1.54	siehe Tab. 9
			+	0.35± 0.05		

Die spezifischen PhoA-Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Hybridproteinen sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min). Es sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (± Standardabweichungen) dargestellt. Das Aktivitäts-Verhältnis ist der Quotient aus spez. Aktivität ohne zur spez. Aktivität mit pGP1-2 (Plasmid mit Gen der T7-RNA-Polymerase).

1.4.5. Haben durch PCR generierte, zufällige Mutationen entscheidenden Einfluß auf Enzymaktivität und Expression der Fusionen? Aussagen zur Anfälligkeit der Topologie-Untersuchungen gegenüber Punktmutationen im charakterisierten Protein

Wie schon erwähnt, wurden die Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und in die Fusionsvektoren kloniert. Anschließend wurde nach Sequenzierung der DNA im Bereich der Fusionsregion die Enzymaktivität in *E. coli* CC118(pGP1-2) getestet. Trotz Verwendung eines Polymerase-Gemisches mit *proof reading*-Funktion in der PCR wurden bei der DNA-Sequenzierung manchmal Punktmutationen im zu untersuchenden Gen festgestellt. In solchen Fällen wurden zwar andere Klone der jeweiligen Fusion herangezogen, aber es stellte sich trotzdem die Frage, wie anfällig das System auf Mutationen reagiert. Gerade bei längeren Genabschnitten war eine komplette Sequenzierung der DNA nicht möglich und es konnten somit Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Bestand vielleicht die Gefahr, daß auf durch Mutationen hervorgerufene Fusionsproteine artifizierlicher Topologie bevorzugt selektiert wurde? Dieser Frage sollte mit folgenden Untersuchungen begegnet werden. Die PhoA-Aktivität und Expression von zufällig festgestellten, mutierten Fusionsproteinen wurde mit Aktivität und Expression der korrekten Fusionen verglichen (Tab. 11; Abb. 16).

Tab. 11: spezifische PhoA-Aktivitäten von korrekten und mutierten CzcA-Fusionen

Plasmid	Set	relevanter Genotyp mit Fusionsposition	spez. Aktivität [U/mg TG]	Mutanten-/ Wt-Aktivität	Bemerkungen
pECD643	3	<i>czcA673-phoA</i>	4.19± 0.65		Wildtyp (Tab. 9)
pECD644	3	<i>czcA673-phoA*</i>	2.79± 0.40	0.67	K633R/ D637G-Doppelmutante
pECD646	3	<i>czcA904-phoA</i>	3.22± 0.08		Wildtyp (Tab. 9)
pECD647	3	<i>czcA904-phoA*</i>	2.45± 0.38	0.76	S7G-Mutante
pECD664	3	<i>czcA927-phoA</i>	0.54± 0.09		Wildtyp (Tab. 9)
pECD665	3	<i>czcA927-phoA*</i>	0.32± 0.09	0.58	I853T-Mutante
pECD669	3	<i>czcA1038-phoA</i>	0.35± 0.07		Wildtyp (Tab. 9)
pECD670	3	<i>czcA1038-phoA*</i>	0.26± 0.09	0.75	L896S/ P995L-Doppelmutante
pECD671	3	<i>czcA1038-phoA*</i>	0.26± 0.01	0.74	A898T-Mutante

Die spezifischen Aktivitäten von permeabilisierten Zellen mit den Hybridproteinen sind in U/mg Trockengewicht (TG) angegeben (1 U = 1 nmol/min). Es sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (± Standardabweichungen) dargestellt. PhoA-Aktivitäten von Hybridproteinen derselben Fusionsposition sind untereinander angegeben.

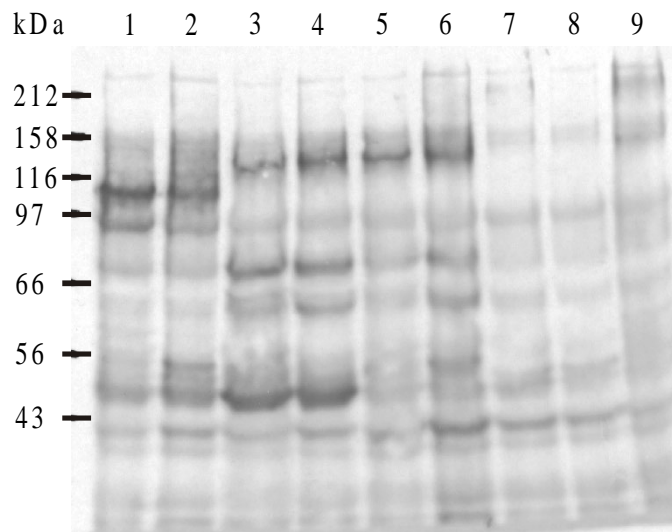


Abb. 16: Westernblot von korrekten und mutierten CzcA'-PhoA-Hybridproteinen mit polyklonalen Anti-PhoA-AK

Rohextrakte von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit den CzcA'-PhoA-Fusionsproteinen bzw. mit zugehörigen Mutanten-Fusionen wurden präpariert, in linearer SDS-PAGE (7.5 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Anti-PhoA-AK inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren 1-9 ist wie folgt (in Klammern theoretische Molekulargewichte der Proteine): Spur 1 – CzcA673'-PhoA (ca. 121 kDa); Spur 2 – CzcA673'-PhoA* (ca. 121 kDa); Spur 3 – CzcA904'-PhoA (ca. 146 kDa); Spur 4 – CzcA904'-PhoA* (ca. 146 kDa); Spur 5 – CzcA927'-PhoA (ca. 148 kDa); Spur 6 – CzcA927'-PhoA* (ca. 148 kDa); Spur 7 – CzcA1038'-PhoA (ca. 160 kDa); Spur 8 – CzcA1038'-PhoA* (ca. 160 kDa; pECD671); Spur 9 – CzcA1038'-PhoA* (ca. 160 kDa; pECD670)

Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, daß das Aktivitätsniveau von Wildtyp-Fusion und zugehöriger Mutanten-Fusion vergleichbar war. Die mutierten Fusionsproteine hatten eine Enzymaktivität in der gleichen Größenordnung wie die Wildtyp-Fusionen. Auffällig war, daß die Aktivität der Mutanten stets geringer war als die der Wildtyp-Hybridproteine (50-75 % Wildtyp-Aktivität).

Auch Expression und Stabilität der korrekten und mutierten Fusionsproteine ähnelten sich sehr. Zumindest konnte ein generelles Problem mit topologischen Daten von zufällig über PCR erzeugten Mutanten ausgeschlossen werden. Allerdings bedeutete dies nicht, daß einzelne Mutationen, von denen speziell topologische Signale betroffen waren bzw. die neue Signale dieser Art einführten, keinen dramatischen Einfluß auf die Meßwerte hätten haben können. Im gewählten Meßsystem erfolgte aber zumindest keine Selektion darauf.

1.4.6. Die Sequenz von *czcA* weicht von der unter EMBL X98451 veröffentlichten ab

Bei der Sequenzierung der DNA im Bereich der Fusionsregionen konnten Abweichungen von der unter der *Accession Number* X98451 in der EMBL-Datenbank veröffentlichten *czc*-DNA-Sequenz festgestellt werden (Abb. 17).

AS-Sequenz (CzcA):	---	Thr ₉₁₈	---	Ser ₉₅₉	Leu	---
DNA (ermittelt):	---	A ₆₈₄₃ CT	---	T ₆₉₆₆ CG	CTG	---
DNA (X98451):	---	A ₆₈₄₃ TT	---	C ₆₉₆₆ TT	GTG	---
AS-Sequenz (CzcA):	---	Ile ₉₁₈	---	Leu ₉₅₉	Val	---

Abb. 17: Vergleich der ermittelten Nukleotidsequenz im *czcA*-Gen mit der publizierten Sequenz (EMBL X98451)

Dargestellt sind lediglich die von der publizierten Sequenz X98451 abweichenden Abschnitte im *czcA*-Gen mit der nach Translation resultierenden AS-Sequenz. Die Unterschiede sind **fett** hervorgehoben. Tiefergestellte Ziffern kennzeichnen die Basenposition in der publizierten Sequenz der *czc*-Determinante (EMBL X98451) bzw. die AS-Sequenz im CzcA-Protein. Die ermittelte Sequenz von *czcA* entspricht der ursprünglich von Nies *et al.* (1989) veröffentlichten.

Diese Abweichungen waren mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf durch PCR hervorgerufene Mutationen zurückzuführen, da sie in allen sequenzierten *czcA*-Genabschnitten vorlagen. Das als DNA-*Template* eingesetzte Plasmid pECD110 mit der SGR der *czc*-Determinante als *EcoRI-BamHI*-Fragment stammte direkt vom Megaplasmid pMOL30 aus *R. metallidurans* CH34 ab. Die ermittelte *czcA*-Sequenz stimmte mit der ursprünglich von Nies *et al.* (1989) publizierten überein. Auch ein Vergleich mit Sequenzen des Genomprojektes von *Ralstonia eutropha* bestätigte die Richtigkeit dieser Nukleotidsequenz von *czcA* (BLAST; Altschul *et al.*, 1997; Nies *et al.*, 1989).

2. Untersuchungen zur Lokalisation der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes nach Fraktionierung von Zellen in die Kompartimente

Ein weiterer Ansatz, die subzelluläre Lokalisation der Czc-Efflux-Komponenten näher zu charakterisieren, bestand darin, die einzelnen Proteine heterolog in *E. coli* K38(pGP1-2) unter Kontrolle eines T7-Promotors zu exprimieren, mit [³⁵S]-Methionin zu markieren und anschließend die Zellen in ihre Kompartimente aufzutrennen. Es wurden die hydrophilen Kompartimente Periplasma und Cytoplasma als auch die Membranen von Zellen, die CzcC bzw. CzcB enthielten, präpariert und analysiert (2.1.). Die Membran-Fraktion wurde mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation weiter in Cytoplasmamembran und äußere Membran getrennt (2.2.). Wie bei den Untersuchungen mit Reporterproteinen wurde vorausgesetzt, daß die anderen Komponenten für eine korrekte Lokalisation der untersuchten Untereinheit nicht notwendig waren.

2.1. CzcC und CzcB sind zumindest an Membranen assoziiert - Fraktionierung von *E. coli*-Zellen mit den Komponenten CzcC bzw. CzcB

Für die Untersuchungen wurden *E. coli* K38(pGP1-2) mit Plasmid pECD119, das für CzcC kodierte, bzw. mit pECD130, das für CzcB kodierte, eingesetzt. Die Zellen mit den exprimierten und markierten Proteinen wurden über die beschriebenen Prozeduren kompartimentiert. Die Zellfraktionen wurden schließlich in einem linearen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Fluorographie auf Vorhandensein der radioaktiv markierten Proteine analysiert (Abb. 18).

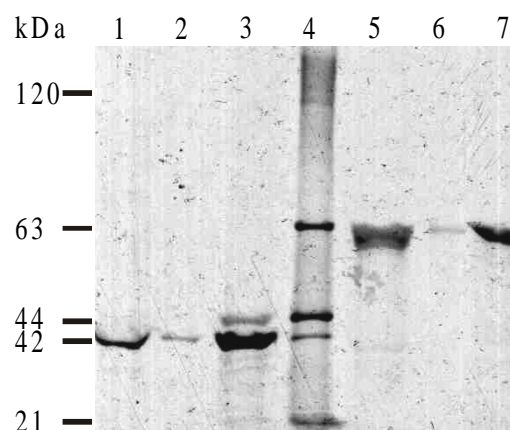


Abb. 18: Fluorographie zum Nachweis von CzcC bzw. CzcB in den Zellkompartimenten

Rohextrakte von *E. coli* K38(pGP1-2) mit markiertem CzcC (pECD119) bzw. CzcB (pECD130) wurden präpariert und in Cytoplasma (lösliche Fraktion) und Membranen (inklusive Zelltrümmer) aufgetrennt. Die Periplasma-Fraktion wurde nach osmotischem Schock an ganzen Zellen isoliert. Die Proben wurden in einer linearen SDS-PAGE (12.5 %iges Gel) aufgetrennt und über Fluorographie detektiert.

Als Marker kam Rohextrakt von *E. coli* K38(pGP1-2, pECD110) mit den ebenfalls markierten Proteinen CzcA (ca. 120 kDa), CzcB (ca. 63 kDa), CzcC (ca. 44 kDa unprozessiert; ca. 42 kDa prozessiert) und dem verkürzten CzcD' (ca. 21 kDa) zum Einsatz.

Die Auftragung in den Spuren 1-7 ist wie folgt: Spur 1 – Cytoplasma (pECD119); Spur 2 – Periplasma (pECD119); Spur 3 – Membranen (pECD119); Spur 4 – Marker (pECD110); Spur 5 – Cytoplasma (pECD130); Spur 6 – Periplasma (pECD130); Spur 7 – Membranen (pECD130)

Es konnten nur qualitative Aussagen getroffen werden, da vor Auftragung der radioaktiven Proben kein Abgleich der Proteinmengen erfolgte, sondern die Zellfraktionen komplett eingesetzt wurden. Beide Proteine waren in allen drei Kompartimenten nachweisbar. Es war deutlich erkennbar, daß große Mengen von CzcC und CzcB in der Membran-Fraktion lokalisiert waren. Da die Fraktion bei dieser Präparation auch noch Zelltrümmer enthielt, konnten auch *Inclusion bodies* vorliegen. Bei genauerer Betrachtung war dies aber mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der Fall, da zum einen ein moderates Überexpressionssystem verwendet wurde und nach Coomassie-Färbung CzcB und CzcC nicht erkennbar waren (Ergebnis nicht gezeigt). Zum anderen wurde CzcC fast ausschließlich in seiner prozessierten Form nachgewiesen. Das Protein wurde also nach Translation nicht artifiziell abgelagert, sondern von der Translokationsmaschinerie weiter bearbeitet.

Zumindest das Cytoplasma schien mit Membranen (und Periplasma) verunreinigt zu sein, da auch hier CzcC in prozessierter Form nachgewiesen wurde. Zur genaueren Beantwortung dieser Frage wären Kompartimentsmarker, Proteine bekannter Lokalisation, hilfreich gewesen.

2.2. Trennung der Membranen von *E. coli*-Zellen mit den Proteinen CzcC bzw. CzcB mittels isopyknischer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

2.2.1. CzcC reichert sich in Membran-Fractionen ungewöhnlich hoher Dichte an

Wie unter 2.1. gezeigt wurde, konnten große Mengen von CzcC in der Membran-Fraktion lokalisiert werden. Es war nun von Interesse, ob CzcC nach Auftrennung der Membranen in Cytoplasmamembran und äußere Membran einer der beiden Fraktionen zugeordnet werden konnte oder ob möglicherweise besondere Membranregionen, die von Bayer *et al.* (1982) beschriebenen Membran-Adhäsionszonen, eine Rolle spielten.

Dazu wurden Versuche mit *E. coli* K38(pGP1-2, pECD119) durchgeführt. Es wurden Membranen des Stammes mit radioaktiv markiertem CzcC präpariert und in einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Die einzelnen Membran-Fractionen wurden unter Aufzeichnung des $A_{280\text{ nm}}$ -Profils abgenommen und in einem linearen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte schließlich durch Fluorographie (Abb. 19).

Die beiden Peaks im $A_{280\text{ nm}}$ -Profil konnten den beiden Membranen zugeordnet werden. Die äußere Membran-Fraktion war mit Fraktion Nr. 4 identisch. Cytoplasmamembranen waren in Fraktionen geringerer Dichte (Nr. 6-8) angereichert. CzcC konnte hauptsächlich in Fraktionen hoher bis mittlerer Dichte nachgewiesen werden (Nr. 1-5). Besonders hoch erschien der CzcC-Anteil im Vergleich zum Gesamtprotein in Fraktion Nr. 2.

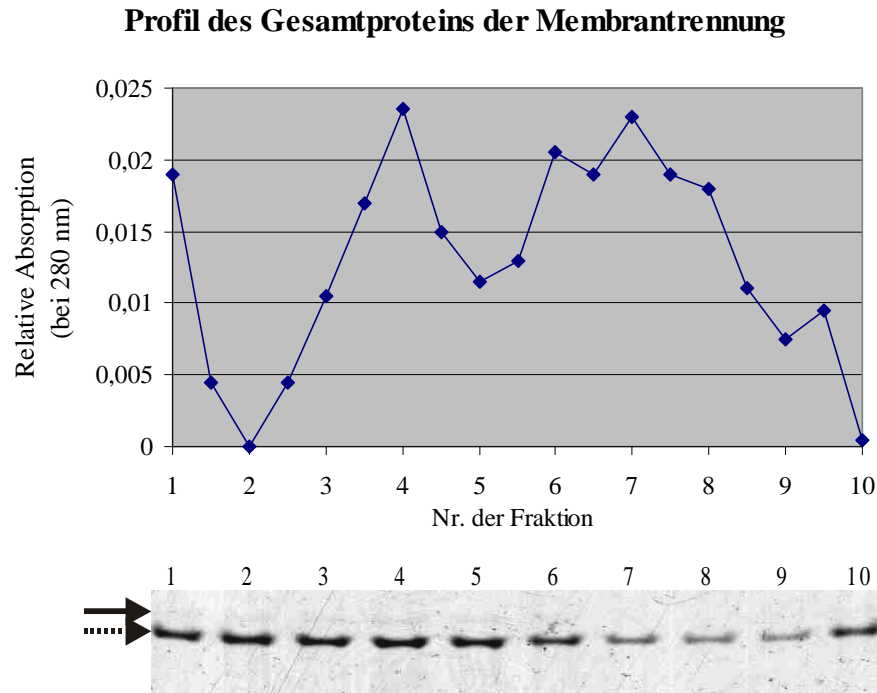


Abb. 19: Profil des Gesamtproteins der Membrantrennung von K38(pGP1-2, pECD119) und Fluorographie zum Nachweis von CzcC in den Membran-Fractionen

Membranen von *E. coli* K38(pGP1-2) mit radioaktiv markiertem CzcC (pECD119) wurden präpariert und im Saccharose-Dichtegradienten [25-60 % (w/w) Saccharose] aufgetrennt. Es wurden zehn Fraktionen mit der dichtesten beginnend gesammelt, komplett in einer linearen SDS-PAGE (12,5 %iges Gel) aufgetrennt und über Fluorographie analysiert.

Auf die Absorption von Fraktion Nr. 2 wurde abgeglichen und die Absorptionen der anderen Fraktionen relativ dazu aufgetragen. Der gestrichelte Pfeil gibt die Position des prozessierten CzcC bei ca. 42 kDa an. Der normale Pfeil markiert die Position des in einigen Fraktionen nachweisbaren, nicht prozessierten CzcC bei ca. 44 kDa. Die Auftragung in den Spuren 1-10 entspricht den Fraktionen Nr. 1-10.

2.2.2. Auch CzcB ist in Membran-Fractionen ungewöhnlich hoher Dichte angereichert

Ähnlich wie CzcC war auch CzcB gut in der Membran-Fraktion nachweisbar (2.1.). Durch Membrantrennung sollte die Lokalisation des Proteins weiter konkretisiert werden.

Membranen von *E. coli* K38(pGP1-2, pECD130) mit markiertem CzcB wurden im Saccharose-Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation getrennt. Der Gradient wurde unter Aufzeichnung von $A_{280 \text{ nm}}$ fraktioniert. Die Fraktionen wurden im linearen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert (Abb. 20).

Die Fraktion der äußeren Membran konnte Fraktion Nr. 4 zugeordnet werden. Cytoplasmamembranen waren in Fraktionen geringerer Dichte (um Nr. 8) angereichert. Das CzcB-Protein konnte hauptsächlich in Fraktionen höherer Dichte nachgewiesen werden (Nr. 1-4). Der Anteil von CzcB am Gesamtprotein erreichte in den Fraktionen Nr. 2 und 3 Höchstwerte.

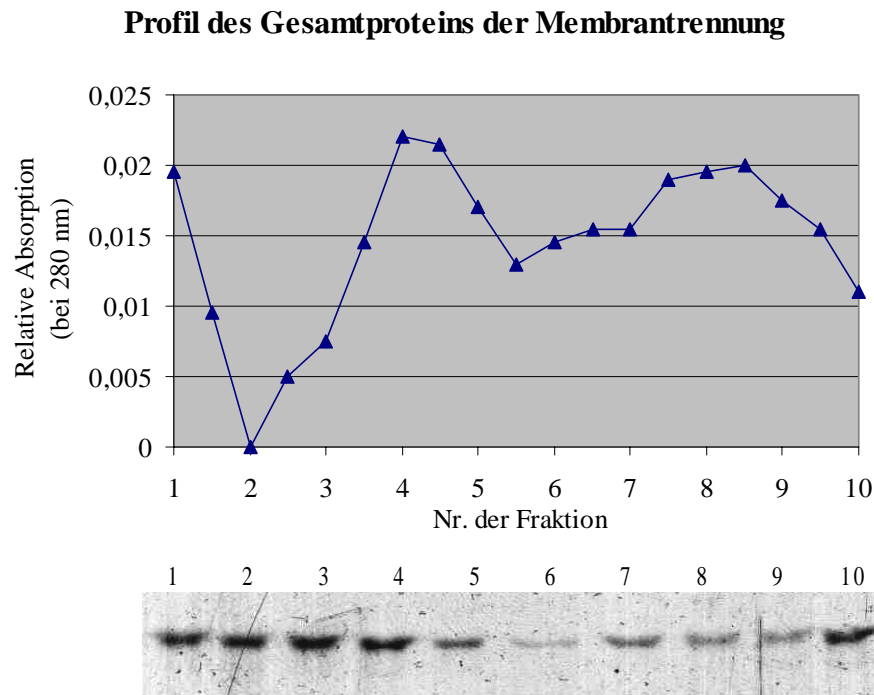


Abb. 20: Profil des Gesamtproteins der Membrantrennung von K38(pGP1-2, pECD130) und Fluorographie zur Detektion von CzcB in den Membran-Fractionen

Membranen von *E. coli* K38(pGP1-2) mit radioaktiv markiertem CzcB (pECD130) wurden präpariert und im Saccharose-Dichtegradienten [25-60 % (w/w) Saccharose] aufgetrennt. Es wurden zehn Fraktionen mit der dichtesten beginnend gesammelt, komplett in einer linearen SDS-PAGE (12.5 %iges Gel) aufgetrennt und über Fluorographie analysiert.

Auf die Absorption von Fraktion Nr. 2 wurde abgeglichen und die Absorptionen der anderen Fraktionen relativ dazu aufgetragen. Die Auftragung in den Spuren 1-10 entspricht den Fraktionen Nr. 1-10.

3. Wie interagieren die Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes? Das *CytoTrap*TM Yeast Two-Hybrid-System (Stratagene GmbH, Heidelberg)

Nachdem Lokalisation bzw. Topologie der einzelnen Komponenten untersucht und soweit geklärt worden war, sollte nun die Gesamtarchitektur des Efflux-Komplexes näher charakterisiert werden. Dazu waren zunächst die Interaktionen der Untereinheiten im Komplex nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde das *CytoTrap*TM *Sos Recruitment*-System (Stratagene GmbH, Heidelberg), ein alternatives *Yeast Two-Hybrid*-System, eingesetzt.

Welche Komponenten sind am Komplex beteiligt? Wechselwirken alle Untereinheiten direkt miteinander oder stehen z. B. CzcC und CzcA nur über CzcB in Kontakt? Neben der Klärung solcher Fragen sollten mit diesem Ansatz auch Aussagen zur stöchiometrischen Zusammensetzung des Czc-Efflux-Komplexes möglich sein. Wenn mehrere Exemplare einer Komponente im Komplex enthalten sind, sollten gegebenenfalls auch Interaktionen zwischen gleichen Komponenten nachweisbar sein.

3.1. Im *Yeast Two-Hybrid-Assay* in der Hefemutante *S. cerevisiae cdc25H* sind keine Interaktionen der Efflux-Komponenten nachweisbar

Im Assay konnten nur lösliche Protein-Domänen der Czc-Proteine getestet werden, da einerseits bei Verwendung von mit hSos fusionierten Membranproteinen falsch positive Ergebnisse vorprogrammiert waren und andererseits bei myristylierten Membranproteinen Interaktionen auf lumenaler Seite des endoplasmatischen Reticulums der Hefe nicht möglich waren. Letzteres hätte falsch negative Ergebnisse zur Folge gehabt. Da außerdem gleiche Domänen sowohl als *Target* als auch als *Bait* dienen sollten, wurden alle für TMS kodierende Bereiche in den *czc*-Strukturgenen deletiert. Nur Protein-Domänen, deren Hydrophilie gesichert war, sollten im Test eingesetzt werden. Im *czcC*-Gen wurde die für die N-terminale Signalsequenz kodierende Region deletiert, in *czcB* die für den N-terminalen Membrananker kodierende Sequenz. Von *czcA* wurden lediglich die Genabschnitte '*czcAI*' und '*czcAII*' verwendet, die für die großen periplasmatischen Domänen I und II kodieren.

Die Amplifizierung der Genbereiche erfolgte mittels PCR ('*czcC* mit den *Primern* '*czcC-EcoRI-NcoI*-Start und '*czcC-SalI*-Ende; '*czcB* mit den *Primern* '*czcB-EcoRI-NcoI*-Start und '*czcB-NotI-XhoI*-Ende; '*czcAI*' mit den *Primern* '*czcAI-EcoRI-NcoI*-Start und '*czcAI-NotI-XhoI*-Ende; '*czcAII*' mit den *Primern* '*czcAII-EcoRI-NcoI*-Start und '*czcAII-NotI-XhoI*-Ende; Tab. 3) und pECD110 als *Template*-DNA. Nach Klonierung im Vektor pGEM[®]-T Easy wurden die Fragmente durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde '*czcC* als *EcoRI-czcC-SalI*-Fragment in den *Target*-Vektor pMyr und als *NcoI-czcC-SalI*-Fragment in den *Bait*-Vektor pSos kloniert. Die anderen drei Genabschnitte wurden analog als *EcoRI-XhoI*-Fragmente in pMyr und als *NcoI-NotI*-Fragmente in pSos kloniert. Alle acht pSos- bzw. pMyr-Derivate wurden erneut zur Kontrolle der korrekten Translationsfusionierung sequenziert.

Die Hefe *S. cerevisiae cdc25H* wurde mit allen 16 Kombinationen aus je einem pSos- und pMyr-Konstrukt transformiert. Konstrukte des Herstellers dienten als Kontrollen. Als Positiv-Kontrolle wurde die Kombination pSos MAFB/pMyr MAFB verwendet. Negativ-Kontrollen waren die Kombinationen pSos Coll/pMyr Lamin C, pSos Coll/pMyr MAFB und pSos MAFB/pMyr Lamin C. Zusätzlich wurden als interne Negativ-Kontrollen alle pSos-Derivate mit pMyr Lamin C und alle pMyr-Derivate mit pSos Coll kombiniert. Der Wachstumstest erfolgte auf SD/Glucose (-UL)- und SD/Galaktose (-UL)-Agar jeweils bei 25 und 37 °C. Auf dem Agar mit Galaktose konnten bei 37 °C nur noch Stämme, bei denen es zur Protein-Interaktion kam, wachsen (Tab. 12).

Lediglich Hefemutanten mit der Positiv-Kontrolle bildeten bei 37 °C auf Galaktose-Agar noch Kolonien, während Stämme mit den anderen Kombinationen nicht wuchsen. Es konnte also keine *In vivo*-Interaktion zwischen den löslichen Domänen der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes im *Yeast Two-Hybrid-Assay* nachgewiesen werden.

Tab. 12: Yeast Two-Hybrid-Assay in *S. cerevisiae* cdc25H auf SD/Galaktose (-UL)-Agar bei 37 °C

pMyr \ pSos	<i>hSos</i> '-' <i>czcC</i> (pECD676)	<i>hSos</i> '-' <i>czcB</i> (pECD677)	<i>hSos</i> '-' <i>czcAI</i> ' (pECD678)	<i>hSos</i> '-' <i>czcAII</i> ' (pECD679)	<i>hSos</i> '-' <i>coll</i> (pSos Coll)	<i>hSos</i> '-' <i>mafB</i> (pSos MAFB)
<i>myr</i> '-' <i>czcC</i> (pECD680)	-	-	-	-	-	
<i>myr</i> '-' <i>czcB</i> (pECD681)	-	-	-	-	-	
<i>myr</i> '-' <i>czcAI</i> ' (pECD682)	-	-	-	-	-	
<i>myr</i> '-' <i>czcAII</i> ' (pECD683)	-	-	-	-	-	
<i>myr</i> '-' <i>hLaminC</i> ' (pMyr Lamin C)	-	-	-	-	-	-
<i>myr</i> '-' <i>mafB</i> (pMyr MAFB)					-	+

Hydrophile Domänen der Czc-Proteine wurden mit Proteinen der Hitzeschock-Antwort (RAS) der Hefe fusioniert. Nach Transformation der temperatursensitiven Hefemutante cdc25H mit Kombinationen aus je einem pSos- und pMyr-Konstrukt konnten nur Stämme, bei denen es zur Protein-Interaktion kam, bei 37 °C wachsen. Das Wachstum wird durch Plus- (+) bzw. Minus- (-) Zeichen beschrieben. Felder mit kombinierten Czc-Protein-Domänen sind grau hervorgehoben. In anderen Feldern ist das Verhalten der Kontroll-Kombinationen gezeigt. Leere Felder deuten auf nicht getestete Kombinationen hin.

Es sind nur die Daten auf SD/Galaktose (-UL) Agar bei 37 °C dargestellt. Bei 25 °C wuchsen alle Stämme sowohl auf SD/Glucose (-UL) Agar als auch auf SD/Galaktose (-UL) Agar. Auf SD/Glucose (-UL) Agar bei 37 °C war dagegen überhaupt kein Wachstum feststellbar.

3.2. Die hSos-Fusionen werden in *S. cerevisiae* cdc25H nicht exprimiert

Die Aussage des Yeast Two-Hybrid-Assays war eindeutig. Keine Kombination von Czc-Fusionsproteinen verhalf der Mutante cdc25H zum Wachstum auf Galaktose-Agar bei 37 °C. Was dieses Ergebnis aber genau bedeutete, sollte weiter untersucht werden. Sollte es tatsächlich keine Wechselwirkungen zwischen den eingesetzten hydrophilen Domänen geben? Oder ließ das Milieu im Cytosol der Hefe die Interaktionen nicht zu? Es bestand auch die Möglichkeit, daß wichtige Wechselwirkungen im Efflux-Komplex erst durch Bindung des Substrates induziert wurden. Fraglich war auch, ob die Hybridproteine in cdc25H überhaupt stabil exprimiert wurden, da das hSos-Protein eine Größe von über 100 kDa hatte.

Um die Expression der Interaktionspartner zu überprüfen, wurden vier Hefestämme mit den Plasmid-Kombinationen pECD676/pECD680 ('*czcC*-Fusionen), pECD677/pECD681 ('*czcB*-Fusionen), pECD678/pECD682 ('*czcAI*'-Fusionen) und pECD679/pECD683 ('*czcAII*'-Fusionen) ausgewählt und bei 25 °C in SD/Galaktose (-UL)-Medium angezogen. Als Negativkontrolle wurde cdc25H mit den Vektoren pSos/pMyr mitgeführt. Die Rohextrakte der fünf Hefen wurden in einem linearen SDS-PAA-Gel (10 %ig) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, und mit Anti-CzcC-, Anti-CzcB- bzw. Anti-CzcA-AK inkubiert.

Um 100 kDa und darüber waren bei keinem der Stämme Signale erkennbar (Ergebnis nicht gezeigt). Das bedeutete, daß kein hSos-Fusionsprotein stabil exprimiert wurde. Das negative

Ergebnis im *Yeast Two-Hybrid*-Assay war auf unzureichende Expression der Interaktionspartner zurückzuführen.

4. *Blue Native* PAGE – Versuch der nativen Isolierung des kompletten Czc-Efflux-Komplexes

Ein weiterer Ansatz, Zusammensetzung, Struktur und Größe des Czc-Efflux-Komplexes zu ergründen, bestand darin, den gesamten Komplex zu solubilisieren und nach einer *Blue Native* PAGE mit Hilfe von Antikörpern zu charakterisieren.

Der Nachweis, daß die Komponenten CzcC, CzcB und CzcA wirklich einen Membranprotein-Komplex bilden, und eine ungefähre Abschätzung der Größe dieses Komplexes sollten mit dieser Methode erbracht werden. Zudem sollten Rückschlüsse auf die Stöchiometrie der Untereinheiten möglich sein.

4.1. Die Komponenten CzcB und CzcA sind im Solubilisat

Mit 0.5 mM ZnCl₂ wurde die Expression des Czc-Efflux-Komplexes von *R. metallidurans* AE128 induziert. Nach Zellaufschluß und Präparation der Membranen wurden die mit DNase I behandelten Membranen zur Solubilisierung der Membranproteine mit N-Laurylsarcosin eingesetzt. Der Nachweis der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes im Solubilisat erfolgte nach linearer SDS-PAGE und Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Westernblot mit polyklonalen Anti-CzcC-, Anti-CzcB- bzw. Anti-CzcA-AK (Abb. 21).

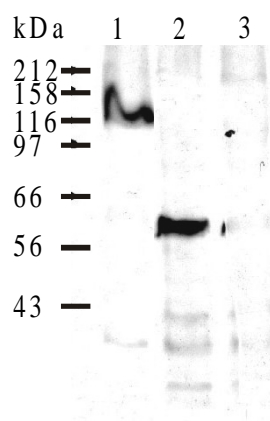


Abb. 21: Westernblot nach SDS-PAGE zum Nachweis der Komponenten CzcC, CzcB und CzcA im Solubilisat mit polyklonalen Antikörpern

Membranen von *R. metallidurans* AE128, mit 0.5 mM ZnCl₂ induziert, wurden präpariert und nach DNase I-Behandlung zur Solubilisierung der Membranproteine mit N-Laurylsarcosin eingesetzt. Das Solubilisat wurde in linearer SDS-PAGE (10 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Anti-CzcC-, Anti-CzcB- bzw. Anti-CzcA-AK inkubiert.

Die Auftragung in den Spuren **1-3** ist wie folgt: Spur **1** – Solubilisat von AE128 mit Anti-CzcA-AK; Spur **2** – Solubilisat von AE128 mit Anti-CzcB-AK; Spur **3** – Solubilisat von AE128 mit Anti-CzcC-AK

Die Proteine CzcB und CzcA waren eindeutig im Solubilisat nachweisbar. Für CzcC konnte kein Signal festgestellt werden. Das Protein war entweder nicht solubilisiert worden oder der gegenüber den Anti-CzcA- bzw. Anti-CzcB-AK beträchtlich unspezifischere Antikörper gegen CzcC war der Grund für das negative Ergebnis.

4.2. Nur die Einzelkomponenten CzcB und CzcA sind nach *Blue Native* PAGE mit Antikörpern detektierbar

Die mit N-Laurylsarcosin solubilisierten Membranproteine von *R. metallidurans* AE128 wurden zum Nachweis des Czc-Efflux-Komplexes einer *Blue Native* PAGE unterzogen, auf eine PVDF-Membran transferiert und im Westernblot mit polyklonalen Anti-CzcC-, Anti-CzcB- bzw. Anti-CzcA-AK analysiert (Abb. 22).

Wie zu erwarten war, konnte mit dem Anti-CzcC-AK kein Signal erhalten werden. Mit den beiden anderen Antikörpern konnten zumindest die Einzelkomponenten CzcB und CzcA nachgewiesen werden. Eine mit allen drei Antikörpern detektierbare Proteinbande gleicher Größe als gewünschtes Signal für den Czc-Efflux-Komplex konnte nicht festgestellt werden. Bei ca. 500-550 kDa konnte lediglich für CzcB und CzcA ein schwaches Signal erhalten werden, das allerdings schwer zu reproduzieren war.

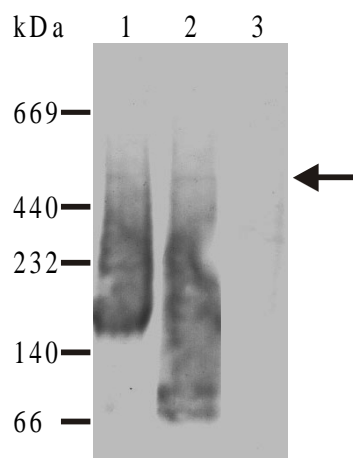


Abb. 22: Westernblot nach *Blue Native* PAGE zum Nachweis des Czc-Efflux-Komplexes im Solubilisat mit polyklonalen Antikörpern

Membranen von *R. metallidurans* AE128, mit 0.5 mM ZnCl₂ induziert, wurden präpariert und nach DNase I-Behandlung zur Solubilisierung der Membranproteine mit N-Laurylsarcosin eingesetzt. Das Solubilisat wurde in einer *Blue Native* PAGE (5-13 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Anti-CzcC-, Anti-CzcB- bzw. Anti-CzcA-AK inkubiert.

Der Pfeil markiert die Position eines schwachen Signals in Spur 1 und 2 bei ca. 500-550 kDa.

Die Auftragung in den Spuren **1-3** ist wie folgt: Spur **1** – Solubilisat von AE128 mit Anti-CzcA-AK; Spur **2** – Solubilisat von AE128 mit Anti-CzcB-AK; Spur **3** – Solubilisat von AE128 mit Anti-CzcC-AK

5. Ein für CzcB spezifischer Proteinkomplex ist nach *In vivo-Crosslinking* mit Formaldehyd nachweisbar

Verschiedene analytische *In vivo-Crosslinking*-Experimente mit den Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes in *R. metallidurans* AE128 und *E. coli* K38(pGP1-2) mit unterschiedlichen Konstrukten sollten zeigen, ob eine Verknüpfung des gesamten Komplexes oder eventueller Subkomplexe mittels Formaldehyd bzw. anderer *Crosslinker* wie Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP; Lomant's Reagenz) an den Interaktionsflächen der Untereinheiten möglich ist.

Die Detektion von radioaktiv markierten Komponenten erfolgte über Autoradiographie, nicht markierte Komponenten wurden mit polyklonalen Antikörpern im Westernblot nachgewiesen und mit dem *Strep-tag II*[®] fusionierte Untereinheiten mit einem *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat analysiert.

5.1. Bei *In vivo-Crosslinking* mit 0.1 % (v/v) Formaldehyd ist ein ca. 220 kDa großer CzcB-*Strep-tag II*[®]-Komplex nachweisbar

In den Versuchen sollten nach *Crosslinking* auftretende Proteinbanden in Beziehung zur jeweils nachgewiesenen Untereinheit gesetzt werden und somit auffällige Effekte den Komponenten CzcC, CzcB bzw. CzcA zugeordnet werden. Es sollte auch das Spektrum möglicher detektierbarer Komplexe näher eingegrenzt werden. Weiterhin mußte die optimale Konzentration an Formaldehyd herausgefunden werden.

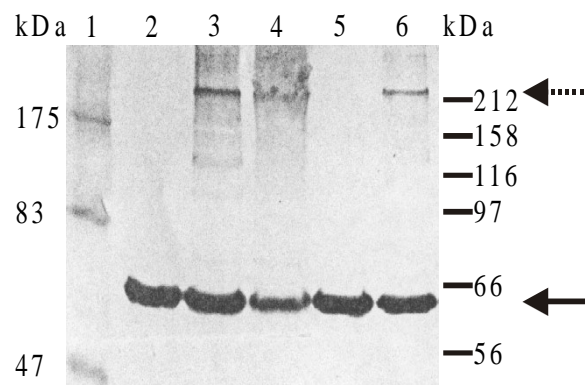


Abb. 23: Nachweis von CzcB-*Strep-tag II*[®]-haltigen Proteinkomplexen mit einem *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat

Rohextrakte von *E. coli*-Stämmen mit unterschiedlichen Konstrukten wurden nach *In vivo-Crosslinking* (ca. 2 h mit verschiedenen HCHO-Konzentrationen) präpariert, in einer SDS-PAGE (7.5 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Zum Vergleich wurden unbehandelte Rohextrakte derselben *E. coli*-Stämme aufgetragen.

Der gestrichelte Pfeil gibt die Position des Komplexes bei ca. 220 kDa an, der normale Pfeil die Position des CzcB-*Strep-tag II*[®]-Monomers bei ca. 63 kDa.

Die Auftragung in den Spuren 1-6 ist wie folgt: Spur 1 – *Prestained Protein Marker, Broad Range*; Spur 2 – BL21(pECD684) ohne HCHO; Spur 3 – BL21(pECD684) mit 0.1 % (v/v) HCHO; Spur 4 – BL21(pECD684) mit 0.5 % (v/v) HCHO; Spur 5 – K38(pGP1-2, pECD675) ohne HCHO; Spur 6 – K38(pGP1-2, pECD675) mit 0.1 % (v/v) HCHO

Dazu wurden jeweils Rohextrakte von *E. coli*-Stämmen mit den induzierten Komponenten nach *Crosslinking* in linearen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die CzcB-*Strep-tag II*[®]-Fusionsproteine mit einem Peroxidase-Konjugat nachgewiesen (Abb. 23).

Es wurden deutlich bessere Ergebnisse mit 0.1 % (v/v) als mit 0.5 % (v/v) HCHO [oder 1 % (v/v) HCHO (Ergebnis nicht gezeigt)] erzielt. Trotzdem lag nur ein geringer Anteil der CzcB-*Strep-tag II*[®]-Fusionsproteine in verknüpfter Form vor.

In *E. coli* K38(pGP1-2, pECD675) mit CzcC und CzcB-*Strep-tag II*[®] war ein ca. 220 kDa großer, CzcB-*Strep-tag II*[®]-haltiger Proteinkomplex nachweisbar. Ein Komplex gleicher Größe konnte auch in anderen Experimenten mit Antikörpern gegen CzcB und bei radioaktiv markiertem CzcB in der Autoradiographie detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der Proteinkomplex war auch im Expressionsstamm *E. coli* BL21(pECD684), der nur CzcB-*Strep-tag II*[®] enthielt, vorhanden. Das Bild war praktisch identisch mit dem von Stamm K38(pGP1-2, pECD675), woraus abgeleitet werden konnte, daß scheinbar keine weitere Komponente in diesem offensichtlichen CzcB-Subkomplex enthalten war. Die Variante der möglichen Beteiligung eines *E. coli*-Proteins sollte durch Reinigung CzcB-*Strep-tag II*[®]-Komplexes und anschließender Zerlegung in seine Bestandteile durch Auflösung des *Crosslinks* ausgeschlossen werden (5.3.).

Weder mit Formaldehyd noch mit anderen *Crosslinkern* wie DSP konnten andere Subkomplexe oder der gesamte Czc-Efflux-Komplex verknüpft werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.2. Die *Crosslinking*-Verknüpfung kann durch Erhitzen aufgelöst werden

Um herauszufinden, ob es sich um eine typische, wiederaufspaltbare Formaldehyd-Verknüpfung handelte und folglich eine Zerlegung des CzcB-*Strep-tag II*[®]-Komplexes in seine Komponenten nach Reinigung möglich wäre, wurden die hier erläuterten Tests durchgeführt.

Es wurden Rohextrakte von *E. coli*-Stämmen mit den induzierten Komponenten nach *In vivo-Crosslinking* auf 96 °C erhitzt, in linearen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die CzcB-*Strep-tag II*[®]-Fusionsproteine wurden mit einem Peroxidase-Konjugat nachgewiesen (Abb. 24).

Die Verknüpfungen mit Formaldehyd innerhalb des CzcB-*Strep-tag II*[®]-Komplexes waren durch Erhitzen fast vollständig aufspaltbar. Es lag also der typische, hitzelabile *Crosslink* durch Ausbildung von Methylenbrücken vor.

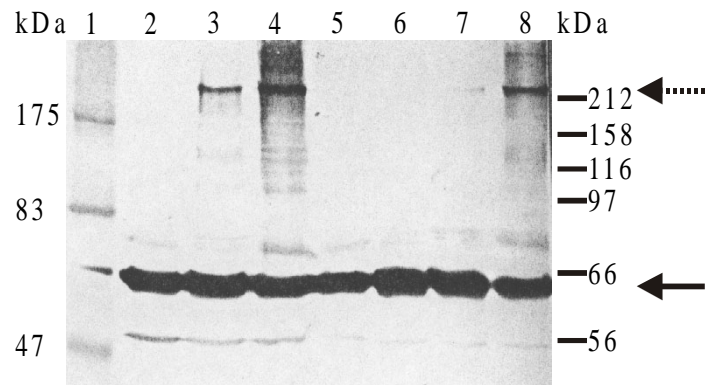


Abb. 24: Beweis für die reversible Verknüpfung des CzcB-Strep-tag II[®]-Komplexes

Rohextrakte von *E. coli*-Stämmen mit unterschiedlichen Konstrukten wurden nach *In vivo*-Crosslinking [ca. 2 h mit 0.1 % (v/v) HCHO] und Erhitzen auf 96 °C (20 min) präpariert, in einer SDS-PAGE (7.5 %iges Gel) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem StrepTactin[®]-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Zum Vergleich wurden unbehandelte Rohextrakte derselben *E. coli*-Stämme aufgetragen. Der gestrichelte Pfeil gibt die Position des Komplexes an, der normale Pfeil die Position des CzcB-Strep-tag II[®]-Monomers.

Die Auftragung in den Spuren 1-8 ist wie folgt: Spur 1 - Prestained Protein Marker, Broad Range; Spur 2 - BL21(pECD684) ohne HCHO; Spur 3 - BL21(pECD684) mit 0.1 % (v/v) HCHO (96 °C); Spur 4 - BL21(pECD684) mit 0.1 % (v/v) HCHO; Spur 5 - K38(pGP1-2, pECD675) ohne HCHO; Spur 6 - K38(pGP1-2, pECD675) ohne HCHO (96 °C); Spur 7 - K38(pGP1-2, pECD675) mit 0.1 % (v/v) HCHO (96 °C); Spur 8 - K38(pGP1-2, pECD675) mit 0.1 % (v/v) HCHO

5.3. Der gereinigte CzcB-Strep-tag II[®]-Komplex entspricht wahrscheinlich einem Homooligomer

Es war zwar relativ unwahrscheinlich, daß ein *E. coli*-Protein am nachgewiesenen CzcB-Subkomplex beteiligt war, da bei *In vivo*-Crosslinking-Experimenten in *R. metallidurans* AE128 Banden ähnlicher Größe festgestellt werden konnten (Ergebnis nicht gezeigt) und da für die Untersuchungen in *E. coli* immer moderate Überexpressionssysteme eingesetzt wurden, die zum Austitrieren eines beteiligten *E. coli*-Proteins hätten führen müssen. Trotzdem sollte durch Reinigung des Komplexes und anschließende Zerlegung in die Komponenten ein stichhaltiger Beweis gefunden werden.

Dazu wurden Membranen von *E. coli* K38(pGP1-2, pECD675) mit den induzierten Komponenten nach *Crosslinking* und Ultraschallaufschluß präpariert, die Membranproteine mit N-Laurylsarcosin solubilisiert und der Protein-Komplex durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proben wurden nach Erhitzen auf 96 °C in Gradienten-SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Zum Vergleich wurde nicht erhitzter, gereinigter CzcB-Strep-tag II[®]-Komplex aufgetragen (Abb. 25).

Der detektierte Proteinkomplex entsprach mit hoher Wahrscheinlichkeit einem Homooligomer. Ob es sich jedoch um ein Homotrimer oder ein Homotetramer handelte, muß Gegenstand der Diskussion bleiben.

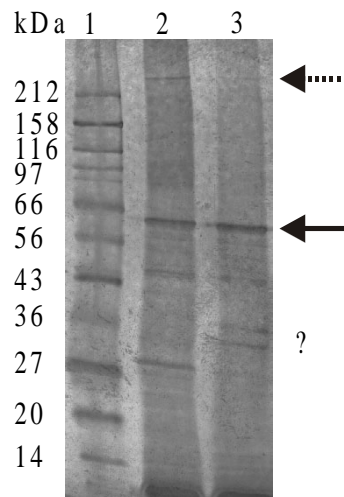


Abb. 25: Zerlegung des gereinigten CzcB-Strep-tag II[®]-Komplexes in seine Komponenten

Aus *E. coli* K38(pGP1-2, pECD675) durch Affinitätschromatographie an *StrepTactin*[®]-Sephrose gereinigte CzcB-Strep-tag II[®]-haltige Membranprotein-Komplexe wurden nach Erhitzen auf 96 °C (20 min) in einer Gradienten-SDS-PAGE (7.5-20 %iges Gel) aufgetrennt und mittels Silberfärbung analysiert. Zum Vergleich wurden unbehandelte gereinigte Membranprotein-Komplexe aufgetragen.

Der gestrichelte Pfeil gibt die Position des Komplexes an, der normale Pfeil die Position des CzcB-Strep-tag II[®]-Monomers. Mit dem Fragezeichen (?) sind zwei nach Spaltung des Komplexes neu hinzukommende Proteinbanden gekennzeichnet.

Die Auftragung in den Spuren 1-3 ist wie folgt: Spur 1 - Protein Marker, Broad Range; Spur 2 – CzcB-Strep-tag II[®]-Komplex; Spur 3 – gespaltenen CzcB-Strep-tag II[®]-Komplex (96 °C)

Nach Hitzebehandlung war der Komplex weitestgehend aufgespalten. Die Bande des CzcB-Strep-tag II[®]-Monomers war dadurch etwas intensiver erkennbar. Allerdings konnten auch zwei zusätzliche Proteine unterhalb des CzcB-Strep-tag II[®]-Monomers nachgewiesen werden. Obwohl nur solubilisierte Membranproteine zur Reinigung eingesetzt wurden, machten auch gegebenenfalls durch *In vivo*-Crosslinking verknüpfte und in kleineren Mengen am Affinitätsmaterial über das Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein gereinigte Subkomplexe des löslichen Acetyl-CoA-Carboxylase-Komplexes eine abschließende Bewertung etwas schwierig.

IV. DISKUSSION

1. *Targeting* und Translokation von Proteinen in Bakterien

Das Proteom von Bakterien, das der Gesamtheit aller Proteine entspricht, ist nicht gleichmäßig auf die verschiedenen Kompartimente der Zelle verteilt. Während der Hauptanteil aller Proteine im Cytoplasma lokalisiert ist, sind annähernd 20 % der synthetisierten Proteine teilweise oder vollständig außerhalb des Cytoplasmas lokalisiert (Pugsley, 1993). Neuere Untersuchungen, die auf der Computer gestützten Analyse des Genoms von *B. subtilis* beruhen, bestätigen die von Pugsley (1993) vorhergesagte Größenordnung. Ca. ein Viertel des Proteoms trägt Membran-Sortierungssignale in Form von hydrophoben Bereichen, die in die Cytoplasmamembran integrieren können (Tjalsma *et al.*, 2000). Demnach sind 18 % des Proteoms durch transmembrane Segmente (TMS) in der Membran verankert und 7 % enthalten ein mögliches N-terminales Signalpeptid, das den Export des Proteins vermittelt und anschließend von speziellen Signalpeptidasen abgespalten wird (Tjalsma *et al.*, 2000).

Damit ein Protein seine definierte Funktion erfüllen kann, ist die Biosynthese der Polypeptid-Kette allein nicht ausreichend. Erst durch die korrekte Faltung im entsprechenden subzellulären Kompartiment wird dies ermöglicht (Economou, 1999; Schatz & Dobberstein, 1996; Fekkes & Driessen, 1999). Das Verständnis der Biogenese von Proteinen, die auch Prozesse wie *Targeting*, Translokation ins Zielkompartiment und Ausbildung der nativen Topologie umfaßt, ist Voraussetzung für die Einordnung von Erkenntnissen zu Struktur und Funktion der Proteine (van Geest & Lolkema, 2000).

In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte bei der Aufklärung der Membranprotein-Insertion und der Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran gemacht. Es zeigte sich, daß alle näher charakterisierten Mechanismen von speziellen Proteinen abhängig sind und die von Pugsley (1993) noch als alternativer Prozeß dargestellte spontane Insertion hydrophober Proteinsegmente in die bakterielle Cytoplasmamembran ohne Unterstützung solcher Proteinfaktoren *in vivo* nicht von Bedeutung ist. Zuletzt wurde diese rein biophysikalische Theorie nur noch für ganz spezielle Ausnahmen wie dem M13 *Procoat*-Protein diskutiert (von Heijne, 1997; de Gier *et al.*, 1998; Bernstein, 1998). Vor kurzem wurde durch Samuelson *et al.* (2000) gezeigt, daß auch M13 *Procoat* nur in Anwesenheit eines membranständigen Proteinfaktors, nämlich YidC, in die Membran inserieren kann.

Die bedeutendste Route des Exports von Proteinen aus dem Cytoplasma verläuft über den Sec-Apparat (Pugsley, 1993). Das eigentliche, membranständige Sec-Translokon besteht aus dem Heterotrimer SecYEG, das als Tetramer den aktiven Protein-Translokationskanal bildet (Manting *et al.*, 2000; Dalbey *et al.*, 2000). An diesem „Holoenzym“ ist in *E. coli* auch der ebenfalls heterotrimere Subkomplex aus SecDF und YajC beteiligt (Duong & Wickner, 1997).

Weiterhin ist eine Assoziation von YidC mit dem Translokon sehr wahrscheinlich (Scotti *et al.*, 2000; Dalbey *et al.*, 2000). Das periphere Membranprotein SecA, das als Homodimer den Translokationsmotor bildet (Shilton *et al.*, 1998; Economou, 1999), liefert die notwendige Energie für den Translokationsprozeß durch die Hydrolyse von ATP (Lill *et al.*, 1989).

Für das *Targeting* von Proteinen zum Sec-Translokon in der Cytoplasmamembran gibt es bei Bakterien zwei unterschiedliche Wege (Schatz & Dobberstein, 1996). Beide beginnen mit dem naszierenden Polypeptid am Ribosom und konvergieren am Sec-Translokon (Valent *et al.*, 1998; Martoglio & Dobberstein, 1998; Fekkes & Driessen, 1999).

Beim klassischen *General Secretory Pathway* (GSP; Pugsley, 1993), der meist von Proteinen genutzt wird, die vollständig über die innere Membran ins Periplasma oder weiter bis in die äußere Membran transloziert werden, bildet das Präprotein einen Komplex mit cytosolischen Chaperonen wie SecB, das als Homotetramer agiert (Watanabe & Blobel, 1989; Kumamoto & Francetic, 1993; de Gier *et al.*, 1997). In diesem posttranslationalen Prozeß wird so das Präprotein mit N-terminalem Signalpeptid im ungefalteten, für die Translokation kompetenten Zustand gehalten (Lecker *et al.*, 1989; Tjalsma *et al.*, 2000). Der Komplex bindet hochaffin an das durch Interaktion mit dem Translokon aktivierte und als Rezeptor dienende SecA (Economou, 1999). Sowohl SecB (Hartl *et al.*, 1990) als auch das Präprotein mit seinem Signalpeptid (Miller *et al.*, 1998) werden spezifisch erkannt (Fekkes *et al.*, 1997). Nach Übergabe des Präproteins an SecA bleibt SecB zunächst gebunden. Durch anschließende Bindung von ATP an SecA wird eine Änderung der Konformation ausgelöst, die zur Freigabe von SecB und zur Initiation der Translokation führt (Fekkes *et al.*, 1997). Durch Zyklen der ATP-getriebenen Insertion und Deinsertion von SecA in die Membran am Translokon wird das Präprotein schrittweise in das Periplasma gepumpt (Economou & Wickner, 1994; Economou, 1999). Sobald die Signalpeptidase-Spaltstelle des Präproteins im Periplasma zugänglich ist, wird in *E. coli* das Signalpeptid durch LepB abgespalten (Dalbey *et al.*, 1997). Parallel zum schrittweisen Austreten der Polypeptid-Kette aus dem Translokon bringen periplasmatische Faltungskatalysatoren durch Bildung von Disulfidbrücken oder auch durch Prolin-Isomerisierung das gereifte Protein in seine native Konformation (Pugsley, 1993; Missiakas & Raina, 1997; Economou, 1999).

Die meisten Proteine der Cytoplasmamembran werden über einen alternativen Weg der Zielsteuerung zum Translokon geleitet, der über den *Signal Recognition Particle* (SRP) verläuft (Luirink *et al.*, 1994; de Gier *et al.*, 1997). Der *E. coli* SRP, ein Ribonukleoprotein-Komplex aus Ffh und 4.5S RNA, bindet mit hoher Affinität hydrophobe Signalpeptide und transmembrane Domänen der an Ribosomen gebundenen, naszierenden Polypeptid-Kette (Bernstein, 1998; de Gier *et al.*, 1997). Im Zusammenwirken mit dem SRP-Rezeptor FtsY wird der gesamte Komplex mit Ribosom und mRNA wahrscheinlich cotranslational zur Membran geleitet. Die der GTP-Hydrolyse durch FtsY folgende Dissoziation des SRP ermöglicht es den hydrophoben Regionen des naszierenden Polypeptids in das Sec-

Translokation zu gelangen (Valent *et al.*, 1998; Dalbey *et al.*, 2000). Der Mechanismus der vom N- zum C-Terminus gerichteten Insertion der TMS in die Membran soll hier anhand der *Signal Anchor (SA)-Stop Transfer (ST)-Hypothese* dargestellt werden (van Geest & Lolkema, 2000; Dalbey *et al.*, 2000). Als *Signal Anchor*-Sequenz sind $N_{in}-C_{out}$ und als *Stop Transfer*-Sequenz $N_{out}-C_{in}$ orientierte TMS definiert. Beide stellen topogene Signale dar, die in der Aminosäuresequenz polytopischer Membranproteine alternierend aufeinander folgen (van Geest & Lolkema, 2000). Mit der Übergabe des ersten hydrophoben Segments durch SRP und Ribosom an das Translokation kann dieses als *Signal Anchor*-Sequenz fungieren und die Translokation der nachfolgenden hydrophilen Region nach außen bewirken. Durch laterale Öffnung des Translokations erfolgt gleichzeitig der Austritt der *Signal Anchor*-Sequenz in die Membran. Bei Eintritt des nächsten hydrophoben Segments in das Translokation wird es als *Stop Transfer*-Sequenz erkannt, als zweite TMS in die Membran inseriert und der Exportprozess von hydrophilen Regionen gestoppt. Nachfolgende topogene Signale werden vom Translokation in äquivalenter Form umgesetzt (van Geest & Lolkema, 2000). Möglicherweise fungiert YidC als Rezeptor für die TMS in der Membran-Insertionsregion des Translokations (Scotti *et al.*, 2000; Dalbey *et al.*, 2000).

Neben den TMS sind noch weitere Merkmale eines Membranproteins als topogene Signale für die Struktur verantwortlich (Prinz *et al.*, 1998). So können positiv geladene Aminosäurereste in hydrophilen Domänen eine cytoplasmatische Lokalisation dieser Regionen bewirken (*positive-inside* Regel; von Heijne, 1986; von Heijne & Gavel, 1988; Boyd & Beckwith, 1989). Auch amphipathische Helices in hydrophilen Domänen tragen zur Verankerung im Cytoplasma bei (Seligman & Manoil, 1994; Kimbrough & Manoil, 1994). Eine schnelle Faltung kann sowohl periplasmatische als auch cytoplasmatische Domänen stabil im jeweiligen Kompartiment verankern (Bardwell, 1994; Denzer *et al.*, 1995; Spiess, 1995; Missiakas & Raina, 1997). Schließlich können Verknüpfungen zwischen den verschiedenen TMS z. B. über Salzbrücken zur Stabilisierung der transmembranen Topologie notwendig sein (Lee *et al.*, 1992). Neben den intrinsischen Signalen der Aminosäuresequenz können auch äußere Faktoren wie das Translokation und die Lipid-Zusammensetzung der Membran die Topologie von inserierten Membranproteinen beeinflussen (Prinz *et al.*, 1998).

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß noch Zweifel bestehen, ob in *E. coli* tatsächlich der Export von Präproteinen und die Insertion von Membranproteinen über ein und denselben Weg erfolgen oder ob die distinkten *Targeting*-Wege auch mit verschiedenen Routen der Translokation verknüpft sind (van Geest & Lolkema, 2000; Tjalsma *et al.*, 2000). Es ist möglich, daß die *Targeting*-Wege verschiedene Translokations mit Proteinen beliefern, die sich in der genauen Zusammensetzung unterscheiden, aber auf dem gleichen *Core*-Element (SecYEG) beruhen (Valent *et al.*, 1998). So wäre z. B. YidC nur an einem Translokation beteiligt, das über *SRP-Targeting* beliefert wird, und würde in einem Translokation für SecB-abhängige Präproteine fehlen (Scotti *et al.*, 2000). Alternativ steht dem das Modell des für

Export und Insertion von Proteinen zuständigen, multifunktionellen Translokons mit flexibler Zusammensetzung gegenüber (Newitt & Bernstein, 1998), bei dem YidC nur zum Translokon tritt, wenn die cotranslationale Insertion von Membranproteinen erfolgt (Scotti *et al.*, 2000).

Warum wird der Darstellung der Mechanismen des Exports von Präproteinen und der Insertion von Membranproteinen in der vorliegenden Arbeit so viel Raum gegeben? Untersuchungen von Ulbrandt *et al.* (1997) zur Identifizierung von Substraten des SRP-Targeting-Weges in *E. coli* geben Antwort auf diese Frage. Die Überexpression von verschiedenen polytopischen Membranproteinen bewirkte in einem Stamm mit einem artifiziell niedrigen Level an SRP eine reduzierte Überlebensfähigkeit der Zellen. Die vorhandenen SRP-Moleküle wurden durch Bindung an die in hohen Konzentrationen synthetisierten Substrate austitriert und standen nicht mehr für das Targeting anderer Proteine mit essentiellen Funktionen zur Verfügung (Ulbrandt *et al.*, 1997). Ein so identifiziertes Substrat ist das multiple Antibiotika-Resistenz vermittelnde Membranprotein AcrB, das wie CzcA der RND-Familie (Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1999) angehört (Ulbrandt *et al.*, 1997). Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, daß auch das polytopische Membranprotein CzcA, das als zentrale Komponente des Czc-Efflux-Komplexes in dieser Arbeit topologisch charakterisiert wurde, SRP-abhängig in die Cytoplasmamembran inseriert wird. Vielleicht ist auch der früher festgestellte toxische Effekt von CzcA bei Überexpression in *E. coli* (Rensing, 1996; Rensing *et al.*, 1997a) zum Teil mit einer Übersättigung der Translokationsmaschinerie zu erklären.

Ein weiterer Weg des bakteriellen Proteinexports, der für in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchungen möglicherweise von Bedeutung ist, verläuft über das *Twin-Arginine Translocation*-System (Tat; Berks, 1996; Berks *et al.*, 2000). Alternativ wird dieses System auch als *Membrane Targeting and Translocation*-System bezeichnet (Mtt; Weiner *et al.*, 1998), da nicht alle zur Membran geleiteten Proteinsubstrate transloziert werden. Das System besteht aus den in der Membran lokalisierten Komponenten TatA, B, C und E sowie dem cytoplasmatischen TatD (Sargent *et al.*, 1998). Im Vergleich zum *General Secretory Pathway* nimmt nur ein kleiner Bruchteil der Präproteine diesen Weg zur Passage der inneren Membran (Berks *et al.*, 2000). Es werden im Gegensatz zum *General Secretory Pathway* gefaltete Proteine und ganze Proteinkomplexe exportiert, die meist einen Cofaktor enthalten (Berks, 1996; Berks *et al.*, 2000). Die N-terminale Signalsequenz von Tat-abhängig translozierten Präproteinen weist einige Besonderheiten wie das *Twin-Arginine*-Motiv [(S/T)RRxFLK] in der relativ langen n-Region, eine weniger hydrophobe h-Region und basische Aminosäurereste in der c-Region des Signalpeptids auf (Berks, 1996; Christòbal *et al.*, 1999). Das von Grass (2000) festgestellte Signalpeptid des CzcC-Proteins trägt eindeutig ein Tat-Motiv (RRLFL). Auch der Pro-Rest an Position -6 bezogen auf die Spaltstelle der Signalpeptidase (AVA₂₂) spricht für Tat-abhängige Translokation (Christòbal *et al.*, 1999). Doch warum sollte CzcC wie einige Redox-Cofaktor tragende Enzyme ins Periplasma

exportiert werden? Zwar werden auch Proteine ohne Cofaktoren transloziert und für diese die Notwendigkeit von cytoplasmatischen Chaperonen für eine korrekte Faltung oder auch eine für Sec-abhängigen Export viel zu stark ausgeprägte Faltungstendenz diskutiert (Berks, 1996; Berks *et al.*, 2000), jedoch ist für OMF-Proteine wie CzcC in dieser Hinsicht nichts bekannt. Bei genauerer Betrachtung des CzcC-Signalpeptids finden sich weitere Hinweise, die am Tat-abhängigen Export zweifeln lassen. Das Signalpeptid ist mit 22 Aminosäureresten sehr kurz, die recht hydrophobe h-Region beinhaltet mehrere Leu-Reste und nur einen Gly-Rest und die c-Region trägt keine positiven Ladungen. Eine positiv geladene c-Region bewirkt in Tat-Signalpeptiden die Vermeidung der Sec-abhängigen Translokation (Bogsch *et al.*, 1997; Christòbal *et al.*, 1999). Wie Experimente mit modifizierten Tat-Signalpeptiden zur Konkurrenz von Tat- und Sec-abhängigen Export zeigen, ist trotz Tat-Motiv ein effizienter Export via Sec-Apparat möglich, wenn eine hydrophobe h-Region und eine nicht positiv geladene c-Region vorliegen (Christòbal *et al.*, 1999; Berks *et al.*, 2000). CzcC wird also höchstwahrscheinlich trotz Tat-Motiv Sec-abhängig über die innere Membran exportiert.

2. Reporter-gen-Fusionen zur Aufklärung der Membran-Topologie und subzellulären Lokalisation von Proteinen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von exportierten Proteinen steht mittlerweile eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Eine herausragende Technologie stellt aber die Methode der Fusionierung von Genen dar, deren Entdeckung und Weiterentwicklung auch für die Geschichte der Molekularbiologie insgesamt von Bedeutung ist (Manoil *et al.*, 1990; Beckwith, 2000; Silhavy, 2000). Speziell Translationsfusionen, bei denen erzeugte Hybridgene für Hybridproteine kodieren (Silhavy, 2000), spielen bei der Aufklärung transmembraner Regionen und der Lage hydrophiler Domänen von polytopischen Membranproteinen in der Cytoplasmamembran die zentrale Rolle (van Geest & Lolkema, 2000). Mit dem zu untersuchenden Gen können dabei ganze Reportergene oder nur für bestimmte Domänen kodierende Genabschnitte fusioniert werden, wie z. B. Epitope von Antikörpern oder spezifische Proteasespaltstellen. Prinzipiell kann dies auf zwei Wegen erfolgen, zum einen durch Insertion in das Zielgen, so daß das resultierende Hybridprotein sowohl mit dem Zielprotein beginnt als auch endet, zum anderen durch klassische Fusion mit einem verkürzten Teil des Zielgens, so daß das Hybridprotein mit dem C-terminal verkürzten Zielprotein beginnt und mit dem *Tag* endet (van Geest & Lolkema, 2000). Dabei gilt: Je geringer der Eingriff in die native Topologie, desto genauer sind die mit der Methode erhaltenen Aussagen. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet sind Insertionen von möglichst kurzen Domänen als *Tags* in das Zielprotein die beste Methode. Im Idealfall kann durch einen Funktionsnachweis der Insertionsmutante des Zielproteins das Vorliegen der nativen

Topologie bewiesen werden. Optimiert ist das Bestreben möglichst geringe Veränderungen der nativen Struktur durch die verwendete Methode zu bewirken in der *Cys-Scanning* Mutagenese, bei der lediglich einzelne Aminosäurereste einer Cys-freien Mutante des Zielproteins gegen Cys-Reste ausgetauscht werden, die dann spezifisch chemisch modifiziert werden können (Frillingos *et al.*, 1998; van Geest & Lolkema, 2000).

Beim Einsatz von Reporterproteinen, auch *Enzyme Tags* genannt, in Untersuchungen der Topologie von Membranproteinen, werden häufig Hybridproteine mit C-terminal verkürzten Teilen des Zielproteins generiert, obwohl seltener auch sogenannte *sandwich*-Fusionen (Ehrmann *et al.*, 1990) genutzt werden (van Geest & Lolkema, 2000). Reporterproteine müssen folgende Ansprüche erfüllen, um zuverlässige Sensoren der subzellulären Lokalisation von Domänen des Zielproteins sein zu können: 1. Die enzymatische Aktivität muß auf ein Kompartiment, entweder Cytoplasma oder Periplasma, beschränkt sein; 2. Die Signalsequenz von normalerweise ins Periplasma exportierten Reportern muß gegen mögliche Exportsignale des Zielproteins austauschbar sein; 3. Die Lokalisation des reifen Teils des Reporterenzym muß ausschließlich durch die Exportsignale des Zielproteins bestimmt werden; 4. Die N-terminale Fusion von Proteinsegmenten mit dem Reporter darf dessen enzymatische Aktivität nicht entscheidend beeinträchtigen (Ehrmann *et al.*, 1990). Diese Kriterien werden von den allgemein verwendeten Reporterenzymen Alkalische Phosphatase (im Periplasma aktives Produkt des *phoA*-Gens; Chang *et al.*, 1986), β -Laktamase (im Periplasma aktives Produkt des *blaM*-Gens) und β -Galaktosidase (im Cytoplasma aktives Produkt von *lacZ*) erfüllt, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (van Geest & Lolkema, 2000).

Die Alkalische Phosphatase (PhoA) wird als Präprotein mit Signalsequenz synthetisiert, aber SecB-unabhängig transloziert (Kumamoto & Beckwith, 1985). Sie bildet im Periplasma ein natives Homodimer, das durch Ausbildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken je Monomer enzymatische Aktivität erlangt (Akiyama & Ito, 1993; Derman *et al.*, 1993). Als Cofaktoren sind in den beiden aktiven Zentren des Dimers auch je zwei Zn^{2+} -Ionen gebunden. Darüber hinaus tragen Mg^{2+} -Ionen zur Stabilisierung der nativen Konformation bei (Holtz & Kantrowitz; 1999). In Topologie-Untersuchungen wird nur der reife Teil des Enzyms ohne Signalsequenz als Reporter eingesetzt (Manoil *et al.*, 1990; van Geest & Lolkema, 2000). Das von Derman & Beckwith (1995) beschriebene Problem, daß Fusionsproteine mit cytoplasmatisch lokalisierter PhoA-Domäne in ruhenden Zellen langsam enzymatisch aktiv werden, wird durch Zusatz von Jodacetamid als Sulfhydryl-Gruppen alkylierendes Agens beim Aktivitätstest gelöst.

Das Reporterenzym β -Galaktosidase (LacZ) ist als Homotetramer im Cytoplasma aktiv (van Geest & Lolkema, 2000). Ein wichtiges Kriterium von Reporterenzymen wird von der β -Galaktosidase allerdings nur ungenügend erfüllt. Der effiziente Transport des Reporters ins Periplasma, vermittelt durch ein vorgeschaltetes Exportsignal im Zielprotein, ist aufgrund von

blockierenden Sequenzen praktisch nicht möglich (Lee *et al.*, 1989; Pugsley, 1993). Die gefaltete LacZ-Domäne des Fusionsproteins verstopft in diesem Fall das Translokon (Bassford *et al.*, 1977; Snyder & Silhavy, 1995), was die beobachtete Toxizität dieser Fusionen erklärt (Manoil, 1990; Manoil, 1991). Der Grund für den trotzdem recht häufigen Einsatz von LacZ-Fusionen in Kombination mit PhoA-Fusionen sind die komplementären Eigenschaften bzw. das reziproke Verhalten der beiden Reporterproteine (Manoil, 1990; Manoil, 1991). Zur Verifizierung cytoplasmatisch lokalisierter Fusionspositionen sind LacZ-Fusionen geeignet. Die Gefahr, daß auf Artefakten beruhende Aktivitäten gemessen werden, ist aber groß, da bei Export das Ausmaß der Einbettung der LacZ-Domäne in die Membran über Inaktivität oder Aktivität einer Fusion entscheidet (van Geest & Lolkema, 2000). Eine ebenso geniale wie einfache Lösung des β -Galaktosidase-Problems wurde von Ginn *et al.* (1997) bei der Charakterisierung des Metall-Tetracyclin/Protonen-Antiporters TetA(K) angewandt. Es wurden Fusionen mit dem kurzen α -Peptid der β -Galaktosidase (LacZ α) konstruiert und die Fähigkeit zur LacZ α -Komplementation überprüft.

Die β -Laktamase (BlaM), ein häufig als Alternative zur Alkalischen Phosphatase eingesetztes Reporterprotein (Broome-Smith *et al.*, 1990; van Geest & Lolkema, 2000), wird mit einer sehr hydrophoben Signalsequenz synthetisiert, die dazu führt, daß das Präprotein via SRP-Targeting-Weg ins Periplasma transloziert wird (Phillips & Silhavy, 1992; Luirink *et al.*, 1994). Das reife Enzym ist als Monomer mit einer Disulfidbrücke im Periplasma aktiv und bewirkt Resistenz gegen Ampicillin (Laminet & Pluckthun, 1989; van Geest & Lolkema, 2000).

Für die Generierung von Reporter-gen-Fusionen stehen verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Methoden zur Verfügung (Manoil, 1991; Manoil, 2000). Spezielle Transposons inserieren *in vivo* in das Zielgen und erzeugen so zufällig Translationsfusionen, auf die selektiert werden muß. Die klassischen Transposons, die oft Anwendung fanden, sind Tn $phoA$ (Manoil & Beckwith, 1985), Tn $blaM$ (Broome-Smith *et al.*, 1990) und Tn $lacZ$ (Manoil, 1990). Mittlerweile sind effizientere Konstruktionen wie IS $phoA/in$ und IS $lacZ/in$ entwickelt worden, die Reporter-gen-Fusionen generieren, die in kurze *in-frame* Insertionen im Zielgen umgewandelt werden können (Manoil & Bailey, 1997; Manoil, 2000). Mit dem Mini-Transposon TnTAP können sogar *phoA-sandwich*-Genfusionen erzeugt werden, die zusätzlich eine spezifische Proteasespaltstelle tragen. Nach Deletion des Reportergens bleibt nur die eingefügte Proteasespaltstelle im Zielgen zurück (Ehrmann *et al.*, 1997).

In vitro werden Fusionen mit dem Zielgen entweder durch partielle Exonuklease III-Behandlung (Henikoff, 1984) erzeugt (Broome-Smith *et al.*, 1990; Manoil, 1991) oder durch direkte Fusionierung von mit PCR hergestellten Abschnitten des Zielgens mit dem entsprechend präparierten Reporter-gen. Keine der genannten Methoden ist ohne Nachteil. Der Vorteil der Verwendung von PCR-Fragmenten ist offensichtlich, gewünschte Fusionspositionen können gezielt vorgegeben und die Zahl notwendiger Fusionen minimiert

werden (Boyd *et al.*, 1993). Als Nachteil sind mit PCR zufällig eingeführte Punktmutationen zu bewerten, die Einfluß auf die Topologie des untersuchten Proteins und somit auf die Aktivitäten der Reporterenzyme haben können (Lee & Manoil, 1994; Gafvelin & von Heijne, 1994).

Ein wichtiger Bestandteil von Untersuchungen der Topologie ist die Kontrolle des Expressionsniveaus und der Stabilität der Fusionsproteine (Manoil, 1991; van Geest & Lolkema, 2000). Es muß nachgewiesen werden, daß unterschiedliche Aktivitäten der Reporterenzyme tatsächlich auf unterschiedliche Lokalisation zurückzuführen sind, und nicht etwa auf differentieller Expression oder Stabilität beruhen. Für einen Überblick ist die mit Antikörpern gegen die Domäne des Reporterproteins im Westernblot erhaltene Momentaufnahme ausreichend. Detailliertere Aussagen zu Synthese und Stabilität können mit *pulse-chase* Experimenten getroffen werden (San Millan *et al.*, 1989; van Geest & Lolkema, 2000).

Die Untersuchungen zu Lokalisation und Topologie der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes in dieser Arbeit wurden mit Alkalischer Phosphatase und zum Teil auch mit β -Galaktosidase als Reporterenzyme durchgeführt, bei der Auswertung der Ergebnisse hatten aber die gemessenen PhoA-Aktivitäten Priorität. Die Abschnitte der *czc*-Gene, die für C-terminal verkürzte Teile des untersuchten Proteins kodierten, wurden mit PCR erzeugt. Expression und Stabilität der Fusionsproteine wurden im Westernblot mit Antikörpern gegen die Reporterprotein-Domäne analysiert.

3. Merkmale der Reporterplasmid-Sets und Nachweis der Funktion

Die verwendeten Reporterplasmid-Sets 1-3 (Abb. 3, 6 und 7) zeichnen sich durch einige gemeinsame Merkmale aus, die hier diskutiert werden sollen. Die Reportergene '*phoA*', '*lacZ*' und '*blaM*' sind nicht vollständig auf den Vektoren enthalten, sondern liegen ohne RBS, Startcodone und für Signalpeptide kodierende Sequenzen vor. Anstelle der fehlenden Abschnitte sind vier Codone vorgeschaltet, die für ein Ser-Arg-Gly-Pro-Oligopeptid kodieren und eine *Linker*-Region bilden, die der Verknüpfung der *czc*-Gene mit den Reportergenen dient, so daß Translationsfusionen entstehen. Die ersten beiden Codone entsprechen der für die Klonierung der Abschnitte der *czc*-Gene bedeutsamen *XbaI*-Schnittstelle. Durch die von den folgenden Codonen gebildeten Gly- und Pro-Reste soll bei Bildung von Fusionsproteinen die möglichst ungehinderte und von der N-terminalen Domäne nicht beeinflusste Faltung der Reporterprotein-Domäne gefördert werden. Arg-Reste sind jedoch neben Lys-Resten als starke topogene Signale für cytoplasmatische Lokalisation bekannt (Andersson *et al.*, 1992), so daß möglicherweise der Arg-Rest in der *Linker*-Region schwächeren Exportsignalen entgegenwirken und den effizienten Export der Reporterdomäne behindern könnte. Genau dieses Problem wurde von Prinz & Beckwith (1994) bei einem Vergleich von PhoA- und

BlaM-Fusionen untersucht. In einer von ihnen verwendeten *Linker*-Region wurde ebenfalls ein Arg-Rest kodiert, der auf eine eingeführte *XbaI*-Schnittstelle zurückzuführen war. Der Austausch dieses Arg-Restes durch einen Ser-Rest führte aber zu keiner Veränderung der Aktivität des Fusionsproteins, die auf veränderte Lokalisation der Reporterdomäne hingedeutet hätte (Prinz & Beckwith, 1994). Ein generell verfälschender Einfluß der in den Reporterplasmid-Sets 1-3 verwendeten *Linker*-Region auf die Ergebnisse der Enzymtests kann also ausgeschlossen werden.

Anhand der *'phoA*-Vektoren soll trotzdem der mögliche artifizielle Einfluß von *Linker*-Sequenzen, die die Übergangsregion in die PhoA-Domäne verändern, verdeutlicht werden. Wie Untersuchungen von Kajava *et al.* (2000) gezeigt haben, ist die Nettoladung der ersten 18 Aminosäurereste der reifen Alkalischen Phosphatase unmittelbar nach der Spaltstelle der Signalpeptidase ein entscheidender Faktor für eine effiziente Translokation. Die Veränderung der negativen Nettoladung (-1) durch Einführung positiv geladener Aminosäurereste senkt die Exporteffizienz deutlich. Besonders die Einführung von Arg-Resten direkt am N-Terminus der prozessierten Alkalischen Phosphatase verhindert den Export ins Periplasma (Kajava *et al.*, 2000). In dem in dieser Arbeit verwendeten Reporterenzym *'PhoA* wird durch das effektive Fehlen der negativen Ladung eines Glu-Restes die Nettoladung der ersten 18 Aminosäurereste neutralisiert (Abb. 26). Eine neutrale Ladung dieser Region ist bei anderen exportierten Proteinen jedoch nichts Ungewöhnliches (Kajava *et al.*, 2000) und dürfte demnach kaum Einfluß haben.

	1	10	18	
Wt :	RTPE MPVLE EN RAAQGDIT...			(-1)
<i>'PhoA</i> :	<u>SRGPPVLE</u> EN RAAQGDITA...			(±0)

Abb. 26: Vergleich der N-terminalen Sequenzen von prozessierter Alkalischer Phosphatase (Wt) und verwendeter Alkalischer Phosphatase (*'PhoA*)

Dargestellt sind die ersten 18 AS-Reste nach der Spaltstelle der Signalpeptidase (Wt) bzw. der kodierten AS-Sequenz (*'PhoA*). Die *Linker*-Region in *'PhoA*, die die ersten fünf AS im reifen Wt-Enzym ersetzt, ist unterstrichen. Die geladenen AS-Reste, die zur Nettoladung der Region beitragen, sind hervorgehoben (**fett**). Die Nettoladung der gesamten Region ist in Klammern angegeben.

Weiteres charakteristisches Merkmal der Plasmid-Sets ist der zur Transkription der Reporter-Gen-Fusionen verwendete T7-Promotor (p_{T7}). Zumindest in den Sets 2 und 3 ist dieser intakt, wie auch der Vergleich von Reporter-Aktivitäten von Fusionsproteinen mit und ohne T7-RNA-Polymerase beweist (Tab. 10). Ein T7-Expressionssystem (Tabor & Richardson, 1985) wurde schon in früheren Experimenten zur heterologen Expression der Czc-Proteine in *E. coli* eingesetzt (Nies *et al.*, 1989) und fand auch in anderen Untersuchungen dieser Arbeit wie Lokalisationsstudien und *In vivo*-Crosslinking-Experimenten Anwendung. In ersten Experimenten zur Topologie bzw. Lokalisation von CzcC und CzcB (Rensing *et al.*, 1997a) und bei der topologischen Charakterisierung des

Na^+/H^+ -Antiporters NhaA von *E. coli* (Rothman *et al.*, 1996) wurde ebenfalls ein T7-Promotor verwendet.

Die Vektoren enthalten außerdem keine RBS für die Reporter-gen-Fusionen. Genabschnitte, die fusioniert werden sollen, müssen demzufolge entweder mit der nativen oder einer künstlichen RBS (Shine & Dalgarno, 1974) versehen werden. Die *czc*-Genfragmente wurden mit ihrer nativen RBS als *KpnI-XbaI*-Fragmente amplifiziert und in die Reporterplasmide kloniert. Zum einen war bekannt, daß die heterologe Expression von CzcC, CzcB und CzcA mit nativer RBS in *E. coli* funktioniert (Nies *et al.*, 1989), zum anderen sollte eine Überexpression der Fusionsproteine vermieden werden, die mögliche toxische Effekte begünstigt hätte (Rensing, 1996; Rensing *et al.*, 1997a) bzw. mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Sättigung der Translokationsmaschinerie (Ulbrandt *et al.*, 1997) und somit zur Verfälschung der Topologie-Daten geführt hätte. Die Expression der Fusionsproteine auf moderatem Niveau sollte sicherstellen, daß die Fusionsproteine korrekt exportiert bzw. in die Membran inseriert werden können.

Der Nachweis der Funktionsfähigkeit der Reporterplasmide wurde mit Translationsfusionen, die für Fusionsproteine bekannter Lokalisation kodierten, geführt. Für das periplasmatisch lokalisierte Fusionsprotein BlaM'-PhoA wurde die komplette Startregion des *blaM*-Gens (mit RBS, Startcodon und für Signalpeptid kodierende Sequenz) mit dem '*phoA*-Gen des Vektors pECD637 (Set 3) fusioniert. Die hohe PhoA-Aktivität (Tab. 6) und die häufig bei periplasmatisch lokalisierten Fusionsproteinen beobachtete Stabilität einer abgespaltenen PhoA-Domäne (Abb. 8) beweisen (van Geest & Lolkema, 2000), daß die Kontrollfusion BlaM'-PhoA exportiert wird, und zwar über den SRP-Targeting-Weg (Phillips & Silhavy, 1992; Luirink *et al.*, 1994). Für die cytoplasmatisch lokalisierten Fusionsproteine 'BlaM'-PhoA und 'BlaM'-LacZ wurde eine modifizierte Startregion des *blaM*-Gens (mit RBS, Startcodon aber ohne für Signalpeptid kodierende Sequenz) mit dem '*phoA*-Gen der Vektoren pECD500 (Set 1) und pECD637 (Set 3) bzw. mit dem '*lacZ*-Gen des Vektors pECD499 (Set 1) fusioniert. Während 'BlaM'-LacZ aktiv ist, zeigt 'BlaM'-PhoA keine Aktivität, unabhängig vom exprimierenden System (Tab. 5 und 6). Die 10x höhere spezifische PhoA-Aktivität von 'BlaM'-PhoA, kodiert von einem pECD637-Derivat (Set 3; auf Basis von pGEM[®]-T Easy), gegenüber der Aktivität desselben Fusionsproteins 'BlaM'-PhoA, kodiert von einem pECD500-Derivat (Set 1; auf Basis von pBR322), ist einerseits auf den mutierten T7-Promotor (Ikeda *et al.*, 1992) der Plasmide des Sets 1 (Abb. 5) und andererseits auf die mit der höheren Kopienzahl von Plasmiden des Sets 3 verbundenen höheren Gendosis zurückzuführen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die hier verwendeten Reporterplasmide funktionieren, da die PhoA-Aktivität der periplasmatischen Fusion BlaM'-PhoA ca. 27x höher ist, als die der cytoplasmatischen Fusion 'BlaM'-PhoA, wenn beide Fusionen vom Vektor pECD637 (Set 3) aus exprimiert werden (Tab. 6). Selbst unter Berücksichtigung der etwas größeren

Proteinmenge des periplasmatischen Fusionsproteins BlaM'-PhoA (Abb. 8) liegt der Wert im Rahmen der in der Literatur genannten Werte von ca. 10-100x höheren PhoA-Aktivitäten im Periplasma (Manoil, 1991; Boyd *et al.*, 1993). Die Untersuchungen mit den Kontrollfusionen verdeutlichen aber auch, daß allgemein Vorsicht beim Vergleich von Daten geboten ist, die mit unterschiedlichen Reportergeräten-Meßsystemen wie z. B. den verschiedenen Reporterplasmid-Sets erhalten wurden. Ein Abgleich der Systeme ist notwendig.

4. CzcC, die OMF-Komponente des CzcCBA-Efflux-Komplexes

Für die Charakterisierung der Lokalisation von CzcC mit Reportergeräten-Fusionen fanden die Vektoren des Sets 1 Anwendung. Acht verschieden lange Abschnitte des *czcC*-Gens wurden in den '*lacZ*-Vektor pECD499 und in den '*phoA*-Vektor pECD500 kloniert, so daß sie für Translationsfusionen kodierten. Im folgenden sollen die mit den Fusionsproteinen erhaltenen Daten interpretiert werden.

Als erste Fusionsposition wurde A20 im Bereich der Spaltstelle der Signalpeptidase (AVA₂₂) der von Grass (2000) identifizierten Signalsequenz gewählt. Beide Fusionsproteine CzcC20-PhoA und CzcC20-LacZ sind nach Westernblot mit Antikörpern gegen die Reporterproteine erkennbar, eine Unterscheidung von möglichen abgespaltenen Reporterdomänen ist aber nicht möglich (Abb. 10). Die an dieser Stelle im Vergleich zur PhoA-Aktivität recht hohe LacZ-Aktivität ist auffällig (Tab. 7). Dieser Fakt könnte mit dem unvollständigen Signalpeptid erklärt werden. Einerseits wird nicht der vollständige Export der PhoA-Domäne ins Periplasma bewirkt und andererseits wird die LacZ-Domäne nicht stark genug in das Translokon eingebettet, so daß sie relativ ungehindert die für enzymatische Aktivität notwendige tetramere Struktur ausbilden kann.

Anders stellt sich die Lage mit vollständigem Signalpeptid an Position T28 dar. Die im Westernblot (Abb. 10) erkennbaren Fusionsproteine zeigen ein anderes Aktivitätsmuster als die an Fusionsposition A20. Während die PhoA-Aktivität von CzcC28-PhoA genauso hoch ist, ist die LacZ-Aktivität von CzcC28-LacZ deutlich geringer (Tab. 7). Die LacZ-Domäne wird jetzt so stark ins Translokon gezogen, daß nur noch geringere Enzymaktivität meßbar ist. Das Verhältnis von LacZ- zu PhoA-Aktivität der Hybridproteine an dieser Position entspricht ungefähr dem Verhältnis der Aktivitäten der Hybridproteine an den folgenden sechs Fusionspositionen, d. h. geringere Aktivität der CzcC'-PhoA-Fusionsproteine korreliert mit geringerer Aktivität der zugehörigen CzcC'-LacZ-Fusionen. Fusionen an Position S93 führen zu höheren Enzymaktivitäten (Tab. 7). Im Westernblot ist bei CzcC93-PhoA sowohl abgespaltene PhoA-Domäne als auch ein hoher Anteil an intaktem Fusionsprotein erkennbar. Überraschenderweise kann CzcC93-LacZ nicht nachgewiesen werden, was auch bei den ebenfalls enzymatisch aktiven Fusionen CzcC158-LacZ, CzcC353-LacZ und CzcC417-LacZ der Fall ist. Gründe dafür mögen geringe Expression gekoppelt mit hoher Instabilität

der Fusionsproteine sein, wahrscheinlicher ist jedoch, daß in diesem unabhängig von den Enzymtests durchgeführten Experiment ein Problem mit der Expression vorlag. Es fällt auf, daß die gemessenen LacZ-Aktivitäten allgemein schlechter als die PhoA-Aktivitäten reproduziert werden können. Dieser Aspekt findet seinen Ausdruck in den vergleichsweise hohen Standardabweichungen der LacZ-Aktivitäten (Tab. 7).

Hybridproteine, die sich von Position T158 ableiten, haben Enzymaktivitäten auf niedrigerem Niveau. Bei der Fusion CzcC158-'PhoA entfällt im Westernblot nur ein Bruchteil des Signals auf das Fusionsprotein selbst, der weitaus größte Teil ist auf die zugehörige abgespaltene PhoA-Domäne zurückzuführen. Fusionsproteine nach Aminosäurerest F223 zeichnen sich wieder durch höhere Enzymaktivitäten aus. Beide Fusionen sind im Westernblot detektierbar, bei CzcC223-'PhoA sind neben dem Fusionsprotein wieder in großen Umfang Abbauprodukte bis hin zur abgespaltenen PhoA-Domäne erkennbar. Gleiches gilt für Translationsfusionen an Position E288, die das höchste Aktivitätsniveau zeigen. Die Fusionen CzcC288-'PhoA und CzcC288-'LacZ sind im Westernblot erkennbar, wobei CzcC288-'PhoA ein ähnliches Abbaumuster zeigt wie CzcC223-'PhoA (Abb. 10). Die Hybridproteine, die sich von Fusionsposition T353 ableiten, haben gegenüber den Fusionen an Position E288 wieder ein niedrigeres Aktivitätsniveau. Diesmal kann im Westernblot fast ausschließlich abgespaltene und stabile PhoA-Domäne und kaum das Fusionsprotein CzcC353-'PhoA nachgewiesen werden. Am C-Terminus von CzcC (Position R417) verknüpfte Fusionsproteine haben relativ geringe Aktivitäten. Wie der Westernblot (Abb. 10) zeigt, ist CzcC417-'PhoA aber ein relativ stabiles CzcC'-'PhoA-Fusionsprotein.

Fünf weitere CzcC'-'PhoA-Fusionen, die nicht in dieser Arbeit und mit einem anderen System konstruiert wurden (Rensing *et al.*, 1997a), zeigen bis auf CzcC296-'PhoA alle PhoA-Aktivität. Da auch kein Nachweis dieser Fusionsproteine mittels Westernblot erfolgte, ist ein Vergleich der Daten mit den Ergebnissen dieser Arbeit aus den schon oben genannten Gründen nicht möglich.

Das kaum als reziprok oder komplementär (Manoil, 1990; Manoil, 1991) zu bezeichnende Verhalten der CzcC'-'PhoA- und CzcC'-'LacZ-Fusionsproteine gleicher Fusionsposition, Komplementarität konnte auch bei Untersuchungen der Topologie von HoxN (Eitinger & Friedrich, 1994) und DtpT (Hagting *et al.*, 1997) nur begrenzt festgestellt werden (van Geest & Lolkema, 2000), ergibt trotzdem ein interpretierbares Gesamtbild. Das Verhältnis der LacZ- und PhoA-Aktivitäten von Hybridproteinen, die sich von einer Fusionsposition ableiten, ist bei Vergleich von A20 und T28 deutlich verändert, bleibt aber an allen folgenden Fusionspositionen ähnlich wie an Position T28. Dies spricht dafür, daß in CzcC nach dem Signalpeptid kein weiteres topogenes Signal in Form eines TMS folgt, das eine veränderte Lage der Reporterdomänen relativ zur Cytoplasmamembran und ein erneut verändertes Verhältnis der Aktivitäten zur Folge hätte. Die an allen Positionen in CzcC recht hohen PhoA-Aktivitäten der CzcC'-'PhoA-Fusionsproteine, für die ein Translokationssignal, das

Signalpeptid von CzcC, unbedingt notwendig ist, deuten auf eine periplasmatische Lokalisation großer Teile des Proteins hin. Auch die meist in großen Mengen nachweisbare abgespaltene und stabile PhoA-Domäne, ist ein Hinweis auf periplasmatisch lokalisierte Fusionsproteine (van Geest & Lolkema, 1996; van Geest & Lolkema, 2000).

Wären die Daten der Hybridproteine von CzcC bei angenommenen Export über das Tat-System erklärbar? Sowohl Berks (1996) als auch Berks *et al.* (2000) diskutieren, ob das System, dessen physiologische Funktion es ist, gefaltete Proteine zu translozieren, vom Mechanismus her gefaltete Proteinsubstrate erfordert oder nicht. Wenn gefaltete Substrate erforderlich wären, hätte dies zur Folge gehabt, daß keine der hier untersuchten CzcC'-PhoA-Fusionen Aktivität zeigen dürfte, da die PhoA-Domäne im Cytoplasma nicht korrekt gefaltet werden kann (Derman & Beckwith, 1991).

Bei der Alkalische Phosphatase-Aktivitätsfärbung der CzcC'-PhoA-Hybridproteine (Abb. 11) werden fast ausschließlich die verschiedenen Isoformen der im Periplasma abgespaltenen, stabilen PhoA-Domäne nachgewiesen (Kajava *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1997a). Lediglich bei den Fusionen CzcC417'-PhoA und CzcC223'-PhoA, die im Westernblot stabilere Hybridproteine zeigen, sind im oberen Bereich des Geles aktive Aggregate der Hybridproteine erkennbar.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Studien zur Lokalisation von CzcC nach Fraktionierung von Zellen in ihre Kompartimente stützen sich auf frühere Experimente, die zeigten, daß die Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes nach heterologer T7-Expression hauptsächlich in der Membran-Fraktion von *E. coli*-Zellen zu finden sind (Nies *et al.*, 1989) unabhängig davon, ob einzelne Komponenten fehlen oder nicht (Rensing *et al.*, 1997a). Von Rensing *et al.* (1997a) wird die Problematik des Vorliegens von *Inclusion bodies* diskutiert, was aber nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Da in den vorliegenden Arbeit CzcC fast ausschließlich in seiner prozessierten Form ohne Signalpeptid nachgewiesen werden kann (Abb. 18), sollten *Inclusion bodies* unwahrscheinlich sein. Wie Untersuchungen zur Lokalisation der β -Laktamase aber zeigten, ist bei Überexpression des Enzyms auch die Bildung dicht gepackter, periplasmatisch lokalisierter Aggregate möglich, die mit der Membran-Fraktion assoziiert sind (Bernadac *et al.*, 1987). Die Auswertung der Ergebnisse der Zellfraktionierung fällt auch deshalb nicht leicht, da mehr Gesamt-Membranprotein als Gesamt-Periplasmaprotein im Gel aufgetrennt wurde (Abb. 18). Nach Auftrennung der Membran-Fraktion im Saccharose-Dichtegradienten ist CzcC hauptsächlich in Fraktionen hoher Dichte enthalten, die mit der Fraktion der äußeren Membran ungefähr übereinstimmen (Abb. 19). Das Protein kann aber nicht Fraktionen mittlerer bzw. intermediärer Dichte zugeordnet werden, wie sie für Membran-Fractionen beschrieben wurden, die die Membran-Adhäsionszonen enthalten sollen (Bayer *et al.*, 1982; Ishidate *et al.*, 1986).

In ähnlichen Untersuchungen zur Lokalisation von TolC, einem mit CzcC verwandten *E. coli*-Protein der OMF-Familie (Paulsen *et al.*, 1997), war auch dieses Protein hauptsächlich in der

Fraktion der äußeren Membran lokalisiert (Morona *et al.*, 1983). Das OMF-Protein PrtF aus *Erwinia chrysanthemi* konnte Fraktionen der äußeren Membran sowie intermediärer Dichte zugeordnet werden (Delepelaire, 1998). Auch OprM, ein OMF-Protein aus *P. aeruginosa*, konnte in Fraktionen der äußeren Membran nachgewiesen werden (Poole *et al.*, 1993; Gotoh *et al.*, 1995), jedoch haben Nakajima *et al.* (2000) Hinweise dafür, daß für die Verankerung in der äußeren Membran einzig und allein der Lipid-Anteil des Lipoproteins verantwortlich ist. Ohne diesen Lipid-Anteil kann OprM nicht mehr an die äußeren Membran angeheftet werden und ist periplasmatisch lokalisiert (Nakajima *et al.*, 2000). Völlig konträr dazu stehen Daten, die OprM als Kanalbildner in der äußeren Membran charakterisieren (Wong & Hancock, 2000). Das vorgeschlagene Topologie-Modell für OprM, das 16 transmembrane β -Faltblattstrukturen umfaßt, basiert zum einen auf Vorhersagen von Computerprogrammen und zum anderen auf Ergebnissen, die mit dem an verschiedenen Stellen in OprM inserierten Malaria-Epitop erhalten wurden (Wong & Hancock, 2000).

Für die Untersuchung der Topologie von TolC wurde das schon erwähnte Mini-Transposon TnTAP eingesetzt (Ehrmann *et al.*, 1997). Von den fünf untersuchten TolC-Insertionsmutanten mit der Spaltstelle der Protease des *Tobacco Etch Virus* (TEV) waren drei bei Protease-Behandlung von ganzen Zellen spaltbar. Zwei dieser drei Mutanten, nämlich die mit Insertionen nach den Aminosäureresten 79 und 306 in TolC (55 und 282 im Protein ohne Signalsequenz), waren zudem permissiv, d. h. biologisch funktionell bzw. phänotypisch still (Ehrmann *et al.*, 1997). Wie die kürzlich von Koronakis *et al.* (2000) veröffentlichte dreidimensionale Kristallstruktur des TolC-Proteins zeigt, liegen die beiden identifizierten Aminosäurereste genau in den zwei kurzen Regionen, die extrazellulär exponiert sind. TolC ist mit vier antiparallelen β -Faltblättern, die sich an die beiden genannten extrazellulären Loop-Strukturen anschließen, in der äußeren Membran verankert. Der übrige Teil des Proteins bildet im wesentlichen ein Bündel von α -Helices, sogenannte *coiled coil*-Strukturen, die weit in den periplasmatischen Raum ragen (Koronakis *et al.*, 2000). Die schon bei früheren Versuchen der Kristallisation festgestellte trimere Struktur von TolC (Koronakis *et al.*, 1997) muß betrachtet werden, um das Bild zu vervollständigen. Die Gesamtarchitektur des trimeren TolC entspricht dann einer langen Röhre, die aus einem von β -Faltblättern und aus einem von *coiled coils* gebildeten Teil besteht (Koronakis *et al.*, 2000).

TolC ist auch ein gutes Beispiel dafür, wie problematisch Strukturvorhersagen für Proteine der äußeren Membran sind, die nicht zur Familie der Porine gehören. Mit den im folgenden genannten Fakten soll auch illustriert werden, warum das Modell für die Topologie von OprM (Wong & Hancock, 2000) wahrscheinlich nicht haltbar ist. Koronakis *et al.* (1997) nutzten den Algorithmus von Schirmer & Cowan (1993) zur Identifizierung von möglichen transmembranen β -Faltblattstrukturen in TolC. Ganze 18 β -Faltblätter wurden für das monomere Protein als membranspannend deklariert (Koronakis *et al.*, 1997), das trimere TolC hat real gerade einmal zwölf solche Bereiche (Koronakis *et al.*, 2000). Grundsätzlich ist die

Vorhersage der amphipathischen, transmembranen β -Faltblätter von Proteinen in der äußeren Membran viel schwieriger als etwa die Vorhersage der hydrophoben α -Helices von Proteinen der Cytoplasmamembran, da β -Faltblätter in ihrer Struktur wesentlich heterogener sind (Gromiha *et al.*, 1997). Hinzu kommt noch, daß auch neuere Software, wie die von Wong & Hancock (2000) verwendete, ausschließlich mit Daten von Porinen getestet und kalibriert werden konnte (Gromiha *et al.*, 1997). Mit der Aufklärung der räumlichen Struktur von TolC ist gleichzeitig die Entdeckung eines völlig neuartigen Strukturtyps von Proteinen der äußeren Membran gelungen, der deutlich von der Porinstruktur abweicht. Von weiteren integralen Proteinen der äußeren Membran, die in Architektur und Funktion von Porinen verschieden sind, wurde in den letzten Jahren die Kristallstruktur entschlüsselt (Buchanan, 1999). Als Beispiele seien die aktiven Transporter von Eisen-Chelat-Komplexen FepA, ein Ferri-Enterobactin-Rezeptor (Buchanan *et al.*, 1999), und FhuA, ein Ferrichrom-Rezeptor (Locher *et al.*, 1998), von *E. coli* genannt. Programme zur Vorhersage von transmembranen β -Faltblattstrukturen können also mittlerweile auf eine wesentlich breitere Datenbasis gestellt werden, was ihre Genauigkeit gerade bei Nicht-Porinen bzw. den Porinen ähnlichen Proteinen beträchtlich erhöht.

Die immense Aussagekraft, die eine konzertierte Verwendung verschiedener Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur im Gegensatz zur isolierten Anwendung einzelner Vorhersagen birgt, wird von Johnson & Church (1999) demonstriert. Die beiden Autoren zeigen am Beispiel der OMF-Proteinfamilie, von ihnen als *Outer Membrane Efflux Proteins* (OEP) bezeichnet, und der MFP-Familie, von ihnen *Periplasmic Efflux Proteins* (PEP) genannt, daß durch Anwendung verschiedenster Algorithmen auf das multiple *Alignment* einer Proteinfamilie ein präzises Bild der noch unbekannt Struktur der Vertreter gezeichnet werden kann. Mit verblüffender Genauigkeit werden alle wesentlichen Strukturelemente, wie die tandemartige Wiederholung der Struktur, die vier transmembranen β -Faltblätter und die *coiled coil*-Strukturen, skizziert (Johnson & Church, 1999), die die Kristallstruktur von TolC auch tatsächlich beinhaltet (Koronakis *et al.*, 2000).

Inwieweit ist die TolC-Struktur nun aber auf CzcC übertragbar? Innerhalb der OMF-Familie können TolC, CzcC und OprM den drei distinkten phylogenetischen Gruppen A, B bzw. C zugeordnet werden (Paulsen *et al.*, 1997). Aus einem *Alignment* von repräsentativen Vertretern der Proteinfamilie wurden TolC (A), CzcC (B) und OprM (C) als prominente Vertreter der phylogenetischen Gruppen herausgegriffen und die konservierten Struktur motive der OMF-Familie (Johnson & Church, 1999) sowie die Elemente der Sekundärstruktur von TolC (Koronakis *et al.*, 2000) hervorgehoben. Die von *PHDseq* Vers. 1.96 (Rost & Sander, 1993) für CzcC und OprM vorhergesagte Sekundärstruktur ist ebenfalls markiert (Abb. 27).

Es fällt auf, daß die Übergänge der α -Helices H2 und H6 in die transmembranen β -Faltblätter S1 bzw. S4 sowie die Loop-Strukturen zwischen den α -Helices H3 und H4 als auch H7 und H8 konserviert sind. Während in der Sequenz von OprM nur das C-terminale Ende von TolC nach dem β -Faltblatt S6 zu fehlen scheint, das bei der Kristallisation von TolC auch entfernt werden mußte (Koronakis *et al.*, 2000), bricht die Sequenz von CzcC schon unmittelbar nach α -Helix H8 ab. In der Sequenz von CzcC fehlen also wahrscheinlich die Strukturelemente H9 und S6 von TolC. Dafür sind im N-terminalen Bereich der reifen Proteine OprM und CzcC vor der α -Helix H1 in TolC zusätzliche Sequenzen ohne Entsprechung in TolC vorhanden. Die tandemartige Wiederholung der Sekundärstrukturen der N-terminalen Hälfte in der C-terminalen Hälfte der Proteine ist in CzcC aber trotz dieser Differenzen voll erhalten. Die aufgezeigten Parallelen lassen keinen anderen Schluß zu, als den, daß die Proteine der OMF-Familie einschließlich CzcC im wesentlichen eine der TolC-Struktur entsprechende räumliche Struktur besitzen. Die vorhandenen Unterschiede liegen dabei eher im Detail.

5. Das MFP CzcB als Untereinheit im CzcCBA-Efflux-Komplex

Die Topologie von CzcB, einer mit den MFP (Dinh *et al.*, 1994) verwandten Komponente des Czc-Efflux-Komplexes, wurde wie CzcC mit dem *'lacZ*-Vektor pECD499 und dem *'phoA*-Vektor pECD500 des Sets 1 untersucht. Drei unterschiedlich lange Abschnitte des *czcB*-Gens wurden mit den Reportergenen fusioniert. Die Untersuchung der CzcB-Hybridproteine wurde in Gegenwart von CzcC durchgeführt, das zusammen mit den Fusionsproteinen vom selben Plasmid aus exprimiert wurde.

Die erste der gewählten Fusionspositionen G38 liegt nach dem ersten TMS und unmittelbar vor der His-reichen Region von CzcB, die eine Besonderheit des Proteins darstellt und für Proteine der MFP-Familie ungewöhnlich ist (Dinh *et al.*, 1994). Es wurde vermutet, daß diese Region für die primäre Bindung der Schwermetall-Kationen verantwortlich sein könnte (Nies & Silver, 1995). Durch ortsspezifische Mutagenese konnte aber gezeigt werden, daß auch drastische Veränderungen in der Region kaum Einfluß auf die Funktion von CzcB haben (Rensing, 1996; Rensing *et al.*, 1997a). Von Position G38 abgeleitete Fusionen sind im Westernblot sehr unterschiedlich nachweisbar (Abb. 13). Während CzcB38-*'PhoA* (oder die stabile, abgespaltene *PhoA*-Domäne) gut detektierbar ist, ist für CzcB38-*'LacZ* kein eindeutiges Signal erkennbar. Die vorhandene *PhoA*-Aktivität deutet aber auf eine periplasmatische Lokalisation dieser Region hin (Tab. 8).

Problematisch ist die Interpretation der Daten an Position K283. Sowohl die *PhoA*-Aktivität als auch die *LacZ*-Aktivität der entsprechenden Fusionen sind gering (Tab. 8). Beide CzcB-Hybridproteine sind im Westernblot nachweisbar, die zwar relativ stabile Fusion CzcB283-*'PhoA* wird aber schwächer exprimiert als die CzcB'-*'PhoA*-Fusionsproteine der anderen beiden Positionen (Abb. 13). Auch bei Topologie-Untersuchungen anderer Vertreter der MFP-

Familie, auf die noch genauer eingegangen werden wird, traten Unregelmäßigkeiten in der zentralen Region der Proteine auf (Schülein *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1993). Fusionsproteine, die am C-Terminus von CzcB (Position H520) verknüpft sind, werden gut exprimiert. Die Fusion CzcB520-'PhoA ist zudem auffällig stabil (Abb. 13). Die hohe LacZ-Aktivität von CzcB520-'LacZ im Vergleich zur geringen PhoA-Aktivität von CzcB520-'PhoA läßt eigentlich eine cytoplasmatische Lokalisation des C-Terminus von CzcB vermuten, zumal *Helixmem* (Eisenberg *et al.*, 1984) ein weiteres TMS in der C-terminalen Region von CzcB vorhersagt (Abb. 12). Es wird aber eine periplasmatische Lokalisation favorisiert, da zum einen für die gemessene PhoA-Aktivität Export ins Periplasma notwendig ist und zum anderen die extrem hohe LacZ-Aktivität auch mit dem sehr weit entfernten Exportsignal am N-Terminus von CzcB erklärt werden kann, das es der LacZ-Domäne ermöglicht die aktive tetramere Struktur einzunehmen, was zusätzlich die Exportkompetenz senkt.

Es existieren zwei weitere CzcB'-'PhoA-Fusionsproteine, die sich von den Positionen A58 und D68 in CzcB ableiten und nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden sind (Rensing *et al.*, 1997a). Während CzcB58-'PhoA aktiv ist, ist die nur zehn Aminosäurereste längere Fusion CzcB68-'PhoA praktisch inaktiv (Rensing *et al.*, 1997a). Es kann nur vermutet werden, daß CzcB68-'PhoA wahrscheinlich nicht exprimiert wird, da keine Daten zum Nachweis dieser Fusionsproteine vorliegen. Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, daß das gesamte CzcB-Protein bis auf die N-terminale Region mit dem TMS im Periplasma lokalisiert ist, wenn auch nicht jeder Widerspruch mit den vorliegenden Daten ausgeräumt werden kann.

Wie schon angedeutet, sind auch einige andere Proteine der MFP-Familie mit Hilfe von Reporter-Gen-Fusionen topologisch charakterisiert wurden, so daß ein Vergleich mit Daten aus diesen Experimenten möglich ist. So wurde z. B. von Skvirsky *et al.* (1995) eine beachtenswerte Analyse von CvaA, einem am Colicin V-Export beteiligten MFP aus *E. coli*, erstellt. CvaA gehört zu einer Gruppe von MFP, die im Zusammenwirken mit einem ABC-Transporter (Nikaido & Hall, 1998) und einem OMF (Paulsen *et al.*, 1997) Proteinexport-Systeme vom Typ I bilden (Filloux *et al.*, 1998). Als OMF-Protein fungiert im Cva-Efflux-System das schon ausführlich diskutierte TolC (Gilson *et al.*, 1990). Mit Hilfe von Tn*phoA* (Manoil & Beckwith, 1985) wurden insgesamt elf PhoA-Fusionsproteine von CvaA generiert, deren Fusionspositionen alle nach dem N-terminalen Membrananker lagen und deren PhoA-Domänen periplasmatisch lokalisiert waren (Skvirsky *et al.*, 1995). Ausführlich setzten sich Skvirsky *et al.* (1995) mit dem Problem einer fehlenden Vergleichsgröße auseinander, wenn alle Fusionsorte auf derselben Seite der Cytoplasmamembran liegen, ein Aspekt, der auch für diese Arbeit nicht ohne Bedeutung ist. Nach Trennung der Membranen von Zellen mit ausgewählten CvaA'-'PhoA-Fusionen, die mit Markerproteinen überprüft wurde, konnten die Fusionsproteine in der Cytoplasmamembran-Fraktion nachgewiesen werden. Durch Protease-

Verdaue wurde außerdem gezeigt, daß die in der Cytoplasmamembran verankerten Fusionsproteine auf der periplasmatischen Seite lokalisiert sind (Skvirsky *et al.*, 1995).

Die Membran-Topologie von HlyD, einem am Hämolyisin-Export beteiligten MFP aus *E. coli*, das vergleichbar mit CvaA im Komplex mit einem ABC-Transporter (Nikaido & Hall, 1998) und dem multifunktionellen OMF TolC (Wandersman & Delepelaire, 1990) agiert, wurde mit TnphoA (Manoil & Beckwith, 1985) und TnlacZ (Manoil, 1990) charakterisiert (Schülein *et al.*, 1992). Es konnten neun aktive HlyD'-PhoA-Fusionen nach dem TMS und eine inaktive HlyD'-PhoA-Fusion davor identifiziert werden (Schülein *et al.*, 1992). Außerdem konnten zwei aktive HlyD'-LacZ-Fusionen generiert werden, deren Fusionspositionen vor dem Membrananker von HlyD lagen. Trotz mehrerer Versuche wurden *in vivo* keine HlyD'-PhoA-Fusionen in der zentralen Region des Proteins (Aminosäurereste 170-345) erhalten. Erst durch Exonuklease III-Behandlung wurden drei HlyD'-PhoA-Hybridproteine in dieser Region generiert, die zwar aktiv waren, aber bei Expression ein vermindertes Wachstum der Zellen verursachten (Schülein *et al.*, 1992). Vielleicht sind hier Parallelen zu dem geschilderten Problem in der zentralen Region von CzcB (K283) zu ziehen. Über Membran-Trennung im Saccharose-Dichtegradienten und Protease-Behandlung von Sphäroplasten, ähnlich wie schon für CvaA beschrieben, wurden die in der Cytoplasmamembran verankerten HlyD'-PhoA-Fusionen auf der periplasmatischen Seite lokalisiert (Schülein *et al.*, 1992).

Weitere Daten zu Membranorganisation und Lokalisation von MFP stammen aus Untersuchungen von AcrA (Ma *et al.*, 1993). AcrA bildet mit den zwei schon erwähnten Komponenten AcrB, einem RND-Transporter (Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1999), und erneut TolC als OMF einen Efflux-Komplex, der in *E. coli* multiple Antibiotika-Resistenz vermittelt (Fralick, 1996; Nikaido, 1996). Mit TnphoA wurden zehn verschiedene AcrA'-PhoA-Hybridproteine generiert, die alle aktiv waren und somit anzeigten, daß zumindest ein Großteil des reifen AcrA-Proteins im Periplasma lokalisiert ist (Ma *et al.*, 1993). Es fällt auf, daß wie schon bei HlyD *in vivo* keine Hybridproteine, die an den Aminosäureresten 197-370 fusioniert waren, konstruiert werden konnten (Ma *et al.*, 1993).

Die umfassendste Analyse der Topologie von Vertretern der MFP mit Reporter-gen-Fusionen wurde an MexA durchgeführt (Yoneyama *et al.*, 2000). MexA bildet mit MexB, einem RND-Protein (Tseng *et al.*, 1999), und OprM einen Efflux-Komplex, der multiple Antibiotika-Resistenz in *P. aeruginosa* vermittelt (Poole *et al.*, 1993). Mit einem System von Broome-Smith *et al.* (1990), das auf partieller Exonuklease III-Behandlung (Henikoff, 1984) basiert, wurden insgesamt 78 MexA'-BlaM-Fusionen konstruiert, die zeigten, daß MexA in der Cytoplasmamembran verankert ist und im Periplasma vorliegt (Yoneyama *et al.*, 2000). Mit Sicherheit hätte aber auch eine wesentlich geringere Zahl von Fusionsproteinen dieselbe Aussagekraft gehabt.

Interessanterweise wurde kürzlich entdeckt, daß es auch in Gram-positiven Bakterien zur MFP-Familie homologe Proteine gibt (Harley *et al.*, 2000). Wenn bisherige Annahmen zutreffen, müssen diesen Proteinen aber in Gram-positiven Organismen zumindest teilweise andere Aufgaben zukommen als in Gram-negativen, da die äußere Membran und OMF-Proteine fehlen (Harley *et al.*, 2000). Ein gut charakterisierter Vertreter dieser MFP-Subfamilie ist LcnD aus *Lactococcus lactis*. Zusammen mit dem ABC-Transporter LcnC bewirkt LcnD den Export von Lactococcinen ins Medium (Franke *et al.*, 1996). Die Topologie von LcnD wurde mit je vier LacZ- und PhoA-Fusionen, die sich jeweils von derselben Position ableiteten, in *E. coli* und *L. lactis* näher untersucht (Franke *et al.*, 1996). Die Fusionen an einer Position vor dem TMS führten zu einem aktiven LcnD'-LacZ-Protein, Fusionen an Positionen nach dem TMS zeigten hauptsächlich PhoA-Aktivität. Das Verhalten von LacZ- und PhoA-Fusionen, die sich von derselben Position in LcnD ableiteten, war komplementär zueinander (Franke *et al.*, 1996). LcnD hat also ebenfalls die für MFP typische Membran-Topologie.

Was schon im Zusammenhang mit den Studien zur Lokalisation von CzcC erwähnt wurde, gilt auch für die Bestimmung der Lokalisation von CzcB nach heterologer Expression mit radioaktiver Markierung in *E. coli* und anschließender Fraktionierung der Zellen in die Kompartimente. Es wurde vorausgesetzt, daß für die native Lokalisation von CzcB keine andere Komponente des Czc-Efflux-Komplexes notwendig ist (Nies *et al.*, 1989; Rensing *et al.*, 1997a). Auch wenn die aufgetragenen Gesamtproteinmengen nicht völlig übereinstimmen, ist deutlich erkennbar, daß CzcB nach Fraktionierung der Zellen in großen Mengen in der Membran-Fraktion vorlag (Abb. 18). Um das Protein der äußeren Membran, der Cytoplasmamembran oder etwa Membran-Adhäsionszonen zuordnen zu können, wurde eine Membran-Trennung im Saccharose-Dichtegradienten durchgeführt. Nach Auftrennung der Membranen kann CzcB überwiegend in Fraktionen mit höherer Dichte wiedergefunden werden, die eher der äußeren Membran entsprechen (Abb. 20). Keinesfalls kann mit den vorgestellten Daten eine Verankerung von CzcB in der Cytoplasmamembran verifiziert werden, sie unterstützen aber die für MFP diskutierte Interaktion mit der äußeren Membran (Dinh *et al.*, 1994). Im übrigen ähnelt das Ergebnis stark dem Bild von CzcC, wofür ein Artefakt als Grund nicht völlig ausgeschlossen werden kann (Abb. 19 und 20).

Das MFP PrtE aus *E. chrysanthemi* konnte nach Trennung der Membranen als Protein der inneren Membran charakterisiert werden, das aber auch in Fraktionen intermediärer Dichte vorliegt (Delepelaire, 1998).

Mit dem AcrA-Protein wurden ebenfalls Zellfraktionierungen zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation durchgeführt (Kawabe *et al.*, 2000). Nach Präparation des Periplasmas mittels osmotischem Schock wurden die Membranen der verbleibenden Zellen im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Die Fraktionierung wurde mit den Kompartimentsmarkern TetB für die innere Membran und β -Laktamase für das Periplasma

überprüft. Sowohl AcrA als auch das ebenfalls untersuchte AcrB waren in der inneren Membran zu finden (Kawabe *et al.*, 2000). Nach Harnstoff-Behandlung konnte der Großteil von AcrA im Gegensatz zu AcrB von der Membran abgelöst und AcrA so als peripheres Protein der Cytoplasmamembran charakterisiert werden (Kawabe *et al.*, 2000).

Für das aktuell wohl am besten untersuchte MFP AcrA existieren noch weitere interessante Ergebnisse. Wie Ma *et al.* (1993) schon vermuteten, ist AcrA ein Lipoprotein (Zgurskaya & Nikaido, 1999a) und damit kein Einzelfall innerhalb der MFP-Familie (Johnson & Church, 1999). Die Annahme, daß eine Verankerung entweder über ein TMS oder eine Lipid-Domäne für die Funktion der MFPs essentiell sein könnte, wurde von Zgurskaya & Nikaido (1999a) eindeutig widerlegt. AcrA erfüllt auch ohne Lipid-Anteil seine Funktion (Zgurskaya & Nikaido, 1999a). Auch MexA ist ein Lipoprotein, das ohne seinen Lipid-Anteil funktioniert (Yoneyama *et al.*, 2000). Wie Kawabe *et al.* (2000) zeigen, stört ein TMS als Membrananker die Funktion von AcrA aber andererseits auch nicht. Durch Mutation des invariablen Cys-Restes (C25A), der normalerweise vor Abspaltung des Signalpeptides durch die Diacylglyceryl-Transferase kovalent modifiziert wird (Tjalsma *et al.*, 2000), wird sowohl die Modifikation als auch die Abspaltung des Signalpeptides verhindert (Kawabe *et al.*, 2000). Weiterhin konnte auch mit *Cys-Scanning* Mutagenese die Lokalisation der Position T60 von AcrA im Periplasma bestätigt werden (Kawabe *et al.*, 2000).

Nachdem ausführlich diskutiert worden ist, daß Proteine der MFP-Familie abgesehen von der N-terminalen Domäne, die für die Verankerung in der Cytoplasmamembran verantwortlich aber für die Funktion nicht notwendig ist, im Periplasma lokalisiert sind, stellt sich nun die Frage, ob weitere charakteristische Elemente der Sekundärstruktur vorhanden sind, die möglicherweise für die Funktion von MFP-Proteinen wie CzcB von Bedeutung sind. Schon bei der Untersuchung der Membran-Topologie von HlyD fiel Schülein *et al.* (1992) auf, daß für die periplasmatisch lokalisierte Domäne des Proteins ausgedehnte Bereiche mit Tendenz zur Ausbildung von α -Helices als Sekundärstruktur vorhergesagt wurden. Besonders ausgeprägt war diese Tendenz in der zentralen Region des Proteins, für die es, wie erwähnt, schwierig war, überhaupt Fusionsproteine zu erhalten (Schülein *et al.*, 1992). Wie sich herausstellte, ist diese zentrale, α -helikale Region, für die der Algorithmus von Lupas *et al.* (1991) *coiled coil*-Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagt, ein wichtiges Merkmal von MFP-Proteinen (Dinh *et al.*, 1994; Pimenta *et al.*, 1996; Johnson & Church, 1999). Die typische *coiled coil*-Struktur der MFP besteht aus zwei Abschnitten ähnlicher Länge, die durch eine kurze Lücke von wenigen Aminosäureresten voneinander getrennt sind (Johnson & Church, 1999). Die Länge der *coiled coil*-Region kann bei den einzelnen Vertretern allerdings ganz unterschiedlich sein. Während scheinbar am Export von Proteinen beteiligte MFP wie HlyD eine längere *coiled coil*-Region von ca. 200 Aminosäureresten ausprägen, ist sie bei anderen MFP wie MexA und AcrA mit ca. 70 Aminosäureresten deutlich kürzer (Neuwald *et al.*, 1997; Johnson & Church, 1999).

Begrenzt wird die zentrale Region am N- und C-terminalen Ende durch je eine Kopie (M_N und M_C) eines von vier β -Faltblättern geprägten Motivs, das sowohl Homologie zu Lipoyl-Domänen von α -Ketocarbonsäure-Dehydrogenasen wie der Pyruvat-Dehydrogenase aufweist (Berg & de Kok, 1997) als auch zu Biotinyl-Domänen von Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteinen der Acetyl-CoA Carboxylasen homolog ist (Neuwald *et al.*, 1997; Johnson & Church, 1999). Alle untersuchten Lipoyl- und Biotinyl-Domänen bestehen aus zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Kopien des Strukturmotivs und sind in ähnlicher Art und Weise gefaltet (Berg & de Kok, 1997; Johnson & Church, 1999). Sie bilden eine als *flattened β -barrel* bezeichnete Tertiärstruktur (Green *et al.*, 1995). Bei den MFPs fehlt allerdings der für die Bindung des Cofaktors verantwortliche, konservierte Lys-Rest und wird durch eine eingeschobene Protein-Domäne, die *coiled coil*-Region, ersetzt (Neuwald *et al.*, 1997; Johnson & Church, 1999).

Sind diese allgemeinen Vorhersagen speziell für die Sekundärstruktur von CzcB nachvollziehbar? Die ungefähre Lage der Struktur motive in CzcB ist wie folgt: An die erste Kopie des Strukturmotivs (M_N), die sich beginnend mit Position V224 bis Position S254 erstreckt (Neuwald *et al.*, 1997), schließt sich unmittelbar der erste Abschnitt der *coiled coil*-Region an, der von Position L257 bis L284 zu reichen scheint (*Coils* Vers. 2.2; Lupas, 1996). Nach einer Lücke von drei Aminosäureresten erstreckt sich dann der zweite Abschnitt der *coiled coil*-Region von Position K288 bis S322 (*Coils* Vers. 2.2; Lupas, 1996). Abschließend folgt die zweite Kopie des Motivs (M_C), die mit Position A327 beginnt und mit S362 endet (Neuwald *et al.*, 1997).

Welche Aufgabe könnte nun aber eine solche Sekundärstruktur der MFPs erfüllen? Für Neuwald *et al.* (1997) sind die Parallelen zwischen der Funktion von MFP-Proteinen in den Efflux-Komplexen und der Funktion der Lipoyl- bzw. Biotinyl-Domänen in Multienzym-Komplexen offensichtlich. Die *coiled coil*-Region von MFPs fungiert demnach als flexibler Arm beim Transfer des Substrates vom Transporter in der Cytoplasmamembran zum OMF-Protein (Neuwald *et al.*, 1997). Dies wird sowohl von Johnson & Church (1999) als auch Zgurskaya & Nikaido (1999a) stark bezweifelt, da in der *coiled coil*-Region keine Substratbindungsstelle liegt, die für eine solche Funktion erforderlich wäre. Außerdem ist selbst für die Kopplung der aktiven Zentren in α -Ketocarbonsäure-Dehydrogenasen ein flexibler Arm als Mechanismus nicht ausreichend (Berg & de Kok, 1997).

Das von Neuwald *et al.* (1997) vorausgesetzte antiparallele Faltungsmodell, also die Ausbildung einer intramolekularen α -helikalen Haarnadelstruktur durch die *coiled coil*-Region und eines *flattened β -barrel* aus den homologen Motiven M_N und M_C , ist für Johnson & Church (1999) aber schon die wahrscheinlichste Variante der Tertiärstruktur, obwohl auch alternative, intermolekulare Modelle diskutiert werden (Abb. 28). Zgurskaya & Nikaido (1999a) betrachten die kompakte Struktur, die aus diesem Modell resultieren würde, als unvereinbar mit ihren Daten, die auf eine sehr asymmetrische, gestreckte Gestalt des in

Lösung monomeren AcrA hindeuten, für die sie die *coiled coil*-Region verantwortlich machen. Dieser offene Widerspruch könnte damit erklärt werden, daß sowohl die kompakte als auch die gestreckte Gestalt von den MFP angenommen werden kann und daß genau dieser Wechsel zwischen beiden Konformationen für ihre Funktion in den Efflux-Komplexen relevant ist (Johnson & Church, 1999; Zgurskaya & Nikaido, 2000a). Dieser Mechanismus würde auch dem von Pimenta *et al.* (1996) für HlyD diskutierten Modell einer Sprungfeder entgegenkommen. Die Dissoziation des *flattened β -barrel*, bestehend aus den Motiven M_N und M_C , wäre aufgrund des teilweise vorhandenen α -helikalen Charakters der Motive möglich (Johnson & Church, 1999).



Abb. 28: Modell für eine mögliche Tertiärstruktur der zentralen Region von CzcB

Dargestellt ist eine intramolekulare, α -helikale Haarnadelstruktur, die von den beiden Abschnitten (der *coiled coil*-Region gebildet wird, und ein *flattened β -barrel*, bestehend aus den homologen Motiven M_N und M_C (antiparalleles Faltungsmodell). Es handelt sich um einen Ausschnitt aus Abb. 6 von Johnson & Church (1999).

Auf jeden Fall scheint sicher zu sein, daß AcrA als prominenter Vertreter der MFP-Familie entweder eine Fusion von Membranen bewirken oder alternativ eine enge Verbrückung derselben vermitteln kann (Zgurskaya & Nikaido, 1999b; Zgurskaya & Nikaido, 2000a). Letztlich wird die Aufklärung der räumlichen Struktur eines MFP zeigen, ob die Modelle zur Tertiärstruktur zutreffen oder nicht.

6. Der RND-Transporter CzcA - zentrale Komponente im CzcCBA-Efflux-System

Die topologische Charakterisierung des polytopischen RND-Transporters CzcA, der in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und die Hauptkomponente des Czc-Efflux-Komplexes bildet, stellt den zentralen Bestandteil der vorliegenden Arbeit dar.

Für die Untersuchung von insgesamt 25 Positionen in CzcA, bis auf A1063 jeweils Arg- bzw. Lys-Reste, kamen im wesentlichen die *'phoA*-Vektoren pECD623 (Set 2) und pECD637 (Set 3) zum Einsatz. Ein Abgleich der beiden Meßsysteme erfolgte einerseits durch Vergleich der spezifischen PhoA-Aktivitäten und des Expressionsniveaus von völlig identischen CzcA'-PhoA-Fusionsproteinen, die aber von den unterschiedlichen Vektoren kodiert wurden. Gewählt wurden dafür Fusionen, die sich von den Positionen R366 bzw. K390 in CzcA

ableiten. Andererseits wurde Expression und Stabilität aller CzcA'-PhoA-Hybridproteine per Westernblot analysiert. Zwei Fusionen, CzcA334-'LacZ und CzcA1063-'LacZ, wurden von Derivaten des 'lacZ-Vektors pECD499 kodiert. Die Expression der CzcA-Hybridproteine erfolgte ohne Anwesenheit anderer Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes. Wie Franke *et al.* (1999) feststellten, hat die gleichzeitige Expression des zugehörigen MFP LcnD keinen Einfluß auf die Topologie von LcnC, dem ABC-Transporter aus *L. lactis*.

Von MexB, dem RND-Protein des MexAB-OprM-Komplexes aus *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993), wurde ebenfalls die Membran-Topologie analysiert (Guan *et al.*, 1999). Mit insgesamt 26 MexB'-PhoA-Hybridproteinen, die durch verschiedene Methoden erhalten wurden, gelang es, ein Modell der Topologie zu verifizieren. Auch hier kam TnTAP (Ehrmann *et al.*, 1997) zum Einsatz, allerdings nur zur Erzeugung von C-terminal verkürzten Fusionsproteinen. Mit mehreren *In vitro*-Methoden wurden außerdem Derivate des Plasmids pBAD*phoA* konstruiert, die eine zweite Serie von MexB'-PhoA-Fusionsproteinen kodierten (Guan *et al.*, 1999). Diese methodische Vielfalt scheint hier aber zumindest nicht förderlich, wenn nicht sogar problematisch zu sein, da z. B. mit zwei verschiedenen Promotoren, mehreren *Linker*-Regionen sowie der nativen als auch einer anderen RBS gearbeitet wurde. Wie im Zusammenhang mit den vorgestellten Plasmid-Sets und den Kontrollfusionen diskutiert, können diese Faktoren starken Einfluß auf das Ergebnis haben und sollten möglichst unverändert bleiben. Auch über den Westernblot können die Systeme nur teilweise abgeglichen werden, da bei einigen Fusionen nur Membranen der exprimierenden Zellen und bei anderen die Rohextrakte der Zellen im SDS-PAA-Gel aufgetrennt wurden (Guan *et al.*, 1999). Erstere Variante verhindert zudem die Detektion von eventuell vorhandener, abgespaltener PhoA-Domäne, die im Periplasma sehr aktiv sein kann (van Geest & Lolkema, 2000).

Eine ebenfalls recht aktuelle Untersuchung der Topologie eines RND-Transporters liegt für MexD, zentrale Komponente des MexCD-OprJ-Komplexes vor (Poole *et al.*, 1996), der ein weiteres Efflux-System aus *P. aeruginosa* bildet, das multiple Antibiotika-Resistenz vermittelt (Gotoh *et al.*, 1999). Von 26 Positionen in MexD wurden 25 MexD'-PhoA- und 18 MexD'-BlaM-Hybridproteine abgeleitet, deren Gene mit Hilfe von PCR-Fragmenten des *mexD*-Gens und zwei Fusionsvektoren generiert wurden und von denen nur die PhoA-Fusionsproteine mit Antikörpern gegen das Reporterprotein nachgewiesen wurden. Für diesen Nachweis wurden ebenfalls die Membranen von Zellen eingesetzt, die die Fusionsproteine exprimierten (Gotoh *et al.*, 1999).

Das RND-Protein AcrB wurde zwar bisher nicht gezielt topologisch charakterisiert, aber im Zuge verschiedener Untersuchungen wurden auch topologische Daten beschrieben (Ma *et al.*, 1993; Ulbrandt *et al.*, 1997). Die hohe Aktivität der mittels Tn*phoA* (Manoil & Beckwith, 1985) erzeugten Fusion AcrB101-'PhoA war Hinweis auf periplasmatische Lokalisation der Fusionsposition (Ma *et al.*, 1993). Auch AcrB576-'PhoA hatte bei korrekter Insertion in die

innere Membran eine periplasmatisch lokalisierte PhoA-Domäne (Ulbrandt *et al.*, 1997). Mit diesen beiden Fusionen wurde erstmals eine periplasmatische Lage der beiden großen hydrophilen Domänen der RND-Proteine (Saier *et al.*, 1994) verifiziert.

Wie die Analysen von Tseng *et al.* (1999) zeigten, ist die RND-Proteinfamilie eine evolutionär alte, ubiquitär verbreitete Superfamilie von Proteinen, die neben den bis dahin bekannten Vertretern noch weitaus mehr Proteine umfaßt. Als neue Subfamilie wurden die SecDF-Proteine charakterisiert, die an der Translokation von Präproteinen beteiligt sind und als Besonderheit meist aus zwei getrennten Polypeptiden bestehen (Tseng *et al.*, 1999). Eine Ausnahme bildet in dieser Hinsicht das SecDF-Protein von *B. subtilis*, bei dem beide Teile zu einem Protein fusioniert sind (Bolhuis *et al.*, 1998). Für die Proteine SecD und SecF aus *E. coli* konnte Gardel *et al.* (1990) durch Konstruktion der aktiven Fusionen SecD45-'PhoA und SecF110-'PhoA mit *TnphoA* beweisen, daß die großen hydrophilen Domänen im Periplasma liegen. Eine detaillierte topologische Charakterisierung von SecD wurde von Pogliano & Beckwith (1994) ebenfalls mit *TnphoA* durchgeführt.

Es soll im folgenden versucht werden, die für CzcA an den verschiedenen Positionen erhaltenen Daten mit denen der anderen drei ausführlich untersuchten RND-Proteine MexB (Guan *et al.*, 1999), MexD (Gotoh *et al.*, 1999) und ferner SecD (Pogliano & Beckwith, 1994) in der entsprechenden Region zu diskutieren. Aus dieser Diskussion resultiert ein Modell der Membran-Topologie von CzcA (Abb. 29).

Das kleinste Fusionsprotein CzcA13-'PhoA, das nur die ersten hydrophilen Aminosäurereste am N-Terminus von CzcA enthält, ist kaum aktiv, aber im Westernblot nachweisbar (Tab. 9; Abb. 15a), auch wenn nur schwer zwischen Fusion und abgespaltener PhoA-Domäne zu unterscheiden ist. Auch MexB9-'PhoA und SecD13-'PhoA haben praktisch keine PhoA-Aktivität (Guan *et al.*, 1999; Pogliano & Beckwith, 1994). Die folgenden CzcA-'PhoA-Fusionen der Positionen R33, R64, K192, R334 und K345, die nach dem vorhergesagten TMS 1 liegen, haben hohe PhoA-Aktivitäten und werden sehr stark als stabile Hybridproteine exprimiert (Tab. 9; Abb. 15a). Das Fusionsprotein CzcA334-'LacZ ist im Verhältnis zur zugehörigen PhoA-Fusion kaum aktiv (Tab. 9). Die zehn MexB-'PhoA-Fusionen nach dem TMS 1 bis zur Position L349 in MexB sind aktiv, wenn auch in unterschiedlichem Maße, und im Westernblot erkennbar (Guan *et al.*, 1999). Fünf MexD-'PhoA- und vier MexD-'BlaM-Fusionsproteine mit Fusionspositionen in der gleichen Region sind ebenfalls aktiv und als Hybridprotein nachweisbar bzw. vermitteln Ampicillin-Resistenz (Gotoh *et al.*, 1999). Schließlich zeigen auch vier SecD-'PhoA-Fusionen, die in dieser hydrophilen Region der RND-Proteine fusioniert sind, hohe PhoA-Aktivität (Pogliano & Beckwith, 1994).

Mit dem Erreichen von Position R366 nach dem von den meisten Programmen vorhergesagten TMS 2 in CzcA (Abb. 14) bricht die Aktivität der entsprechenden Fusion CzcA366-'PhoA abrupt zusammen und es ist fast kein Fusionsprotein und keine abgespaltene PhoA-Domäne detektierbar, unabhängig vom exprimierenden System (Tab. 9; Abb. 15a).

Auch MexB366-'PhoA ist inaktiv, aber als Fusionsprotein nachweisbar (Guan *et al.*, 1999). Die Hybridproteine MexD361-'PhoA und MexD366-'PhoA sind ebenfalls inaktiv, die Existenz der Fusionen aber gut nachweisbar. Die Fusion MexD361-'BlaM vermittelt keine Ampicillin-Resistenz (Gotoh *et al.*, 1999).

Nach dem folgenden TMS 3 hat die von der nächsten Position K390 in CzcA abgeleitete PhoA-Fusion wieder hohe Aktivität und wird stark exprimiert, unabhängig vom exprimierenden Vektor. Neben dem Fusionsprotein kann aber auch freie PhoA-Domäne detektiert werden (Tab. 9; Abb. 15a). MexB392-'PhoA hat ebenfalls enzymatische Aktivität, ist aber als Fusion kaum erkennbar (Guan *et al.*, 1999). Von der entsprechenden Fusionsposition in MexD V392 wurden wieder sowohl PhoA- als auch BlaM-Fusion gebildet, die beide enzymatisch aktiv sind. Die Existenz von MexD392-'PhoA ist deutlich erkennbar (Gotoh *et al.*, 1999). Auch das Hybridprotein SecD502-'PhoA ist hochaktiv (Pogliano & Beckwith, 1994).

Die beiden nächsten Positionen R419 und R449 von CzcA liegen in einer wahrscheinlich sowohl für den „Protonentransport“ (Nies & Silver, 1995) als auch für die primäre Bindung der Schwermetall-Kationen interessanten Region (Juhnke, 1997; Goldberg, 1999; Goldberg *et al.*, 1999), die schon im putativen TMS 4 beginnt und sich in den nachfolgenden hydrophilen Teil des Proteins erstreckt. Allerdings unterscheiden sich die beiden Fusionen CzcA419-'PhoA und CzcA449-'PhoA extrem in ihrer Aktivität. Während CzcA449-'PhoA inaktiv und kaum erkennbar ist, wird CzcA419-'PhoA stark als aktives und stabiles Hybridprotein exprimiert (Tab. 9; Abb. 15a). Aufgrund dieses Ergebnisses könnte vermutet werden, daß TMS 4 erst zwischen R419 und R449 in CzcA gebildet wird, eine Variante, die sehr unwahrscheinlich ist, da alle elf genutzten Programme für die hydrophile Region kein TMS vorhersagen (Abb. 14). Es ist eher anzunehmen, daß der kurze Abschnitt nach TMS 4 in CzcA419-'PhoA aufgrund des Fehlens wichtiger topologischer Signale wie Arg- und Lys-Resten nicht ausreicht, die PhoA-Domäne des Fusionsproteins im Cytoplasma zu verankern (Boyd & Beckwith, 1989; von Heijne, 1989; van Geest & Lolkema, 2000). Die Fusionsproteine MexB411-'PhoA und MexB440-'PhoA weisen keine Aktivität auf und nur MexB411-'PhoA ist im Westernblot sichtbar (Guan *et al.*, 1999). MexD424-'PhoA, -'BlaM und MexD437-'PhoA sind ebenfalls nicht enzymatisch aktiv, die PhoA-Fusionsproteine nur äußerst schlecht detektierbar (Gotoh *et al.*, 1999). Auch die Fusionen SecD538-'PhoA und SecD561-'PhoA sind ohne relevante Aktivität (Pogliano & Beckwith, 1994).

Die von Position K475 nach dem TMS 5 in CzcA abgeleitete, inaktive Fusion CzcA475-'PhoA ist kaum im Westernblot erkennbar (Tab. 9; Abb. 15a). Vielleicht verhindert hier die Konstellation aus K475 im Zusammenwirken mit dem Arg-Rest der *Linker*-Region eine periplasmatische Lokalisation der PhoA-Domäne. Sowohl die Hybridproteine MexB459-'PhoA und MexB473-'PhoA als auch MexD472-'PhoA werden als aktive Fusionen exprimiert (Guan *et al.*, 1999; Gotoh *et al.*, 1999). SecD588-'PhoA zeigt ebenfalls hohe

spezifische Aktivität (Pogliano & Beckwith, 1994). Diese Daten deuten eine periplasmatische Lokalisation von K475 in CzcA an, auch wenn mit CzcA475-'PhoA dies nicht bewiesen werden kann.

Die folgenden Hybridproteine CzcA510-'PhoA und CzcA532-'PhoA mit Fusionspositionen nach dem TMS 6 in CzcA haben die erwartete niedrige PhoA-Aktivität und sind als Fusionen nachweisbar (Tab. 9; Abb. 15a). Auch die Fusion MexB538-'PhoA hat nur geringe Aktivität und ist erkennbar (Guan *et al.*, 1999). Von MexD wurden in dieser Region drei MexD-'PhoA-Fusionen und ein MexD-'BlaM-Hybridprotein konstruiert, die alle keine Aktivität zeigen. Die PhoA-Fusionen sind zum Teil kaum nachweisbar (Gotoh *et al.*, 1999).

Die folgenden vier nach dem TMS 7 in der zweiten großen hydrophilen Domäne von CzcA gelegenen Fusionspositionen, R557, R673, R830 und R880, führen bei Fusionierung mit der PhoA-Reporterdomäne zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während CzcA557-'PhoA kaum aktiv, aber im Westernblot erkennbar ist, zeigen die anderen drei Fusionen zum Teil sehr hohe Aktivität und sind als Fusionsproteine deutlich erkennbar. Im Fall der von allen Fusionen aktivsten Fusion CzcA830-'PhoA ist neben dem stark exprimierten Fusionsprotein ein großer Anteil abgespaltener und stabiler Reporterdomäne vorhanden (Tab. 9; Abb. 15a und b). Da die drei längeren Fusionsproteine eindeutig auf periplasmatische Lage hindeuten und mit ziemlicher Sicherheit kein Wechsel des Kompartimentes zwischen Position R557 und R673 erfolgt, kann zur Begründung des Verhaltens von CzcA557-'PhoA nur ähnlich wie schon bei CzcA475-'PhoA argumentiert werden. Die drei MexB-'PhoA-Fusionen mit Fusionspositionen in der korrespondierenden Region von MexB sind aktiv und werden stark exprimiert (Guan *et al.*, 1999). Die entsprechenden fünf MexD-'PhoA- und vier MexD-'BlaM-Hybridproteine sind ebenfalls enzymatisch aktiv und die PhoA-Fusionen im Westernblot erkennbar (Gotoh *et al.*, 1999).

Die nach TMS 8, dem TMS mit der höchsten Hydrophobizität von CzcA, gelegene Position K904 zeigt bei Fusionierung mit der PhoA-Domäne ein Verhalten, das abermals einer Interpretation bedarf. Die hohe Aktivität und das deutlich sichtbare Fusionsprotein inklusive abgespaltener und stabiler PhoA-Domäne deuten auf Lage des Reporters im Periplasma hin (Tab. 9; Abb. 15b; van Geest & Lolkema, 2000). Zur Erklärung muß das Fehlen positiv geladener Aminosäurereste, wie schon für CzcA419-'PhoA diskutiert, herangezogen werden (Boyd & Beckwith, 1989). Alternativ könnte auch ein insgesamt schwaches für cytoplasmatische Lokalisation der sehr kurzen hydrophilen Domäne im nativen CzcA-Protein ausreichendes topogenes Signal diskutiert werden, daß aber die effiziente Verankerung der Reporterdomäne im Cytoplasma nicht bewirken kann. Die Fusion MexB897-'PhoA hat die für cytoplasmatisch lokalisierte PhoA-Domänen der Fusionsproteine typische geringe Aktivität. Im Westernblot ist ein Signal sichtbar, das spezifisch für die Fusion ist, aber aufgrund seiner Lage eher einem Aggregat entspricht oder mit ungewöhnlichem Laufverhalten der Fusion im SDS-PAA-Gel zu begründen ist (Guan *et al.*, 1999). Signale dieser Art sind

teilweise auch bei den langen CzcA'-PhoA-Fusionen (Abb. 15b) und bei mehreren MexD'-PhoA-Fusionen zu finden (Gotoh *et al.*, 1999). Bei den Untersuchungen der drei Membranproteine konnten die Proben vor Auftragung auf die SDS-PAA-Gele nicht erhitzt werden, da sonst nur ein sehr unscharfes Signal, wie z. B. für CzcA in Abb. 18, sichtbar ist. Von der nach TMS 8 in MexD gelegenen Position W891 abgeleitete Fusionsproteine vermitteln weder Ampicillin-Resistenz (MexD891-'BlaM) noch haben sie PhoA-Aktivität (MexD891-'PhoA). MexD891-'PhoA ist aber im Westernblot nachweisbar (Gotoh *et al.*, 1999).

CzcA927-'PhoA, die nächste Fusion von CzcA, deren Fusionsposition dem TMS 9 folgt, zeigt wider Erwarten geringe PhoA-Aktivität und ist als Hybridprotein gut erkennbar (Tab. 9; Abb. 15b). Das Verhalten ähnelt sehr dem von CzcA475-'PhoA und CzcA557-'PhoA, so daß die dort angeführten Gründe auch hier gelten mögen. Sowohl die korrespondierende Fusion MexB921-'PhoA als auch die Fusionen MexD920-'PhoA und MexD920-'BlaM sind aktiv, die PhoA-Fusionen sind im Blot erkennbar (Guan *et al.*, 1999; Gotoh *et al.*, 1999).

Mit CzcA958-'PhoA und CzcA980-'PhoA kann die cytoplasmatische Lokalisation der hydrophilen Domäne nach TMS 10 bewiesen werden, da die Hybridproteine kaum aktiv sind und neben einem Signal, das von ungewöhnlichem Laufverhalten zeugt, auch Fusionen erwarteter Größe erkennbar sind (Tab. 9; Abb. 15b). Die Fusion MexB972-'PhoA zeigt ebenfalls kaum PhoA-Aktivität und ausschließlich das beschriebene Laufverhalten (Guan *et al.*, 1999). Auch die Fusionsproteine MexD957-'PhoA, MexD968-'PhoA und MexD957-'BlaM sind, wie erwartet, inaktiv. Das längere der beiden PhoA-Fusionsproteine ist deutlich schlechter im Westernblot erkennbar als das kürzere (Gotoh *et al.*, 1999).

Bei Fusion der nach dem TMS 11 von CzcA gelegenen Position R1008 mit der PhoA-Reporterdomäne entsteht die äußerst instabile Fusion CzcA1008-'PhoA. Da aber die in großer Menge vorhandene, abgespaltene PhoA-Domäne stabil und aktiv ist, kann von einer periplasmatischen Lage der Region zwischen den TMS 11 und 12 ausgegangen werden (Tab. 9; Abb. 15b; van Geest & Lolkema, 2000). Die entsprechende Fusion von MexB, MexB1007-'PhoA, wird als stabiles Hybridprotein exprimiert und hat PhoA-Aktivität (Guan *et al.*, 1999). Genauso verhält es sich mit MexD998-'PhoA, außerdem kann die zugehörige BlaM-Fusion Ampicillin-Resistenz vermitteln (Gotoh *et al.*, 1999).

Nach dem letzten TMS von CzcA, dem TMS 12, ergibt sich ein eindeutiges Bild: Alle drei gebildeten PhoA-Fusionen haben kaum Aktivität und sowohl Fusionen erwarteter Größe als auch im SDS-PAA-Gel ungewöhnlich laufende sind erkennbar (Tab. 9; Abb. 15b). Die im Verhältnis zur PhoA-Aktivität von CzcA1063-'PhoA hohe LacZ-Aktivität von CzcA1063-'LacZ ist zusätzlicher Hinweis für die cytoplasmatische Lokalisation des C-Terminus von CzcA (Tab. 9). Die C-terminalen Fusionen von MexB und MexD, MexB1046-'PhoA bzw. MexD1043-'BlaM, sind beide nicht aktiv, MexB1046-'PhoA zeigt ausschließlich das ungewöhnliche Laufverhalten (Guan *et al.*, 1999; Gotoh *et al.*, 1999).

Die wichtigsten Erkenntnisse zur Membran-Topologie von CzcA sollen noch einmal kurz zusammengefaßt werden: Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus des Proteins sind auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert. Die beiden großen hydrophilen Domänen von CzcA liegen im Periplasma und bilden die großen periplasmatischen Domänen I und II. Die hydrophile Domäne zwischen TMS 4 und 5 ist im Cytoplasma lokalisiert und kann demzufolge für die primäre Bindung der Schwermetall-Kationen verantwortlich sein. Die Wiederholung der Topologie der N-terminalen Hälfte im C-terminalen Teil des Proteins ist eine Bestätigung für die Hypothese der tandemartigen, intragenischen Duplikation von zwei 6 TMS-Segmenten (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999). In den beiden großen hydrophoben Regionen des Proteins ist eine detaillierte Auflösung nur begrenzt gelungen.

Es wird ein auf den experimentell ermittelten Daten und der Vorhersage von *SOAP* (Kyte & Doolittle, 1982; Klein *et al.*, 1985) beruhendes, zweidimensionales Modell der topologischen Organisation von CzcA mit zwölf TMS vorgeschlagen (Abb. 29). Die statistische Verteilung der positiv geladenen Aminosäurereste, darunter Arg- und Lys-Reste als starke topogene Determinanten, auf die Kompartimente zeigt, daß dieses Modell mit der *positive-inside* Regel (von Heijne, 1986) übereinstimmt (Tab. 13).

Am auffälligsten ist jedoch die Asymmetrie in der Verteilung der His-Reste, die zwar weniger Topologie bestimmend aber funktionell dafür um so interessanter sind. Auf die Gesamtzahl der Aminosäurereste in den Kompartimenten bezogen, sind im Cytoplasma 14x so viele His-Reste wie im Periplasma lokalisiert (Tab. 13). Zumindest für H439 im putativen Metallbindemotiv C417-x₅-H423-x₃-H427-H428-x₉-F-H439 zwischen TMS 4 und 5 konnte essentielle Bedeutung für die Ausprägung der Resistenz gegenüber toxischen Konzentrationen von Co²⁺-, Zn²⁺- und Cd²⁺-Ionen nachgewiesen werden (Juhnke, 1997).

Tab. 13: Statistische Verteilung positiv geladener Aminosäurereste von CzcA auf die Kompartimente

Protein	Kompartiment	Zahl der Aminosäurereste			Anteil (in %)	
		basisch	davon His	Gesamt	basisch	His
CzcA (MexD)	Periplasma	80 (61)	2	691 (666)	11.6 (9.2)	0.3
	Membran	0 (4)	0	204 (247)	0 (1.6)	0
	Cytoplasma	35 (24)	7	168 (130)	20.8 (18.5)	4.2

Die statistischen Angaben von CzcA beruhen auf dem in Abb. 29 dargestellten Modell der Membran-Topologie des Proteins. Zum Vergleich sind in Klammern Daten zur Verteilung der AS-Reste in MexD angegeben (Gotoh *et al.*, 1999).

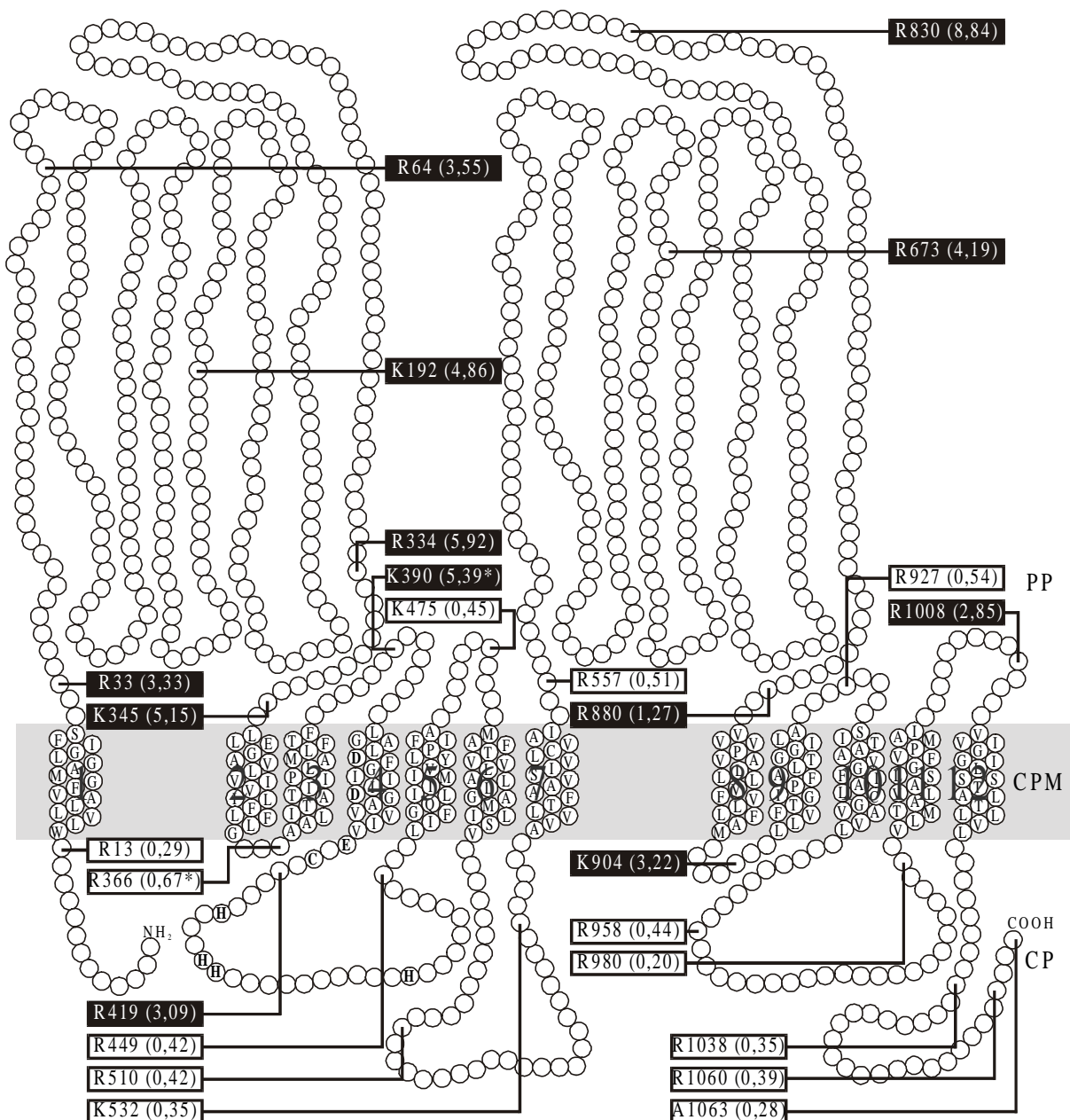


Abb. 29: Zweidimensionales Modell der Membran-Topologie des CzcA-Proteins

Die AS-Sequenz von CzcA wird durch Kreise symbolisiert, in transmembranen Regionen sind diese mit dem Einbuchstaben-Code der einzelnen AS-Reste versehen. Die transmembranen α -Helices, die die Cytoplasmamembran (CPM) durchspannen, sind nummeriert (TMS 1-12). Das möglicherweise als Ladungsrelais-System für den „Protonentransport“ fungierende „DDE“-Motiv und die AS-Reste der putativen Bindungsregion der Schwermetall-Kationen sind hervorgehoben (**fett**). AS-Reste, die mit Alkalischer Phosphatase-Domäne fusioniert wurden (Fusionspositionen), sind mit Rechtecken verbunden, die den Ein-Buchstaben-Code des Restes sowie seine Lage in der Primärsequenz von CzcA wiedergeben. Die in Klammern gesetzten Zahlenwerte entsprechen den spez. Aktivitäten der entsprechenden CzcA'-PhoA-Fusionen (Tab. 9) in U/mg Trockengewicht (TG; 1 U = 1 nmol/min). Mit Stern (*) gekennzeichnete Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel aus den beiden in Tab. 9 angegebenen spez. Aktivitäten für PhoA-Fusionen an dieser Position. Die vorgenommene Klassifizierung der Aktivitäten wird durch die Farbe des Rechtecks verdeutlicht, wobei **schwarz** hohe Aktivität und **weiß** geringe Aktivität andeutet. In der Regel liegen Positionen mit **schwarzen** Rechtecken im Periplasma (PP) und Positionen mit **weißen** Rechtecken im Cytoplasma (CP).

Bei der Betrachtung des Modells (Abb. 29) fällt außerdem auf, daß in fünf TMS (TMS 3, 5, 8, 9 und 11) Pro-Reste enthalten sind. Diese in den α -Helices globulärer Proteine äußerst selten anzutreffenden und als „Helixbrecher“ bekannten Aminosäurereste (Chou & Fasman, 1978) werden in transmembranen α -Helices offensichtlich häufiger toleriert (von Heijne, 1991). Durch den „Prolin-Knick“ resultieren gebogene α -Helices, denen gegebenenfalls strukturelle oder auch funktionelle Bedeutung zukommen kann (von Heijne, 1991). Die auch in transmembranen α -Helices festgestellte Struktur brechende Eigenschaft von Pro-Resten wird nur wirksam, wenn das TMS länger als 13 Aminosäurereste ist und der Pro-Rest in der Nähe der Enden positioniert ist (Nilsson, *et al.*, 1998). Ob die von Tseng *et al.* (1999) identifizierten, putativen amphipathischen α -Helices, die einigen TMS in RND-Proteinen scheinbar unmittelbar vorgeschaltet sind, eine Funktion als topologische Signale im Sinne von Kimbrough & Manoil (1994) haben, bleibt abzuwarten.

Über den schon viel diskutierten Funktionsmechanismus von RND-Transportern wie CzcA ist erst wenig bekannt. CzcA bewirkt bei Expression ohne die Komponenten CzcB und CzcC im sensitiven Stamm *R. metallidurans* AE104 nur eine geringfügig gesteigerte Resistenz gegenüber den Schwermetall-Kationen (Rensing *et al.*, 1997a). Mit in Proteoliposomen rekonstituiertem CzcA kann *In vitro* ein von CzcA abhängiger Kationen/Protonen-Antiport, der zur erhöhten Akkumulation der Schwermetall-Kationen in den Liposomen führt, gemessen werden (Goldberg, 1999; Goldberg *et al.*, 1999). Das schon lange für CzcA favorisierte Funktionsmodell einer Zwei-Kanal-Pumpe, das davon ausgeht, daß der erste Kanal mit dem möglicherweise als Ladungsrelais-System fungierenden „DDE“-Motiv von TMS 4 für den „Protonentransport“ verantwortlich ist, während der zweite Kanal, der von den sechs TMS der C-terminalen Hälfte von CzcA gebildet wird, der Kationen-Kanal ist (Nies, 1992a; Nies & Silver, 1995; Goldberg, 1999; Goldberg *et al.*, 1999), scheint plausibel, obwohl Beweise dafür fehlen und die Lage der putativen primären Metallbindestelle nach TMS 4 eher dagegen spricht. Anstelle zwei distinkter Kanäle ist genauso ein aus allen zwölf TMS bestehender Kanal mit unterschiedlich spezialisierten Regionen vorstellbar.

Auch für den RND-Transporter AcrB konnte die Funktion als Protonen-Antiporter nach Rekonstitution in Proteoliposomen gezeigt werden (Zgurskaya & Nikaido, 1999b). RND-Proteine wie AcrB und MexB, die ein breites Spektrum sehr hydrophober Substrate ungeladener oder geladener Natur transportieren können, tragen ebenfalls ein „DDE“-Motiv im TMS 4, jedoch liegen in diesem die Asp-Reste im Unterschied zu CzcA direkt hintereinander (Goldberg *et al.*, 1999; Tseng *et al.*, 1999; Zgurskaya & Nikaido, 2000a). Aufgrund der sehr verschiedenen Substratspezies wird aber angenommen, daß der von AcrB und MexB vermittelte Efflux über einen anderen Mechanismus als bei CzcA erfolgen muß (Goldberg *et al.*, 1999; Zgurskaya & Nikaido, 2000a). Interessanterweise wird dabei auch eine Substratbindung direkt in der Lipid-Phase der Membran oder an der dem Periplasma zugewandten Seite diskutiert (Nikaido, 1998; Zgurskaya & Nikaido, 2000a).

7. Der CzcCBA-Membranprotein-Komplex - ein Drei-Komponenten-Efflux-System

Auch wenn schon frühere Untersuchungen einen von den Komponenten CzcA, CzcB und CzcC gebildeten Efflux-Komplex indizierten (Nies *et al.*, 1989; Rensing *et al.*, 1997a), waren diese Hinweise nur indirekter Natur und der Nachweis für die Existenz eines Membranprotein-Komplexes stand noch aus. Da ein solcher Komplex auf physischen Interaktionen der einzelnen Untereinheiten beruht, wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, diese nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurde das *Sos Recruitment*-System (SRS) verwendet, ein alternatives *Yeast Two-Hybrid*-System (Aronheim & Karin, 2000; Frederickson, 1998), bei dem die Hybridproteine nicht im Zellkern der Hefe wechselwirken müssen und mit dem deshalb theoretisch auch Membranproteine charakterisiert werden können (Stagljar *et al.*, 1998). Allerdings gilt dies nur mit Einschränkungen, denn lediglich Interaktionen von cytoplasmatisch lokalisierten Loops der Membranproteine mit den cytoplasmatischen hSos-Fusionsproteinen sind nachweisbar. Interaktionen im Lumen des endoplasmatischen Reticulums sind mit dem System dagegen weder möglich noch detektierbar.

Auch andere für Membranproteine geeignete Systeme, die auf der Rekonstitution von nativem Ubiquitin aus N- und C-terminaler Hälfte (Stagljar *et al.*, 1998; Stagljär & te Heesen, 2000) bzw. der Komplementation der β -Galaktosidase basieren (Rossi *et al.*, 1997) und mit denen Interaktionen im Lumen des endoplasmatischen Reticulums nachweisbar sind, haben das Problem der notwendigen Detektion dieser Interaktionen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Aus diesen Gründen wurden nur die hydrophilen Domänen der Czc-Proteine in den Interaktionstests mit dem SRS eingesetzt. Dies führte wahrscheinlich dazu, daß ein für *Yeast Two-Hybrid*-Systeme beschriebenes Problem, real vorhandene Protein-Protein-Interaktionen in einigen Fällen nicht beweisen zu können, an Bedeutung gewann. Häufig sind kaum exprimierte, bei Expression in der Hefe toxische oder auch nicht korrekt gefaltete Interaktionspartner, die abgebaut werden, Ursachen dafür (Niethammer & Sheng, 1998; Frederickson, 1998). Das Faltungsproblem kann besonders bei normalerweise exportierten Proteinen bzw. Protein-Domänen und bei isoliert eingesetzten Loop-Domänen von Membranproteinen entscheidend sein. Der Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem *Yeast Two-Hybrid*-Ansatz kann aufgrund dieser kaum lösbarer Probleme unmöglich sein (Niethammer & Sheng, 1998; Frederickson, 1998). Für die Einordnung der negativen Tests mit den Czc-Protein-Domänen war die Überprüfung der Expression der Interaktionspartner wichtig, da sie zeigte, daß mangelhafte Expression und Instabilität der Hybridproteine Wechselwirkungen verhinderten. Als Schlußfolgerung läßt sich daraus ableiten, daß *Yeast Two-Hybrid*-Systeme zum Nachweis von Interaktionen in Membranprotein-Komplexen wie dem Czc-Efflux-Komplex weniger geeignet sind.

Mit einem anderen Ansatz, der *Blue Native* PAGE, die zur nativen Auftrennung von solubilisierten Membranprotein-Komplexen dient (Schägger & von Jagow, 1991), sollte die Zusammensetzung und ungefähre Größe des Czc-Efflux-Komplexes festgestellt werden. Es wurde deutlich, daß der putative Komplex ziemlich instabil zu sein scheint und wahrscheinlich beim Solubilisieren zerfällt, was die in hoher Konzentration vorliegenden Einzelkomponenten CzcA und CzcB erklären würde. Falls das schwache, für beide Proteine spezifische Signal von ca. 500-550 kDa kein Artefakt ist (Abb. 22), könnte es sich um einen Czc-Komplex handeln, über dessen genaue Zusammensetzung hier aber nicht spekuliert werden soll.

Mit *In vivo*-*Crosslinking*-Experimenten wurde versucht, den gesamten Czc-Efflux-Komplex oder mögliche Subkomplexe durch Verbrückung der Komponenten zu stabilisieren, so daß auch die Analyse mittels SDS-PAGE möglich war. Ein gut geeigneter *Crosslinker*, um unbekannte Wechselwirkungen näher einzugrenzen, ist das *in vivo* applizierbare und recht unspezifische Formaldehyd (Skare *et al.*, 1993). Ein für CzcB spezifischer Protein-Komplex von ca. 220 kDa Größe, der am besten mit 0.1 % (v/v) Formaldehyd verknüpft werden konnte, ist der einzige eindeutig nachweisbare Komplex, der aus diesen Versuchen resultierte (Abb. 23). Wahrscheinlich wurde die Verknüpfung dieses Komplexes durch eine Vielzahl von Formaldehyd-reaktiven Reste in entsprechender Lage begünstigt (Higgs *et al.*, 1998). Wie typische Formaldehyd-Verbrückungen war die Verknüpfung durch Erhitzen auflösbar (Abb. 24). Bemerkenswert ist außerdem, daß der CzcB-Komplex völlig unabhängig von anderen Komponenten, also auch bei alleiniger Expression von CzcB in *E. coli*, und ohne Zusatz von Substrat (Schwermetall-Kationen) ausgebildet wurde. Es scheint sich also, um einen stabilen und permanenten Subkomplex des Czc-Efflux-Systems zu handeln.

Wie setzt sich dieser CzcB-Komplex nun zusammen? Da es sich bei den nach Reinigung und Zerlegung des CzcB-*Strep-tag II*[®]-Komplexes zusätzlich auftretenden Proteinen, die kleiner als CzcB waren (Abb. 25), wahrscheinlich eher um Abbauprodukte von CzcB als um mit CzcB im Komplex interagierende *E. coli*-Proteine handelt (Legatzki *et al.*, 2001), kann von einem Homooligomer ausgegangen werden. Die Größe des CzcB-*Strep-tag II*[®]-Monomers kann mit ca. 63 kDa angegeben werden, die des homooligomeren Komplexes mit ca. 220 kDa. Unter Berücksichtigung eines ungewöhnlichen Laufverhaltens von verknüpften Proteinkomplexen im SDS-PAA-Gel, das durch ihre Form bzw. Gestalt hervorgerufen werden kann (Higgs *et al.*, 1998), könnte ein verminderte gelelektrophoretische Mobilität eines CzcB₃-Homotrimers erklärt werden. Ein Homotetramer ist zwar ebenfalls möglich, aber eher unwahrscheinlich, da z. B. auch das Monomer des MFP HlyD eine Größe von ca. 56 kDa hat, der homotrimere Komplex HlyD₃ allerdings scheinbar ca. 185-190 kDa groß ist (Thanabalu *et al.*, 1998). Eine noch höher geordnete Struktur von CzcB, die eventuell auf der CzcB₃-Einheit basieren könnte, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da oberhalb des Trimers immer ein weiteres schwaches Signal erkennbar war (Abb. 23 und 24). Die relativ geringe

Effizienz des *Crosslinks* im Zusammenwirken mit den für die Verbrückung notwendigen, multiplen *Crosslink*-Ereignissen macht allerdings Detektion und Analyse von Komplexen dieser Größenordnung sehr schwierig (Skare *et al.*, 1993).

Welche Erkenntnisse sind bei verwandten Efflux-Systemen zu Interaktionen von Untereinheiten und zum Membranprotein-Komplex selbst bekannt? Umfangreiche Daten liegen wieder für das in *E. coli* multiple Antibiotika-Resistenz vermittelnde AcrAB-TolC-System (Ma *et al.*, 1993; Fralick, 1996) vor. So ist ohne Zusatz von Substrat eine Co-Immunoprecipitation von AcrA zusammen mit AcrB möglich (Kawabe *et al.*, 2000). In *In vivo*-*Crosslinking*-Experimenten mit den *Crosslinkern* Disuccinimidylglutarat (DSG) und DSP, die ebenfalls nicht in Gegenwart von Transportsubstraten des Systems durchgeführt wurden, gelang es Zgurskaya & Nikaido (2000b), die Subkomplexe AcrA₂, AcrA₃, AcrA₂B und AcrA₃B nachzuweisen. Der zweifelsfreie Beweis, daß nur AcrA Bestandteil von AcrA₂ und AcrA₃ war, wurde nach Affinitätsreinigung der mit *His*₆-tag versehenen Protein-Komplexe in einer zweidimensionalen SDS-PAGE geführt. Es war aber unmöglich, einen Komplex zu identifizieren, an dem die OMF-Komponente TolC beteiligt war (Zgurskaya & Nikaido, 2000b). Bei der Suche nach Gründen dafür unterscheiden die Autoren triviale, wie ein unspezifischer Anti-TolC-AK, der problematische Transfer des Gesamtkomplexes auf eine PVDF-Membran oder für eine Verknüpfung fehlende reaktive Aminosäurereste in TolC, von weniger trivialen, wie eine reversible Rekrutierung von TolC durch eine vom Substrat induzierte Konformationsänderung von AcrAB (Zgurskaya & Nikaido, 2000b). Für das AcrAB-TolC-System bleibt also festzuhalten, daß die Oligomerisierung von AcrA unabhängig von AcrB verläuft und Voraussetzung für die Interaktion mit AcrB ist, welche wiederum zu der vom Substrat unabhängigen Bildung eines AcrA₃B-Präkomplexes in der Cytoplasmamembran führt (Zgurskaya & Nikaido, 2000b).

Eine Fülle von interessanten Ergebnissen liegt für das HlyBD-TolC-System (Wandersman & Delepelaire, 1990) vor, das für den ATP-getriebenen Hämolyisin-Export in *E. coli* verantwortlich ist. Durch ortsspezifische Mutagenese konnte gezeigt werden, daß eine TolC-homologe Region von HlyD mit TolC interagiert und der C-Terminus von HlyD den ABC-Transporter HlyB kontaktiert (Schüle *et al.*, 1994; Schlör *et al.*, 1997). Aus *In vivo*-*Crosslinking*-Experimenten mit DSP und DSG mit anschließender Affinitätsreinigung der Protein-Komplexe über mit *His*₆-tag versehene Komponenten konnten folgende Erkenntnisse abgeleitet werden: Das MFP HlyD bildet unabhängig von den anderen Komponenten und vom Proteinsubstrat HlyA Homotrimere (HlyD₃). Ebenfalls unabhängig vom Substrat und von TolC wird in der Cytoplasmamembran ein Präkomplex aus HlyB und HlyD gebildet. HlyB und HlyD können wiederum voneinander unabhängig das Proteinsubstrat binden. Ein Komplex mit TolC wird nur in Gegenwart des Präkomplexes aus HlyB und HlyD und des Substrates gebildet. Die Verbrückung dieses Komplexes ist reversibel, nach Export des Substrates erfolgt die Dissoziation in Präkomplex und TolC (Thanabalu *et al.*, 1998).

Auch das CvaAB-TolC-System, das den ATP-abhängigen Colicin V-Export in *E. coli* abwickelt, wurde mittels *In vivo-Crosslinking* mit Formaldehyd in Gegenwart von Colicin V charakterisiert (Hwang *et al.*, 1997). Aus einer Vielzahl möglicher Subkomplexe glauben die Autoren ein Homodimer des ABC-Transporters CvaB (CvaB₂), ein Homodimer des MFP CvaA (CvaA₂) und das Homotrimer des OMF TolC (TolC₃) herausfiltern zu können und plädieren für einen unabhängig vom Substrat gebildeten, permanenten Komplex, für den sie die Zusammensetzung CvaA₂B₂TolC₃ vorschlagen (Hwang *et al.*, 1997).

Im Widerspruch dazu stehen allerdings Daten zum Metalloproteasen sekretierenden PrtDEF-System aus *E. chrysanthemi* (Delepelaire, 1998), die mit Substrat-Affinitätschromatographie ohne kovalente Verknüpfung gewonnen wurden (Letoffe *et al.*, 1996). Zusammengefaßt lassen die Ergebnisse auf einen allein vom Proteinsubstrat induzierten und gesteuerten Zusammenbau des ABC-Transporter-Efflux-Komplexes schließen. Ein Präkomplex kann nicht identifiziert werden, allerdings wird eine Intensivierung der Wechselwirkungen zwischen locker assoziierten Untereinheiten durch das Substrat auch in Betracht gezogen (Letoffe *et al.*, 1996). Dies ist für Thanabalu *et al.* (1998) auch Erklärung dafür, warum der Präkomplex wahrscheinlich nur nach Stabilisierung mit *Crosslinkern* isoliert werden kann.

Von Letoffe *et al.* (1996) wurden auch Hybrid-Transport-Systeme verwendet, die sich aus ABC-Transporter-, MFP- und OMF-Komponenten verschiedener, eng verwandter Proteinexport-Systeme zusammensetzen. Diese kombinierten Systeme können Erkenntnisse über die für die Festlegung der Substratspezifität verantwortlichen Komponenten und notwendige spezifische Interaktionen zwischen den Untereinheiten im Komplex liefern.

Bei Untersuchungen mit dem multifunktionellen OMF TolC und den Komponenten des PrtDEF- und des HasDEF-Systems, das in *Serratia marcescens* das Häm-bindende Protein HasA ausschleust, zeigte sich, daß das Hybridsystem aus PrtD (ABC), HasE (MFP) und TolC (OMF) im Prinzip wie PrtDEF funktioniert (Binet & Wandersman, 1995). Aus ähnlichen Tests, die noch auf das Lipase sekretierende LipBCD-System aus *S. marcescens* (Akatsuka *et al.*, 1995) ausgedehnt wurden, ging hervor, daß das MFP PrtE nur mit dem zugehörigen OMF PrtF interagieren kann, während die MFPs HasE und LipC mit einem breiteren Spektrum von OMF-Proteinen funktionell wechselwirken können (Akatsuka *et al.*, 1997). Verallgemeinert zeigen diese Untersuchungen deutlich, daß die Substratspezifität der Proteinexport-Systeme zwar ausschließlich vom ABC-Transporter in der inneren Membran bestimmt wird, jedoch für einen erfolgreichen Export des Protein-Substrates auch funktionell kompatible Komponenten vorliegen müssen, d. h. spezifische Interaktionen zwischen ABC-Transporter und MFP sowie zwischen MFP und OMF sind für den Transportprozeß von essentieller Bedeutung (Binet & Wandersman, 1995; Akatsuka *et al.*, 1997).

Gibt es in dieser Hinsicht möglicherweise Unterschiede zwischen den ATP-getriebenen Proteinexport-Systemen vom Typ I und den *PMF*-getriebenen Efflux-Systemen mit einem RND-Transporter als zentrale Komponente? Zur Bildung von Hybrid-Transport-Systemen

wurde der RND-Transporter CnrA des CnrCBA-Efflux-Systems (Liesegang *et al.*, 1993), das in *R. metallidurans* CH34 Resistenz gegen Co^{2+} und Ni^{2+} vermittelt, mit den MFP und OMF der drei eng verwandten Efflux-Systeme für Schwermetall-Kationen NccCBA aus *Achromobacter xylosoxidans* 31A (Schmidt & Schlegel, 1994), CzcCBA und CnrCBA kombiniert (Grass, 2000; Legatzki *et al.*, 2001). Weder das MFP CnrB allein noch die komplette funktionelle Einheit aus CnrB und dem OMF CnrC kann ausgetauscht werden, nur die OMF-Komponenten CzcC und NccC können CnrC im CnrCBA-Komplex funktionell ersetzen. Eine mögliche Änderung des Substratspektrums der CnrA-Hybrid-Efflux-Systeme hin zu Zn^{2+} - bzw. Cd^{2+} -Ionen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da bei keiner Kombination eine Erhöhung der MIC dieser Schwermetall-Kationen festzustellen war (Grass, 2000; Legatzki *et al.*, 2001). Etwas problematisch scheint aber, daß aufgrund der fehlenden translationalen Kopplung der rekonstituierte CnrCBA-Komplex mit *in trans* zu *cnrA* kodierten CnrC und CnrB nicht annähernd das Resistenzniveau des koordiniert exprimierten Komplexes vermitteln kann (Grass, 2000; Legatzki *et al.*, 2001).

Interessant sind auch Experimente, die mit den verschiedenen Antibiotika-transportierenden Systemen von *P. aeruginosa* MexAB-OprM MexCD-OprJ und MexEF-OprN durchgeführt wurden. Beispielsweise hat das aktive, chimäre System MexCD-OprM eine Substratspezifität wie MexCD-OprJ (Gotoh *et al.*, 1998; Srikumar *et al.*, 1997). Während die Hybrid-Transport-Systeme MexAD-OprM, MexCB-OprM inaktiv sind, funktioniert MexAB-OprJ wie MexAB-OprM (Yoneyama *et al.*, 1998; Srikumar *et al.*, 1997). Auch das System MexEF-OprM ist aktiv und hat ein Substratspektrum wie MexEF-OprN, dagegen sind MexAB-OprN, MexAF-OprM und MexEB-OprM inaktiv (Maseda *et al.*, 2000). Als Fazit läßt sich ableiten, daß die OMF-Komponenten oft austauschbar sind, was aber keine Änderung des Substratspektrums zur Folge hat, da die nicht einzeln austauschbaren RND und MFP scheinbar als funktionelle Einheit die Substratspezifität der Efflux-Systeme festlegen (Srikumar *et al.*, 1997; Yoneyama *et al.*, 1998; Maseda *et al.*, 2000).

Wie wirkt sich das Fehlen einzelner Komponenten auf die vom Czc-Efflux-Komplex vermittelte Resistenz aus? Zum völligen Zusammenbruch der Resistenz führt das Fehlen des RND-Transporters CzcA im System. Wenn jedoch CzcA und CzcB ohne die OMF-Komponente CzcC exprimiert werden, wird noch Zn^{2+} -Resistenz auf hohem Niveau und eine Restresistenz gegen Co^{2+} vermittelt (Nies *et al.*, 1989; Rensing, 1996). Die gemeinsame Expression von CzcA und CzcC ohne das MFP CzcB führt zum Verlust der vom kompletten System vermittelten Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Resistenz, nur eine Restresistenz gegen Co^{2+} bleibt erhalten (Nies *et al.*, 1989). Wie schon im Zusammenhang mit der Funktion von CzcA erwähnt, führt die alleinige Expression des RND-Transporters zum fast vollständigen Verlust der Resistenz gegenüber Co^{2+} -, Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen, die MICs unterscheiden sich kaum von denen des sensitiven Stamms *R. metallidurans* AE104 (Rensing *et al.*, 1997a). Wie der Unterschied zwischen der Expression von CzcCA und CzcA allein in bezug auf die

Restresistenz gegen Co^{2+} zu erklären ist, bleibt unklar. Sollten doch direkte Wechselwirkungen von RND- und OMF-Komponenten ohne Mitwirken von MFP möglich sein? Für die von CzcBA in *R. metallidurans* AE104 vermittelte Zn^{2+} - und Co^{2+} -Resistenz (Nies *et al.*, 1989; Rensing *et al.*, 1997a) muß auch die mögliche Rekrutierung eines anderen OMF in Betracht gezogen werden, obwohl die Selektivität in bezug auf die transportierten Substrate scheinbar dagegen spricht. Dieser Effekt könnte damit erklärt werden, daß dieses OMF-Protein nicht konstitutiv exprimiert wird und die Expression nur durch Zn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen induziert wird. Bei einem Vergleich der Protein-Sequenz von CzcC mit dem zur Zeit sequenzierten Genom von *Ralstonia eutropha* kann neben CzcC tatsächlich auch ein weiteres OMF-Protein identifiziert werden, das wesentlich verwandter mit CzcC ist als CnrC (Ergebnis nicht gezeigt; *BLAST*; Altschul *et al.*, 1997). Da der RND-Transporter zwar die Substratspezifität des Efflux-Komplexes festlegt, für einen effizienten Efflux-Prozeß aber höchstwahrscheinlich entsprechende MFP und OMF unbedingt nötig sind, bedarf die von Grass (2000) geäußerte These, daß die RND-Pumpe allein eine Grundresistenz gegen bestimmte Schwermetall-Kationen vermittelt, die durch OMF- und MFP-Komponenten lediglich gesteigert wird, dahin gehend einer Modifizierung.

Nakajima *et al.* (2000) fordern für das MexAB-OprM-System neben den drei Komponenten noch zusätzlich ein TolC-ähnliches Protein in der äußeren Membran, da OprM auch als periplasmatisches Protein ohne Lipid-Anteil sowie als über einen langen Membrananker in der Cytoplasmamembran verankertes Protein funktionsfähig ist. Deshalb geben diese Autoren OprM den Namen MexM. Obwohl ein TolC-ähnliches Protein mit OprM eigentlich vorliegt und deshalb wahrscheinlich auch nicht zusätzlich nötig ist, kann die Existenz einer weiteren Komponente im Sinne des schon von Rensing *et al.* (1997a) für das Czc-System diskutierten „OmpY“ nicht ausgeschlossen werden.

Abschließend sollen die wichtigsten Aspekte der geführten Diskussion in einem Modell der Struktur und Funktion von Membranprotein-Komplexen, die den *Transenvelope Transport* von Substraten in Gram-negativen Bakterien vermitteln, zusammengefaßt werden. Allgemein bestehen die Systeme aus einer zentralen Komponente, die von einem RND-Transporter bzw. einem ABC-Transporter gebildet wird und mit einem MFP und einem OMF assoziiert ist. Die Efflux-Komplexe beruhen auf einem ähnlichen Struktur- und Funktionsprinzip. Unterschiedlich ist neben der Energiekopplung (*PMF*- oder ATP-getrieben) auch mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bindung der Transportsubstrate. Hinsichtlich der Bildung des Komplexes können grundsätzlich zwei Hypothesen unterschieden werden: Zum einen könnte der Komplex nach seiner unabhängig vom Substrat verlaufenden Bildung permanent existieren, zum anderen könnte er durch ständige Assoziation und Dissoziation von Subkomplexen abhängig von der Gegenwart des Substrats gekennzeichnet sein. Die vorübergehende, reversible Bildung des Efflux-Komplexes scheint aktuell die wahrscheinlichste Modellvariante zu sein, zumal mit der Entdeckung von Präkomplexen

Daten existieren, die diese Sicht belegen (Thanabalu *et al.*, 1998; Johnson & Church, 1999; Zgurskaya & Nikaido, 1999a, 2000a, 2000b). Den MFP-Komponenten wie CzcB kommt dabei eine bedeutende Aufgabe zu. Sie bewirken entweder die Ausbildung eines transperiplasmatischen Kanals (Abb. 30; Johnson & Church, 1999; Pimenta *et al.*, 1996) oder die Adhäsion bzw. Fusion der Membranen (Johnson & Church, 1999; Zgurskaya & Nikaido, 2000a). Bei Bildung des Periplasma und Peptidoglykan durchquerenden Kanals würde das MFP im gestreckten Zustand den Transport ermöglichen (Abb. 30), bei Adhäsion der Membranen würde dagegen der Transport bei kompakter Struktur des MFP erfolgen (Johnson & Church, 1999; Zgurskaya & Nikaido, 2000a). In jedem Fall wäre das MFP mit der drastischen Veränderung seiner Konformation das dynamische Element des Efflux-Komplexes. Da Konformationsänderung auch mit Energietransfer verbunden ist, sind Parallelen zwischen den MFP und TonB, wie von Yoneyama *et al.*, (2000) für die Interaktion von MexA mit OprM diskutiert, durchaus vorstellbar.

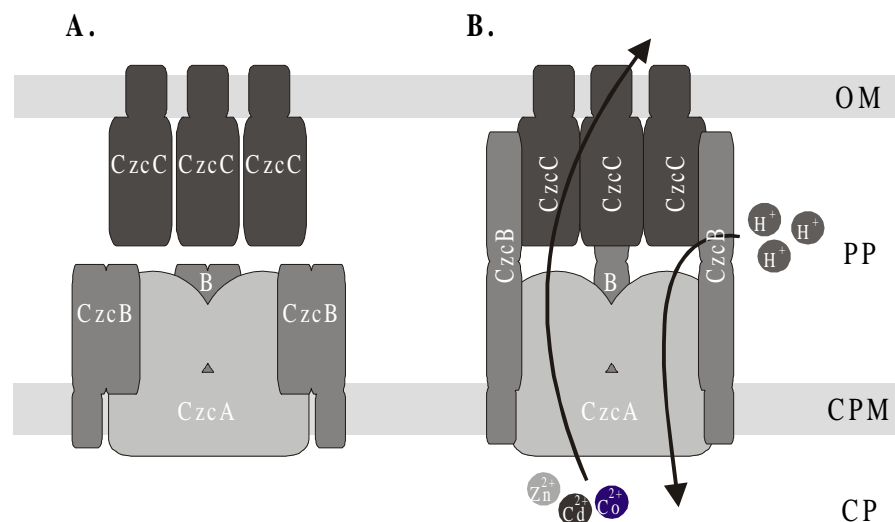


Abb. 30: Hypothetisches Modell zu Struktur und Funktion des Czc-Efflux-Komplexes

Dargestellt ist der Czc-Efflux-Komplex mit den Komponenten CzcC, CzcB und CzcA als Beispiel für Drei-Komponenten-Efflux-Systeme mit einem RND-Transporter als zentrale Untereinheit. In der gezeigten dynamischen Sicht existiert dieser Komplex nicht permanent, sondern ist durch reversible Assoziation und Dissoziation von Subkomplexen gekennzeichnet (nach Johnson & Church, 1999; Thanabalu *et al.*, 1998). Die Schwermetall-Kationen Co^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} werden im Antiport gegen Protonen vom Cytoplasma (CP) direkt ins Medium transportiert (*transenvelope*-Transport). Das vorgeschlagene stöchiometrische Verhältnis von einem RND-Transporter, drei MFP und drei OMF-Proteinen spiegelt die aktuell wahrscheinlichste Konstellation wider. Im inaktiven Zustand **A.** ohne Schwermetall-Kationen bilden CzcA und CzcB einen Präkomplex in der Cytoplasmamembran (CPM). Eine Assoziation mit CzcC in der äußeren Membran (OM) besteht nicht. Die Bindung von Schwermetall-Kationen durch CzcA führt zu Änderungen in der Konformation des Präkomplexes (aktiver Zustand **B.**). Durch den von CzcB vermittelten Kontakt mit CzcC wird ein transperiplasmatischer Kanal gebildet, der die Passage der Schwermetall-Kationen durch die innere Membran, das Periplasma (PP) und die äußere Membran ermöglicht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die *czc*-Determinante von *Ralstonia metallidurans* CH34, die auf dem Megaplasmid pMOL30 liegt, vermittelt Resistenz gegen die Schwermetall-Kationen Co^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} . Durch den von der Determinante kodierten, induzierbaren CzcCBA-Efflux-Komplex werden die Schwermetall-Kationen aktiv aus der Zelle ausgeschleust. Der chemiosmotisch getriebene Membranprotein-Komplex besteht aus dem *Resistance, Nodulation, Cell Division* (RND)-Transporter CzcA, der die zentrale Komponente darstellt, dem *Membrane Fusion Protein* (MFP) CzcB und dem *Outer Membrane Factor* (OMF) CzcC. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum einen mit der Lokalisation der einzelnen Komponenten bzw. ihrer Domänen und zum anderen mit der Zusammensetzung und Struktur des Czc-Efflux-Komplexes.

1. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation bzw. Membran-Topologie der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes wurden verschiedene Reporterplasmid-Sets zur Konstruktion von Translationsfusionen entwickelt, deren Funktionsfähigkeit mit Kontrollplasmiden nachgewiesen wurde, die für Fusionsproteine bekannter Lokalisation kodierten.
2. Mit Hilfe von CzcC'-PhoA- und CzcC'-LacZ-Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, daß große Teile von CzcC im Periplasma liegen.
3. Die spezifischen Aktivitäten von CzcB'-LacZ- und CzcB'-PhoA-Hybridproteinen lassen darauf schließen, daß sich auch CzcB in den periplasmatischen Raum erstreckt.
4. Für die Untersuchung der Membran-Topologie von CzcA wurden 25 Fusionspositionen im Protein ausgewählt. An allen Positionen wurden CzcA'-PhoA-Fusionen gebildet, an zwei Positionen zusätzlich CzcA'-LacZ-Fusionen. Mit den spezifischen Aktivitäten der Hybridproteine konnte gezeigt werden, daß die Termini von CzcA auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind. Die beiden großen hydrophilen Domänen des Proteins liegen im Periplasma und bilden die großen periplasmatischen Domänen I und II. Es wird ein zweidimensionales Modell der topologischen Organisation von CzcA mit zwölf transmembranen Segmenten (TMS) vorgeschlagen, das auf experimentell ermittelten Daten und Computervorhersagen beruht.
5. Durch Fraktionierung von *E. coli*-Zellen mit den Komponenten CzcC bzw. CzcB konnte gezeigt werden, daß die Proteine unabhängig von der Gegenwart der anderen Untereinheiten hauptsächlich in der Membran-Fraktion lokalisiert sind. Bei der Trennung

der Membranen in einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde sowohl CzcC als auch CzcB in Membran-Fractionen höherer Dichte angereichert, die ungefähr mit der Fraktion der äußeren Membran übereinstimmten.

6. Mit dem *Sos Recruitment*-System (SRS), einem alternativen *Yeast Two-Hybrid*-System, konnten keine Interaktionen der Komponenten des Czc-Efflux-Komplexes nachgewiesen werden, da die hSos-Fusionen in *S. cerevisiae* cdc25H nicht exprimiert wurden.
7. Beim Versuch der nativen Isolierung des kompletten Czc-Efflux-Komplexes mittels *Blue Native* PAGE konnte gezeigt werden, daß der Komplex instabil ist und wahrscheinlich bei der Solubilisierung zerfällt, was das Vorhandensein der einzelnen Untereinheiten CzcB und CzcA in hohen Konzentrationen im Solubilisat erklären würde. Das schwache, für beide Proteine spezifische Signal von ca. 500-550 kDa könnte demnach verbliebener Czc-Efflux-Komplex sein.
8. Durch *In vivo-Crosslinking*-Experimente wurde versucht, den gesamten Czc-Efflux-Komplex oder mögliche Subkomplexe durch Verbrückung der Komponenten zu stabilisieren. Ein für CzcB spezifischer Protein-Komplex von ca. 220 kDa Größe, wahrscheinlich ein CzcB₃-Homotrimer, wurde mit 0.1 % (v/v) Formaldehyd effizient verknüpft und über Affinitätschromatographie gereinigt. Der Komplex war durch Erhitzen wieder spaltbar.

VI. LITERATUR

- Akada, R.** 1994. Quick-check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques* **17(1)**: 58.
- Akatsuka, H., R. Binet, E. Kawai, C. Wandersman und K. Omori.** 1997. Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters: molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF, and HasDEF exporters. *J. Bacteriol.* **179(15)**: 4754-4760.
- Akatsuka, H., E. Kawai, K. Omori und T. Shibatani.** 1995. The three genes *lipB*, *lipC*, and *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *J. Bacteriol.* **177(22)**: 6381-6389.
- Akiyama, Y. und K. Ito.** 1993. Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **268**: 8146-8150.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andersson, H., E. Bakker und G. von Heijne.** 1992. Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267(3)**: 1491-1495.
- Anton, A.** 1997. Untersuchung der Struktur des CzcD-Proteins aus *Alcaligenes eutrophus* CH34 durch den Einsatz von Reporter-Gen-Fusionen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl und D. H. Nies.** 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* **181(22)**: 6876-6881.
- Appleyard, R. K.** 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**: 440-452.
- Aronheim, A. und M. Karin.** 2000. Analysis and identification of protein-protein-interactions using protein recruitment systems. *Methods Enzymol.* **328**: 47-59.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith und K. Struhl.** 1993. Current protocols in molecular biology. Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Bardwell, J. C.** 1994. Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* **14(2)**: 199-205.
- Bassford P. J., Jr., T. J. Silhavy und J. Beckwith.** 1979. Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into *E. coli* periplasm. *J. Bacteriol.* **139**: 19-31.
- Bayer, M. H., G. P. Costello und M. E. Bayer.** 1982. Isolation and partial characterization of membrane vesicles carrying markers of the membrane adhesion sites. *J. Bacteriol.* **149(2)**: 758-767.

- Beckwith, J.** 2000. The all purpose gene fusion. *Methods Enzymol.* **326**: 3-7.
- Bensadown, A. und D. Weinstein.** 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.
- Berg, A. und A. de Kok.** 1997. 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. The central role of the lipoyl domain. *Biol. Chem.* **378**: 617-634.
- Berks, B. C.** 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22(3)**: 393-404.
- Berks, B. C., F. Sargent und T. Palmer.** 2000. The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35(2)**: 260-274.
- Bernadac, A., J. M. Bolla, C. Lazdunski, M. Inouye und J. M. Pages.** 1987. Precise localization of an overproduced periplasmic protein in *Escherichia coli*: use of double immuno-gold labelling. *Biol. Cell.* **61(3)**: 141-147.
- Bernstein H. D.** 1998. Membrane protein biogenesis: The exception explains the rules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95(25)**: 14587-14589.
- Binet, R. und C. Wandersman.** 1995. Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* **14(10)**: 2298-2306.
- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russel-Jones und E. C. Gottschlich.** 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179.
- Bogsch, E., S. Brink und C. Robinson.** 1997. Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J.* **16(13)**: 3851-3859.
- Bolhuis, A., C. P. Broekhuizen, A. Sorokin, M. L. van Roosmalen, G. Venema, S. Bron, W. J. Quax und J. M. van Dijl.** 1998. SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J. Biol. Chem.* **273(33)**: 21217-21224.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa und S. Falkow.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- Bonner, W. M. und R. A. Laskey.** 1974. A film detection method for Tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83-88.
- Boyd, D. und J. Beckwith.** 1989. Positively charged amino acid residues can act as topogenic determinants in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86(23)**: 9446-9450.
- Boyd, D., B. Traxler und J. Beckwith.** 1993. Analysis of the topology of a membrane protein by using a minimum number of alkaline phosphatase fusions. *J. Bacteriol.* **175(2)**: 553-556.
- Brim, H., M. Heyndrickx, P. de Vos, A. Wilmotte, D. Springael, H. G. Schlegel und M. Mergeay.** 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterization

of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst. Appl. Microbiol.* **22(2)**: 258-268.

Broome-Smith, J. K., M. Tadayyon und Y. Zhang. 1990. Beta-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol. Microbiol.* **4(10)**: 1637-1644.

Brosius, J., R. L. Cate und A. P. Perlmutter. 1982. Precise location of two promoters for the beta-lactamase gene of pBR322. S1 mapping of ribonucleic acid isolated from *Escherichia coli* or synthesized in vitro. *J. Biol. Chem.* **257(15)**: 9205-9210.

Brown, N. L., J. Camakaris, B. T. Lee, T. Williams, A. P. Morby, J. Parkhill und D. A. Rouch. 1991. Bacterial resistances to mercury and copper. *J. Cell. Biochem.* **46(2)**: 106-114.

Buchanan, S. K. 1999. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9(4)**: 455-461.

Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm und J. Deisenhofer. 1999. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6(1)**: 56-63.

Bullock, W. O., J. M. Fernandez und J. M. Short. 1987. XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galaktosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378.

Chang, C. N., W. J. Kuang und E. Y. Chen. 1986. Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*. *Gene* **44(1)**: 121-125.

Chou, P. Y. und G. D. Fasman. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advan. Enzymol.* **47**: 45-148.

Christòbal, S., J. W. de Gier, H. Nielsen und G. von Heijne. 1999. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18(11)**: 2982-2990.

Corbisier, P., D. van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. de Lorenzo, N. L. Brown, J. R. Lloyd, J. L. Hobman, E. Csöregi, G. Johansson und B. Mattiasson. 1999. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bio available heavy metals in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **387**: 235-244.

Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne und A. Elofsson. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* **10(6)**: 673-676.

Dalbey, R. E., M. Chen, F. Jiang und J. C. Samuelson. 2000. Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12(4)**: 435-442.

Dalbey, R. E., M. O. Lively, S. Bron und J. M. van Dijk. 1997. The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* **6(6)**: 1129-1138.

de Gier, J. W., Q. A. Valent, G. von Heijne und J. Luirink. 1997. The *E. coli* SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS Lett.* **408(1)**: 1-4.

- de Gier, J. W., P. A. Scotti, A. Saaf, Q. A. Valent, A. Kuhn, J. Luirink und G. von Heijne.** 1998. Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95(25)**: 14646-14651.
- Delepelaire, P.** 1998. *Erwinia* metalloprotease permease: aspects of secretion pathway and secretion functions. Methods Enzymol. **292**: 67-81.
- de Maagd, R. A. und B. Lugtenberg.** 1986. Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, and cytoplasmic components. J. Bacteriol. **167**: 1083-1085.
- Denzer, A. J., C. E. Nabholz und M. Spiess.** 1995. Transmembrane orientation of signal-anchor proteins is affected by the folding state but not the size of the N-terminal domain. EMBO J. **14(24)**: 6311-6317.
- Derman, A. I. und J. Beckwith.** 1991. *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. J. Bacteriol. **173(23)**: 7719-7722.
- Derman, A. I. und J. Beckwith.** 1995. *Escherichia coli* alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. J. Bacteriol. **177**: 3764-3770.
- Derman, A. I., W. A. Prinz, D. Belin und J. Beckwith.** 1993. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Science **262(5140)**: 1744-1747.
- Diels, L., Q. Dong, D. van der Lelie, W. Baeyens und M. Mergeay.** 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. J. Ind. Microbiol. **14(2)**: 142-153.
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay und D. H. Nies.** 1985. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. Arch. Int. Physiol. Biochim. **93**: B27-B28.
- Dinh, T., I. T. Paulsen und M. H. Saier, Jr.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **176(13)**: 3825-3831.
- Dong, Q. und M. Mergeay.** 1994. Czc/Cnr efflux: a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. Mol. Microbiol. **14(1)**: 185-187.
- Dressler, C., U. Kües, D. H. Nies und B. Friedrich.** 1991. Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. Applied Environ. Microbiol. **57**: 3079-3085.
- Driessen, A. J. M., B. P. Rosen und W. N. Konings.** 2000. Diversity of transport mechanisms: common structural principles. Trends Biochem. Sci. **25**: 397-401.
- Duong, F. und W. Wickner.** 1997. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. EMBO J. **16(10)**: 2756-2768.

- Economou, A.** 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol.* **7(8)**: 315-320.
- Economou, A. und W. Wickner.** 1994. SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78(5)**: 835-843.
- Ehrmann, M., D. Boyd und J. Beckwith.** 1990. Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87(19)**: 7574-7578.
- Ehrmann, M., P. Bolek, M. Mondigler, D. Boyd und R. Lange.** 1997. TnTIN and TnTAP: mini-transposons for site-specific proteolysis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94(24)**: 13111-13115.
- Eisenberg, D., E. Schwarz, M. Komaromy und R. Wall.** 1984. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Microbiol.* **179**: 125-142.
- Eitinger, T. und B. Friedrich.** 1991. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **266(5)**: 3222-3227.
- Eitinger, T. und B. Friedrich.** 1994. A topological model for the high-affinity nickel transporter of *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **12(6)**: 1025-1032.
- Eitinger, T. und M. A. Mandrand-Berthelot.** 2000. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.* **173(1)**: 1-9.
- Fekkes, P. und A. J. M. Driessen.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63(1)**: 161-173.
- Fekkes, P., C. van der Does und A. J. M. Driessen.** 1997. The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16(20)**: 6105-6113.
- Filloux, A., G. Michel und M. Bally.** 1998. GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **22(3)**: 177-198.
- Fralick, J. A.** 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178(19)**: 5803-5805.
- Franke, C. M., K. J. Leenhouts, A. J. Haandrikman, J. Kok, G. Venema und K. Venema.** 1996. Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **178(6)**: 1766-1769.
- Franke, C. M., J. Tiemersma, G. Venema und J. Kok.** 1999. Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter protein LcnC. Involvement of LcnC in lactococcal maturation. *J. Biol. Chem.* **274(13)**: 8484-8490.
- Frederickson, R. M.** 1998. Macromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9(1)**: 90-96.

- Frillingos, S., M. Sahin-Toth, J. Wu und H. R. Kaback.** 1998. Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *Faseb J.* **12(13)**: 1281-1299.
- Gafvelin, G. und G. von Heijne.** 1994. Topological "frustration" in multispanning *E. coli* inner membrane proteins. *Cell* **77(3)**: 401-412.
- Gardel, C., K. Johnson, A. Jacq und J. Beckwith.** 1990. The *secD* locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **9(10)**: 3209-3216.
- Gielow, A., L. Diederich und W. Messer.** 1991. Characterization of a phage-plasmid hybrid (phasyl) with two independent origins of replication isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 73-79.
- Gilson, L., H. K. Mahanty und R. Kolter.** 1990. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* **9(12)**: 3875-3894.
- Ginn, S. L., M. H. Brown und R. A. Skurray.** 1997. Membrane topology of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter TetA(K) from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179(11)**: 3786-3789.
- Goldberg, M.** 1999. Reinigung und aktive Rekonstitution von CzcA, einem Mitglied der RND-Proteinfamilie. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke und D. H. Nies.** 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J. Biol. Chem.* **274(37)**: 26065-26070.
- Goris, J., P. De Vos, D. Janssens, M. Mergeay und P. Vandamme.** 2001. Polyphasic taxonomic study of *Ralstonia eutropha*-like strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (eingereicht).
- Gotoh, N., T. Kusumi, H. Tsujimoto, T. Wada und T. Nishino.** 1999. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **458(1)**: 32-36.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, A. Nomura, K. Okamoto, M. Tsuda und T. Nishino.** 1998. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165(1)**: 21-27.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, K. Poole, J. I. Yamagishi und T. Nishino.** 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(11)**: 2567-2569.
- Grass, G.** 2000. Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Grass, G., C. Grosse und D. H. Nies.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* **182(5)**: 1390-1398.
- Green, J. D. F., E. D. Laue, R. N. Perham, S. T. Ali und J. R. Guest.** 1995. Three-dimensional structure of a lipoyl domain from the dihydrolipoyl acetyltransferase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **248**: 328-343.

- Gromiha, M. M., R. Majumdar und P. K. Ponnuswamy.** 1997. Identification of membrane spanning β -strands in bacterial porins. *Protein Eng.* **10(5)**: 497-500.
- Große, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. Navarrette-Santos, B. Lawley, N. L. Brown und D. H. Nies.** 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **181(8)**: 2385-2393.
- Guan, L., M. Ehrmann, H. Yoneyama und T. Nakae.** 1999. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **274(15)**: 10517-10522.
- Gupta, A., B. A. Whitton, A. P. Morby, J. W. Huckle und N. J. Robinson.** 1992. Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC6301 selected for tolerance to cadmium. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **248(1323)**: 273-281.
- Hagting, A., J. v. d. Velde, B. Poolman und W. N. Konings.** 1997. Membrane topology of the di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **36(22)**: 6777-6785.
- Harley, K. T., G. M. Djordjevic, T. T. Tseng und M. H. Saier.** 2000. Membrane-fusion protein homologues in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **36(2)**: 516-517.
- Hartl, F. U., S. Lecker, E. Schiebel, J. P. Hendrick und W. Wickner.** 1990. The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63(2)**: 269-279.
- Henikoff, S.** 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28(3)**: 351-359.
- Hess, H. H. und J. E. Lees.** 1978. Water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal. Biochem.* **85**: 295-300.
- Higgins, C. F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 67-113.
- Higgs, P. I., P. S. Myers und K. Postle.** 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* **180(22)**: 6031-6038.
- Hirokawa T., S. Boon-Chieng und S. Mitaku.** 1998. SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins. *Bioinformatics (formerly CABIOS)* **14(4)**: 378-379.
- Hmiel, S. P., M. D. Snavely, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1986. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *J. Bacteriol.* **168(3)**: 1444-1450.
- Hobman, J. L. und N. L. Brown.** 1996. Overexpression of MerT, the mercuric ion transport protein of transposon Tn501, and genetic selection of mercury hypersensitivity mutations. *Mol. Gen. Genet.* **250(1)**: 129-134.

- Hofmann, K., P. Bucher, L. Falquet und A. Bairoch.** 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucl. Acids Res.* **27**: 215-219.
- Hofmann, K. und W. Stoffel.** 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **347**: 166.
- Holtz, K. M. und E. R. Kantrowitz.** 1999. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.* **462(1-2)**: 7-11.
- Hultberg, M.** 1998. Rhizobacterial glutathione levels as affected by starvation and cadmium exposure. *Curr. Microbiol.* **37(5)**: 301-305.
- Hwang, J., X. Zhong und 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(20)**: 6264-6270.
- Ikeda, R. A., C. M. Ligman und S. Warshamana.** 1992. T7 promoter contacts essential for promoter activity in vivo. *Nucl. Acids Res.* **20(10)**: 2517-2524.
- Ishidate, K., E. S. Creeger, J. Zrike, S. Deb, B. Glauner, T. J. MacAlister und L. I. Rothfield.** 1986. Isolation of differentiated membrane domains from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, including a fraction containing attachment sites between the inner and outer membranes and the murein skeleton of the cell envelope. *J. Biol. Chem.* **261(1)**: 428-443.
- Jerpseth, B., A. Greener, J. M. Short, J. Viola und P. L. Kretz.** 1993. *Strategies* **6**: 24.
- Kehres, D. G., C. H. Lawyer und M. E. Maguire.** 1998. The CorA magnesium transporter gene family. *Microb. Comp. Genomics* **3(3)**: 151-169.
- Johnson, J. M. und G. M. Church.** 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J. Mol. Biol.* **287(3)**: 695-715.
- Juhnke, S.** 1997. Einfluß von Punktmutationen im *czcA*-Gen auf die Funktion des CzcA-Proteins. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Kajava, A. V., S. N. Zolov, A. E. Kalinin und M. A. Nesmeyanova.** 2000. The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **182(8)**: 2163-2169.
- Kawabe, T., E. Fujihira und A. Yamaguchi.** 2000. Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA. *J. Biochem. (Tokyo)* **128(2)**: 195-200.
- Kimbrough, T. G. und C. Manoil.** 1994. Role of a small cytoplasmic domain in the establishment of serine chemoreceptor membrane topology. *J. Bacteriol.* **176(22)**: 7118-7120.
- Klein, P., M. Kanehisa und C. DeLisi.** 1985. The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **815(3)**: 468-476.

- Koch, S.** 1997. Untersuchung der Struktur des ChrA-Transporters in *Alcaligenes eutrophus* unter Einsatz von Reporter-Gen-Fusionen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Komeda, H., M. Kobayashi und S. Shimizu.** 1997. A novel transporter involved in cobalt uptake. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94(1)**: 36-41.
- Koronakis, V., J. Li, E. Koronakis und K. Stauffer.** 1997. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. Mol. Microbiol. **23(3)**: 617-626.
- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi und C. Hughes.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature **405(6789)**: 914-919.
- Kumamoto, C. A. und J. Beckwith.** 1985. Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **163(1)**: 267-274.
- Kumamoto, C. A. und O. Francetic.** 1993. Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein in vivo. J. Bacteriol. **175**: 2184-2188.
- Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. **10**: 203-209.
- Kyte, J. und R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Lamiet, A. A. und A. Pluckthun.** 1989. The precursor of beta-lactamase: purification, properties and folding kinetics. EMBO J. **8(5)**: 1469-1477.
- Lecker, S. H., R. Lill, T. Ziegelhoffer, C. Georgopoulos, P. J. Bassford, Jr., C. A. Kumamoto und W. Wickner.** 1989. Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli* - SecB, trigger factor and GroEL - form soluble complexes with precursor proteins in vitro. EMBO J. **8(9)**: 2703-2709.
- Lee, C., P. Li, H. Inouye, E. R. Brickman und J. Beckwith.** 1989. Genetic studies on the inability of beta-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. **171(9)**: 4609-4616.
- Lee, E. und C. Manoil.** 1994. Mutations eliminating the protein export function of a membrane-spanning sequence. J. Biol. Chem. **269(46)**: 28822-28828.
- Lee, J. I., P. P. Hwang, C. Hansen und T. H. Wilson.** 1992. Possible salt bridges between transmembrane alpha-helices of the lactose carrier of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **267(29)**: 20758-20764.

- Legatzki, A., G. Grass, T. Pribyl, T. Hoffmann, A. Hunger, T. Bloß, A. Anton und D. H. Nies.** 2001. Czc-mediated heavy metal homeostasis in *Ralstonia metallidurans*. (in Vorbereitung).
- Letoffe, S., P. Delepelaire und C. Wandersman.** 1996. Protein secretion in Gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporter is ordered and promoted by substrate binding. *EMBO J.* **15**: 5804-5811.
- Li, T., H. H. Ho, M. Maslak, C. Schick und C. T. Martin.** 1996. Major groove recognition elements in the middle of the T7 RNA polymerase promoter. *Biochemistry* **35(12)**: 3722-3727.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui und H. G. Schlegel.** 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **175(3)**: 767-778.
- Lill, R., K. Cunningham, L. A. Brundage, K. Ito., D. Oliver und W. Wickner.** 1989. SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**: 961-966.
- Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch und D. Moras.** 1998. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95(6)**: 771-778.
- Lowry, O. H., A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Luirink, J., C. M. ten Hagen-Jongman, C. C. van der Weijden, B. Oudega, S. High, B. Dobberstein und R. Kusters.** 1994. An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *EMBO J.* **13(10)**: 2289-2296.
- Lupas, A.** 1996. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* **266**: 513-525.
- Lupas, A., M. Van Dyke und J. Stock.** 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162-1164.
- Lutsenko, S. und J. H. Kaplan.** 1995. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* **34(48)**: 15607-15613.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido und J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175(19)**: 6299-6313.
- Mandel, M. und A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- Manoil C.** 1990. Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.* **172**: 1035-1042.
- Manoil, C.** 1991. Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and β -galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol.* **34**: 61-75.

- Manoil, C.** 2000. Tagging exported proteins using *Escherichia coli* alkaline phosphatase gene fusions. *Methods Enzymol.* **326**: 35-47.
- Manoil, C. und J. Bailey.** 1997. A simple screen for permissive sites in proteins: analysis of *Escherichia coli* lac permease. *J. Mol. Biol.* **267(2)**: 250-263.
- Manoil, C. und J. Beckwith.** 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 8129-8133.
- Manoil, C., J. J. Mekalanos und J. Beckwith.** 1990. Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* **172(2)**: 515-518.
- Manting, E. H., C. van der Does, H. Remigy, A. Engel und A. J. M. Driessen.** 2000. SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **19**: 852-861.
- Martoglio, B. und B. Dobberstein.** 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8(10)**: 410-415.
- Maseda, H., H. Yoneyama und T. Nakae.** 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-oprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(3)**: 658-664.
- Mergeay, M.** 2000. Bacteria adapted to industrial biotopes: Metal-resistant *Ralstonia*. In *Bacterial Stress Responses*, Kapitel 26, Seiten 403-414. Ed. G. Storz und R. Hengge-Aronis ASM Press Washington DC.
- Mergeay, M., C. Houba und J. Gerits.** 1978. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **86(2)**: 440-442.
- Mergeay, M., D. H. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles und F. van Gijsegen.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a fakultativ chemolithotroph with plasmid bound resistance to heave metals. *J. Bacteriol.* **162**: 328-334.
- Miller, A., L. Wang und D. A. Kendall.** 1998. Synthetic signal peptides specifically recognize SecA and stimulate ATPase activity in the absence of preprotein. *J. Biol. Chem.* **273(19)**: 11409-11412.
- Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Missiakas, D. und S. Raina.** 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* **179(8)**: 2465-2471.
- Morona, R., P. A. Manning und P. Reeves.** 1983. Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153(2)**: 693-699.
- Nakajima, A., Y. Sugimoto, H. Yoneyama und T. Nakae.** 2000. Localization of the outer membrane subunit OprM of RND-family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **275(39)**: 30064-30068.

- Navarro, C., L. F. Wu und M. A. Mandrand-Berthelot.** 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol. Microbiol.* **9(6)**: 1181-1191.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley und S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28(3)**: 239-242.
- Neuwald, A. F., J. S. Liu, D. J. Lipman und C. E. Lawrence.** 1997. Extracting protein alignment models from the sequence database. *Nucl. Acids Res.* **25**: 1665-1677.
- Newitt, J. A. und H. D. Bernstein.** 1998. A mutation in the *Escherichia coli* *secY* gene that produces distinct effects on inner membrane protein insertion and protein export. *J. Biol. Chem.* **273(20)**: 12451-12456.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak und G. von Heijne.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**: 1-6.
- Nies, A., D. H. Nies und S. Silver.** 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171(9)**: 5065-5070.
- Nies, A., D. H. Nies und S. Silver.** 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **265(10)**: 5648-5653.
- Nies, D. H.** 1992a. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* **27(1)**: 17-28.
- Nies, D. H.** 1992b. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **174(24)**: 8102-8110.
- 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(10)**: 2707-2712.
- Nies, D. H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51(6)**: 730-750.
- Nies, D. H.** 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* **4(2)**: 77-82.
- Nies, D. H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch und M. H. Saier, Jr.** 1998. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* **180**: 5799-5802.
- Nies, D. H., M. Mergeay, B. Friedrich und H. G. Schlegel.** 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **169(10)**: 4865-4868.

- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu und S. Silver.** 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86(19)**: 7351-7355.
- Nies, D. H. und S. Silver.** 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. **171(2)**: 896-900.
- Nies, D. H. und S. Silver.** 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. J. Ind. Microbiol. **14(2)**: 186-199.
- Niethammer, M. und M. Sheng.** 1998. Identification of ion channel-associated proteins using the yeast two-hybrid system. Methods Enzymol. **293**: 104-122.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **178(20)**: 5853-5859.
- Nikaido, H.** 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. **1(5)**: 516-523.
- Nikaido, H. und J. A. Hall.** 1998. Overview of bacterial ABC transporters. Methods Enzymol. **292**: 3-20.
- Nikaido, H. und M. H. Saier, Jr.** 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. Science **258(5084)**: 936-942.
- Nilsson, I., A. Saaf, P. Whitley, G. Gafvelin, C. Waller und G. von Heijne.** 1998. Proline-induced disruption of a transmembrane alpha-helix in its natural environment. J. Mol. Biol. **284(4)**: 1165-1175.
- Nucifora, G., L. Chu, T. K. Misra und S. Silver.** 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86(10)**: 3544-3548.
- Olafson, R. W., W. D. McCubbin und C. M. Kay.** 1988. Primary- and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium. Biochem. J. **251(3)**: 691-699.
- Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi und J. Carson.** 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. **247(12)**: 3962-3972.
- Owens, R. A. und P. E. Hartman.** 1986a. Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol. **168(1)**: 109-114.
- Owens, R. A. und P. E. Hartman.** 1986b. Glutathione: a protective agent in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* as measured by mutagenicity and by growth delay assays. Environ. Mutagen. **8(5)**: 659-673.
- Patzer, S. I. und K. Hantke.** 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **28(6)**: 1199-1210.

- Paulsen, I. T., M. H. Brown und R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60(4)**: 575-608.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi und 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 Microbiol. Lett.* **156(1)**: 1-8.
- Paulsen, I. T. und M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156(2)**: 99-103.
- Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski und M. H. Saier, Jr.** 1998. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* **277(3)**: 573-592.
- Peitzsch, N.** 1999. Der Chromatstoffwechsel des schwermetallresistenten Bakteriums *Alcaligenes eutrophus* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Persson, B. und P. Argos.** 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* **237(2)**: 182-192.
- Persson, B. und P. Argos.** 1996. Topology prediction of membrane proteins. *Prot. Sci.* **5(2)**: 363-371.
- Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* **100**: 197-206.
- Phillips, G. J. und T. J. Silhavy.** 1992. The *E. coli ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature* **359**: 744-746.
- Pimenta, A., M. Blight, D. Clarke und I. B. Holland.** 1996. The Gram-negative cell envelope "springs" to life: coiled-coil *trans*-envelope proteins. *Mol. Microbiol.* **19**: 643-645.
- Pogliano, K. J. und J. Beckwith.** 1994. Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli secD* operon and its products. *J. Bacteriol.* **176(3)**: 804-814.
- Poole, K., K. Krebes, C. McNally und S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175(22)**: 7363-7372.
- Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li und T. Nishino.** 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **21(4)**: 713-724.
- Prinz, W. A. und J. Beckwith.** 1994. Gene fusion analysis of membrane protein topology: a direct comparison of alkaline phosphatase and beta-lactamase fusions. *J. Bacteriol.* **176(20)**: 6410-6413.
- Prinz, W. A., D. H. Boyd, M. Ehrmann und J. Beckwith.** 1998. The protein translocation apparatus contributes to determining the topology of an integral membrane protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273(14)**: 8419-8424.

- Prossnitz, E., K. Nikaido, S. J. Ulbrich und G. F. Ames.** 1988. Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **263(34)**: 17917-17920.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57(1)**: 50-108.
- Rao, M. J. K. und P. Argos.** 1986. A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **869**: 197-214.
- Rabilloud, T., G. Carpentier und P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9(6)**: 288-291.
- Rensing, C.** 1996. Bakterielle Schwermetallresistenzen und ihre Expression in Eukaryonten. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Rensing, C., M. Ghosh und B. P. Rosen.** 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J. Bacteriol.* **181(19)**: 5891-5897.
- Rensing, C., T. Pribyl und D. H. Nies.** 1997a. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* **179(22)**: 6871-6879.
- Rensing, C., B. Mitra und B. P. Rosen.** 1997b. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94(26)**: 14326-14331.
- Rossi, F., C. A. Charlton und H. M. Blau.** 1997. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 8405-8410.
- Rost, B., R. Casadio, P. Fariselli und C. Sander.** 1995. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* **4(3)**: 521-533.
- Rost, B., P. Fariselli und R. Casadio.** 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* **5(8)**: 1704-1718.
- Rost, B. und C. Sander.** 1993. Prediction of secondary structure at better than 70 % accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**: 584-599.
- Rothman, A., E. Padan und S. Schuldiner.** 1996. Topological analysis of NhaA, a Na^+/H^+ antiporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271(50)**: 32288-32292.
- Saier M. H., Jr.** 2000a. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(2)**: 354-411.
- Saier M. H., Jr.** 2000b. Vectorial Metabolism and the Evolution of Transport Systems. *J. Bacteriol.* **182(18)**: 5029-5035.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer und J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11(5)**: 841-847.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Samuelson, J. C., M. Chen, F. Jiang, I. Moller, M. Wiedmann, A. Kuhn, G. J. Phillips und R. E. Dalbey.** 2000. YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406(6796)**: 637-641.
- San Millan, J. L., D. Boyd, R. Dalbey, W. Wickner und J. Beckwith.** 1989. Use of phoA fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase. *J. Bacteriol.* **171(10)**: 5536-5541.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA-Sequencing with chain terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 5463-5467.
- Sargent F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks und T. Palmer.** 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* **17(13)**: 3640-3650.
- Schägger, H. und G. von Jagow.** 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**: 223-231.
- Schatz, G. und B. Dobberstein.** 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271(5255)**: 1519-1526.
- Schiering, N., W. Kabsch, M. J. Moore, M. D. Distefano, C. T. Walsh und E. F. Pai.** 1991. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607. *Nature* **352**: 168-172.
- Schirmer, T. und S. W. Cowan.** 1993. Prediction of membrane-spanning beta-strands and its application to maltoporin. *Protein Sci.* **2**: 1361-1363.
- Schlör, S., A. Schmidt, E. Maier, R. Benz, W. Goebel und I. Gentschev.** 1997. In vivo and in vitro studies on interactions between the components of the hemolysin (HlyA) secretion machinery of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **256(3)**: 306-319.
- Schmidt, T. und H. G. Schlegel.** 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* **176(22)**: 7045-7054.
- Schülein, R., I. Gentschev, H. J. Mollenkopf und W. Goebel.** 1992. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* **234(1)**: 155-163.
- Schülein, R., I. Gentschev, S. Schlör, R. Gross und W. Goebel.** 1994. Identification and characterization of two functional domains of the hemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* **245(2)**: 203-211.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork und C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 5857.
- Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting und P. Bork.** 2000. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucl. Acids Res.* **28**: 231-234.

- Schwuchow, T.** 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Scotti, P. A., M. L. Urbanus, J. Brunner, J. W. de Gier, G. von Heijne, C. van der Does, A. J. Driessen, B. Oudega und J. Luirink.** 2000. YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19(4)**: 542-549.
- Seligman, L. und C. Manoil.** 1994. An amphipathic sequence determinant of membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* **269(31)**: 19888-19896.
- Sensfuss, C. und H. G. Schlegel.** 1988. Plasmid pMOL28-encoded resistance to nickel is due to specific efflux. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 295-298.
- Shapira, S. K., J. Chou, F. V. Richaud und M. J. Casadaban.** 1983. New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of beta-galactosidase. *Gene* **25(1)**: 71-82.
- Sharma, R., C. Rensing, B. P. Rosen und B. Mitra.** 2000. The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275(6)**: 3873-3878.
- Shi, J., W. P. Lindsay, J. W. Huckle, A. P. Morby und N. J. Robinson.** 1992. Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett.* **303(2-3)**: 159-163.
- Shilton, B., D. I. Svergun, V. V. Volkov, M. H. J. Koch, S. Cusack und A. Economou.** 1998. *Escherichia coli* SecA shape and dimensions. *FEBS Lett.* **436**: 277-282.
- Shine, J. und L. Dalgarno.** 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71(4)**: 1342-1346.
- Siddiqui, R. A., K. Benthin und H. G. Schlegel.** 1989. Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* **171**: 5071-5078.
- Silhavy, T. J.** 2000. Gene fusions. *J. Bacteriol.* **182(21)**: 5935-5938.
- Silver, S. und L. T. Phung.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- Skare, J. T., B. M. Ahmer, C. L. Seachord, R. P. Darveau und K. Postle.** 1993. Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J. Biol. Chem.* **268(22)**: 16302-16308.
- Skvirsky, R. C., S. Reginald und X. Shen.** 1995. Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177(21)**: 6153-6159.
- Smith, R. L. und M. E. Maguire.** 1995. Distribution of the CorA Mg²⁺ transport system in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **177(6)**: 1638-1640.

- Smith, R. L. und M. E. Maguire.** 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol. Microbiol.* **28(2)**: 217-226.
- Snavely, M. D., J. B. Florer, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: $^{28}\text{Mg}^{2+}$ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *J. Bacteriol.* **171(9)**: 4761-4766.
- Snavely, M. D., S. A. Gravina, T. T. Cheung, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1991. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression. *J. Biol. Chem.* **266(2)**: 824-829.
- Snyder, W. B. und T. J. Silhavy.** 1995. Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177(4)**: 953-963.
- Solioz, M. und C. Vulpe.** 1996. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* **21(7)**: 237-241.
- Sonnhammer E. L. L., G. von Heijne und A. Krogh.** 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, Seiten 175-182. Ed. J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff und C. Sensen. Menlo Park, CA: AAAI Press.
- Spiess, M.** 1995. Heads or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett.* **369(1)**: 76-79.
- Srikumar, R., X. Z. Li und K. Poole.** 1997. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179(24)**: 7875-7881.
- Stagljar, I., C. Korostensky, N. Johnsson und S. te Heesen.** 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 5187-5192.
- Stagljar, I. und S. te Heesen.** 2000. Detecting interactions between membrane proteins in vivo using chimeras. *Methods Enzymol.* **327**: 190-198.
- Stüber, D. und H. Bujard.** 1981. Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78(1)**: 167-171.
- Szomolanyi, E., A. Kiss und P. Venetianer.** 1980. Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli*. *Gene* **10(3)**: 219-225.
- Tabor, S.** 1990. Expression using the T7 RNA polymerase/promotor system. In *Current protocols in molecular biology*, Chap. 16.2. Ed. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith and K. Struhl. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Tabor, S. und C. C. Richardson.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 1074-1078.

- Taghavi, S., M. Mergeay und D. van der Lelie.** 1997. Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid* **37(1)**: 22-34.
- Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes und V. Koronakis.** 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* **17(22)**: 6487-6496.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson.** 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. H. Jongbloed, S. Bron und J. M. van Dijl.** 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(3)**: 515-547.
- Tseng, T.-T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau und M. H. Saier, Jr.** 1999. The RND Permease Superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1(1)**: 107-125.
- Turner, J. S. und N. J. Robinson.** 1995. Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. *J. Ind. Microbiol.* **14(2)**: 119-125.
- Tusnády, G. E. und I. Simon.** 1998. Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction. *J. Mol. Biol.* **283**: 489-506.
- Ulbrandt, N. D., J. A. Newitt und H. D. Bernstein.** 1997. The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* **88(2)**: 187-196.
- Ullmann, A.** 1984. One-step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene* **29(1-2)**: 27-31.
- Valent, Q. A., P. A. Scotti, S. High, J. W. de Gier, G. von Heijne, G. Lentzen, W. Wintermeyer, B. Oudega und J. Luirink.** 1998. The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.* **17(9)**: 2504-2512.
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay und D. H. Nies.** 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **23(3)**: 493-503.
- van Geest, M. und J. S. Lolkema.** 1996. Membrane topology of the sodium ion-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*. Evidence for a new structural class of secondary transporters. *J. Biol. Chem.* **271(41)**: 25582-25589.
- van Geest, M. und J. S. Lolkema.** 2000. Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(1)**: 13-33.
- Vieira, J. und J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* **19**: 259-268.

- Vogelstein, B. und D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**: 615-619.
- von Heijne, G.** 1986. The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. EMBO J. **5(11)**: 3021-3027.
- von Heijne, G.** 1989. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. Nature **341(6241)**: 456-458.
- von Heijne, G.** 1991. Proline kinks in transmembrane alpha-helices. J. Mol. Biol. **218(3)**: 499-503.
- von Heijne, G.** 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. J. Mol. Biol. **225**: 487-494.
- von Heijne, G.** 1997. Getting greasy: how transmembrane polypeptide segments integrate into the lipid bilayer. Mol. Microbiol. **24(2)**: 249-253.
- von Heijne, G. und Y. Gavel.** 1988. Topogenic signals in integral membrane proteins. Eur. J. Biochem. **174(4)**: 671-678.
- Wandersman, C. und P. Delepelaire.** 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87(12)**: 4776-4780.
- Watanabe, M. und G. Blobel.** 1989. Cytosolic factor purified from *Escherichia coli* is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 2728-2732.
- Weber, K. und M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **244(16)**: 4406-4412.
- Weiner, J. H., P. T. Bilous, G. M. Shaw, S. P. Lubitz, L. Frost, G. H. Thomas, J. A. Cole und R. J. Turner.** 1998. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. Cell **93(1)**: 93-101.
- Wessel, D. und 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.
- Westenberg, D. J. und M. L. Guerinot.** 1997. Regulation of bacterial gene expression by metals. Adv. Genet. **36**: 187-238.
- Wilkins M. R., E. Gasteiger, A. Bairoch, J.-C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel und D. F. Hochstrasser.** 1998. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. In 2-D Proteome Analysis Protocols. Ed. A. J. Link. Humana Press, New Jersey.
- Wilson, J. R., C. Leang, A. P. Morby, J. L. Hobman und N. L. Brown.** 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? FEBS Lett. **472(1)**: 78-82.
- Wong, K. K. und R. E. Hancock.** 2000. Insertion mutagenesis and membrane topology model of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM. J. Bacteriol. **182(9)**: 2402-2410.

- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yoneyama, H., H. Maseda, H. Kamiguchi und T. Nakae.** 2000. Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *J. Biol. Chem.* **275**(7): 4628-4634.
- Yoneyama, H., A. Ocaktan, N. Gotoh, T. Nishino und T. Nakae.** 1998. Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**(3): 898-902.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 1999a. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285**(1): 409-420.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 1999b. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(13): 7190-7195.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 2000a. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37**(2): 219-225.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 2000b. Cross-Linked Complex between Oligomeric Periplasmic Lipoprotein AcrA and the Inner-Membrane-Associated Multidrug Efflux Pump AcrB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**(15): 4264-4267.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. D. H. Nies für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stets gewährte wissenschaftliche Unterstützung während meiner Arbeit bedanken. Herr Prof. D. H. Nies war auch bemüht, den Doktoranden die Möglichkeit zu geben, Projekte im fortgeschrittenen Stadium zu beenden.

Mein Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe Nies für die ständige Hilfsbereitschaft, so manchen guten fachlichen Tip und das Verständnis, das ich an den weniger erfolgreichen Tagen erfahren habe.

Ich danke ebenfalls den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, besonders Herrn Prof. J. R. Andreesen, für die gute Zusammenarbeit und verschiedene wissenschaftliche Hinweise.

Dem Graduiertenkolleg „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ danke ich für die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts.

Für zuverlässige Sequenzierungen sowie Primersynthesen danke ich Grit Schleuder und Ute Lindenstrauß.

Antje, Ede und Susi danke ich für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ede und Sina danke ich dafür, daß ich bei ihnen stets willkommen war und sie Zeit für mich hatten.

Wichtig ist es mir, meinen Eltern und meiner Schwester Kathleen dafür zu danken, daß sie immer für mich da waren und mir die Möglichkeit gegeben haben, mich frei zu entfalten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Aus anderen Werken entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 21.1.2001

Thomas Pribyl

Lebenslauf

Thomas Pribyl

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Staatsangehörigkeit: BRD
Geburtsdatum: 6.3.1971
Geburtsort: Eilenburg (Sachsen)

Ausbildung

- 1977-1987 **Polytechnische Oberschule**
Eilenburg
Abschluß der 10. Klasse mit dem Prädikat: „mit Auszeichnung bestanden“
- 1987-1989 **Erweiterte Oberschule**
Eilenburg
Abschluß des Abiturs mit dem Prädikat: „mit Auszeichnung bestanden“
- 1990-Sept. 1995 **Martin- Luther- Universität**
Halle
Studium der Biochemie
Diplomarbeit zum Thema: „Molekulargenetische Charakterisierung der Metall-Hypersensitivität von *E. coli* EC351(pGP1-2)“
Abschluß des Diploms mit der Note: „Gut“
- seit Nov. 1995 **Martin- Luther- Universität**
Halle
wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. D. H. Nies
Promotion
- 1989/90 **Wehrdienst**
Grundwehrdienst bei den Baupionieren