

Charakterisierung von CDF-Transportern aus
Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*
und *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Tanja Bloß
geb. am 9. März 1972 in Jena

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. D. H. Nies
2. Prof. D. Scheel
3. Prof. E. Weiler

Halle (Saale), 19.04.2001

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Stämme und Plasmide	7
2.1.1 Bakterienstämme und Hefestämme	7
2.1.2 Pflanzen und DNA-Banken	8
2.1.3 Plasmide	9
2.2 Kultivierungsbedingungen für Bakterien	10
2.2.1 Nährmedien und Zusätze	10
2.2.2 Zellanzucht, Induktion und Zellernte	13
2.2.3 Stammhaltung	13
2.3 Kultivierungsbedingungen für Hefen	14
2.3.1 Nährmedien und Zusätze	14
2.3.2 Zellanzucht, Induktion und Zellernte	16
2.3.3. Stammhaltung	17
2.4 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	17
2.4.1 Isolierung von DNA	17
2.4.1.1 Analytische Megaplasmidisolierung	17
2.4.1.2 Isolation von <i>Ralstonia metallidurans</i> Gesamt-DNA nach Marmur	18
2.4.1.3 Mikroplasmidpräparation	18
2.4.1.4 Miniplasmidisolierung	19
2.4.1.5 Präparative Plasmidisolierung	19
2.4.1.6 Plasmidisolierung mittels QIAprep <i>Spin</i> Säulen	20
2.4.1.7 Plasmidisolierung mittels Anionen-Austauscher-Säulen	20
2.4.1.8 Schnelle Isolation von Hefe-Gesamt-DNA	20
2.4.1.9 Präparation genomischer DNA aus Hefe mittels Anionen-Austauscher- Säulen	21
2.4.1.10 Präparation genomischer DNA aus Tomatenzellkulturen	21
2.4.1.11 Präparation genomischer DNA aus Blättern von Tabak und Arabidopsis	22
2.4.2 DNA-Techniken	22
2.4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	22
2.4.2.2 DNA-Größenstandard	23
2.4.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	23
2.4.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
2.4.2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA	23

Inhaltsverzeichnis

2.4.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	24
2.4.2.7	Dialyse von DNA-Fragmenten	24
2.4.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.4.2.9	Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode	24
2.4.2.10	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	25
2.4.2.11	Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	25
2.4.2.12	Selektion rekombinanter <i>S. cerevisiae</i> -Klone	25
2.4.2.13	Plasmidtransfer durch Konjugation	26
2.4.2.14	Phageninfektion einer Bakterienkultur - <i>Screening</i> einer Genbank	26
2.4.2.15	<i>In vivo Excision</i> positiver Phagen	26
2.4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	27
2.4.3.1	Auswahl der Primer	27
2.4.3.2	Standard Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.4.3.3	Reinigung von PCR-Produkten	32
2.4.4	DNA-Sequenzierung	32
2.4.4.1	Sequenzierung mit dem <i>SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™</i> DNA Sequencing Kit-ALF™	32
2.4.4.2	Sequenzierung unter Verwendung des <i>dRhodamine Termination</i> <i>Cycle Sequencing-Kits</i>	33
2.4.4.3	Das Sequenziergel	34
2.4.4.5	Auswertung der Sequenzdaten	34
2.5	Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	35
2.5.1	Herstellung der Sonden	35
2.5.1.1	Synthese von DNA-Fragmenten	35
2.5.1.1	Digoxigenin-Markierung der Sonden	35
2.5.2	Digoxigenin-markierte Längenstandards	35
2.5.3	DNA:DNA-Hybridisierung	36
2.5.3.1	Gelelektrophorese und <i>DNA-Blotting</i>	36
2.5.3.2	Kolonie-Hybridisierung	36
2.5.3.3	Plaque-Hybridisierung	37
2.5.3.4	Hybridisierung	37
2.5.4	Chemilumineszens-Nachweis	37
2.5.5	Wiederverwendung von Nylonmembranen	38
2.6	Molekulargenetische Arbeiten mit RNA	38
2.6.1	Isolierung von RNA	38
2.6.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	38
2.6.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Tomatenzellkulturen	39
2.6.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis</i> -Blättern	39
2.6.1.4	Isolierung von mRNA aus Pflanzenmaterial mittels <i>Oligotex™</i>	40
2.6.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	40
2.6.3	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.6.4	RNA:DNA-Hybridisierung	41

Inhaltsverzeichnis

2.6.4.1	Gelelektrophorese und RNA- <i>Blotting</i>	41
2.6.4.2.	Hybridisierung	41
2.6.4.3	Chemilumineszens-Nachweis	42
2.6.5	<i>Reverse Transkription</i> - Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	42
2.7	Zellwachstumsversuche	43
2.7.1	Wachstumsversuche mit <i>R. metallidurans</i> -Stämmen	43
2.7.1.1	Das Klett-Summerson-Colorimeter	43
2.7.1.2	Zellanzucht von <i>Ralstonia</i> -Stämmen für Wachstumsversuche	43
2.7.1.3	Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Schwermetallsalzen	44
2.7.2	Wachstumsversuche mit Hefen	44
2.7.2.1	Trockengewichtsbestimmung von <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	44
2.7.2.2	Toxizitätsbestimmung	45
2.7.2.3	Schwermetall-Akkumulation in Hefen	45
2.8.	Proteinbiochemische Methoden	46
2.8.1	Protein-Expression und -Reinigung über das <i>Strep-tag</i> [®] II <i>Expression, Detection and Purification System</i>	46
2.8.1.1	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	46
2.8.1.2	Zellaufschluß	46
2.8.1.3	Membranpräparation	47
2.8.1.4	Solubilisierung der Membranen	47
2.8.1.5	Affinitätschromatographie an Step-Tactin-Sephrose	47
2.8.1.6	Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen	48
2.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford	48
2.8.3	Proteinbestimmung nach Lowry <i>et al.</i> (1951), mod.	48
2.8.4	Chloroform-Methanol-Fällung	49
2.8.5	Elektrophoretische Methoden	49
2.8.5.1	Probenvorbereitung	49
2.8.5.2	Protein Marker	49
2.8.5.3	Lineare SDS-PAGE	50
2.8.5.4	SDS-Tricin-PAGE nach Schagger <i>et al.</i> ,1988	50
2.8.5.5	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran	51
2.8.6	Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	52
2.8.6.1	Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	52
2.8.6.2	Silberfärbung	52
2.8.6.3	Trocknung von Polyacrylamid-Gelen	53
2.8.7	Sequenzierung von Proteinen	53
2.8.8	Nachweis von gebundenem Zink in Proteinen mittels ⁶⁵ Zn-Blot	53
2.8.9	Antikörpernachweis	53
2.8.10	Rekonstitutionsexperimente	54
2.8.10.1	Herstellung von Liposomen	54
2.8.10.2	Herstellung von Proteoliposomen	54

Inhaltsverzeichnis

2.8.10.3	Nachweis eines künstlichen pH-Gradienten durch Fluoreszenzlöschung	54
2.9	Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen	55
2.9.1	Aufnahme radioaktiver Metalle durch Liposomen/Proteoliposomen	55
2.9.2	Aufnahme radioaktiver Metalle durch die Hefen <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	55
2.9.3	Aufnahme radioaktiver Metalle durch <i>R. metallidurans</i>	56
3.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	57
3.1	Nachweis von CDF-Proteinen in Pflanzen	57
3.1.1	Nachweis von pflanzlichen CDF-Proteinen durch heterologe <i>Southern</i> -Hybridisierung	57
3.1.2	Klonierung und Sequenzierung von RT-PCR-Produkten mit degenerierten Primern	58
3.1.3	Nachweis eines 250 bp-Fragmentes in Tomate und <i>Silene cucubalis</i>	59
3.1.4	<i>Screening</i> von cDNA-Banken (Tomate, <i>Silene</i>) nach dem kompletten CDF-Protein kodierenden Gen	61
3.1.4.1	<i>Screening</i> mittels PCR	62
3.1.4.2	<i>Screening</i> mittels Hybridisierung und <i>In vivo Excision</i>	63
3.2	Klonierung des <i>ZAT1</i> -Gens, eines Zink-Transporters aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.2.1	Expression des <i>Zat1</i> -STREptag-Fusionsproteins	64
3.2.2	Reinigung des <i>Zat1</i> -STREptag-Fusionsproteins	66
3.2.3	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des <i>Zat1</i> -STREptag-Fusionsproteins	68
3.2.4	<i>Zat1p</i> -Rekonstitution in Liposomen	68
3.2.4.1	Herstellung und Kontrolle der Proteoliposomen	68
3.2.4.2	Metallaufnahme-Experimente mit <i>Zat1p</i> -Proteoliposomen	69
3.2.5	Konstruktion einer Δ <i>ZAT</i> -Mutante	72
3.2.6	Expression und Reinigung des Δ <i>Zat1</i> -STREptag-Fusionsproteins	74
3.2.7	Vergleichende ^{65}Zn -Bindungsuntersuchung an <i>Zat1p</i> und Δ <i>Zat1p</i>	75
3.3	Untersuchungen mit <i>Ralstonia metallidurans</i>	77
3.3.1	Vergleich des metallsensitiven <i>R. metallidurans</i> -Stammes AE104 mit dem <i>ZAT1</i> -Gen enthaltenden <i>R. metallidurans</i> -Stamm AE104	77
3.3.2	Einfluß des <i>ZAT1</i> -Gens auf die Metallresistenz der <i>R. metallidurans</i> - Stämme AE104, AE128 und DN182	79
3.4	Untersuchungen an der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
3.4.1	Konstruktion einer <i>cot1/zrc1</i> -Doppelmutante von <i>S. cerevisiae</i>	82
3.4.1.1	Herstellung der <i>cot</i> - und <i>zrc1</i> -Einzelmutanten	82
3.4.1.2	Herstellung der <i>cot1/zrc1</i> -Doppelmutante	82
3.4.2	Bestimmung der Minimalen InhibitorKonzentration (MIC) von Schwermetallen für die Einzelmutanten sowie die Doppelmutante	85
3.4.3	Toxizitätstest in Flüssigkulturen	86
3.4.4	Komplementation der Mutationen	88

Inhaltsverzeichnis

3.4.4.1	<i>ZRC1</i> komplementiert die <i>zrc1</i> -Mutante	88
3.4.4.2	<i>ZATI</i> komplementiert die Mutanten nicht	89
3.4.4.3	<i>czcD</i> komplementiert die Mutanten nicht	90
3.4.5	Metallakkumulation der <i>S. cerevisiae</i> -Mutanten	91
3.5	Untersuchungen an der Spaltheefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	93
3.5.1	Toxizitätsbestimmung der <i>zrc1</i> -Mutante im Vergleich zum Wildtyp	93
3.5.2	Aufnahme radioaktiver Metalle durch <i>S.pombe zrc1</i> -Mutante und Wildtyp	95
3.5.3	Akkumulation radioaktiver Metalle in <i>S.pombe zrc1</i> -Mutante und Wildtyp	96
4.	DISKUSSION	98
4.1	Der Zink-Transporter <i>Zat1p</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> ist der erste pflanzliche Vertreter der CDF-Proteinfamilie	98
4.2	In Liposomen funktionell rekonstituiertes <i>Zat1p</i> transportiert Zn^{2+} -Ionen	105
4.3	<i>Zat1p</i> bindet Zn^{2+} -Ionen an der putativen Bindestelle zwischen den transmembranen Helices IV und V	107
4.4	<i>Zat1p</i> aus <i>A. thaliana</i> komplementiert die Funktion von <i>CzcD</i> in <i>R. metallidurans</i>	110
4.5	Die Hefemutanten <i>cot1</i> , <i>zrc1</i> und <i>cot1/zrc1</i> reagieren mit verändertem Resistenzverhalten auf die Anwesenheit der Schwermetallsalze $ZnCl_2$, $CoCl_2$ und $CdCl_2$	113
4.6	<i>Zrc1p</i> der Hefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ist ein Metall-Transporter der Vakuolenmembran, der Resistenz gegenüber Zink und Cobalt vermittelt	118
5.	ZUSAMMENFASSUNG	123
6.	LITERATURVERZEICHNIS	125

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> (Proteinfamilie)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDP- <i>Star</i> [™]	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
cpm	<i>counts per minute</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithioeritol
dw	<i>dry weight</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LiOAc	Lithiumacetat
M	Molarität
MFP	<i>Membran Fusion Protein</i>
mg	Milligramm
MIC	Minimale Inhibitor-Konzentration
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
nt	Nukleotide
NA	Nähragar
NaAc	Natriumacetat
NB	Nährbouillon
OD	optische Dichte
OMF	<i>Outer Membrane Factor</i> (Proteinfamilie)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	pounds per square inch
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>R. metallidurans</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RND	<i>Resistance, Nodulation, Cell division</i> (Proteinfamilie)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

RT-PCR	<i>Reverse Transcription-</i> Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cucubalis</i>	<i>Silene cucubalis</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
VIS	<i>visible</i>
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-D-galaktopyranosid
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

1. EINLEITUNG

Alle lebenden Organismen dieser Erde sind sich ständig verändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Dazu gehören Temperaturschwankungen, die Verringerung der schützenden Ozonschicht oder die Kontamination von Sedimenten und Gewässern. Deshalb haben viele Organismen Systeme entwickelt, die ein Überleben ihrer Art trotz widriger Umweltbedingungen ermöglichen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Rolle der Schwermetall-Ionen, von denen Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} in nanomolaren Konzentrationen lebensnotwendig sind. In höheren Konzentrationen sind diese Metall-Ionen, wie auch die nichtessentiellen Schwermetall-Ionen Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} und Pb^{2+} , extrem toxisch (van Assche and Clijsters, 1990; Gadd, 1993; Ragan and Mast, 1990). Während in einigen Ökosystemen Schwermetallmangel auftreten kann (Zn^{2+} -Mangel: Ruel and Bouis, 1989), werden andere Gebiete durch Verwitterung und die zunehmende Industrialisierung mit steigenden Schwermetall-Konzentrationen belastet. Entscheidendes Kriterium für die Toxizität ist jedoch nicht die absolute Konzentration des Metalls, sondern dessen Bioverfügbarkeit (Traina and Laperche, 1999). In Abhängigkeit vom chemischen und physikalischen Zustand eines Metalls und seiner Umgebung ist die Bioverfügbarkeit eine sehr variable und ortsspezifische Größe (Brown *et al.*, 1999), die meistens nicht mit der absoluten Konzentration korreliert. Sowohl Mangel als auch Überschuss an Metallen beeinflussen die Homöostase der Organismen auf vielfältige Weise.

Die toxische Wirkung der Schwermetalle beruht hauptsächlich auf dem Vermögen der Zweiwertigen Kationen, mit Thiol-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, Imidazol- und anderen funktionellen Gruppen von Proteinen zu interagieren oder Cofaktoren essentieller Proteine zu verdrängen, was zum Funktionsverlust vieler Proteine führt. Für Pro- und Eukaryoten sind ganz unterschiedliche Mechanismen bekannt, um sich vor den schädlichen Metallkonzentrationen zu schützen. Während die überschüssigen Metalle in Eukaryoten vorwiegend komplexiert und in der Vakuole sequestriert werden (MacDiarmid *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997), besitzen Prokaryoten hauptsächlich Efflux-Systeme, um das toxische Metall aus dem Cytosol in das umgebende Medium zu transportieren (Nies, 1999).

Metallmangel hingegen kann zum Ausfall essentieller Stoffwechselprozesse führen, wenn die Funktion Metall-enthaltender oder abhängiger Enzyme gestört ist. So ist Zink unentbehrlich für die Funktion von mehr als 300 Enzymen (Coleman, 1998), wie RNA- und DNA-Polymerasen, Hydrogenasen, Alkalische Phosphatase, Cu/Zn-Superoxiddismutase oder Carboxipeptidase. Zn-Finger, Zn-Cluster und RING-Finger-Domänen sind Merkmal vieler Transkriptionsregulatoren. 3 % aller Genprodukte von *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* enthalten typische Zn-Bindedomänen (Böhm *et al.*, 1997; Clarke and Berg, 1998). Kupfer spielt eine große Rolle bei Oxidations- und Reduktionsvorgängen und ist z.B. Bestandteil von Cytochrom-Oxidase, Dopamin β -Hydroxylase und Cu/Zn-

Superoxiddismutase (DiDonato and Sarkar, 1997). Cobalt ist Bestandteil des Vitamin B12 (Carty *et al.*, 1974), sowie der erst kürzlich beschriebenen Nitril-Hydratasen (Kobayashi and Shimizu, 1998).

Bakterien können ihren Stoffwechsel aufgrund ihrer hohen Reproduktions- und Mutationsrate sowie dem Gentransfer durch Plasmide sehr schnell und effektiv an veränderte Umweltbedingungen anpassen. Bei hohen Metallkonzentrationen außerhalb der Bakterienzelle gelangen die Metallkationen über schnelle und unspezifische Aufnahmesysteme (CorA-Mg²⁺-Aufnahmesystem) in die Zelle (Smith *et al.*, 1995). Hier kann eine Bindung und damit verbundene „Inaktivierung“ der Kationen durch das Peptid Glutathion (Hultberg, 1998) oder durch Metallothioneine (Turner *et al.*, 1993) erfolgen. Desweiteren können Quecksilber (Hg²⁺) zum flüchtigen Hg⁰ (Schiering *et al.*, 1991) oder Cr⁶⁺ zum weniger toxischen Cr³⁺ (Peitzsch *et al.*, 1998) reduziert werden. Weitverbreitet, aber an einen hohen Energieaufwand gekoppelt, ist der Efflux der Kationen ins umgebende Medium. Die hierfür benötigte Energie stammt entweder aus der ATP-Hydrolyse (P-Typ ATPasen) oder der protonenmotorischen Kraft (PMF) durch den Protonengradient über der Membran (H⁺/Kationen-Antiporter). Ein gut untersuchtes schwermetallresistentes Bakterium ist *Ralstonia metallidurans* CH34 (früher *Alcaligenes eutrophus*; Brim *et al.*, 1999), das mehrere verschiedene Schwermetall-Resistenzen besitzt. Seine beiden Megaplasmide pMOL28 und pMOL30 kodieren für mindestens acht Schwermetall-Determinanten. Das kleinere Plasmid pMOL28 (180 kb; Taghavi *et al.*, 1997) kodiert für die Chromat- (Nies *et al.*, 1998; Peitzsch, 1999) und eine Quecksilberresistenz (Diels *et al.*, 1985) sowie für die Resistenz gegen Cobalt und Nickel (Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993). Auf dem größeren Plasmid pMOL30 (238 kb; Mergeay *et al.*, 1985) befinden sich Gene für Resistenzen gegen Cobalt, Zink und Cadmium (Nies *et al.*, 1987), Blei (Mergeay, 2000), Kupfer (Dressler *et al.*, 1991) und Quecksilber (Diels *et al.*, 1985). Eine weitere Resistenzdeterminante gegen Quecksilber befindet sich auf dem Bakterienchromosom (Dressler *et al.*, 1991).

Die Resistenz gegenüber Cobalt, Zink und Cadmium beruht auf einem aktiven Efflux der Metall-Kationen vom Cytoplasma über beide Membranen ins Außenmedium (Nies and Silver, 89). Kernstück des Czc-Efflux-Komplexes sind das RND-(*Resistance Nodulation Cell Division*)-Protein CzcA (Goldberg *et al.*, 1999), das MFP (*Membrane Fusion Protein*) CzcB (Saier *et al.*, 1994) und der OMF (*Outer Membrane Factor*) CzcC. Desweiteren gehören zum System mindestens sechs Regulatorproteine, deren Gene in zwei Regionen stromaufwärts (*czcN* und *czcI*) bzw. stromabwärts (*czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE*) in der gleichen Orientierung wie die Strukturgene *czcCBA* transkribiert werden (Grosse *et al.*, 1999). Den Proteinen CzcN und CzcI, die in der *Upstream Regulatory Region* (URR) kodiert werden, konnten bisher noch keine Funktionen zugeordnet werden. Das in der *Downstream Regulatory Region* (DRR) kodierte CzcD gehört zu den ersten Vertretern der Familie der *Cation Diffusion Facilitators*

(CDF) und ist selbst eine eigenständige Homöostase-Efflux-Pumpe (Anton *et al.*, 1999). Das periplasmatisch lokalisierte CzcE weist große Homologie zu CopH auf, welches für die vollständige Ausprägung der Kupfer-Resistenz in *R. metallidurans* essentiell ist. CzcR+S bilden ein Zwei-Komponenten-System aus Histidin-Sensor-Kinase und *Response*-Regulator (van der Lelie *et al.*, 1997).

Anders als die Bakterien antworten Pflanzen unter anderem mit der Synthese von Phytochelatinen auf Metallstress (de Miranda *et al.*, 1990; Grill and Zenk, 1989). Hierbei handelt es sich um niedermolekulare Peptide, die aus mehreren $(\gamma \text{ Glu-Cys})_n$ Gly-Einheiten aufgebaut sind. Die Komplexierung der Metalle (hauptsächlich Cadmium) erfolgt durch Thiolatbildung mit den Sulfhydrylgruppen der Cysteine. Howden *et al.* (1995) konnten zeigen, daß die Cd^{2+} -Sensitivität einer *Arabidopsis*-Mutante (*cad1 cad2*) auf einem Defekt in der Phytochelatinsynthese beruht. Keinen Effekt zeigte diese Mutante gegenüber Cu^{2+} und Zn^{2+} . Kupfer-Ionen werden in Pflanzen fast ausschließlich durch Metallothioneine komplexiert (Zhou and Goldsbrough, 1994), während Glutathion verschiedene Metalle (As, Cd, Cu, Hg, Zn) bindet und transferiert (Freedman *et al.*, 1989). Die Phytochelatinsynthese aus *A. thaliana* (AtPcs1p) bindet selbst Cd^{2+} -Ionen und vermittelt dadurch bereits geringe Cd-Resistenz (Vatamaniuk *et al.*, 1999). Die extrazelluläre Komplexierung der Metall-Ionen durch organische Säuren, als Malat oder Citrat, ist ein wesentlicher Mechanismus der Aluminium-Toleranz. Delhaize and Ryan (1995) konnten zeigen, daß die Al-Toleranz von Weizen mit einem erhöhten Malat-Efflux aus den Wurzelspitzen verbunden ist, der wiederum durch Aluminium stimuliert wird. Auch Al-tolerante *Arabidopsis*-Pflanzen weisen einen erhöhten Efflux organischer Säuren in den Wurzeln auf (Larsen *et al.*, 1998). Desweiteren kann die Toleranz verschiedener Pflanzen gegenüber hohen Schwermetallkonzentrationen auf einer Blockierung der Aufnahmesysteme oder auf Detoxifikation und Kompartimentierung beruhen. Dabei kommt es zur Aktivierung der Metalle, die anschließend mittels Transferase an hydrophile Substanzen wie Glutathion, Glucose oder Malonat gekoppelt und in die Vakuole transportiert werden. Die Komplexierung durch Metallothioneine bewirkt eine konstitutive Kupfer-Toleranz in *Arabidopsis* (Zhou and Goldsbrough, 1994).

Angetrieben wird die noch am Beginn stehende Aufklärung des Metallstoffwechsels der Pflanzen durch eine mögliche Nutzung der Pflanzen zur Dekontaminierung verseuchter Böden (Phytoremediation) auf der einen, und die Veredlung pflanzlicher Nahrungsmittel (erhöhter Mineraliengehalt) auf der anderen Seite (Salt *et al.*, 1998; Gleba *et al.*, 1999). Auch wenn der Einsatz gentechnisch veränderter Organismen nicht unumstritten ist, liegt hier ein großes Potential zur Überwindung globaler Probleme der Menschheit. Während Untersuchungen der nichtessentiellen Schwermetalle hauptsächlich der Entwicklung von Pflanzen zur Phytoremediation dient, sollen die Transportmechanismen einiger essentieller Metalle bei der Konstruktion hochwertiger Nahrungsmittel Anwendung finden. Im Mittelpunkt steht hierbei

das Eisen, da Eisenmangel weltweit die führende Nahrungsmittelstörung ist (Grusak and DellaPenna, 1999). Der limitierende Schritt bei der Fe-Aufnahme aus dem Boden ist die Reduktion des Fe^{3+} zum Fe^{2+} (Grusak *et al.*, 1990) durch die membrangebundene Fe^{3+} -Chelat-Reduktase Fro2p. Eide *et al.* (1996) exprimierten das *Arabidopsis thaliana* Gen *IRT1* in einer Hefemutante mit defekter Fe-Aufnahme (*fet3 fet4*) und beobachteten eine Aufhebung des Defekts. Obwohl Irt1p weder mit dem hochaffinen Fe^{2+} -Transporter Ftr1p der Hefe noch mit dem niedrigaffinen Fe^{2+} -Transporter Fet4p der Hefe strukturelle Ähnlichkeit aufweist, scheint Irt1p der Fe^{2+} -Transporter zur Aufnahme des Fe^{2+} aus dem Boden zu sein. Unter Eisenmangel-Bedingungen wurde nur in der Wurzel von *A. thaliana* *IRT1* mRNA nachgewiesen. Die Speicherung des Eisens in den Pflanzen erfolgt durch das Chloroplasten-Protein Ferritin (Harrison and Arosio, 1996). Die Überexpression des Speicherproteins Ferritin in *A. thaliana* und Tabak führt zu einem erhöhten Fe-Gehalt der Pflanze, aber diese verhält sich wie eine Pflanze unter Eisenmangel-Bedingungen (Wuytswinkel *et al.*, 1999; Wuytswinkel *et al.*, 1998). Deshalb ist eine strenge Regulation von Aufnahme, Speicherung und Transport innerhalb der Pflanze unabdingbar. Desweiteren muß die Konkurrenz der Metalle untereinander betrachtet werden. So konnte am Modell der Hefe gezeigt werden, daß die Expression des *IRT1* kodierten Transporters unter Eisenmangel-Bedingungen zu einer erhöhten unspezifischen Aufnahme von Zink, Mangan und Cadmium führt (Welch *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1998). Diese unspezifische Cadmium-Aufnahme in die Pflanze ist der Hauptzugang in die Nahrungskette und somit eine ernstzunehmende Gefahr für die menschliche Gesundheit. Andererseits kann man dieses und weitere Aufnahmesysteme vielleicht schon in Kürze für eine gezielte Akkumulation von Metallen aus kontaminierten Böden anwenden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist nur die funktionelle Expression der bakteriellen Hg^{2+} -Reduktase (*merA*) in transgenen *Arabidopsis*- (Rugh *et al.*, 1996) und Pappel-Pflanzen (Rugh *et al.*, 1998) bekannt. Das weniger toxische und flüchtige Hg^0 wird nach der Reduktion durch die transgenen Pflanzen freigesetzt.

Zinkdefizit führt bei einigen Pflanzen (Obstbäume, Mais, Hopfen) zu sichtbaren Schäden, wie Zwergwuchs, spärlicher Belaubung, kleinen Blättern oder Chlorose. Grotz *et al.* (1998) identifizierten kürzlich in *Arabidopsis thaliana* die ersten pflanzlichen Zn-Transporter (*ZIP*-Familie), deren Gene *ZIP1* und *ZIP3* unter Zn-Mangel in den Wurzeln exprimiert werden, was darauf schließen läßt, daß die Genprodukte mit hoher Affinität Zn^{2+} vom Boden in die Pflanze transportieren. Die Expression von *ZIP4* unter Zn-Mangel in den Wurzeln und in den Trieben läßt vermuten, daß es sich hierbei um einen intrazellulären Zn-Transporter mit einer potentiellen Chloroplasten-Zielsequenz handelt. Im Gegensatz dazu wurde zeitgleich in *Arabidopsis* das *ZAT1* Gen beschrieben, welches bei Überexpression in transgenen Pflanzen unter Zn-Streß zu erhöhter Resistenz durch verstärkte Zn-Akkumulation in den Wurzeln führt (van der Zaal *et al.*, 1999). Die Expression ist jedoch nicht Zink induziert, sondern konstitutiv in allen Pflanzenteilen. Es ist möglich, daß die Resistenz auf einem Transport des Zinks in die

Vakuole beruht, wie es bereits bei der Zn-toleranten *Silene vulgaris* nachgewiesen wurde (Verkleij *et al.*, 1998).

Eine Form der Adaptation an hohe Metallkonzentrationen in der Umgebung ist die verstärkte Akkumulation der Metalle durch die Pflanze. Normale Metalltoleranz entspricht einer Akkumulation von 10-100 µg Metall pro Gramm Trockengewicht. Hyperakkumulierende Pflanzen haben einen Metallgehalt ≥ 10 mg/g Trockengewicht. Bisher sind über 400 solcher Pflanzenspezies bekannt, darunter 16, die Zink hyperakkumulieren. Während das Windengewächs *Ipomoea alpina* bis zu 10 mg Kupfer pro Gramm Trockengewicht anreichert, kann das Hellerkraut *Thlaspi caerulescens* bis zu 40 mg Zink pro Gramm Trockengewicht tolerieren (Grill and Zenk, 1989). Pence *et al.* (2000) stellten bei vergleichenden Untersuchungen mit dem hyperakkumulierenden Hellerkraut *Thlaspi caerulescens* und dem nicht akkumulierenden Hellerkraut *Thlaspi arvense* fest, daß die Zn^{2+} -Akkumulation durch eine hohe Expression des hochaffinen Zn-Transporters *ZNT1* in *Thlaspi caerulescens* hervorgerufen wird. Möglicherweise hat eine Mutation im putativen Zn-abhängigen Transkriptionsaktivator die Expressionsregulation von *ZNT1* unter Zn-Streß verändert.

Als Modellorganismus bei der Untersuchung von Stoffwechselmechanismen der Eukaryoten wird häufig die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Die hohe Reproduktionsrate und die einfache Handhabung dieser einzelligen Eukaryoten begünstigen viele Ergebnisse in kürzester Zeit. Sind Gene und die Funktion der entsprechenden Proteine erst aufgeklärt, dann werden die Hefe-Mutanten mit dem Genom von Pflanzen und Tieren komplementiert, um funktionell homologe Proteine der Eukaryoten aufzuspüren und charakterisieren zu können. Ein Viertel aller klonierten Gene menschlicher Krankheiten haben entsprechende homologe Hefesequenzen, und viele dieser menschlichen Gene entfalten ihre Funktion im Hefe-System (Bassett *et al.*, 1996). Sehr gut untersucht ist die Verknüpfung von Eisen- und Kupfer-Stoffwechsel der Hefen. Cu^{2+} wird nach Reduktion zu Cu^{1+} durch die Fre1p Reduktase über die beiden hochaffinen Cu-Transporter Ctr1p und Ctr3p (Dancis *et al.*, 1994) sowie den vermutlich niedrigaffinen Transporter Ctr2p (Kampfenkel *et al.*, 1995) in die Zelle aufgenommen. Nach Komplexierung des Cu^{2+} durch das cytosolische „Chaperon“ Atx1p (Lin and Culotta, 1995; Lin *et al.*, 1997) wird überschüssiges Cu^{2+} durch die *CCC2* kodierte P-typ ATPase ins Golgi Kompartiment des sekretorischen Systems transportiert (Fu *et al.*, 1995). Das hier freigesetzte Cu^{2+} wird in das *FET3* Genprodukt eingebaut, eine Multi-Kupfer-Oxidase, die Bestandteil des hochaffinen Fe-Aufnahmesystems ist (Askwith *et al.*, 1994). Während die Fet3p Oxidase das Fe^{2+} in Fe^{3+} umwandelt, transportiert die *FTR1* kodierte Permease Fe^{3+} ins Cytosol (Stearman *et al.*, 1996). Eisenmangel führt zu erhöhter Genexpression von *FRE1*, *FET3*, *FTR1* und *CCC2* durch Bindung des Transkriptionsaktivators Aft1p, der wiederum durch Fe^{2+} inhibiert wird (Casas *et al.*, 1997). Kupfer-Defizit führt zu verringerter Fe^{2+} -Aufnahme, wenn nicht ausreichend Cu^{2+} für den

Einbau in die *FET3* kodierte Oxidase verfügbar ist. Kommt es nun zu Fe^{2+} -Mangel, so ist die Cu^{2+} -Aufnahme durch fehlende Fre1p Reduktase-Aktivität blockiert. Die Aktivität der $\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$ spezifischen Reduktase Fre1p und des Cu^{1+} spezifischen Ctr1p Transporters werden auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit vom Kupfer-Status der Zelle durch den Transkriptionsaktivator Mac1p reguliert (Georgatsou *et al.*, 1997; Jungmann *et al.*, 1993).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen der Nachweis und die funktionelle Charakterisierung von pflanzlichen Proteinen, die Homologie zu einer neuen Familie von Schwermetall-Transport-Proteinen aufweisen. Bereits 1995 beschrieben Nies und Silver die CDF-Proteinfamilie (*Cation Diffusion Facilitator*), deren 4 Mitglieder als membrangebundene Proteine in den Transport von Zink, Cadmium und Cobalt involviert sind. Neben CzcD aus *Ralstonia metallidurans*, dem ersten Vertreter dieser Familie, gehören dazu die Hefe-Proteine Zrc1p und Cot1p, die Zink-, Cadmium- bzw. Cobaltresistenz vermitteln, sowie die Zink-Transporter Znt1p bis Znt4p der Säugetiere (Ratte, Maus, Mensch). Die Experimente basierten auf den Gensequenzen dieser Proteine und Daten von *czcD* aus *R. metallidurans*, die im Rahmen einer Diplomarbeit erhalten wurden (Schwuchow, 1995). Unter Verwendung von Hybridisierungs- und PCR-Techniken wurde das Genom verschiedener Pflanzen nach homologen Gensequenzen durchsucht. Während dieser Untersuchungen wurden durch die rasante Entwicklung der Sequenzieretechnik ständig neue homologe Sequenzen in den Datenbanken gefunden, jedoch keine aus Pflanzen. Um die Funktion der CDF-Proteine zu untersuchen, wurden die *S. cerevisiae*-Mutanten *zrc1* und *cot1* sowie die Doppelmutante *zrc1/cot1* konstruiert. Im Gegensatz dazu erfolgten weitere Studien an einem prokaryotischen System. *R. metallidurans* AE128 und der ΔczcD -Deletionsstamm DN182 wurden für diese Experimente mit verschiedenen CDF-Proteinen komplementiert.

Beim regelmäßigen Durchsuchen der Sequenzdatenbanken wurde 1998 ein *Arabidopsis thaliana* Gen identifiziert, das ein putatives CDF-Protein kodiert. Dieses Gen wurde kloniert, exprimiert und das Protein gereinigt. Während einige Experimente (Rekonstitution in Liposomen, Metall-Aufnahme-Messungen) mit dem gereinigten Protein durchgeführt wurden, beschrieben es van der Zaal *et al.* (1999) als Zat1p (Zn-Transporter von A. *thaliana*). Somit erfolgte die Charakterisierung eines Zn-Transporters aus *A. thaliana*, dem ersten pflanzlichen Vertreter der CDF-Proteinfamilie.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme und Hefestämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Stämme

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Ralstonia metallidurans</i>			
AE104	plasmidfrei		Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE128	pMOL30	CobB ^r , Zin ^r , Cad ^r (<i>czc</i> -Determinante)	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN182	(pMOL30-ΔD)	Δ <i>czcD</i>	Stammsammlung der AG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
YPH499	plasmidfrei	ura3-52 lys2-801 ^{amber} ade2-101 ^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 mating typ a	Stratagene GmbH, Heidelberg
YPH500	plasmidfrei	ura3-52 lys2-801 ^{amber} ade2-101 ^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 mating typ α	Stratagene GmbH, Heidelberg
YK37 (INVSC2)	plasmidfrei	ura3-167 his3-Δ200 mating typ α	Stammsammlung der AG
YK38	plasmidfrei	Δ <i>COT1</i> :Kan ^r	diese Arbeit
YK39	plasmidfrei	Δ <i>ZRC1</i> :Kan ^r	diese Arbeit
YK40	plasmidfrei	Δ <i>COT1</i>	diese Arbeit
YK41	plasmidfrei	Δ <i>ZRC1</i>	diese Arbeit
YK42	plasmidfrei	Δ <i>COT1</i> Δ <i>ZRC1</i> :Kan ^r	diese Arbeit
YK43	plasmidfrei	Δ <i>ZRC1</i> Δ <i>COT1</i> :Kan ^r	diese Arbeit
YK44	plasmidfrei	Δ <i>COT1</i> Δ <i>ZRC1</i>	diese Arbeit
YK45	pECD 711	Δ <i>COT1</i>	diese Arbeit
YK46	pECD 712	Δ <i>COT1</i>	diese Arbeit
YK47	pECD 710	Δ <i>COT1</i> Δ <i>ZRC1</i> <i>czcD</i>	diese Arbeit
YK48	pYES2	Δ <i>COT1</i> Δ <i>ZRC1</i>	diese Arbeit
YK49	pECD 708	Δ <i>COT1</i> Δ <i>ZRC1</i> <i>ZAT1</i>	diese Arbeit
YK50	pECD 709	Δ <i>COT1</i> Δ <i>ZRC1</i> Δ <i>ZAT1</i>	diese Arbeit
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			
FY261	plasmidfrei	h ⁺ <i>ade6-M216 leu1-32 ura4-Δ18 can1-1</i>	Dr. Clemens, IBP Halle
FY261/Δ <i>Zrc</i>	plasmidfrei	Knock-out durch Insertion des <i>leu2</i> -Markers	Dr. Clemens, IBP Halle
<i>Escherichia coli</i>			
JM83	plasmidfrei	F ⁺ <i>ara</i> Δ(<i>lac</i> – <i>proAB</i>) <i>rpsL</i> (str ^r) <i>thi</i> φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	Vieira and Messing 1982
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987

2. Material und Methoden

XL1-Blue MRF ⁺ Kan	plasmidfrei	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMRmrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, lac [F' proAB, lacI^q\Delta M15, Tn5 (kan^r)]$	Stratagene GmbH, Heidelberg
XL2-Blue	plasmidfrei	<i>recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44, relA1 lac [F' proAB, lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>	Stratagene GmbH, Heidelberg
ER 2566	plasmidfrei	<i>F' λ fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 $\Delta(mcrC-mrr) 114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]; T7$-Expressionsstamm</i>	NewEngland BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
BL21(DE3) pLysS	plasmidfrei	<i>E. coli B F dcm ompT hsdS(r_B-m_B-) galI (DE3) [pLysS Cam^r]</i>	Stratagene Europe, Amsterdam
VS 126	pUBS 520	<i>E. coli B F dcm ompT hsdS(r_B-m_B-) galI (DE3) [pLysS Cam^r] Kan^r lacI^q argU (Expression des Zat-Gens)</i>	diese Arbeit
S17-1		<i>proA2 Tra⁺ recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
LE 392	plasmidfrei	<i>hsdR514 hsdM supE44 supF58 lacY1 galK2 galT22 metB1 trpR55</i>	Maniatis <i>et al.</i> , 1982
XLOLR	plasmidfrei	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proAB lac^q\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]^c$	Stratagene GmbH, Heidelberg

2.1.2 Pflanzen und DNA-Banken

Für die Versuche mit Pflanzenmaterial wurden folgende Pflanzenkulturen/DNA-Banken eingesetzt.

A) Zellsuspensionskultur der Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus)

Anlage, Passagierung und Kultivierungsbedingungen wurden von Tewes *et al.*, 1984 beschrieben. Die Anzucht erfolgte in 500 ml Standrundkolben bei 28 °C im Dunkeln auf Rundschüttlern (140 rpm).

B) -Pi-cDNA-Bank einer Tomaten-Zellkultur

Zur Isolierung von cDNA-Klonen mit CDF-Protein homologen Genen wurde eine aus der mRNA (isoliert aus 48 h in Pi-freier Nährlösung kultivierten Tomatenzellen) hergestellte cDNA-Expressionsbank verwendet. Diese wurde von Frau Dr. Köck zur Verfügung gestellt (Köck *et al.*, 1995).

C) *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Ackerschmalwand), zur Verfügung gestellt von Dr. Scheel (IPB Halle)

2. Material und Methoden

D) *Nicotiana tabacum* Pflanzen (Tabak), zur Verfügung gestellt von Dr. Scheel (IPB Halle)

E) *Silene cucubalis* Pflanzen (Taubenkropf-Leimkraut), zur Verfügung gestellt von Dr. Neumann (IPB Halle)

F) *Silene cucubalis* cDNA-Bank, zur Verfügung gestellt von Dr. Neumann (IPB Halle)

2.1.3 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Plasmide

Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
pGEM [®] -T Easy	Amp ^r , <i>lacPOZ</i> , zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, WI-USA
pUC18	Amp ^r , <i>lacPOZ</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19	Amp ^r , <i>lacPOZ</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pBluescript II KS M13 (+)	Amp ^r <i>lacZα</i>	Stratagene, Heidelberg
pVDZ'2	Tet ^r IncP1 <i>lacZ'</i> Mob ⁺ Tra ⁻	Deretic <i>et al.</i> , 1987
pVK102	Tet ^r Kan ^r	Knauf and Nester, 1982
pASK-IBA3	Amp ^r Streptag II (C-terminal)	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA5	Amp ^r Streptag II (N-terminal)	IBA GmbH, Göttingen
pUBS520	Kan ^r <i>lacI^q</i> <i>argU</i> (ermöglicht Expression des <i>Zat</i> -Gens)	Brinkmann, 1990
123pep	123pep-PCR-Produkt <i>Sma</i> I in pUC18	Leister <i>et al.</i> , 1996
pRS 404	Amp ^r <i>trp1 lacZα</i> (yeast integrating plasmid)	Stratagene, Heidelberg
pRS 405	Amp ^r <i>leu2 lacZα</i> (yeast integrating plasmid)	Stratagene, Heidelberg
pYES 2	Amp ^r <i>ura3</i>	Stratagene, Heidelberg
pUG 6	Amp ^r <i>kan^r loxP</i>	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pSH 47	<i>ura3 cre</i>	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pECD 526	250bp 123pep PCR-Produkt aus Tomate in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 527	250bp 123pep PCR-Produkt aus <i>Silene cucubalis</i> in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 688	<i>Zat</i> -Gen <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pDNA 308	<i>Zat</i> -Gen <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> in pVDZ'2	diese Arbeit
pECD 689	1,3kb <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment aus as 1 in pRS 404	diese Arbeit
pECD 690	1,3kb <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment aus as 1 in pRS 405	diese Arbeit
pECD 691	Δ <i>CotI SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 692	Δ <i>ZrcI SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 693	Δ <i>CotI SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pRS 404	diese Arbeit
pECD 694	Δ <i>CotI SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pRS 405	diese Arbeit

2. Material und Methoden

pECD 695	$\Delta ZrcI$ <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pRS 404	diese Arbeit
pECD 696	$\Delta ZrcI$ <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pRS 405	diese Arbeit
pECD 697	<i>Zat</i> <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 698	<i>Zat</i> <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment aus pECD 697 in pASK3	diese Arbeit
pECD 699	<i>Zat</i> <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pASK5	diese Arbeit
pECD 700	ΔZat <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 701	ΔZat <i>SacII</i> / <i>PstI</i> -Fragment aus pECD 700 in pASK3	diese Arbeit
pECD 702	1300bp <i>ZrcI</i> -PCR-Produkt in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 703	2300bp <i>ZrcI</i> -PCR-Produkt in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 704	1300bp <i>czcD</i> -PCR-Produkt in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 705	<i>Zat</i> mit RBS in pGEM [®] -T Easy	diese Arbeit
pECD 706	<i>Zat</i> <i>EcoRI</i> aus pECD 688 in sense in pYES2	diese Arbeit
pECD 707	<i>Zat</i> <i>EcoRI</i> aus pECD 688 in antisense in pYES2	diese Arbeit
pECD 708	<i>Zat</i> -Streptag aus pECD 698 in pYES2	diese Arbeit
pECD 709	ΔZat -Streptag aus pECD 701 in pYES2	diese Arbeit
pECD 710	<i>czcD</i> aus pECD 704 in pYES2	diese Arbeit
pECD 711	<i>ZrcI</i> aus pECD 702 in pYES2	diese Arbeit
pECD 712	<i>ZrcI</i> aus pECD 703 in pYES2	diese Arbeit
pECD 713	<i>Zat</i> mit RBS aus pECD 705 in pYES2	diese Arbeit

2.2 Kultivierungsbedingungen für Bakterien

2.2.1 Nährmedien und Zusätze

A) Nährbouillon I (SIFIN GmbH, Berlin)

25 g Nährbouillon I

ad 1 l H₂O

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

B) Nutrient Broth NB-Medium

6.7 g Nutrient Broth

ad 1 l H₂O

Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*- und *Ralstonia metallidurans* - Stämmen für Konjugations-Experimente.

C) Nähragar (SIFIN GmbH, Berlin)

36.5 g Nähragar I bzw. 26 g Nähragar II

ad 1 l H₂O

Diese Festmedien dienten der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

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

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g Natriumchlorid
NaOH ad pH 7.0
ad 1 l H₂O

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

E) Top-Agar

LB-Medium wird mit 0,7 % (w/v) Agar versetzt. Mit diesem Agar werden LB-Platten zur Herstellung von Bacteriophagenplatten überschichtet.

F) Spurenelementlösung SL6 (10 fach) nach Pfennig (1974)

900 ml H₂O
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 Na₂Mo₄ x 2 H₂O ad 1 l H₂O

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

Komponente A (20 fach):

800 ml H₂O
121.1 g Tris-HCl
HCl ad pH 7.0
danach Zugabe von:
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 (10 fach) nach Pfennig (1974)
ad 1 l H₂O

Komponente B (20 fach):

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

2. Material und Methoden

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Für die Anzucht von *Ralstonia metallidurans* im Flüssigmedium wurden 2 g/l Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle zugesetzt und mitsterilisiert.

Für Tris-Minimal-Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 2 g/l Natriumgluconat und 15 g/l (bei Zugabe von Metallsalzen 20 g/l) Bacto-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt.

H) Medienzusätze

I. Schwermetallsalze

Die Schwermetallsalze ZnCl₂, CoCl₂, CdCl₂ lagen als 1 M bzw. 0.1 M wässrige Stammlösungen vor. Die Stammlösungen wurden im sterilen Medium auf die beschriebenen Endkonzentrationen verdünnt.

II. 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 in Tabelle 3 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

Tab. 3: Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 g/l H ₂ O	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H ₂ O	25 mg/l (<i>E. coli</i>) 1 g/l (<i>Ralstonia metallidurans</i>)
Tetracyclin	12.5 g/l 50 % Ethanol	12.5 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l Ethanol (96 %)	20 mg/l
Streptomycin	10 g/l H ₂ O	10 mg/l

III. Weitere Medienzusätze

Als weitere Zusätze in den Nährmedien dienten der künstliche Induktor IPTG sowie das chromogene Substrat X-Gal. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C.

IPTG lag als wässrige Stammlösung von 200 g/l vor und wurde in einer Endkonzentration von 40 mg/l den sterilen Medien zugesetzt. 200 g/l X-Gal wurden in Dimethylformamid gelöst. Die Endkonzentration im Medium betrug 48 mg/l.

2.2.2 Zellanzucht, Induktion und Zellernte

Ralstonia metallidurans

Die Anzucht von *Ralstonia metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Medium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 2 g/l Natriumgluconat zugesetzt wurde. Für Konjugationsversuche wurde *Ralstonia metallidurans* in NB-Medium angezogen.

Als Kulturgefäße für die Anzuchten aller Stämme dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß ca. 1:5 betrug. Die Zugabe von Antibiotika und 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 (im Brutraum) für 1-5 Tage inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C in einer Laborzentrifuge (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) oder durch 15 s Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei 12000 rpm und Raumtemperatur.

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 und Erlenmeyerkolben, wobei ebenfalls auf ein Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C (Brutraum) in fast waagrecht eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (HS500, IKA Labortechnik) oder in Erlenmeyerkolben 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) gemessen. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 37 °C (im Brutraum) für 12-24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder durch 10 minütige Zentrifugation in einer Hettich-Zentrifuge (Universal 30 RF, Tuttlingen) bei 4 °C und 5000 rpm, in der Sigma-Laborzentrifuge bei 4 °C und 12000 rpm oder durch 30 s Zentrifugation in der Sigma Tischzentrifuge.

2.2.3 Stammhaltung

Die Kultivierung von *Ralstonia metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agar-Platten, wobei den plasmidtragenden Stämmen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt

wurden. 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 dem jeweiligen Antibiotikum entsprechender Konzentration 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. Um einer Kontamination der Stämme vorzubeugen, wurden alle Stämme mit neu konstruierten Plasmiden sowie die Stämme, mit denen ständig gearbeitet wurde, in Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Glycerin [Endkonzentration 20 % (v/v)] versetzt.

2.3 Kultivierungsbedingungen für Hefen

2.3.1 Nährmedien und Zusätze

S. cerevisiae-Stämme

A) YPD-Komplexmedium

- 10 g Hefeextrakt
- 20 g Bacto[®]-Pepton
- 20 g Glucose
- ad 1000 ml H₂O

B) Synthetisches Glucose Minimal-Medium (SD/Glucose)

- 6.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 20 g Glucose
- ad 1000 ml H₂O

C) Synthetisches Galaktose Minimal-Medium (SD/Galaktose)

- 6.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 20 g Galaktose
- ad 1000 ml H₂O

D) Supplementiertes Minimal-Medium (SMM)

- 6.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 20 g Glucose
- ad 1000 ml H₂O

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium die entsprechenden sterilfiltrierten Supplemente der Tabelle 4 zugegeben.

2. Material und Methoden

Tab. 4: Supplementstammlösungen und Endkonzentration im Medium

Supplement	Stock-Konzentration(g/100ml)	Volumen (ml) für 1l Medium	Endkonzentration im Medium (mg/l)
Adeninsulfat	0.2	10	20
Uracil	0.2	10	20
L-Tryptophan	1	2	20
L-Histidin-HCl	1	2	20
L-Leucin	1	3	30
L-Lysin-HCl	1	3	30

E) Festmedien

Zur Herstellung fester Medien wurde dem Nährmedium 2 % Bacto-Agar (w/v) zugesetzt.

Nach dem Autoklavieren und Gießen der Platten wurden diese 3 Tage bei RT getrocknet.

S.pombe-Stämme

A) Edinburgh-Minimal-Medium (EMM 2)

3 g Kaliumhydrogen-Phthalat

2.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

5 g NH_4Cl

20 g Glucose

20 ml 50 x Salz-Stock

1 ml 1000 x Vitamin-Stock

0.1 ml 10000 x Mineral-Stock

ad 1000 ml H_2O

50 x Salz-Stock (1Liter)

52.5 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0.735 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

50 g KCl

2 g Na_2SO_4

1000 x Vitamin-Stock (1Liter)

1 g Pantothersäure

10 g Nicotinsäure

10 g Inositol

10 mg Biotin

10000 x Mineral-Stock (1Liter)

5 g Borsäure

4 g MnSO₄

4 g ZnSO₄ x 7 H₂O

2 g FeCl₂ x 6 H₂O

0.4 g Molybdänsäure

1 g KI

0.4 g CuSO₄ x 5 H₂O

10 g Zitronensäure

B) Supplementiertes Minimal-Medium

EMM 2 + 225 mg/l Adeninsulfat und Uracil

C) Festmedien

Zur Herstellung fester Medien wurde dem Nährmedium 2 % Bacto-Agar (w/v) zugesetzt.

Nach dem Autoklavieren und Gießen der Platten wurden diese 3 Tage bei RT getrocknet.

2.3.2 Zellanzucht, Induktion und Zellernte

Saccharomyces cerevisiae

Die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen erfolgte in YPD-Komplexmedium oder in SMM mit entsprechenden Supplementen. Als Kulturgefäße dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß ca. 1:5 betrug. Die Zugabe von Supplementen und 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 (OD₆₀₀) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd., England) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30 °C (im Brutraum) für 1-5 Tage inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch 5 minütige Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C in einer Laborzentrifuge (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) oder durch 5 s Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei 12000 rpm und Raumtemperatur.

Schizosaccharomyces pombe

Die verwendeten *Schizosaccharomyces pombe*-Stämme wurden in EMM 2 mit oder ohne Supplementen angezogen. Die weitere Handhabung erfolgte, wie es für *S. cerevisiae* beschrieben wurde.

2.3.3 Stammhaltung

Die Kultivierung von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte auf SMM-Agar-Platten, wobei den verschiedenen Stämmen die zur Selektion notwendigen Supplemente zugesetzt wurden. Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so daß zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand.

S. pombe-Stämme wurden auf EMM2-Platten mit den entsprechenden Supplementen kultiviert. Die Stämme wurden alle vier Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 30 °C wurden alle Platten im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt. Um einer Kontamination der Stämme vorzubeugen, wurden alle Stämme mit neu konstruierten Plasmiden oder Veränderungen im Genom in Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Glycerin [Endkonzentration 20 % (v/v)] versetzt.

2.4 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.4.1 Isolierung von DNA

Da es für die Arbeit mit DNA erforderlich war, vorhandene DNasen zu inaktivieren, wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen vor Beginn der Versuche bei 121 °C autoklaviert. Hitzeinstabile Geräte wurden mit 70%igem Ethanol abgerieben, hitzelabile Lösungen filtersterilisiert.

2.4.1.1 Analytische Megaplasmidisolierung (nach Nies *et al.*, 1987)

Es wurden 10 ml einer *Ralstonia metallidurans*-Übernachtkultur abzentrifugiert und in 2 ml E-Puffer [75 mM Tris-Acetat (pH 7.3), 1 mM EDTA] resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lysispuffer [5 Teile 1 N NaOH + 6 Teile 200 g/l SDS + 9 Teile H₂O.] wurde 1 h bei 68 °C inkubiert. Es wurden 400 µl 5 M NaCl und 6 ml Phenol : Chloroform 1:1 (v/v) auf die heiße Probe gegeben und diese 20 mal kräftig aus dem Handgelenk geschwenkt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die Oberphase 1 h bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die wäßrige Phase in ein frisches 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, mit 100 µl 10 %iger Essigsäure neutralisiert und mit 6 ml Diethylether extrahiert. Zur vollständigen Phasentrennung wurde 5 min zentrifugiert. Ether- und Interphase wurden verworfen und verbliebene Etherreste bei 60 °C (10-20 min) verdampft. Die Megaplasmid-DNA wurde mit 6 ml eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol bei -70 °C für 30 min gefällt. Eine anschließende Zentrifugation bei 5000 rpm für 30 min bei 4 °C führte zur Sedimentation der DNA, die dann in 500 µl H₂O resuspendiert wurde. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl 5 M NaCl und 1 ml 96 % (v/v) Ethanol umgefällt (30 min bei -70 °C), mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und mittels Vakuumpumpe getrocknet. Das Megaplasmid-DNA-Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und 1 h bei 50 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.4.1.2 Isolation von *Ralstonia metallidurans* Gesamt-DNA nach Marmur (Johnson, 1981)

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Isolation von Gesamt-DNA, wie sie in abgewandelter Form für viele Bakterien durchführbar ist.

7.5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 15 min bei 4 °C und 4500 rpm abzentrifugiert (Hettich, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde in 7.5 ml Phosphatpuffer [10 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, pH 6.8] gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0.85 ml eiskalter Saccharose-Lösung [250 g/l Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] resuspendiert und auf Eis gelagert. Nach Einmischen von 0.1 ml Lysozym-Lösung [10 g/l Lysozym, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] verblieb der Ansatz für 15 min bei 30 °C im Wasserbad. Es wurden 1.25 ml Saccharose-Lösung, 0.1 ml Proteinase-K-Lösung [2.5 g/l Proteinase K, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] und 1.25 ml SDS-Lösung [15 g/l] zugegeben, für 3 h bei 37 °C und anschließend 15 min bei 55 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden folgende Chemikalien durch kräftiges Schwenken (10-15 min) eingemischt: 0.94 ml Natriumperchlorat-Lösung [5 M in H₂O], 1.25 ml Phenol/NaCl und 1.25 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:1). Nach Zentrifugation bei 4200 rpm und 20 °C für 20 min (Hettich Universal 30, RF, Tuttlingen) wurde die Oberphase abgenommen und in ein neues Greinerröhrchen überführt. Die stark viskose Lösung wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol von Phenolresten befreit, indem kräftig aus dem Handgelenk geschüttelt wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei 4200 rpm und 20 °C für 10 min wurde die wäßrige Oberphase abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe von 120 µl 10%iger Essigsäure zur Neutralisation der DNA. Es schloß sich die Extraktion mit 6 ml Diethylether an, indem erneut geschwenkt wurde, bis ein homogenes Gemisch entstand. Nach Zentrifugation (4500 rpm, 4 °C, 10 min) wurde die Unterphase in ein neues Röhrchen überführt und zum Abdampfen der Diethyletherreste bei 60 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 6 ml Ethanol (96 %) bei -20 °C über Nacht. Es wurde bei 4500 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert, das erhaltene Pellet in 500 µl H₂O resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es schloß sich eine zweite Fällung nach Zugabe von 10 µl 5 M NaCl-Lösung und 1 ml Ethanol (96 %) für 2 h bei -20 °C an. Es wurde 1 h bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Laborzentrifugen) und das dabei erhaltene Pellet im Vakuum getrocknet. Danach wurde die DNA in 250 µl H₂O bei 50 °C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.4.1.3 Mikroplasmidpräparation (nach Akada 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnte so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach überprüft werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) sowie 10 µl Stop-Mix [40 %

Glycerol (v/v), 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2TM, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) für 10 s und Zentrifugation für 3 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden ca. 25 µl des wäßrigen Überstandes im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.4.1.4 Miniplasmidisolierung (verändert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Diese Methode diente der schnellen Analyse von Plasmid-DNA, deren Reinheit für Restriktionsanalysen und PCR ausreichend war.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 3 ml Nährbouillon mit Antibiotika über Nacht. Davon wurden 1.5 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 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, 10 g/l SDS]. Es wurde gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III [3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure] zugesetzt, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) für 10 min bei 12000 rpm. Der Überstand wurde mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0.7 Vol Isopropanol. Nach dem Mischen wurde für 1 h bei 12000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend in 20 µl H₂O [mit 0.1 g RNaseA/I] aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.4.1.5 Präparative Plasmidisolierung (in Anlehnung an Birnboim und Doly, 1979; Große *et al.*, 1999)

Diese recht umfangreiche Plasmidisolierungstechnik diente zur Präparation großer DNA-Mengen von *low-copy*-Plasmiden (pVDZ'2).

Bis zum ersten Zentrifugationsschritt waren die Schritte gleich wie 2.4.1.4, allerdings wurde mit dem doppelten Volumen an Hauptkultur gearbeitet. Dann wurde der Überstand nochmals zentrifugiert und der Überstand mit 0.8 % Vol Isopropanol bei RT für 30 min gefällt. Die Pelletierung erfolgte über 30 min bei 5000 rpm und RT. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bevor es in 500 µl TE-Puffer gelöst wurde. 500 µl 4 M LiCl wurden zugegeben und der Ansatz auf Eis 30 min inkubiert. Wieder wurde 10 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C) und die DNA aus dem Überstand anschließend mit 1/10 Vol 3 M Na-Acetat und 2.5 Vol Ethanol gefällt. Erneut wurde zentrifugiert (25 min, 5000 rpm und 4 °C) und das Pellet in 300 µl TE gelöst. Jetzt konnte die Lösung zuerst für 30 min mit 2 µl RNase (50 mg/ml) bei 37 °C und dann für 15 min bei 37 °C mit 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) behandelt

werden. Vor Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion wurde das Volumen auf 500 μl mit H_2O aufgefüllt. Wieder wurde mit Na-Acetat und Ethanol die DNA gefällt (s.o.) und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das DNA-Pellet in 100 μl H_2O aufgenommen.

2.4.1.6 Plasmidisolation mittels QIAprep Spin Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H_2O eluiert.

Es wurden 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 12000 rpm pelletiert. Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

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

Diese Plasmidisolation beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Zellen und der DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule. Es handelt sich hierbei um eine Methode, mit der hochreine, kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA gewonnen werden konnte. Die DNA wurde auf eine Anionen-Austauscher-Säule (QIAGEN GmbH, Hilden) gegeben und anschließend mit 1.25 mM NaCl eluiert. Diese Methode vermeidet die Verwendung von Phenol. Mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Mini Kit* konnten kleinere Mengen von *low-copy* Plasmiden zur Analyse gewonnen werden. Es wurden 10 ml *E. coli*-Übernachtskultur aufgearbeitet und die Lösungen nach Anweisung des QIAGEN-Protokoll für Minipräparation mit QIAGEN-tip 20 eingesetzt. Mit dieser Methode konnte ebenfalls eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt werden. In diesem Fall wurde das "*Midi Plasmid Purification Protocol*" (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet.

2.4.1.8 Schnelle Isolation von Hefe-Gesamt-DNA

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur einfachen und schnellen Isolation von Hefe-Gesamt-DNA, die als Template für PCR-Kontrollen eingesetzt wurde.

10 ml einer Übernachtskultur in YPD-Medium wurden in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 5 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1 M Sorbitol resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 s Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden die Zellen in 0.5 ml folgender Lösung resuspendiert (1 M Sorbitol, 50 mM K-Phosphat, 14 mM β -Mercaptoethanol). Zur Bildung von Sphäroplasten wurden 100 mg *Yeast lytic Enzyme* (5 U/mg, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA) zugegeben und für 2 h bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Sphäroplasten wurden in der Tischzentrifuge sedimentiert und in 0.5 ml 50 mM EDTA, 0.2 % (w/v) SDS resuspendiert. Es wurde 1 μl DEPC zugegeben und 15 min bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Durch die Zugabe von 50 μl

5 M K-Acetat und 30-minütige Inkubation auf Eis wurden die Proteine ausgefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation wurde der klare Überstand abgenommen, und die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml Ethanol (96 %) bei RT. Es wurde 15 s zentrifugiert und das luftgetrocknete DNA-Pellet in 0.4 ml H₂O resuspendiert. Eine weitere Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 ml Isopropanol und Zentrifugation für 15 s. Das trockene Pellet wurde mit 70 % (v/v) Isopropanol gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl H₂O gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.4.1.9 Präparation genomischer DNA aus Hefe mittels Anionen-Austauscher-Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)

Diese Isolation beruht auf einer modifizierten Lyse der Hefe-Sphäroplasten und der DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule. Es handelt sich hierbei um eine Methode, mit der hochreine genomische DNA gewonnen werden kann. Die DNA wurde auf eine Anionen-Austauscher-Säule (QIAGEN GmbH, Hilden) gegeben und anschließend mit 1.25 mM NaCl eluiert. Diese Methode vermeidet die Verwendung von Phenol. Mit Hilfe der *QIAGEN Genomic-tip 500* sowie des *Genomic DNA Buffer Set* konnten große Mengen von genomischer DNA zur Analyse gewonnen werden. Es wurden 100 ml *S. cerevisiae*-Kultur (OD₆₀₀ 0,3) aufgearbeitet, und die Lösungen nach Anweisung des *QIAGEN Genomic-tip*-Protokolls (Hefen) für Maxi-Präparation mit *Genomic-tip 500* eingesetzt.

Die so isolierte genomische DNA wurde für Restriktionsanalysen und Southern-Hybridisierungen eingesetzt.

2.4.1.10 Präparation genomischer DNA aus Tomatenzellkulturen (nach Dellaporta *et al.*, 1983)

100 ml Tomatenzellkultur wurden filtriert und zweimal mit H₂O gewaschen. Das Frischgewicht wurde bestimmt (8 g) und die Zellen in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die fein zerkleinerten Zellen wurden in 20 ml Extraktionspuffer [200 mM Tris-HCl, pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS] aufgenommen und bei 60 °C 20 min inkubiert. Es wurden 20 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gemischt und zur Phasentrennung 10 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Um Phenolreste zu beseitigen, wurde mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zum Überstand wurde 1/3 Vol 5 M K-Acetat zugegeben, 30 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 5000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Das glasige Zuckerpellet wurde verworfen und die DNA im Überstand mit 0.54 Vol Isopropanol gefällt. Nach 30-minütiger Fällung bei -20 °C wurde zentrifugiert (30 min, 5000 rpm, 4 °C), das Pellet getrocknet und in 20 ml H₂O gelöst (über Nacht oder 2-3 h bei 60 °C). Es folgte eine RNase-Behandlung (Endkonz. 0.1 mg/ml) bei 60 °C für mindestens 1 Stunde. Anschließend wurde erneut 3 mal mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

(25:24:1) und zweimal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Durch Zugabe von 0.54 Vol Isopropanol und 0.1 Vol 3 M Na-Acetat zum Überstand wurde die DNA gefällt (30 min, -20 °C). Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml H₂O gelöst (über Nacht oder 2-3 h bei 60 °C). Die DNA wurde bei -20 °C gelagert. Die so isolierte genomische DNA wurde als Template für PCR-Ansätze, für Restriktionen und für Southern-Hybridisierungen verwendet.

2.4.1.11 Präparation genomischer DNA aus Blättern von Tabak und Arabidopsis

Ungefähr 3 junge Blätter wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 1,5 % [w/v] SDS; 10 mM β -Mercaptoethanol) aufgenommen, gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 300 μ l 5 M K-Acetat pH 4.8 und Inkubation im Eisbad (10 min) denaturiert und durch Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gemischt und bei 12000 rpm für 5 min zentrifugiert. Durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol zur Oberphase wurde die DNA gefällt und 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 50 μ l H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.4.2 DNA-Techniken

2.4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (*Easy Cast™ Elektrophoresis System*). Dabei variierte die Gelkonzentration von 0.6 % (w/v) bei großen Fragmenten bis zu 2 % (w/v) bei kleinen Fragmenten.

Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA, pH 8.0) 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 Volumen Stopp-Lösung [40 % (v/v) Glycerin, 0.1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, \pm 2.5 g/l Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-10 μ l (analytische Gele) bzw. 20-50 μ l (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen). Die Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (UV-Transilluminator, Appligene, Illkirch), die Dokumentation mittels Image-Master (Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.4.2.2 DNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe *HindIII* geschnittener λ -DNA, *EcoRI/BamHI* geschnittener Plasmid-DNA pES1 sowie dem *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* (MBI).

Der *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* umfasst 14 Fragmente von 3 000, 2 000, 1 500, 1 200, 1 031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp Länge.

Das Plasmid pES1 hat eine Größe von ca. 12.8 kb. Nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* treten elf Fragmente auf, deren Größen bei 4 000, 2 500, 1 700, 1 300, 800, 660, 600, 510, 375, 230 und 140 bp liegen.

Bei der Restriktion von DNA des Phagen λ (Gesamtgröße 48.5 kb) mit *HindIII* entstehen acht Fragmente mit einer Größe von 23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564 und 139 bp.

2.4.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität Ethidiumbromid-markierter DNA-Proben mit Standardproben (DNA-Fragmente bekannter Konzentration). Dies war vor allem für Sequenzreaktionen wichtig. Die Konzentrationsbestimmung für Ligationen erfolgte durch direkten Vergleich der miteinander zu ligierenden Fragmente.

2.4.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (analytisch) bis 100 μ l (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0.1 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro μ g DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, die 1 μ g DNA in 1 h bei 37 °C spaltet.

Nach Überprüfung auf vollständige Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese wurden die Enzyme durch Ausheizen (10 min bei 70 °C) inaktiviert.

2.4.2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Reinigung der DNA erfolgte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden). Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silika-Gel-Membran, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift erfolgte die Elution der DNA mittels H₂O. Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen und die DNA mit 50 μ l H₂O eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

2.4.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des Protokolls des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

2.4.2.7 Dialyse von DNA-Fragmenten

Mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA-Fragmente wurden vor der Ligation dialysiert. Dazu wurde die DNA auf einen Filter (Porengröße 0.2 µm, Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) aufgetropft, der sich auf der Oberfläche einer mit H₂O gefüllten Petrischale befand. Nach 15 min wurde die entsalzte DNA herunterpipettiert und konnte weiterverwendet werden.

2.4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10-30 µl durchgeführt. Das Verhältnis Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Konzentrationen sowie nach den Größen von Vektor und Fragment. Zur Freilegung kohäsiver Enden wurden Vektor- und Fragment-DNA 5 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 1-3 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. PCR-Produkte mit überstehendem 3'Adenin (entstehen bei Verwendung von Polymerasen ohne 3'→5' Exonukleaseaktivität) wurden in den pGEM[®]-T Easy-Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega, Madison). Ligationsansätze wurden über Nacht bzw. für 2-3 Tage (große Plasmide, wie pVDZ'2) bei 6 °C im Kühlschrank inkubiert.

2.4.2.9 Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Die Transformation wurde in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Von dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Diese wurde 1:100 in einer 100 ml Hauptkultur verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden in sterile, auf Eis vorgekühlte Greiner-Röhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in 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 im Eisbad bis zur Transformation (mindestens 3 h, maximal 24 h) aufbewahrt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80 °C gelagert. Je 200 µl CaCl₂-kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden

mit der zu transformierenden DNA gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C, wonach die Transformationsansätze 2 min auf Eis gekühlt wurden. Nach Zugabe von 0.8 ml Nährbouillon/LB-Medium und Inkubation für 45 min bei 37 °C wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.2.10 Transformation von *S. cerevisiae*

Von dem zu transformierenden *S. cerevisiae*-Stamm wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Diese wurde 1:10 in einer 100 ml Hauptkultur verdünnt und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1.0 kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4 °C) und mit 10 ml 0.1 M Li-Acetat gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in 10 ml 0.1 M Li-Acetat resuspendiert und 1 h bei 30 °C (150 rpm) geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (1000 rpm, 5 min, 4 °C) und in 500 µl 0.1 M Li-Acetat aufgenommen. Je 50 µl kompetente Hefe-Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA (5 µg) gemischt und 10 min bei 30 °C inkubiert. Es wurden 500 µl PEG-Lösung [40 % (w/v) PEG4000; 10 mM Tris, pH 7.5] zugegeben, gemischt und 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C. Der Ansatz wurde mit 900 µl H₂O aufgefüllt, gemischt und 5 s zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut mit 1 ml H₂O gewaschen und pelletiert. Die transformierten Hefezellen wurden in 100 µl H₂O resuspendiert und der gesamte Ansatz wurde auf Selektionsagar ausplattiert. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.4.2.11 Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Transformanten wurden auf Nähragar-Platten mit IPTG und X-Gal unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (Markergen des transformierten Plasmids) selektiert. Rekombinante Klone konnten in der Regel durch Test auf α -Komplementation identifiziert werden. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α -Komplementation der β -Galaktosidase durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA zugrunde. Dies erkennt man an weißen Kolonien, da der rekombinante Klon nicht mehr in der Lage ist, X-Gal in einen Indigo-Farbstoff umzuwandeln.

2.4.2.12 Selektion rekombinanter *S. cerevisiae*-Klone

Die Selektion rekombinanter Hefe-Klone beruht auf dem Verlust der Auxotrophie einer Aminosäure des Wildtyps, da diese durch das Markergen des transformierten Plasmids wieder von der Hefe selbst bereitgestellt und verstoffwechselt werden kann.

Die Transformanten wurden auf SMM-Agar-Platten mit Supplementen, jedoch ohne Uracil selektiert. Rekombinante Klone waren in der Lage, ohne Uracil zu wachsen, da das Markergen des transformierten Plasmids die Uracil-Auxotrophie des Wildtyps aufhebt.

2.4.2.13 Plasmidtransfer durch Konjugation

Der konjugative Plasmidtransfer wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) und *R. metallidurans*-Zellen jeweils aus einer NB-Übernachtskultur durchgeführt. Je 100 µl der konjugierenden Stämme wurden auf einer NA-Platte zusammen ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Konjuganten (als Rasen auf Platte sichtbar) wurden mit 5 ml Saline [9 g/l NaCl] abgeschwemmt, verdünnt (10^{-3}) und auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten mit Tetracyclin ausplattiert, welche ein Wachstum von *E. coli*-Zellen aufgrund von Auxotrophien und von plasmidfreien *R. metallidurans*-Zellen aufgrund fehlender Antibiotikaresistenz verhindern sollten.

2.4.2.14 Phageninfektion einer Bakterienkultur - *Screening* einer Genbank

Für die Phageninfektion wurde der *E. coli*-Stamm XL1blue eingesetzt. Die Zellen einer Übernachtskultur [LB-Medium mit 0.2 % (w/v) Maltose] wurden pelletiert, in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und 1 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die so für die Transfektion vorbereiteten Zellen konnten bis zu 3 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die vorhandenen Phagenüberstände mit den cDNA-Fragmenten (DNA-Banken) wurden in SM-Puffer [100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2 % (w/v) Gelatine] bis 10^{-6} verdünnt und im gleichen Verhältnis mit den vorbereiteten *E. coli*-Zellen gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die infizierten Zellen mit 10 ml flüssigem Topagar vermischt und auf LB-Agarplatten (Ø 13cm) gleichmäßig verteilt. Die infizierten und lysierten Bakterien waren nach Inkubation über Nacht bei 37 °C als durchsichtige Plaques auf dem Bakterienrasen zu erkennen. Von den so erhaltenen Phagenplatten wurden Membranfilter abgezogen (jeweils ein Original und ein Duplikat) und für die Plaquehybridisierung weiterverwendet. Die Filter wurden asymmetrisch markiert, so daß eine spätere Zuordnung von positiven Signalen zum zugehörigen Plaque möglich war. Diese positiven Plaques wurden ausgestochen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit SM-Puffer überführt. Zur Konservierung wurde ein Tropfen Chloroform zugegeben. In dieser Form können die Bacteriophagen sehr lange im Kühlschrank gelagert und weiterverwendet werden. Die Phagenüberstände der positiven Plaques wurden erneut verdünnt und einem nochmaligen *Screening* zur Anreicherung der positiven Signale unterzogen. Im Allgemeinen folgt noch ein drittes *Screening*, um einen gereinigten positiven Phagen zu isolieren.

2.4.2.15 *In vivo Excision* positiver Phagen

Bei den verwendeten cDNA-Banken handelte es sich um λZAP-Phagen. Aus den positiven Phagen wurden durch *in vivo Excision* die pBluescript SK-Phagemide mit dem gesuchten cDNA-Fragment isoliert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (ZAP-cDNA SyntheseKIT, Stratagene). Die isolierten Phagemide wurden wie Plasmide für Restriktionen und Sequenzierungen eingesetzt.

2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.4.3.1 Auswahl der Primer

Die Ableitung der Primer erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms OLIGO aus bekannten Sequenzen.

Die Oligonukleotid-Primer (Tabelle 5) wurden von kommerziellen Anbietern (Gibco BRL, Eggenstein; Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in H₂O gelöst und auf eine Endkonzentration von ca. 20 pmol/μl verdünnt.

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Primer

Überexpressions-Primer			
Primer-Name/ Orientierung		Sequenz 5'->3 ^{Position} ^a	Beschreibung
Streptag ZnTp <i>SacII</i>	→	AAAACCGCGGTGAGTCTTCAAGTCCCCACCAT	Klonierung von <i>ZAT1</i> (<i>SacII/PstI</i>) in pASK3
Sreptag ZnTp <i>PstI</i>	←	AAAAGTGCAGGCGCTCGATTTGTATCGTGAC	Klonierung von <i>ZAT1</i> (<i>SacII/PstI</i>) in pASK3
pASK5 <i>SacII</i>	→	AAAACCGCGGTGAGTCTTCAAGTCCCCACCAT	Klonierung von <i>ZAT1</i> (<i>SacII/PstI</i>) in pASK5
pASK5 <i>PstI</i>	←	AAAAGTGCAGGCGCTCGATTTGTATCGTGAC	Klonierung von <i>ZAT1</i> (<i>SacII/PstI</i>) in pASK5

Sequenzierprimer			
Streptag3 up	→	AGTAGCGGTAAACGGCAGACA	bindet stromabwärts der MCS von pASK3
Streptag3 down	←	CAGTGATAGAGAAAAGTGAA	bindet stromaufwärts der MCS von pASK3
Upr-ABI	←	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>Universal</i> Primer, Sequenzierprimer für ABI
Rpr-ABI	→	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>Reverse</i> Primer, Sequenzierprimer für ABI
Upr-CY'5	←	CY'5-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>Universal</i> Primer, CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pUC- und pGEM-T-Easy-Konstrukte
Rpr-CY'5	→	CY'5-CAGGAAACAGCTATGAC	<i>Reverse</i> Primer, CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pUC- und pGEM-T-Easy-Konstrukte
T3	←	AATTAACCCTCACTAAAGGG	bindet an den T3-Promotor in Plasmiden (pBluescript, pGEM T-Easy)

2. Material und Methoden

T7	→	GTAATACGACTCACTATAGGGC	bindet an den T3-Promotor in Plasmiden (pBluescript, pGEM T-Easy)
----	---	------------------------	---

RT-PCR-Primer

GA 957	→	TTTTTTTTTTTTTTTT	bindet am polyA⁺-Schwanz der mRNA
GA 948	←	GTCGGCGTAGCAGGGTT T T C G C G G	degenerierter Primer der TMH IV der CDF-Proteine
GA 949	→	GCATCTCCAATACGTGAAAAAAGACTCC G T GA A T GG C A A A G C	degenerierter Primer der TMH V der CDF-Proteine
123pep up	→	GCCTGTCACATGCTGTTGA	bindet an der TMH I der Kartoffel CDF-Sequenz (123pep)
123pep down	←	AGCAGCCCACCAACAGACAC	bindet an der TMH IV der Kartoffel CDF-Sequenz (123pep)/spez. Reinigung
123pep up/Biotin	→	BIOTIN - GCCTGTCACATGCTGTTGA	bindet an der TMH I der Kartoffel CDF-Sequenz (123pep)/spez. Reinigung
123pep down/Biotin	←	BIOTIN - AGCAGCCCACCAACAGACAC	bindet an der TMH IV der Kartoffel CDF-Sequenz (123pep)
123pep down2	←	TCATCAAACCAGCAGCAAAT	bindet an TMH I der Tomaten 123pep-Sequenz stromaufwärts
123pep up2	→	GTGTCTGTTGGTGGGCTGCT	bindet an TMH IV der Tomaten 123pep-Sequenz stromabwärts
T3	→	AATTAACCCTCACTAAAGGG	bindet an den T3-Promotor in Plasmiden (pBluescript)
T7	←	GTAATACGACTCACTATAGGGC	bindet an den T3-Promotor in Plasmiden (pBluescript)
SK	→	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	bindet in MCS von pBluescript
KS	←	TCGAGGTAGACGGTATC	bindet in MCS von pBluescript

2. Material und Methoden

Klonierungsprimer

Arath. <i>EcoRI</i>	→	AAAGAATTCAGGAGTTTCTATGGAGTCTTCAAG TCCCCA	Klonierung von <i>ZATI</i> mit RBS (fett) von <i>czcD</i>
Arath. <i>BamHI</i>	←	AAAGGATCCTTAGCGCTCGATTTGTATCGT	Klonierung von <i>ZATI</i>
GA 946	→	ACCAGGAAACTAATAGAGTCA	Klonierung von <i>ZRCI</i> (1370bp)
GA 947	←	CTTCAGCCCTTTATATCTTTA	Klonierung von <i>ZRCI</i> (1370bp)
GA 950	→	GTGGGTGTCGCAGGGTTG	bindet an der TMH IV von <i>COTI</i>
GA 951	←	AGCATCGCCCAAACGTGAAGAAACAC	bindet an der TMH V von <i>COTI</i>
GA 678	→	CCGGATCCGGACTCTTGATGTATCTCCGG	Klonierung von <i>ZRCI</i> (2385bp)
GA 679	←	GGCTGCAGGGAACAAGCAGGCGCCCG	Klonierung von <i>ZRCI</i> (2385bp)
GA 680	→	ATCCGCATAAACGAGAAGACT	Klonierung von <i>COTI</i> (1600bp)
GA 681	←	TTTCGCTTTTCCTCTTTTTT	Klonierung von <i>COTI</i> (1600bp)
<i>czcR</i> ou	←	AAACAATTGGCGGTTTCGTCTTCTACAACAAGTAC C	Klonierung von <i>czcD</i> (1300bp)
<i>czcD</i> od	→	AAACATATGGCGACTGCGTCCGGTGCT	Klonierung von <i>czcD</i> (1300bp)
<i>Zat/ RBS EcoRI</i>	→	AAAGAATTCGCCCTTACCCAGAGATAGAT	Klonierung von <i>ZATI</i> mit eigener RBS
Δ <i>Zat</i> up	←	AAAGGTACCCCTAGCAGAACAGCCATTATGAT	bindet an den Basen 697- 717 des <i>ZATI</i> -Gens, Konstruktion von Δ <i>ZATI</i>
Δ <i>Zat</i> down	→	AAAGGTACCGGGGATGTTACTGAGCAATTGTTG	bindet an den Basen 543- 519 des <i>ZATI</i> -Gens, Konstruktion von Δ <i>ZATI</i>
<i>Zat</i> -Streptag <i>NotI</i>	→	AAAGCGGCCGCTAGAGAAAAGTGAAATGAATA	Klonierung der Streptag Fusionsproteine in pYES2
<i>Zat</i> -Streptag <i>SphI</i>	←	AAAGCATGCTCACTTCACAGGTCAAGCTTA	Klonierung der Streptag Fusionsproteine in pYES2

Knock out-Primer

Δ <i>ZrcI</i> P1	→	AAAACCGCGGTCCCTACCTACGCCGAAAATATAT A	bindet ca. 400b stromabwärts des <i>ZRCI</i> - Gens, Konstruktion von Δ <i>ZRCI</i>
-------------------------	---	---	---

2. Material und Methoden

<i>ΔZrcI</i> P2	←	AAAAGGATTCGATTCTCAATTCTTTACCGGTGAT	bindet ca. 40b stromaufwärts des <i>ZRCI</i> -Startcodons, Konstruktion von <i>ΔZRCI</i>
<i>ΔZrcI</i> P3	→	AAAAGAATTCAACTGCAATACTTCCAATTGCCTG	bindet ca. 40b stromabwärts des <i>ZRCI</i> -Stopcodons, Konstruktion von <i>ΔZRCI</i>
<i>ΔZrcI</i> P4	←	AAA <u>ACTGCAGG</u> CACTTAGTAAATTGGAGCAGGGTT	bindet ca. 400b stromaufwärts des <i>ZRCI</i> -Gens, Konstruktion von <i>ΔZRCI</i>
<i>ΔCotI</i> P1	→	AAAACCGCGGGAGGGAAAAAGAAAGTGTGGAGGAG	bindet ca. 470b stromabwärts des <i>COTI</i> -Gens, Konstruktion von <i>ΔCOTI</i>
<i>ΔCotI</i> P2	←	AAAAGGATTCTTTTACCTGTTTGCTTCCGAGTTT	bindet ca. 40b stromaufwärts des <i>COTI</i> -Startcodons, Konstruktion von <i>ΔCOTI</i>
<i>ΔCotI</i> P3	→	AAAAGAATTCACAGCTGATTGCTTAGAGGATCAT	bindet ca. 40b stromabwärts des <i>COTI</i> -Stopcodons, Konstruktion von <i>ΔCOTI</i>
<i>ΔCotI</i> P4	←	AAA <u>ACTGCAGA</u> AAGCTGGAGTAATCTAAAAAAGC	bindet ca. 300b stromaufwärts des <i>COTI</i> -Gens, Konstruktion von <i>ΔCOTI</i>

Gene-disruption-Primer

F 12	→	ATGAAACTCGGAAGCAAACAGGTAAAAATTATATCCTTGTCAGCTGAAGCTTCGTACGC	enthält am 5'Ende die ersten 40b des <i>COTI</i> -Gens, gekoppelt mit 5'Ende des Kanamycin-resistenz-Gens, Konstruktion einer <i>COTI-Km</i> -Kassette
G 01	←	AATGATCCTCTAAGCAATGAGCTGTGTTGCAGTTGGCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	enthält am 5'Ende die letzten 40b des <i>COTI</i> -Gens, gekoppelt mit 3'Ende des Kanamycin-resistenz-Gens, Konstruktion einer <i>COTI-Km</i> -Kassette

2. Material und Methoden

GA 962	→	ATGATCACCGGTAAAGAATTGAGAATCATCTCTCT TTTGACAGCTGAAGCTTCGTACGC	enthält am 5'Ende die ersten 40b des <i>ZRCI</i> -Gens, gekoppelt mit 5'Ende des Kanamycin-resistenz-Gens, Konstruktion einer <i>ZRCI-Km</i> -Kassette
GA 963	←	CAGGCAATTGGAAGTATTGCAGTTTACAGCGTCA TCTACAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	enthält am 5'Ende die letzten 40b des <i>ZRCI</i> -Gens, gekoppelt mit 3'Ende des Kanamycin-resistenz-Gens, Konstruktion einer <i>ZRCI-Km</i> -Kassette

^{a)}Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet. CY-5 kennzeichnet eine Fluoresceinmarkierung der Primer.

2.4.3.2 Standard Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von rekombinanten Klonen.

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

Zur Analyse wurde *Taq*-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Hierbei wurden entweder gereinigte Plasmide oder frisches Koloniematerial als Template eingesetzt. Die Zellen wurden mittels sterilem Zahnstocher von der Agaroberfläche in steriles H₂O überführt. Nach Erhitzen bei 96 °C für 3 min und anschließender Zentrifugation konnte der Überstand als Template eingesetzt werden und ersetzte im Ansatz das zuzufügende Wasser.

Reaktionsansatz: 5 µl 10 x PCR Puffer
 3-5 µl Mg²⁺-Stammlösung (2.5 mM)
 1 µl 20 mM dNTP-Mix
 1 µl Primer 1 (20 pmol)
 1 µl Primer 2 (20 pmol)
 1 µl Template-DNA (ca.100 ng /µl)
 ad 50 µl steriles H₂O

Der Ansatz wurde gemischt und nach kurzer Zentrifugation zum Schutz vor Verdunstung mit 35 µl Mineralöl überschichtet.

Die Reaktionen sind als *Hot-Start*-Reaktionen im PCR-Block (Trio-Thermoblock, Biometra) nach folgendem Protokoll abgelaufen:

2. Material und Methoden

1)	3 min	96 °C	<i>Hot-Start</i>
Zugabe von Polymerase (0.3-2 U). Dabei wurde die Mineralölschicht mit der Pipettenspitze durchstoßen.			
2)	10 s	96 °C	Denaturierung
3)	20 s	x °C	<i>Annealing</i>
4)	1 min/kb	72 °C	<i>Extension (Pwo/Taq)</i>
Schritte 2-4 in 25-30 Zyklen			
5)	5 min	72 °C	Nachsynthese (<i>Pwo/Taq</i>)
6)	Pause	4 °C	

Das Temperaturprotokoll wurde dem jeweiligen Primer-Paar (*Annealing*-Temperatur) und dem *Template* (*Extension*-Zeit) angepaßt.

2.4.3.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem "*QIAquick PCR Purification Protocol*" (QIAGEN GmbH, Hilden).

2.4.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wird durch enzymatische Synthese eine markierte, komplementäre Kopie des zu sequenzierenden Matrizenstranges erstellt.

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

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter Verwendung des *SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™* (Epicentre Technologies, Madison, USA). Es wurden CY'5-markierte-Primer (Tabelle 5) verwendet.

Zuerst wurde auf Eis ein *Premix* pipettiert:

7.2 µl	<i>SequiTherm EXCEL II Sequencing Puffer</i>
2.0 µl	Fluorescein-markierter Primer (2 pmol)
x µl	DNA (250 fmol)
ad 16 µl	H ₂ O
1.0 µl	<i>SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase</i> (5 U/µl)

Der *Premix* wurde gemischt und auf Eis gelagert.

Vier 0.5 µl-PCR-Reaktionsgefäße wurden mit A; C; G und T beschriftet. Dann wurden je nach Beschriftung 2 µl *SequiTherm EXCEL II Long-Read Termination Mix* A, C, G, T pipettiert und je 4 µl *Premix* zugegeben.

2. Material und Methoden

Die PCR wurde in einem UNO-Thermoblock mit Deckelheizung (Biometra, 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 in 30 Zyklen			
5)	Pause	4 °C	

Nach Abschluss der PCR wurde zu jeder Reaktion 3 µl Stop-Lösung (5 mg Dextranblau/1 ml 95 % Formamid) gegeben. Bis zur Auftragung auf das Sequenziergel erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.4.4.2 Sequenzierung unter Verwendung des *dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits* (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Für die Sequenzreaktion, die im Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) stattfand, wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

1 µl	Plasmid-DNA (0.5 µg)
2 µl	Primer (4 pmol)
2 µl	<i>ABI-Sequencing-Mix</i>
ad 10 µl	H ₂ O

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

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

Nach Ablauf des Programms wurde die wässrige Unterphase abgenommen und restliches Mineralöl durch Adhäsion an einen schräg gelegten Streifen Parafilm entfernt. Die DNA wurde anschließend zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl Ethanol zugegeben wurden. Nach 20-minütiger Zentrifugation (RT, 14000 rpm) und anschließendem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und war bei -20 °C bis zur Sequenzierung 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.

2.4.4.3 Das Sequenziergel

Die Produkte der Sequenzreaktion wurden am A.L.F.TMDNA-*Sequencer* in einem 7%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel in 1 x TBE als Laufpuffer [10 x TBE: 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8.0)] aufgetrennt.

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

Die Lösung wurde durch einen Filter der Porengröße 0.2 µm vakuumfiltriert und entgast. Nach Zugabe von 225 µl 10 % APS und 22.5 µl TEMED wurde das Gel gegossen. Die Polymerisation dauerte 1 Stunde. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

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

2.4.4.4 Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Alf-Manager DBA. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen Clone 4 (*Clone Manager*-Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, USA) und Dnasis (Version V5.00) ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Internet-Programm *Basic Logic Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm ClustalW vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen *Simple Modula Architecture Research* (SMART, Schultz *et al.*, 1998, Schultz *et al.*, 2000), *Scan Prosite*, *Profile Scan* und *Compute pI/Mw Expasy* des *Expasy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

2.5 Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

2.5.1 Herstellung der Sonden

2.5.1.1 Synthese von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die als Sonden für den Nachweis von Nukleinsäuren verwendet werden sollten, wurden entweder direkt mittels Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid ausgeschnitten oder durch den Einsatz spezifischer Primer mittels PCR amplifiziert. Die Isolierung und Reinigung der Fragmente erfolgte wie bereits beschrieben (2.4.2.5).

2.5.1.2 Digoxigenin-Markierung der Sonden (DIG DNA LABELING Kit, Roche, Mannheim)

Die DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des *DIG DNA Labeling and Detection Kit* (Roche Mannheim) durch *Random Priming* mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Je 1 µg DNA-Fragment wurde in 15 µl H₂O aufgenommen, 10 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 2 µl Hexanukleotid-Mix (10x) und dNTP-Labeling-Mix (10x) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) wurde der Ansatz gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) wurde die Markierungsreaktion beendet. Es wurden 2.2 µl 4 M LiCl und 3 Vol Ethanol zugegeben, gemischt und die markierte DNA für 30 min bei -70 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4 °C) wurde die DNA mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. 25 µl der DIG-markierten Sonde wurden direkt für die Hybridisierung eingesetzt.

2.5.2 Digoxigenin-markierte Längenstandards

Um die Größe der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden Digoxigenin-markierte Größenstandards eingesetzt. Für die Southern-Experimente kam der DIG-Marker VII (Roche, Mannheim) zum Einsatz. Er enthält 15 DNA-Fragmente mit folgenden Größen: 8000; 7100; 6000; 4800; 3500; 2700; 1900; 1850; 1500; 1400; 1150; 1000; 680; 490 und 370 bp. Um die Größe kleiner PCR-Produkte zu bestimmen, wurde der DIG-Marker VI (Roche, Mannheim) aufgetragen. Die Markerbanden haben die folgenden Größen: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 2 x 298, 2 x 234, 220 und 2 x 154. Der Marker wurde mit im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht.

2.5.3 DNA:DNA-Hybridisierung (nach Southern, 1975)

2.5.3.1 Gelelektrophorese und DNA-*Blotting*

Plasmide oder chromosomale DNA wurden nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen in 1%igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für mindestens 2 h in 1 x TAE-Puffer. Das Agarose-Gel wurde unter leichtem Schwenken auf einer Laborwippe wie folgt für den DNA-Transfer auf die Membran vorbereitet:

Depurinieren: 5 min 0.25 N HCl

Denaturierung: 20 min Denaturierungslösung [0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl]

Neutralisierung: 20 min Neutralisierungslösung [1 M Tris (pH 7.5), 1.5 M NaCl]

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit H₂O gespült.

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) auf Gelgröße zurechtgeschnitten, 20 min in H₂O und anschließend in 10 x SSC (0.15 M Na-Citrat, pH 7.0; 1.5 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Agarose-Gel auf die Membran erfolgte mittels Druck-Blot in einer Blottingapparatur (Posi Blot™ *Pressure Blotter*, Statagene, Heidelberg). Die vorbereitete Membran wurde auf mit 10 x SSC benetztes Filterpapier in der Blotting-Apparatur gelegt, darüber die Maske und anschließend das Gel. Darauf wurde ein mit 10 x SSC getränkter Schwamm gelegt, die Apparatur geschlossen und ein Druck von 75 mm Hg-Säule angelegt. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte für 3-14 h. Anschließend wurde die Position des Geles auf der Membran markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch 3-minütige UV-Bestrahlung (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet zwischen Filterpapier im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.5.3.2 Kolonie-Hybridisierung

Transformierte Zellen wurden geordnet auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) mit dem Durchmesser einer Petrischale wurde in H₂O gewaschen, getrocknet und anschließend luftblasenfrei auf die Agaroberfläche gelegt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Membran abgezogen und die Kolonien durch Inkubation auf mit Denaturierungslösung (0.5 N NaOH; 1.5 M NaCl) getränktem Filterpapier für 15 min lysiert. Nach der anschließenden 15-minütigen Inkubation auf mit Neutralisierungslösung (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4; 1.5 M NaCl) getränktem Filterpapier wurden die Filter in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und die DNA durch 3-minütige UV-Bestrahlung fixiert.

2.5.3.3 Plaque-Hybridisierung

Die Bakteriophagen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, und von jeder Platte wurden 2 Membranen abgezogen. Dazu wurde die vorher mit H₂O gespülte Nylonmembran mit dem Durchmesser der Petrischale luftblasenfrei auf die Oberfläche der Agarplatte gelegt und asymmetrisch markiert. Nach 5 min wurde die Membran abgezogen und weiterbehandelt wie bei der Kolonie-Hybridisierung (2.5.3.2).

Positive Klone wurden aus den Agarplatten ausgestochen und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 1 ml SM-Puffer [100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2 % (w/v) Gelatine] und 50 µl Chloroform überführt. Die Proben wurden im Kühlschrank gelagert, wobei die Phagen aus dem Agar in den Puffer diffundieren und Bakterienreste durch Chloroform lysiert werden.

2.5.3.4 Hybridisierung

Die Membran mit der fixierten DNA wurde zur Entfernung von Salzresten kurz in Wasser gespült und anschließend für mindestens 1 h in 10 ml Prähybridisierungs-Lösung [5 x SSC, 10 g/l Blocking Reagenz, 10 g/l N-Lauroylsarcosin, 0.2 g/l SDS] im Hybridisierungssofen (OV4, Biometra) bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (45-68 °C, abhängig von Homologie der Sonde) prähybridisiert. Die markierte Sonde wurde in 10 ml neuer Hybridisierungslösung aufgenommen und 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurde sie gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei entsprechender Temperatur über Nacht.

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte die Entfernung unspezifischer Bindungen durch folgende Waschschriffe: 2 x 5 min bei RT in 2 x SSC mit 1 g/l SDS

2 x 15min bei Hybridisierungstemperatur in 0.1-1 x SSC mit 1 g/l SDS

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

2.5.4 Chemilumineszens-Nachweis (DIG-*Luminescent Detection* Kit, Roche Mannheim)

Alle Schritte zum Chemilumineszens-Nachweis wurden unter leichtem Schwenken (Laborwippe) bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Lösungen wurden in solchen Mengen eingesetzt, daß die Membran vollständig bedeckt war.

Die Membran wurde 5 min in Waschpuffer (Puffer 1 [0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl, pH 7.5] mit 0.3 % (v/v) Tween 20) inkubiert. Es schloss sich eine Inkubation für 30 min in Puffer 2 [Puffer 1 mit 1 % (v/v) Blocking-Reagenz] an. Danach wurde für weitere 30 min mit Anti-DIG-AP-Konjugat (Verdünnung 1:20000 in Puffer 2) behandelt.

Anschließend wurde zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min in Puffer3 [0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5] äquibriert, abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt. Die Membran wurde

gleichmäßig mit der verdünnten Substratlösung (CDP-Star[™] in Puffer3 1:100) benetzt, mit einer zweiten Folie abgedeckt und 5 min inkubiert. Dann wurde die Membran auf Filterpapier getrocknet und luftblasenfrei in eine neue Folie eingeschweißt. Zum besseren Start des Substratumsatzes wurde 15 min bei 37 °C inkubiert.

Die Membran wurde in einer Röntgenkassette für 15 min bis 3 h auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch 1-10-minütige Inkubation in Entwicklerlösung. Es folgte ein kurzes Spülen im Wasserbad. Anschließend wurde der Film fixiert und noch einige Minuten gewässert.

2.5.5 Wiederverwendung von Nylonmembranen

Nylonmembranen konnten mehrmals für Hybridisierungen eingesetzt werden. Dazu wurde die Sonde durch „strippen“ von der Membran entfernt. Die Membran wurde kurz in H₂O gespült und 2 x 10min in folgender Lösung [0.2 N NaOH; 0.1 % (w/v) SDS] bei 37 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC gewaschen, getrocknet und zwischen Filterpapier aufbewahrt.

2.6 Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

2.6.1 Isolierung von RNA

Alle Lösungen, die mit RNA in Berührung kamen, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem bidestilliertem Wasser hergestellt oder, wenn möglich, wurde DEPC direkt zur Lösung gegeben. Diethylpyrocarbonat wurde in einer Endkonzentration von 0.1 % (v/v) zugesetzt und diente der Inaktivierung von RNasen. Das mit DEPC versetzte H₂O sowie die Lösungen wurden 12 h bei 37 °C inkubiert und danach autoklaviert. Dieses Wasser wird im folgenden mit DEPC-H₂O bezeichnet. Die für die Isolation eingesetzten Geräte wurden, soweit möglich, zweimal 25 min autoklaviert, hitzelabile Gegenstände, z.B. automatische Pipetten, mit 70 % (v/v) Ethanol abgerieben.

Alle Arbeiten wurden mit Einweghandschuhen (Roth, Karlsruhe) durchgeführt, da die an Händen anhaftenden RNasen die Hauptkontaminationsquelle darstellen (Ausubel *et al.*, 1993).

2.6.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae*

9 ml YPD-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 30 °C solange geschüttelt, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0.8-1 und damit die mittlere, exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Mit AE-Puffer (50 mM Na-Acetat pH 5.3; 10 mM EDTA) equilibriertes Phenol wurde auf 65 °C vorgewärmt, bevor die Zellen in 15 ml Greiner-Röhrchen abzentrifugiert wurden (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem DEPC-H₂O resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge (1500 rpm, 3 min, 4 °C). Das Pellet

wurde in 500 µl eiskaltem AE-Puffer resuspendiert, 50 µl 10 % (w/v) SDS zugegeben und gemischt. Zur Probe wurden 550 µl vorgewärmtes Phenol zugegeben und 30 s gevortext. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei 65 °C (Heizblock, um Kontamination zu vermeiden!), wobei jede Minute einmal gevortext wurde. Die Probe wurde in ein Kochsalz-Eis-Gemisch überführt, bis sich Phenolkristalle bildeten. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei RT (12000 rpm), und die wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Phenol-Behandlung wurde noch einmal wiederholt und die wäßrige Phase mit 500 µl Chloroform extrahiert. Nach Vortexen und Zentrifugation wurde die RNA in der wäßrigen Phase gefällt. Dazu wurden 0.1 Vol 3 M Na-Acetat, pH 5.3 und 3 Vol Ethanol zugegeben und 30 min bei -80 °C gelagert. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, 4 °C) und Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde die RNA in 40 µl DEPC-H₂O gelöst. 50-200 µg RNA konnten unter diesen Bedingungen isoliert werden und wurden für *Northern*-Hybridisierungen eingesetzt.

2.6.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Tomatenzellkulturen (nach Reinbothe, 1992)

100 ml Tomatenzellkultur wurden filtriert und zweimal mit DEPC-H₂O gewaschen. Das Frischgewicht wurde bestimmt und die Zellen in flüssigem Stickstoff gemörsert. Pro Gramm Zellen wurden 3 ml Extraktionspuffer [100 mM Tris-HCl, pH 8.8; 100 mM NaCl, 5 mM EDTA; 2 % (w/v) SDS] in 50 ml Greiner-Röhrchen vorgelegt und die gefrorenen, fein zerkleinerten Zellen zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte durch 4 x 30s Ultraschall-Behandlung. Es wurde 1 Vol Phenol zugegeben, gevortext und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit 1 Vol Phenol extrahiert. Dann wurden zur wäßrigen Phase 0.25 Vol Chloroform zugegeben, gevortext und extrahiert. Anschließend wurde in der Oberphase durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Na-Acetat pH 5.2 und 2.5 Vol Ethanol die RNA gefällt (mindestens 30 min bei -80 °C). Nach Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4 °C) und Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde die RNA in 1 ml DEPC-H₂O gelöst. Es wurde 1 ml 4 M LiCl zugegeben, und die RNA präzipitierte über Nacht im Kühlschrank. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 30 min. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, pelletiert, getrocknet und in 0,5-1 ml DEPC-H₂O gelöst.

2.6.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*-Blättern

Ungefähr 300 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in 500 µl Extraktionspuffer [200 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM EDTA; 100 mM LiCl; 1 % (w/v) SDS] aufgenommen und gevortext. Zum Ansatz wurden 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) zugegeben, 30 s gevortext und zentrifugiert (12000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol-Extraktion wiederholt. Die Oberphase wurde in ein neues

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol 6 M LiCl versetzt und zur Fällung der RNA 4 h auf Eis stehengelassen. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min. Das Pellet wurde mit 500 µl 3 M LiCl gewaschen, 10 min im Vakuum getrocknet und in 150 µl DEPC-H₂O gelöst. Anschließend wurden 0,1 Vol 3 M Na-Acetat und 2 Vol Ethanol zugegeben und die RNA über Nacht bei -20 °C erneut gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 8 min im Vakuum getrocknet und in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.6.1.4 Isolierung von mRNA aus Pflanzenmaterial mittels *Oligotex*TM (QIAGEN GmbH, Hilden)

Diese Präparation beruht auf Bindung der eukariotischen, polyadenylierten mRNA an eine polythymidinylierte Matrix. Dabei handelt es sich um eine stabile Suspension aus Latexpartikeln, die kovalent mit dT₃₀ Oligonukleotiden verbunden sind. Die polyA⁺ mRNA hybridisiert bei hohen Salzkonzentrationen direkt an *Oligotex*TM durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem polyA⁺-Schwanz und der dT₃₀-Sequenz. Die Elution der reinen mRNA erfolgt mit Puffer geringer Salzkonzentration. Wichtigster Schritt der Präparation ist die Lyse des Zellmaterials, wobei ein wenig viskoses Lysat die größte mRNA-Ausbeute garantiert. Es wurden 10 mg Zellmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 600 µl Puffer OL1 zur Lyse zugegeben. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden wie im „*Oligotex Direct mRNA Mini Protocol*“ beschrieben durchgeführt.

2.6.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die frisch isolierte RNA wurde in DEPC-H₂O verdünnt und am Gene-Quant (Pharmacia, Freiburg) vermessen. Es wurde möglichst so verdünnt, daß die Absorption bei 260 nm zwischen 0.6 und 1.5 lag. Die Konzentration der Nukleinsäuren lag zwischen 0.5-3.5 µg/µl. Die Reinheit konnte als Quotient aus Nukleinsäuren/Protein (260/280 nm) bestimmt werden.

2.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke wurden denaturierende Formaldehyd-Gele verwendet. Pro 50 ml Gel wurden 0.75 g Agarose in 43.5 ml DEPC-H₂O und 5 ml 10 x MOPS [0.2 M MOPS, 0.05 M Natriumacetat (pH 7.0), 0.01 M Na₂EDTA] durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf 50 °C wurden 1.5 ml 37 % (v/v) Formaldehyd zugesetzt, gut gemischt und das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer.

Aufgetragen wurden für analytische Gele 2-10 µg, für präparative Gele 10-40 µg Gesamt-RNA pro Spur. Die RNA wurde mit 12.5 µl Formamid, 2.5 µl 10 x MOPS und 4 µl Formaldehyd versetzt und 15 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt, 3 µl Probenpuffer [100 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 1 g/l SDS, 1 g/l

Bromphenolblau] und 1.5 µl Ethidiumbromid zugegeben und im Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße für 1.5-4 h bei 70-140 V.

2.6.4 RNA:DNA-Hybridisierung (Northern-Hybridisierung)

2.6.4.1 Gelelektrophorese und RNA-*Blotting*

Die RNA wurde in denaturierenden Formaldehyd-Gelen (siehe 2.6.3) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V für mindestens 2 h in 1 x MOPS-Puffer. Das Gel wurde unter leichtem Schwenken auf einer Laborwippe wie folgt für den RNA-Transfer auf die Membran vorbereitet:

Denaturierung: 20 min Denaturierungslösung [0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl]

Neutralisierung: 20 min Neutralisierungslösung [1 M Tris (pH 7.5), 1.5 M NaCl]

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit DEPC-H₂O gespült.

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 20 min in DEPC-H₂O und anschließend in 10 x SSC (0.15 M Na-Citrat, pH 7.0, 1,5 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der RNA aus dem Agarose-Gel auf die Membran erfolgte mittels Druck-Blot in einer Blottingapparatur. Die vorbereitete Membran wurde auf mit 10 x SSC benetztes Filterpapier in der Blotting-Apparatur gelegt, darüber die Maske und schließlich das Gel. Darauf wurde ein mit 10 x SSC getränkter Schwamm gelegt, die Apparatur geschlossen und ein Druck von 75 mm Hg-Säule angelegt. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte für 12-24h. Anschließend wurde die Position des Geles auf der Membran markiert. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch 3 minütige UV-Bestrahlung (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet zwischen Filterpapier im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.6.4.2 Hybridisierung

Die Membran mit der fixierten RNA wurde zur Entfernung von Salzresten in DEPC-H₂O gespült und anschließend für mindestens 1 h in 10 ml Prähybridisierungs-Lösung [0.25 M Na₂HPO₄; 1 mM EDTA; 20 % (w/v) SDS; 0.5 % (w/v) Blocking Reagenz;] im Hybridisierungs-ofen bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (40-68 °C, abhängig von Homologie der Sonde) prähybridisiert. Die markierte Sonde wurde in 10 ml neuer Hybridisierungslösung aufgenommen und 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurde sie gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei entsprechender Temperatur über Nacht.

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte die Entfernung unspezifischer Bindungen durch folgende Waschschriffe:

2. Material und Methoden

2 x 5 min [2 x SSC ; 0.1 % (w/v) SDS] bei RT

2 x 15min [0.1 x SSC; 0.1 % (w/v) SDS] bei

Hybridisierungstemperatur

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

2.6.4.3 Chemilumineszenz-Nachweis (DIG-*Luminescent Detection* Kit, Roche Mannheim)

Der Chemilumineszenz-Nachweis erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben.

2.6.5 *Reverse Transkription*-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Diese Methode wurde für das *Screening* pflanzlicher mRNA nach CDF-Protein homologen Genen eingesetzt. Dabei wird die als *Template* eingesetzte mRNA im ersten Schritt durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, und im zweiten Schritt wird die synthetisierte cDNA in einer PCR-Reaktion vervielfältigt. Es wurde das *Titan™ One Tube RT-PCR-System* (Fa. Boehringer) verwendet, bei dem cDNA-Synthese und PCR nacheinander im gleichen Ansatz in Gegenwart eines optimierten Puffers und eines speziellen Enzymgemischs stattfinden. Der Enzym-Mix besteht aus der Reversen Transkriptase AMV und dem *Expand™ High Fidelity* Enzym-Mix.

Für RT-Reaktion wurde ein Oligo dT-Primer (3'antisense) verwendet, der mit dem polyA⁺-Schwanz der mRNA hybridisiert. Für den PCR-Schritt wurden von den bisher bekannten CDF-Proteinen abgeleitete degenerierte Primer (Tab. 5) eingesetzt.

Reaktionsansatz:	<u>Mix 1</u>	<u>Mix 2</u>
	1 µl 20 mM dNTP-Mix	10 µl 5 x RT-PCR-Puffer
	1 µl Primer1 (20 pmol)	1 µl Enzym-Mix
	1 µl Primer2 (20 pmol)	14 µl DEPC-H ₂ O
	2.5 µl DTT (100 mM)	
	2 µl RNA (10 ng)	
	17,5 µl DEPC-H ₂ O	

Beide Mixe wurden auf Eis zusammenpipettiert und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Reaktion verlief nach folgendem Protokoll:

1)	30 min	50 °C
2)	2 min	94 °C
3)	30 s	94 °C
4)	30 s	50 °C
5)	2 min	68 °C
Schritte 3-5 in 10 Zyklen		
6)	30 s	94 °C
7)	30 s	50 °C
8)	2 min +5 s Zeitinkrement	68 °C
Schritte 6-8 in 30 Zyklen		
9)	30 s	94 °C
10)	30 s	50 °C
11)	7 min	68° C
12)	Pause	4 °C

2.7 Zellwachstumsversuche

2.7.1 Wachstumsversuche mit *R. metallidurans*-Stämmen

2.7.1.1 Das Klett-Summerson-Colorimeter

Das Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., New York) diente der Zelltrübungsmessung wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Dazu wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, da er im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) das meiste Licht transmittiert. Zur Kalibrierung der Skala wurde unbeimpftes Medium (Nullwert) verwendet. Aus den erhaltenen Klett-Einheiten (KE) konnte unter Verwendung einer Eichkurve für *R. metallidurans* die Konzentration der zugehörigen Zellsuspension ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probennahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

2.7.1.2 Zellanzucht von *Ralstonia*-Stämmen für Wachstumsversuche

Die Zelltrübungsmessungen wurden in Tris-gepuffertem Minimalmedium mit 2 g/l Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle und Schwermetall-Salzen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte eine einheitliche, in Tris-Minimalmedium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogene Vorkultur des jeweiligen Stammes. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 30 °C und 140 rpm kultiviert und nach 48 h entnommen. Den Stämmen, die neue Plasmidkonstrukte enthielten (pVDZ'2-Derivate), wurde

in der Vorkultur Tetracyclin (10 µg/ml) zur Selektion zugegeben. Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten 100 ml Erlenmeyerkolben.

Für die Anzucht der zu vermessenden Hauptkulturen wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 20 ml Tris-Minimalmedium [2 g/l Natriumgluconat] mit der entsprechenden Vorkultur 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 kontinuierlich mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

2.7.1.3 Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Schwermetallsalzen

Die Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) erfolgte auf Tris-Minimal-Agar. Es wurden Platten mit steigender Konzentration an Schwermetall-Salzen gegossen. Auf den Platten wurden die entsprechenden Stämme aus Vorkulturen in Sektoren ausgestrichen und bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert. Als Minimale Inhibitor Konzentration wird die niedrigste Metallkonzentration bezeichnet, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen.

2.7.2 Wachstumsversuche mit Hefen

2.7.2.1 Trockengewichtsbestimmung von *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Zur Bestimmung des Trockengewichtes der beiden Hefe-Stämme wurden jeweils 300 ml YPD- bzw. EMM 2-Medium 5%ig mit den Vorkulturen beimpft und bis zum Beginn der stationären Wachstumsphase schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, 3 x mit H₂O gewaschen und in je 100 ml H₂O resuspendiert. Es wurden jeweils 30 Verdünnungen der Hefe-Suspensionen hergestellt und die Zelltrübung als optische Dichte (OD₆₀₀) an einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd., England) gemessen. Anschließend wurden die Verdünnungen filtriert und die Filter (Porengröße 0.45µm, Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) mit dem Zellmaterial bei 60 °C für 3 Tage getrocknet. Das Gewicht der Zellen wurde bestimmt und die folgenden Trockengewichtseichkurven berechnet.

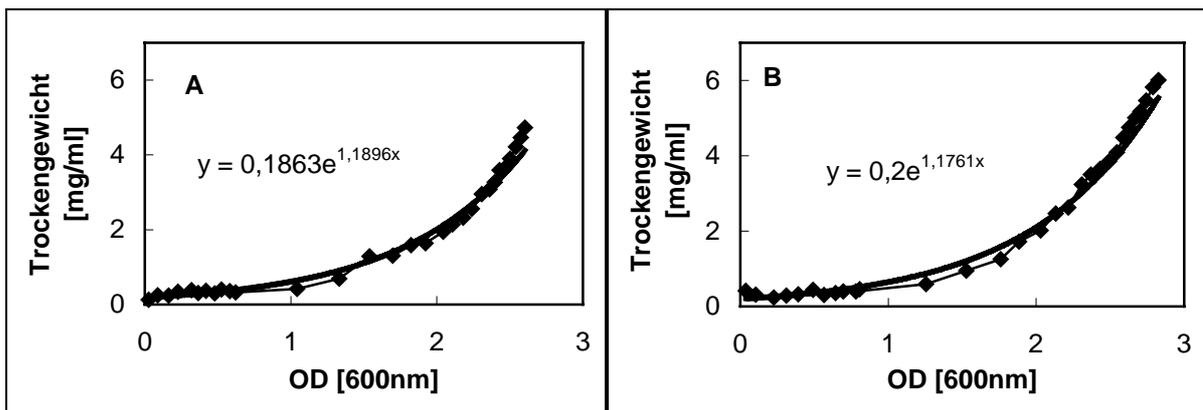


Abb. 1: Bestimmung des Trockengewichts der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (A) und *Schizosaccharomyces pombe* (B) als Funktion der Optischen Dichte (OD_{600}).

2.7.2.2 Toxizitätsbestimmung

5 ml Medium (YPD bzw. EMM 2) wurden 1%ig mit einer Vorkultur beimpft und 24 Stunden bei 30 °C schüttelnd (140 rpm) inkubiert. Dem Medium wurden verschiedene Schwermetall-Salze unterschiedlicher Konzentration zugesetzt, während die Positiv-Kontrolle ohne Zusätze inkubiert wurde. Anschließend wurde das Wachstum als optische Dichte (OD_{600}) an einem UV/VIS-Spektrophotometer gemessen und prozentual gegen die Positiv-Kontrolle aufgetragen.

2.7.2.3 Schwermetall-Akkumulation in Hefen

Mit diesem Experiment wurde untersucht, wieviel Metall die Hefe-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp über einen längeren Zeitraum (bis zur stationären Phase) akkumulieren. Dazu wurden 30 ml Minimal-Medium (SMM bzw. EMM 2) mit den entsprechenden Supplementen versetzt, 1%ig mit einer Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren, logarithmischen Wachstumsphase bei 30 °C geschüttelt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 μ M $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$ (Endkonzentration) plus 1 μ l der radioaktiven Metall-Stammlösungen von $^{65}ZnCl_2$ (spez. Aktivität 185 GBq/g), $^{57}CoCl_2$ (spez. Aktivität 315 MBq/ μ g) und $^{109}CdCl_2$ (spez. Aktivität 37 MBq/ μ g) zu den einzelnen Ansätzen. Nach bestimmten Zeiten wurde das Wachstum als OD_{600} bestimmt und je eine Probe (450 μ l) entnommen. Die Probe wurde filtriert (Membranfilter NC45, Schleicher und Schuell, Dassel), 3 x mit 5 ml SSW-Waschpuffer [1 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$; 1 mM KH_2PO_4 ; 20 mM $Na_3Citrat$; 1 mM EDTA pH 4.2] gespült und in ein Mini-Poly-Q Röhrchen (Beckman Instruments, München) überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ (Beckman Instruments, München) wurde die Radioaktivität des entsprechenden Isotops im Flüssigkeitsszintillationszähler (Szintillationssystem LS 6500, Beckman Instruments, München) ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben.

Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 100 µl Probe entnommen und direkt mit 4 ml Ready SafeTM gemischt und gemessen. Anschließend konnte berechnet werden, wieviel µmol radioaktives Metall pro g Trockengewicht akkumuliert wurde.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Protein-Expression und -Reinigung über das *Strep-tag*^{®II} Expression, Detection and Purification System (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Die Reinigung von Proteinen über das *Strep-tag*^{®II} Expression, Detection and Purification System (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen) beruht auf der Expression eines Fusionsproteins aus Target und *Strep-tagII*-Peptid (NH₂-WSHPQFEK-COOH) wobei die Expression über den stringent regulierten Tetracyclin-Promotor gesteuert wird. Das Fusionsprotein (N- oder C-terminale Fusion) wird in einem Schritt durch Chromatographie an immobilisiertem Streptactin von den bakteriellen Proteinen abgetrennt. Die spezifische Kompetition durch Desthiobiotin führt zu einer schonenden Elution des gereinigten rekombinanten Proteins von der Säule. Die geringe Größe des *Strep-tagII*-Peptids sollte weder Faltung noch Funktion des rekombinanten Proteins stören.

2.8.1.1 Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Expressionsstamm *E. coli* VS 126 transformiert. Für die Vorkultur wurden 10 ml LB-Medium (mit 125 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) mit einer frisch transformierten Einzelkolonie des Expressionsstammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Für die Expressionskultur wurde 1 l LB-Medium (mit 125 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 30 °C geschüttelt (200 rpm). Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung (OD₆₀₀) verfolgt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1.0 wurden 100 µg Anhydrotetracyclin zur Induktion der *ZATI*-Genexpression und 300 µl 1M IPTG zur Induktion der *argU*-Genexpression (pUBS520) zugegeben. Nach 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation in der SORVALL RC 5B-plus-Zentrifuge im GS3-Rotor (Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) bei 8000 rpm und 4 °C für 15 min geerntet. Die Zellpellets wurden bei -20 °C gelagert.

2.8.1.2 Zellaufschluß

A) French-Press

Das Zellpellet wurde in 40 ml (pro Liter Kultur) Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA] resuspendiert und mit DNase (10 mg/ml) und PMSF (1mM) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in der 20K-Zelle der French-Press (Amicon, Silver Springs,

Maryland, USA) bei 1200 psi in 3 Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (5000 rpm, 1 h, 4 °C) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

B) Ultraschall

Das Zellpellet wurde in 40 ml (pro Liter Kultur) Puffer W [100mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA] resuspendiert und mit DNase (10 mg/ml) und PMSF (1mM) versetzt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (UW60, UniEquip Laborgerätebau, Martinsried) 10 x in 20 sec-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 1 h bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

2.8.1.3 Membranpräparation

Aus dem klaren Überstand nach dem Zellaufschluß wurden durch Ultrazentrifugation (100000g) die Membranen isoliert. Die Zentrifugation erfolgte mit dem Swingout-Rotor SW28 in der Ultrazentrifuge L8-60M (Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto, California) für 90 min bei 4 °C und 27000 rpm. Das Membranpellet wurde in 4 ml Puffer W resuspendiert. Durch mehrmaliges Ansaugen und Ablassen mittels Pasteurpipette wurde das feste Pellet zerkleinert und das mehrmalige Durchdrücken durch eine Kanüle führte nach langer Zeit zu einer homogenen Suspension. Diese wurde bei -20 °C gelagert.

2.8.1.4 Solubilisierung der Membran (nach Hanada *et al.*, 1988)

Die isolierten Membranen wurden einer Membranproteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951), mod. unterzogen und auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml mit Puffer W verdünnt. Anschließend wurden dem Ansatz 1 mg n-Dodecylmaltosid/mg Protein und 3.5 mg/ml Phosphatidylcholin zugegeben und 1 h auf Eis gerührt. Die Solubilisierung konnte optisch durch Aufklaren der Lösung beobachtet werden. Die solubilisierten Membranen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Swingout-Rotor SW28 in der Ultrazentrifuge für 60 min bei 4 °C und 27000 rpm) und der klare Überstand konnte sofort zur Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepharose eingesetzt werden.

2.8.1.5 Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepharose

Das Solubilisat wurde direkt auf die mit Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA; 0.1 % (w/v) n-Dodecylmaltosid] äquilibrierte Strep-Tactin Sepharose-Säule (1 ml) gegeben, wobei auf Eis und unter Schwerkraftfluß gearbeitet wurde. Nach dem Auftragen des Solubilisates wurde mit 6 x 1 ml Puffer W gewaschen und anschließend mit 8 x 0.5 ml Puffer E [100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA; 0.1 % (w/v) n-Dodecylmaltosid; 2.5 mM Desthiobiotin] das Fusionsprotein eluiert. Alle Wasch- und Elutionsfraktionen wurden später mittels SDS-PAGE ausgewertet. Die Regenerierung der Affinitätssäule erfolgte durch

dreimaliges Waschen mit 5 ml Puffer R [100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA; 1mM HABA].

2.8.1.6 Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen

Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgt mittels Dialyse. Die verwendeten Dialyseschläuche mit Porengrößen von 12-14 kDa (Fa. Serva, Heidelberg) wurden in 0.1 % (w/v) EDTA für 15 min gekocht, in H₂O gespült und in 0.1 % (w/v) EDTA im Kühlschrank gelagert.

Das Einengen von Proteinlösungen erfolgte durch Einlegen der sich in einem Dialyseschlauch befindenden Proteinlösung in trockenes PEG20000 (Harris und Angal, 1989). Nach Erreichen des gewünschten Volumens wurde der Dialyseschlauch in den entsprechenden Puffer überführt und die eingengte Lösung einer Dialyse unterzogen.

2.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Für die Proteinbestimmung wurden 20 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. Verdünnung mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 594 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde. Die Herstellung der Bradford-Lösung erfolgte, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96% Ethanol 1 h gerührt und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85%ige o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H₂O aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei RT im Dunkeln.

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

Um die Konzentration membrangebundener Proteine zu bestimmen, wurde eine nach Lowry *et al.*, 1951; Bensadown and Weinstein. 1976 und Hess and Lees. 1978 modifizierte Methode angewandt. Dazu wurden die folgenden Lösungen verwendet:

- 1.) 10 mg/ml Na-Desoxycholat
- 2.) 240 mg/ml Trichloressigsäure
- 3.) 0.8 N NaOH
- 4.) Reagenz A: 0.2 g Na₂-Tartrat und 10 g Na₂CO₃ wurden in 68 ml 0.8 N NaOH gelöst und auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt.
- 5.) Reagenz B: 2 g Na₂-Tartrat und 1 g CuSO₄ wurden in 12.5 ml 0.8 N NaOH gelöst und auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt.
- 6.) Reagenz-Mix: 25 Vol 0.8 N NaOH, 18 Vol Reagenz A und 2 Vol Reagenz B wurden immer frisch gemischt
- 7.) Reagenz C: 1 Vol Folin Ciocalteu wurde mit 2 Vol H₂O immer frisch gemischt

Zu 600 µl Probe (1:100 bis 1:500 verdünnt) oder BSA-Standard (5-60 µg) wurden 10 µl Na-Desoxycholat zugegeben, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl TCA zugesetzt und der Ansatz 7 min bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Danach wurde das Pellet in 450 µl Reagenz-Mix gelöst und 2 x 300 µl Reagenz C zugegeben. Zwischendurch wurde mehrmals geschüttelt. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurden die Proben bei 750 nm vermessen.

2.8.4 Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel and Flügge 1984)

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

Dazu wurden 100 µl Proteinprobe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt, 300 µl Wasser zugegeben und nach Schütteln für 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 und Probenpuffer aufgenommen.

2.8.5 Elektrophoretische Methoden

Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Fa. 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.

2.8.5.1 Probenvorbereitung

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 20 g/l SDS, 50 % (v/v) Glycerin 0.5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau] gemischt und 5 min bei 45 °C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufs Gel.

2.8.5.2 Protein Marker (New England Biolabs GmbH, Schwalbach i. Taunus)

Um Aussagen über die Größe der im Gel analysierten Proteine treffen zu können, wurden Protein Marker mit aufgetragen.

Dabei wurden 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 verwendet.

2.8.5.3 Lineare SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 10, 12.5 oder 15%ige Gele zum Einsatz.

Trenngel:

	10 %	12.5 %	15 %	17.5 %
30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid Stammlösung	2.0 ml	2.5 ml	3.0 ml	3.5 ml
1.88 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
5 g/l SDS	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
H ₂ O	1.6 ml	1.1 ml	0.6 ml	0.1 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
APS (10%ig)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Das Gelgemisch wurde nach dem Mischen luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um eine planare Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml Wasser überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngelges wurde das Wasser wieder entfernt und 1.5 ml Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde.

Sammelgel:

30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid Stammlösung	0.33 ml
0.625 M Tris-HCl (pH 8.8)	0.4 ml
5 g/l SDS	0.4 ml
H ₂ O	0.87 ml
TEMED	2 µl
APS (10%ig)	10 µl

Der Elektrodenpuffer [2 mM Tris (pH 8.3), 0.2 M Glycin, 10 g/l SDS] wurde in den Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben. Das Gel wurde (ohne *Spacer*) mittels Klemmen an der Kammer befestigt und der Kamm unter Puffer entnommen.

Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung durchgeführt. Dabei lag zuerst eine Stromstärke von 10 mA pro angeschlossenen Gel an. Nach 15 min wurde die Stromstärke auf 20 - 25 mA pro Gel heraufreguliert und die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke bis zum Herauslaufen der Bromphenolblau-Front durchgeführt.

2.8.5.4 SDS-Tricin-PAGE nach Schägger *et al.*, 1988

Dieses Tricine-SDS-PAGE-System wurde eingesetzt, um die Proteine für eine N-terminale Ansequenzierung aufzutrennen. Es wurden 6 ml Trenngel (18%ig) zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit H₂O zur Gewinnung einer scharfen Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel überschichtet.

2. Material und Methoden

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
40 % Acrylamid	0.2 ml	1.8 ml
Gelpuffer [3 M Tris, 10.4 mM SDS (pH 8.45)]	0.5 ml	2.0 ml
H ₂ O	1.3 ml	2.2 ml
10 % APS	20 µl	30 µl
TEMED	2 µl	5 µl

Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer dienten Kathoden- [0.1 M Tris, 0.1 M Tricin, 3.5 mM SDS, pH 8.4] und Anodenpuffer [0.2 M Tris (pH 8.9)], die in die entsprechenden Elektrodenkammern gegeben wurden. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung mit einer Stromstärke 25 mA pro Gel durchgeführt.

2.8.5.5 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran, Fa. Millipore, Eschwege).

A) Semi-dry-Blot

Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol, H₂O und 10 min in AnodenpufferII [25 mM Tris, 10% Methanol pH 10.4] geschwenkt. Auch auf Gelgröße wurden sechs Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zugeschnitten und drei mit Kathodenpuffer [25 mM Tris pH 9.4, 40 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol], zwei mit Anodenpuffer I [0.3 mM Tris, 10 % Methanol, pH10.4] und eines mit Anodenpuffer II getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung beim Transfer störender Salze in Kathoden-Puffer gespült. In der Blotapparatur (Biometra Göttingen) wurden nacheinander 2 Lagen Whatman-Papier in Anodenpuffer I getränkt, eine Lage Whatman-Papier mit Anodenpuffer II, die Membran, das Proteingel und 3 Lagen Whatman-Papier Kathodenpuffer enthaltend, luftblasenfrei übereinandergelegt und der Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm² Gelfläche) über eine halbe Stunde.

Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt. Die Membran wurde luftgetrocknet und die abgetrennte Markerspür wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen. Für die Ansequenzierung von Proteinen wurde die Membran mit 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250 gelöst in 50 % (v/v) Methanol, 7.5 % (v/v) Essigsäure für 2 min gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes mit 50 % (v/v) Methanol und 7.5 % (v/v) Essigsäure.

B) Tank-Blot

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach dem Gellauf in dem auf 4 °C vorgekühltem Transferpuffer [1 Vol 0.1 M CAPS pH 11.0; 8 Vol H₂O; 1 Vol Methanol] geschwenkt, um die beim Transfer auf die Membran störenden Salze zu entfernen. Außerdem wurden 12 Lagen Whatman-3MM-Papier auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls mit gekühltem Transferpuffer getränkt. Eine PVDF-Membran, die gleichfalls der Gelgröße entsprach, wurde nacheinander für jeweils 1 min in Methanol, H₂O und Transferpuffer äquilibriert. Nach Aufbau des Blots, bei dem das Gel und die Membran zwischen je 6 Lagen Whatman-3MM-Papier gelagert wurden, erfolgte der Transfer der Proteine bei 100 V und 250 mA für 90 min auf die PVDF-Membran. Die Tank-Blot-Apparatur wurde dabei auf einen Magnetrührer gestellt, so daß ein kontinuierlicher Pufferstrom erzeugt wurde, der, wie die Vorkühlung des Transferpuffers, dem Abfangen der während der Übertragung entstehenden Wärme diente. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran luftgetrocknet, die Markerspuren abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung unterzogen. Ebenso wurde das Gel zur Überprüfung der Blot-Effizienz Coomassie gefärbt.

2.8.6 Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.8.6.1 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (nach Weber and Osborn 1969)

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung [2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0.5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O] inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes durch Inkubation in Entfärbelösung [50 % Methanol, 7.5 % Essigsäure]. Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O aufbewahrt.

Zur Färbung von Markerspuren auf PVDF-Membranen wurden diese 1 min in Färbelösung inkubiert, anschließend ebenfalls unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt und luftgetrocknet.

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

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 100 ml Fixierlösung [50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Ethanol in H₂O] für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gel eine Minute in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und zwei Minuten in 100 ml Vorbehandlungslösung [40 mg Natriumthiosulfat in H₂O] inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in H₂O (je 20 s) wurde das Gel 20 min mit Imprägnier-Lösung (200 mg Silbernitrat und 50 µl 37 % (v/v) Formaldehyd in 100 ml H₂O) behandelt. An einen weiteren Waschschrift mit H₂O schloß sich die Entwicklung (6 g Na₂CO₃, 1 mg Na₂S₂O₃ und 70 µl Formaldehyd in 100 ml H₂O) an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem nacheinander 2 x 2 min mit H₂O, einem Methanol [50 %

(v/v)]-Essigsäure [12 % (v/v)]-Gemisch und 100 ml 50 % Methanol (v/v) in H₂O gewaschen wurde. Anschließend konnte das Gel in H₂O aufbewahrt oder getrocknet werden.

2.8.6.3 Trocknung von Polyacrylamid-Gelen

Um die PAA-Gele haltbar zu machen, wurden sie mittels Vakuumvorrichtung 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 i. Breisgau) 75 min auf 60 °C erhitzt. Die Gele verblieben danach noch bis zur vollständigen Abkühlung unter Vakuum.

2.8.7 Sequenzierung von Proteinen

Die N-terminale Sequenzierung der in *E.coli* überexprimierten Proteine wurde im Labor von Dr. Peter Rücknagel, Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft, Halle, durchgeführt. Das jeweilige Protein wurde dazu auf eine PVDF-Membran geblottet, mit Coomassie angefärbt und das Membranstück ausgeschnitten. Die Sequenzierung erfolgte durch automatischen Edman-Abbau unter Verwendung des Hewlett-Packard G1005A-Proteinsequenz-Analysesystems.

2.8.8 Nachweis von gebundenem Zink in Proteinen mittels ⁶⁵Zn-Blot (nach Klimpel *et al.*, 1994)

Die zu untersuchenden Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mittels *Semi-dry*-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend 2 x mit (5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) Lösung und 5 x mit H₂O zur Entfernung von Salzen gewaschen. Dann wurde die Membran für 3 h in 50 ml Zn-Puffer (100 µM CaCl₂; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 3 µl ⁶⁵ZnCl₂-Stammlösung [spez. Aktivität 185 GBq/g]) inkubiert. Ungebundenes ⁶⁵ZnCl₂ wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (100 µM CaCl₂; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) entfernt. Die feuchte Membran wurde in Folie eingeschweißt und in einer Röntgenkassette auf einem Röntgenfilm exponiert. Dieser wurde nach 1-3 Tagen entwickelt. Die Entwicklung des Filmes erfolgte durch 10-minütige Inkubation in Entwicklerlösung. Es folgte ein kurzes Spülen im Wasserbad. Anschließend wurde der Film fixiert, einige Minuten gewässert und getrocknet.

2.8.9 Antikörpernachweis

Für den Antikörpernachweis von *Strep*-tag II-Fusionsproteinen wurde der *Strep*-tag-Detection-Kit (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen) eingesetzt. Hierbei wurde die Membran zuerst zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen 30 min mit Puffer S1 inkubiert. Dann folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem Streptactin gekoppelten

Peroxidasekonjugat und nach mehrmaligem Waschen mit H₂O und Puffer W erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe von Chromogen und Peroxidasesubstrat. Nach wenigen Minuten waren die Proteinbanden sichtbar, und die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit H₂O gestoppt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und zwischen Filterpapier lichtgeschützt aufbewahrt.

2.8.10 Rekonstitutionsexperimente

2.8.10.1 Herstellung von Liposomen (nach Reidlinger, 1994)

Zur Herstellung von Liposomen wurde vorgereinigtes Phosphatidylcholin TypII-S verwendet. Der Lecithinanteil dieser Präparation betrug ca. 17 % (Fa. Sigma, Produktinformation). Das Lipidgemisch (50 mg/ml) wurde in Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0; 2 mM DTT) aufgenommen und zum Ultraschall eingesetzt. Die Suspension wurde in einer Eis-NaCl-Mischung gekühlt und solange für je 30 s bei 60 W mit Ultraschall behandelt, bis die zunächst trübe Suspension transluzierend war. Zwischen den Ultraschall-Pulsen wurden die Proben für je 2 min gekühlt.

2.8.10.2 Herstellung von Proteoliposomen (nach Racker, 1979)

Die vorgeformten Liposomen wurden auf eine Lipidkonzentration von 10 mg/ml mit Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0; 2 mM DTT) verdünnt und mit Chaps (Endkonzentration 11 mM) versetzt. Das gereinigte Zat1-Strep-tag-Protein (2 µg/µl) wurde zu dem Lipid-Detergenz-Gemisch gegeben und für 72 h gegen Tris-Puffer bei mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Das Verhältnis von Lipid zu Protein betrug 50:1 (w/w). Nach der Dialyse wurden die Proteoliposomen durch Ultrazentrifugation pelletiert (100000 g, 15 min, 4 °C) und in 1/10 Vol Tris-Puffer resuspendiert. Die Proteoliposomen wurden zu je 20 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle wurden Liposomen ohne Protein der gleichen Behandlung unterzogen.

2.8.10.3 Nachweis eines künstlichen pH-Gradienten durch Fluoreszenzlöschung

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

Das Beladen der Liposomen erfolgte durch langsames Auftauen und 30-minütige Inkubation der Liposomen/Proteoliposomen in Gegenwart von 0.5 M NH₄Cl auf Eis. Um das Löschen der Fluoreszenz nachzuweisen, wurden 2 ml des 2 µM Acridin-Orange (3,6 bis-Dimethylaminoacridin) enthaltenden Cholinchlorid-Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.5 M

Cholinchlorid; 5 mM MgCl₂) in Quarzküvetten in einem Spectrofluorometer (SFM 25, Fa. Kontron, Eching) bei einer Wellenlänge von 493 nm vorinkubiert. Die Fluoreszenzemission wurde bei 530 nm detektiert und mit dem Programm *WIND* (32-bit spectroscopy software for windows, Fa. Kontron, Eching) am angeschlossenen PC dargestellt. Nachdem sich das Signal stabilisiert hatte, wurden 5 µl der Liposomen/Proteoliposomen zugegeben und die relative Fluoreszenz über 15 min verfolgt. Die Liposomen/Proteoliposomen waren intakt, wenn die relative Fluoreszenz nach Zugabe der geladenen Liposomen/Proteoliposomen von 100 % auf 40 % absank und im Verlauf der Detektion ganz langsam wieder 80 % der relativen Fluoreszenz erreichte. Nach diesem Test wurden mit diesen Liposomen/Proteoliposomen Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen durchgeführt.

2.9 Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen

2.9.1 Aufnahme radioaktiver Metalle durch Liposomen/Proteoliposomen (nach Goldberg *et al.*, 1999)

Die Aufnahmeversuche fanden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, in einem Gesamtvolumen von 30 µl statt. Es wurde in einem Thermoblock bei 25 °C inkubiert. Die Liposomen/Proteoliposomen wurden zum vorgelegten Aufnahme-Puffer (10 mM Tris, pH 9.0; 0.5 M Cholinchlorid; 5 mM MgCl₂) zugegeben und 1 min inkubiert. Durch Zugabe der radioaktiven Metalle ⁶⁵ZnCl₂ (spez. Aktivität 185 GBq/g; DuPont, Bad Homburg), ⁵⁷CoCl₂ (spez. Aktivität 315 MBq/µg; Amersham Pharmacia, Freiburg) und ¹⁰⁹CdCl₂ (spez. Aktivität 37 MBq/µg; Amersham Pharmacia, Freiburg) in unterschiedlichen Konzentrationen wurde die Reaktion gestartet. Nach definierten Zeiten wurden Proben (je 5 µl) entnommen, abfiltriert (Membranfilter NC45, Schleicher und Schuell, Dassel) und 2 x mit 0.5 ml Waschpuffer [0.2 M Cholinchlorid; 10 mM Tris-HCl, pH 7.0; 10 mM MgCl₂; 10 mM EDTA] gespült. Die Membranfilter wurden in ein Mini-Poly-Q Röhrchen überführt, und nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität des entsprechenden Isotops im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 5 µl Probe direkt mit 4 ml Ready Safe™ gemischt und gemessen.

2.9.2 Aufnahme radioaktiver Metalle durch die Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Es wurden 50 ml Minimal-Medium (SMM bzw. EMM 2) mit den entsprechenden Supplementen versetzt, 1%ig mit einer Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren, logarithmischen Wachstumsphase bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 4 °C, 5 min) geerntet und 2 x mit Uptake-Puffer [10 mM MES,

2 % (w/v) Glucose, pH 6.1] gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 40 ml Uptake-Puffer resuspendiert und die OD₆₀₀ für die Trockengewichtsbestimmung gemessen. Die Aufnahmemessung erfolgte in 50 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 140 rpm im Wasserbadschüttler (Gyrotory G76, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey). Es wurden 3.5 ml Zellen in Uptake-Puffer vorgelegt und 4 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl einer radioaktiven Metall-Stammlösung von ⁶⁵ZnCl₂ (spez. Aktivität 185 GBq/g; DuPont, Bad Homburg), ⁵⁷CoCl₂ (spez. Aktivität 315 MBq/µg; Amersham Pharmacia, Freiburg) und ¹⁰⁹CdCl₂ (spez. Aktivität 37 MBq/µg; Amersham Pharmacia, Freiburg) wurde die Reaktion gestartet. Nach definierten Zeiten wurden Proben (450 µl) entnommen und filtriert (Membranfilter NC45). Die Filter wurden 3 x mit 5 ml Puffer SSW [1 mM NaCl; 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂; 1 mM KH₂PO₄; 20 mM Na₃Citrat; 1 mM EDTA pH 4.2] gewaschen und in ein Mini-Poly-Q Röhrchen überführt.

Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität des entsprechenden Isotops im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 100 µl Probe entnommen und direkt mit 4 ml Ready Safe™ gemischt und gemessen. Anschließend wurde berechnet, wieviel µmol radioaktives Metall pro g Trockengewicht aufgenommen wurden.

2.9.3 Aufnahme radioaktiver Metalle durch *R. metallidurans*

20 ml Tris-Minimalmedium wurden 1%ig mit einer Vorkultur angeimpft und 24 h schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C) und 2 x mit 10 mM Tris, pH 7.0 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Tris, pH 7.0 resuspendiert und mit einem Klett-Summerson-Colorimeter die Kletteinheiten zur Bestimmung des Trockengewichts gemessen. Die Aufnahmemessungen erfolgten in 50 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 140 rpm im. Es wurden 3 ml Zellen und 30 µl 20 % (w/v) Na-Gluconat vorgelegt und 1 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Durch Zugabe von 15 µl einer radioaktiven Metall-Stammlösung von ⁶⁵ZnCl₂ (spez. Aktivität 185 GBq/g; DuPont, Bad Homburg), ⁵⁷CoCl₂ (spez. Aktivität 315 MBq/µg; Amersham Pharmacia, Freiburg) und ¹⁰⁹CdCl₂ (spez. Aktivität 37 MBq/µg; Amersham Pharmacia, Freiburg) wurde die Reaktion gestartet. Nach definierten Zeiten wurden Proben (300 µl) entnommen und filtriert (Membranfilter NC45). Die Filter wurden 2 x mit 3 ml Waschpuffer [10 mM Tris pH 7,0; 10 mM MgCl₂] gewaschen und in ein Mini-Poly-Q Röhrchen überführt.

Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität des entsprechenden Isotops im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 100 µl Probe entnommen und direkt mit 4 ml Ready Safe™ gemischt und gemessen. Anschließend wurde berechnet, wieviel µmol radioaktives Metall pro g Trockengewicht aufgenommen wurden.

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1 Nachweis von CDF-Proteinen in Pflanzen

Ziel dieser Arbeit war es, den Nachweis zu erbringen, daß Proteine der CDF-Familie (*cation diffusion facilitator*) auch im Pflanzenreich verbreitet sind. Dazu wurden die Genome von Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Tabak (*Nicotiana tabacum*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und Taubenkropf-Leimkraut (*Silene cucubalis*) untersucht. Eine sich anschließende Charakterisierung sollte helfen, die Funktion dieser Proteinfamilie im Metallstoffwechsel zu verstehen. Für die Charakterisierung dieser Proteinfamilie wurde mit verschiedenen Organismen gearbeitet. Als bakterieller Vertreter wurde *Ralstonia metallidurans* untersucht. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* wurden für die Experimente mit eukaryotischen Systemen verwendet.

3.1.1 Nachweis von pflanzlichen CDF-Proteinen durch heterologe *Southern*-Hybridisierung

Für die Suche nach CDF-homologen Genen wurde chromosomale DNA von Tabak, Tomate, Tomatenzellkulturen und *Silene cucubalis* eingesetzt. Die DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und auf eine Nylonmembran geblottet. Anschließend wurde mit verschiedenen Sonden bei unterschiedlichen Temperaturen hybridisiert. Hierbei wurden zuerst die Hefegene *COTI* und *ZRCI* mittels PCR amplifiziert und als Sonden eingesetzt. Bei Hybridisierungstemperaturen > 60 °C konnten keine Signale detektiert werden. Bei der Hybridisierung mit der *COTI*-Sonde bei 55 °C wurden die folgenden Fragmente markiert (Ergebnis nicht gezeigt)

-Tomaten-Zellkultur: 1.2 kb; 2.1 kb; 2.5 kb *Bam*HI-Fragmente und 1.6 kb; 2.6 kb *Eco*RI-Fragmente

-*Silene cucubalis*: 2.7 kb; 3.1 kb *Eco*RI-Fragmente und 2.4 kb *Hind*III-Fragment.

Mit der *ZRCI*-Sonde wurde bei gleicher Hybridisierung ein 6.8 kb *Eco*RI-Fragment von Tomaten-Zellkultur- und Tabak-DNA markiert (Abb. 2). Wurden beide Sonden gleichzeitig zur Hybridisierung eingesetzt, so wurde bei Tabak ein 6.8 kb *Eco*RI-Fragment und bei der Tomaten-Zellkultur ein 1.6 kb *Eco*RI-Fragment markiert.

Somit wurde erstmals der Beweis erbracht, daß im Pflanzengenom *COTI*- bzw. *ZRCI*-homologe DNA-Sequenzen vorhanden sind.

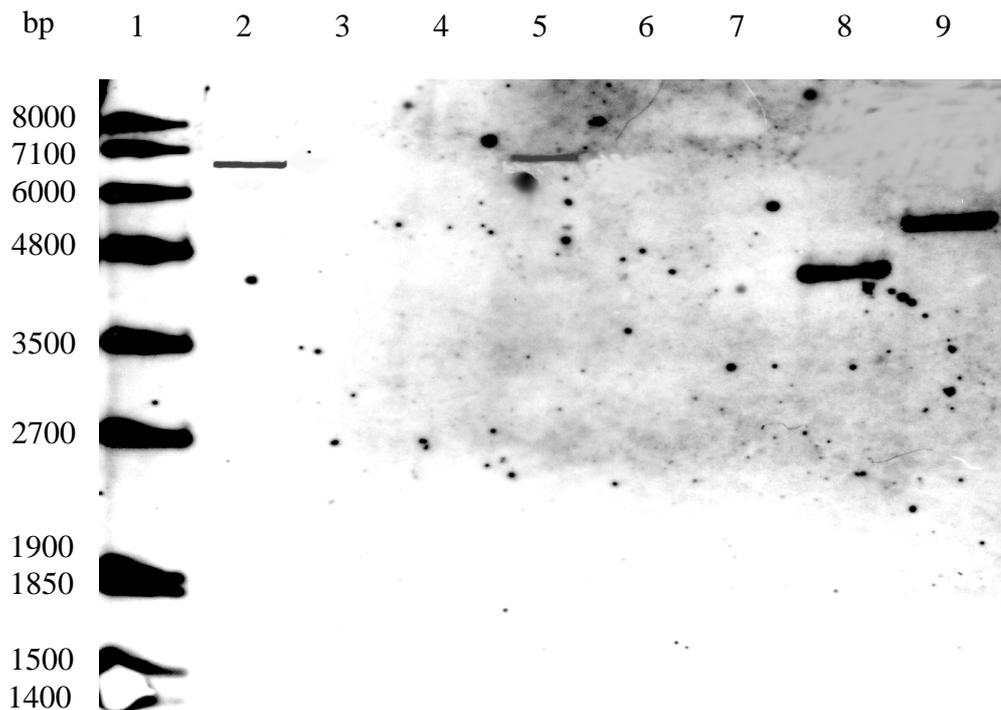


Abb. 2: Southern-Hybridisierung genomischer DNA mit *ZRCI*-Sonde bei 55 °C

Spur 1: DIG-Marker VII (Roche), Spur 2: Tomaten-DNA *EcoRI* geschnitten, Spur 3: Tomaten-DNA *HindIII* geschnitten, Spur 4: Tomaten-DNA *SalI* geschnitten, Spur 5: Tabak-DNA *EcoRI* geschnitten, Spur 6: Tabak-DNA *HindIII* geschnitten, Spur 7: Tabak-DNA *SalI* geschnitten, Spur 8: *S. cerevisiae*-DNA *EcoRI* geschnitten, Spur 9: *S. cerevisiae*-DNA *HindIII* geschnitten.

3.1.2 Klonierung und Sequenzierung von RT-PCR-Produkten mit degenerierten Primern

Parallel zu den Southern-Hybridisierungs-Experimenten wurde versucht, mit degenerierten Primern über RT-PCR einzelne Domänen der CDF-Proteine zu amplifizieren. Da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Sequenzen für CDF-Protein kodierende Gene in Pflanzen bekannt waren, konnte das Vorhandensein von Exon/Intron-Strukturen innerhalb der gesuchten Gene nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde die mRNA von Tabak, Tomaten-Zellkultur und *Silene* isoliert und durch Reverse Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Es wurden degenerierte Primer abgeleitet, die im konservierten Bereich der transmembranen Helices IV (GA948) und V (GA949) der bekannten CDF-Proteine liegen. Zusätzlich wurde ein Oligo dT-Primer in Kombination mit dem deg. Primer der TMH IV (GA948) verwendet, um den C-Terminus amplifizieren zu können. Die RT-PCR-Reaktion wurde mit dem *Titan™ One Tube RT-PCR-System* (Fa. Boehringer) nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Hierbei laufen das Umschreiben der mRNA in die cDNA und die Amplifizierung der cDNA nacheinander in einem Reaktionsgefäß ab. In einem 1,5%igen Agarosegel konnten keine Produkte nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Wurden jedoch 2 µl der RT-PCR-Reaktion als *Template* für eine weitere PCR-Reaktion (Taq-Polymerase) eingesetzt, so konnten spezifische PCR-

Produkte erhalten werden (Abb. 3). Diese Produkte wurden isoliert, in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert und sequenziert. Beim Vergleich der Sequenzen mit verschiedenen Gen- und Protein-Datenbanken wurde jedoch bei keinem der klonierten PCR-Produkte eine Homologie zu den bekannten CDF-Proteinen gefunden. Der Nachweis von CDF-Protein-Domänen über RT-PCR mit degenerierten Primern führte nicht zum Erfolg.

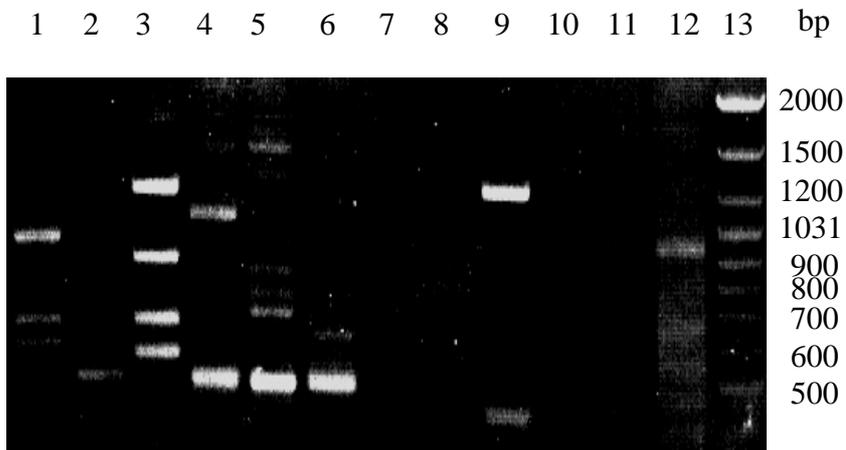


Abb. 3: PCR-Produkte mit verschiedenen Primerkombinationen und *Annealing*-Temperaturen, Als *Template* wurden jeweils 2 µl der vorhergehenden RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

Spur 1: Tomaten-DNA mit GA957 und GA948 bei 45 °C, Spur 2: Tomaten-DNA mit GA957 und GA948 bei 50 °C, Spur 3: Tomaten-DNA mit GA957 und GA948 bei 55 °C, Spur 4: Tomaten-DNA mit GA957 und GA949 bei 45 °C, Spur 5: Tomaten-DNA mit GA957 und GA949 bei 50 °C, Spur 6: Tomaten-DNA mit GA957 und GA949 bei 55 °C, Spur 7: *Silene*-DNA mit GA957 und GA948 bei 45 °C, Spur 8: *Silene*-DNA mit GA957 und GA948 bei 50 °C, Spur 9: *Silene*-DNA mit GA957 und GA948 bei 55 °C, Spur 10: *Silene*-DNA mit GA957 und GA949 bei 45 °C, Spur 11: *Silene*-DNA mit GA957 und GA949 bei 50 °C, Spur 12: *Silene*-DNA mit GA957 und GA949 bei 55 °C, Spur 13: *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* (MBI).

3.1.3 Nachweis eines 250 bp-Fragmentes in Tomate und *Silene cucubalis*

Beim regelmäßigen Durchsuchen der verschiedenen Gen- und Proteindatenbanken fanden wir eine Sequenz der Kartoffel (123pep, Acc.Nr. U60071), die Homologie zur CDF-Proteinfamilie besitzt. Dabei handelt es sich um ein 494 bp großes PCR-Produkt, welches auf der Suche nach Pathogen-Resistenzgenen der Kartoffel mit degenerierten Primern amplifiziert, kloniert und sequenziert wurde (Leister *et al.*, 1996). Die Homologie dieses 123pep Produkts besteht zum N-Terminus der bisher bekannten CDF-Proteine (Abb. 4). Das klonierte 123pep PCR-Produkt wurde von C. Gebhardt (Köln) zur Verfügung gestellt.

3. Experimente und Ergebnisse

<i>czcD_R.metallidurans</i>	----MGAGHSHDHPGGNERSLKIALALTGTFLIAEVVGGVMTKSLALISD	46
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	-----MITGKELRIISLLTLDTVFFLEITIGYMSHSLALIAD	38
<i>123pep_Kartoffel</i>	FTTSVMKPLRHILGERKSRKIALFLLINTAYMVVEFAAGFMSNSLGLISD	50
	: . : * : .::: * . * *::*: .***:	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	AAHMLTDTVALAIALAAIAIAK-RPADKKRTFGYRFEILAAAFNALLLF	95
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	SFHMLNDIISLLVALWAVDVAKNRGPDAKYTYGWKRAEILGALINAVFLI	88
<i>123pep_Kartoffel</i>	ACHMLFDCAALAIGLYASYISR-LPANGQFN YGRGRFEVLSGYTNAVLLV	99
	: *** * : * : . * * ::: . : : .:* * *:* . . ***: .	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	GVAIYILYEAYLRKSPQIES-TGMFVVAVLGLIINLISMRLSSGQSS	144
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	ALCFSIMIEALQRLIEPQEIQNPRLVLYVGVAGLISNVVGLFLFDHGS	138
<i>123pep_Kartoffel</i>	LVGALIVLESFERILDPQEVTT-NLLSVSVGGLLVNIVGLIFFHEEHHH	148
	: * : * : * : . * : : . : : * . * * : * : : : .	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	-----	
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	SLHSHSHGVSVEGNNDLDIESNATHSHSHASLPNDNLAIDEDAISSPGPS	188
<i>123pep_Kartoffel</i>	-----	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	-----SLNVKGAYLE	154
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	GQIGEVLPQSVVNRLSNESQPLLNHDDHDSHESKPKGHRSLNMHGVFLH	238
<i>123pep_Kartoffel</i>	-----AHG--GSCSH	156
	: . * .	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	VWSDLLGSVGVIAGAIIRFTGWAW-----VDSIAIVLIGLWVLPRT-	196
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	VLGDALGNIGVIAAALFIWKTEYSWRYS DPIVSLIITIIIFSSALPLSR	288
<i>123pep_Kartoffel</i>	SHSHSKTQ-----	164
	. . .	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	-----WIL-----	199
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	RASRILLQATPSTISADQIQREILAVPGVIAVHDFHVWNLTESIYIASIH	338
<i>123pep_Kartoffel</i>	-----	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	-----	
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	VQIDCAPDKFMSSAKLIRKIFHQHGIHSATVQPEFVSGDVNEDIRRRFSI	388
<i>123pep_Kartoffel</i>	-----	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	-----	
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	IAGGSPSSQEAFDSHGNTHEGRKSSPIAYGATTASSNCIVDDAVNCNT	438
<i>123pep_Kartoffel</i>	-----	
<i>czcD_R.metallidurans</i>	----	
<i>ZRCI_S.cerevisiae</i>	SNCL	442
<i>123pep_Kartoffel</i>	----	

Abb. 4: Sequenzvergleich des 123pep PCR-Produkts der Kartoffel mit den Genen *ZRCI* (*S. cerevisiae*) und *czcD* (*R. metallidurans*)

Aus der vorhandenen 123pep-Sequenz wurden die Primer 123pep up und down abgeleitet, die im konservierten Bereich der transmembranen Helices I und IV liegen. Diese Primer wurden in RT-PCR-Reaktionen eingesetzt, um das homologe Fragment der mRNA von Tomate und *Silene* zu amplifizieren. Die RT-PCR-Reaktion wurde mit dem *Titan™ One Tube RT-PCR-*

3. Experimente und Ergebnisse

System (Fa. Boehringer) nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Die erwarteten PCR-Produkte sollten ungefähr 250 bp groß sein. Es wurden bei beiden Ansätzen mehrere Produkte erhalten, wobei ein jeweils ca. 250 bp Hauptprodukt isoliert und in den Vektor pGEM®-T Easy kloniert wurde (pECD526 und pECD527). Die Sequenzierung der beiden Fragmente bestätigte, daß 123pep homologe Fragmente aus Tomate und *Silene* amplifiziert wurden. Wie in der Abbildung 5 zu erkennen ist, sind die 123pep-Sequenzen von Kartoffel, Tomate und *Silene* nahezu identisch. Damit wurde ein weiterer Beweis erbracht, daß es homologe Sequenzen im Pflanzengenom gibt.

123pep/Kartoffel	GGTTTACGACTTCAGTTATGAAACCTCTCCGGCATATCTTGGGTGAGAGGAAGTCACGCA
123pep/Kartoffel	AGATTGCGCTTTTCTTTTGATCAATACAGCTTACATGGTTGTGGAATTTGCTGCTGGTT
123pep/Kartoffel	TTATGAGTAATAGCCTTGGGTTGATATCAGATGCCTGTCACATGCTGTTGA?TTGTGCA
123pep/ <i>Silene</i>GCCTGTCACATGCTGTTGA?TTGTGCA
123pep/TomateGCCTGTCACATGCTGTTGAATTTGTGCA
123pep/Kartoffel	GCTCTAGCTATTGGATTATATGCGTCTTACATATCACGGTTGCCAGCAAATGGTCAGTTT
123pep/ <i>Silene</i>	GCTCTAGCTATTGGATTATATGCGTCTTACATATCACGGTTGCCAGCAAATGGTCAGTTT
123pep/Tomate	GCTCTAGCTATTGGATTATATGCGTCTTACATATCACGGTTGCCAGCAAATGGTCAATTT
123pep/Kartoffel	AACTACGGCCGTGGAAGATTTGAGGTTCTTTCTGGGTATACAAATGCTGTTCTTTTGGTC
123pep/ <i>Silene</i>	AACTAGGGCCGTGGAAGATTTGAGGTTCTTTCTGGGTATACAAATGCTGTTCTTTTGGTC
123pep/Tomate	AACTACGGCCGAGGAAGATTTGAGGTTCTTTCTGGGTATGCAAATGCTGTTCTTTTGGTC
123pep/Kartoffel	CTTGTGGGAGCGTTAATTGTGCTTGAATCATTGAGAGGATTTAGACCCTCAGGAGGTT
123pep/ <i>Silene</i>	CTTGTGGGAGCGTTAATTGTGCTTGAATCATTGAGAGGACTTTAGACCCTCAGGAGGTT
123pep/Tomate	CTTGTGGGAGCGTTGATTGTGCTTGAATCATTGAGAGGATATTGGACCCTCAGGAGGTT
123pep/Kartoffel	ACCACTAACAGTCTATTGTGCTGCTGTTGGTGGGCTGCTTGTAAATATTGTGGGTTTG
123pep/ <i>Silene</i>	ACCACTAACAGTCTATTGTGCTGCTGTTGGTGGGCTGCT.....
123pep/Tomate	TCCACTAACAGCCTATTGTGCTGCTGTTGGTGGGCTGCT.....
123pep/Kartoffel	ATCTTCTTTCACGAGGAACATCATCATGCCCATGGTGGATCATGTTCCCATTCATCTCT
123pep/Kartoffel	CATTCCAAAACCCAA.....

Abb. 5: Sequenzvergleich der 123pep-Fragmente von Kartoffel, Tomate und *Silene*

3.1.4 Screening von cDNA-Banken (Tomate, *Silene*) nach dem kompletten CDF-Protein kodierenden Gen

Da das Vorhandensein eines CDF-Protein kodierenden Gens in Kartoffel, Tomate und *Silene* durch ein Genfragment nachgewiesen werden konnte, galt es nun, das komplette Gen im Genom dieser Pflanzen zu finden. Für diese Suche standen cDNA-Banken von Tomatenzellkulturen und *Silene cucubalis* zur Verfügung. In Vorversuchen wurde geprüft, ob die unter 3.1.3 beschriebenen 123pep-Fragmente mittels PCR aus den beiden cDNA-Banken

amplifiziert werden konnten. Dazu wurden die Phagenüberstände der cDNA-Banken bis 10^{-6} verdünnt und je 2 μ l als *Template* für die PCR-Reaktion mit den Primern 123pep.up und 123pep.down eingesetzt. Die Sequenzen der erhaltenen PCR-Produkte waren der Beweis, daß das gesuchte Gen in den beiden cDNA-Banken enthalten sein sollte (Ergebnis nicht gezeigt).

3.1.4.1 *Screening* mittels PCR

Die 250 bp großen 123pep-Produkte wurden durch PCR in den cDNA-Banken von Tomate und *Silene* bereits nachgewiesen. Um größere Fragmente, bzw. das komplette Gen zu amplifizieren, wurden biotinylierte Primer der bekannten 123pep-Sequenz sowie universelle Primer (T3 und T7), die mit der *Multicloning site* (MCS) der Bacteriophagen hybridisieren, eingesetzt (nach Tillmann und Eschrich, 1997).

In der ersten PCR-Reaktion wurde dabei jeweils nur einer der beiden biotinylierten Primer (pep.up bzw. pep.down) eingesetzt. Amplifizierte DNA-Einzelstränge sollten an ihrem 5`Ende biotinyliert sein und wurden durch Bindung an paramagnetische Streptavidin-Partikel (Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles, Promega) gereinigt und konzentriert. Sie dienten als *Template* für die zweite PCR-Reaktion, bei der die biotinylierten Primer jeweils mit dem universellen Primer T3 bzw. T7 als Primerpaar verwendet wurden. Je nach Orientierung des gesuchten Fragments im λ -ZAP-Vektor sollten entweder die Primerkombinationen T7/pep.down und T3/pep.up oder die Kombinationen T7/pep.up und T3/pep.down eindeutige PCR-Produkte liefern. Nur bei Verwendung der Tomaten cDNA-Bank als *Template* wurde bei der Primerkombination T3/pep.down ein ca. 400 bp PCR-Produkt enthalten, während bei allen anderen PCR-Ansätzen keine Produkte amplifiziert wurden. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM[®]-T Easy-Vektor kloniert und sequenziert. Es enthielt das 5`Ende des CDF-Protein kodierenden Gens aus Tomate mit der *EcoRI*-Schnittstelle zur Klonierung in den λ -ZAP-Vektor. Um das 3`Ende und den Startpunkt des Gens zu fischen, wurden zwei neue Primer (pep.up2 und pep.down2) abgeleitet (Abb. 6), und die beschriebenen PCR-Reaktionen mit diesen Primern wiederholt. Es wurden keine Produkte amplifiziert, so daß die universellen Primer T3 und T7 in weiteren PCR-Ansätzen durch die Primer SK und KS ersetzt wurden. Es wurden Produkte (200-300 bp) amplifiziert, kloniert und sequenziert, doch die Sequenzen waren entweder identisch mit dem bereits bekannten Fragment oder hatten keine Homologie zum gesuchten Gen. Da alle Ansätze, das komplette CDF-Protein kodierende Gen zu finden, nicht zum Erfolg führten, wurde dieses Experiment beendet.

3. Experimente und Ergebnisse

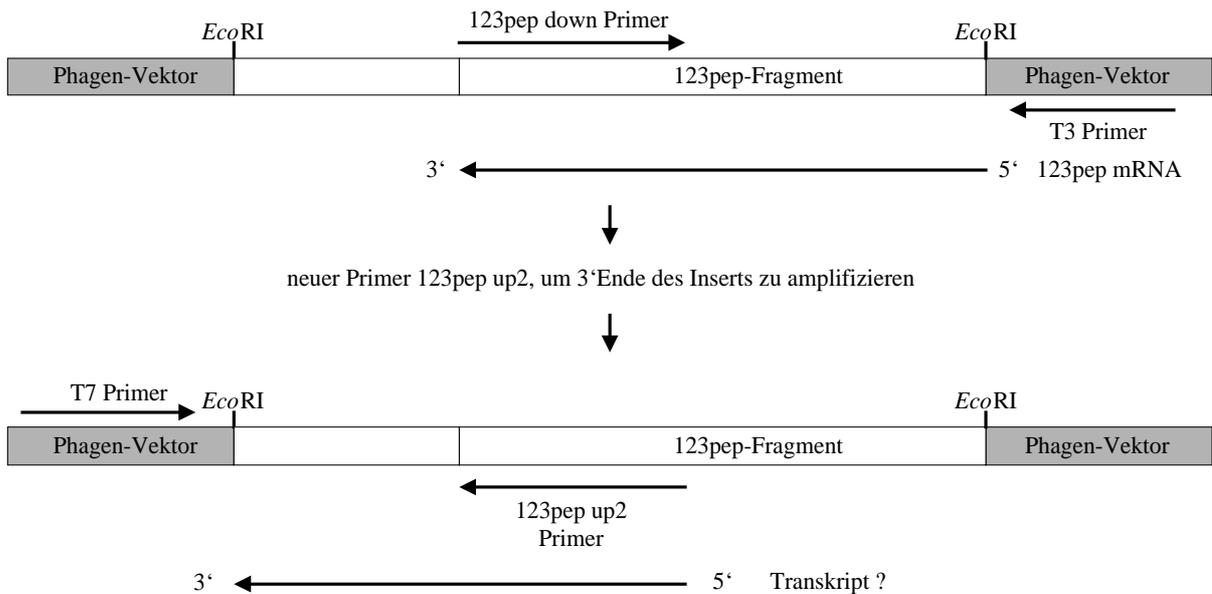


Abb. 6: Amplifikation eines 123pep PCR-Produkts aus der Tomaten cDNA-Bank und Ableitung eines neuen Primerpaares zur Amplifikation des unbekanntem Teils des Inserts

3.1.4.2 Screening mittels Hybridisierung und *In vivo Excision*

Parallel zum *Screening* mittels PCR wurden die cDNA-Banken auf herkömmliche Weise mittels Plaque-Hybridisierung nach den kompletten CDF-Protein kodierenden Gen durchsucht. Die zur Verfügung stehenden Phagenüberstände mit den cDNA-Fragmenten von Tomate und *Silene* wurden bis 10^{-6} verdünnt und für die Transfektion in *E. coli* XL1blue-Zellen eingesetzt. Von den so erhaltenen Phagenplatten wurden Membranfilter abgezogen (jeweils ein Original und ein Duplikat) und für die Plaquehybridisierung weiterverwendet. Die Filter wurden asymmetrisch markiert, so daß eine spätere Zuordnung von positiven Signalen zum zugehörigen Plaque möglich war. Als Sonden für die Hybridisierung wurden die 123pep PCR-Produkte von Tomate bzw. *Silene* verwendet. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen; die Temperatur betrug $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Filter wurden mit $1 \times \text{SSC}$ gewaschen. Positive Plaques wurden ausgestochen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit SM-Puffer überführt. Die Phagenüberstände der positiven Plaques wurden erneut verdünnt und einem nochmaligen *Screening* zur Anreicherung der positiven Signale unterzogen. Es wurden sehr viele „Positive Klone“ für die *in vivo Excision* eingesetzt und die darin enthaltenen Fragmente sequenziert (Ergebnis nicht gezeigt), doch letztendlich handelte es sich immer um „Falsch Positive“, so daß es auch hier zum ergebnislosen Abbruch des Versuchs kam.

3.2 Klonierung des *ZATI*-Gens, eines Zink-Transporters aus *Arabidopsis thaliana*

Das Vorhandensein von CDF-Protein kodierenden Genen im Pflanzengenom (*Lycopersicon esculentum*, *Silene cucubalis*) konnte, wie unter 3.1 beschrieben, nachgewiesen werden. Jedoch gelang es nicht, Klone mit vollständigen Gensequenzen zu finden, um das codierte CDF-Protein exprimieren zu können. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Sequenz von *Arabidopsis thaliana* veröffentlicht (Acc.Nr. AC005310), die ein putatives CDF-Protein kodiert. Dieses Gen wurde mittels PCR amplifiziert, in Expressionsvektoren kloniert und das Protein in *E. coli* exprimiert. Im folgenden wird das Protein mit Zat1p (Zink-Transporter von *A. thaliana*) bezeichnet (van der Zaal *et al.*, 1999).

3.2.1 Expression des Zat1-STREPTag-Fusionsproteins

Für die Expression des Zat1p in *E. coli* wurde das *Strep*-tag II-System verwendet. Das Gen wurde mittels PCR unter Nutzung der aufgeführten Primer (siehe Tab. 5) von *A. thaliana*-Gesamt-DNA amplifiziert, und in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert. Die Überprüfung des korrekten Leserahmens erfolgte mittels Sequenzierung.

Die Expressionskassetten der *Strep*-tag II-Vektoren stehen unter der transkriptionellen Kontrolle des *tetA* Promotor/Operators. Durch die sich an den *tetA* Promotor/Operator anschließende Ribosomenbindestelle wird die Initiation der Translation gewährleistet. Die Induktion der Genexpression im *E. coli*-Stamm BL21 erfolgte durch die Zugabe des künstlichen Induktors Anhydrotetracyclin. Nach Auftrennung von 20 µg Membranprotein im SDS-PAA-Gel konnte keine zusätzliche Bande im Vergleich zur mitgeführten Vektorkontrolle detektiert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Auch in der löslichen Fraktion sowie in den Zelltrümmern war keine zusätzliche Proteinbande zu erkennen. Um auszuschließen, daß es sich um ein Konzentrationsproblem handelt, wurden die Fraktionen auf eine PVDF-Membran gebロットet und einem Antikörpernachweis unterzogen. Aber auch mit dieser Methode konnte kein *Strep*-tag fusioniertes Protein nachgewiesen werden. Es galt nun herauszufinden, warum *E.coli* dieses pflanzliche Protein nicht exprimiert. Es folgte eine genaue Auswertung der *Codon usage* für *E.coli*. Dabei stellte sich z.B. heraus, daß von den 13 Argininen des *ZATI*-Gens nur 4 durch die für *E. coli* gebräuchlichen Codons CGC und CGG codiert sind. Die restlichen 9 Arginine sind durch die Codons AGA und AGG festgelegt (Abb. 7).

3. Experimente und Ergebnisse

```

atggagtctt caagtcccca ccatagtcac attggtgagg ttaatgttgg aaaatctgat
M E S S S P H H S H I V E V N V G K S D
gaagagagaa taattgtggc gagtaaagtc tgtggagaag caccatgtgg gttttcagat
E E R I I V A S K V C G E A P C G F S D
tctaagaatg cttccgggga tgctcacgaa cgctctgctt ctatgcggaa gctttgtatc
S K N A S G D A H E R S A S M R K L C I
gccgtcgtgc tgtgtctagt gttcatgagt gttgaagttg ttgggtgggat taaagccaat
A V V L C L V F M S V E V V G G I K A N
agtttagcta tattaaccga tgcagctcat ttgctctctg acgttgctgc ctttgctatc
S L A I L T D A A H L L S D V A A F A I
tccctcttct cattgtgggc tgctggctgg gaagcgactc ctaggcagac ttacgggttc
S L F S L W A A G W E A T P R Q T Y G F
ttcaggattg agattttggg tgctcttgta tctatccagc tcatttggtt gctcacgggt
F R I E I L G A L V S I Q L I W L L T G
attctggttt atgaagcgat tatcagaatt gttacagaga ccagtgaggt taatggattc
I L V Y E A I I R I V T E T S E V N G F
ctcatgtttc tgggtgctgc ctttggctca gtggtgaaca tcataatggc tgttctgcta
L M F L V A A F G L V V N I I M A V L L
gggcatgatac atggtccaca gtcatggaca tgggcatggc acggccatga ccatcacaat
G H D H G P Q S W T W A W H G H D H H N
catagccatg gggtgactgt taccactcat caccatcatc acgatcatga acatggccat
H S H G V T V T T H H H H H D H E H G H
agtcatggtc atggagagga caagcatcat gctcatgggg atgttactga gcaattgttg
S H G H G E D K H H A H G D V T E Q L L
gacaaatcga agactcaagt cgcagcaaaa gagaaaagaa agagaaacat caatctccaa
D K S K T Q V A A K E K R K R N I N L Q
ggagcttatc tgcagtgcct tggggattcc atccagagtg ttgggtgtat gattggagga
G A Y L H V L G D S I Q S V G V M I G G
gctatcattt ggtacaatcc ggaatggaag atagtggatc tgatctgcac acttgctttt
A I I W Y N P E W K I V D L I C T L A F
tcggttattg tcctaggaac aaccatcaac atgattcgca acattctaga agtattgatg
S V I V L G T T I N M I R N I L E V L M
gagagtacac ccagagagat tgacgccaca aagctcgaaa agggtttgct cgaatggaa
E S T P R E I D A T K L E K G L L E M E
gaagtgggtg ctgttcatga gctccacata tgggctatca cagtgggaaa agtgcatttg
E V V A V H E L H I W A I T V G K V L L
gcttgccatg tcaatatcag accagaagca gatgcagata tggtgctcaa caaggtaatt
A C H V N I R P E A D A D M V L N K V I
gattacatcc gcagggagta caacattagt catgtcacga tacaatcga gcgctaa
D Y I R R E Y N I S H V T I Q I E R

```

Abb. 7: Aminosäure- und Nukleotid-Sequenz des Zat1p aus *A. thaliana*

Die Arginin-Reste sind fett hervorgehoben und die zusätzlich markierten Arg-Reste werden durch die Codons AGA und AGG kodiert.

Brinkman (1990) hat festgestellt, daß die unzureichende Verfügbarkeit einer in *E. coli* in geringer Menge vorhandenen tRNA_{Arg}[AGA/AGG] Ursache fehlender oder geringer Genexpression in *E. coli* sein kann. Die Anhäufung von AGA- und AGG-Codons bewirkt bei der Expression eine „Titration“ der entsprechenden tRNA, des *argU*-Genproduktes. Durch Supplementierung des *argU*-Gens auf Plasmiden konnte die Auszehrung des tRNA-Pools bei der Genexpression verhindert werden. Das *argU* enthaltende Plasmid pUBS 520 stand für diese Arbeit zur Verfügung. Es wurde in den Expressionsstamm BL21 transformiert (VS 126). Dieser neu entstandene Expressionsstamm wurde mit dem Plasmid pECD698 (Zat1-STREPTag-Fusionsprotein) transformiert. Es folgte eine weitere Expression, wobei als Induktor für die Expression von *argU* zusätzlich 0.1 mM IPTG zugegeben wurde. Wiederum konnte nach Auftrennung aller Fraktionen im SDS-PAA-Gel keine zusätzliche Proteinbande

3. Experimente und Ergebnisse

im Vergleich zur Vektorkontrolle ausgemacht werden. Jedoch wurde beim Antikörpernachweis der auf eine PVDF-Membran geblotteten Proteine eine Doppelbande in der Membranfraktion angefärbt. Das Molekulargewicht der Doppelbande lag bei ca. 40 kDa, was der Größe des Fusionsproteins ungefähr entspricht (Abb. 8).

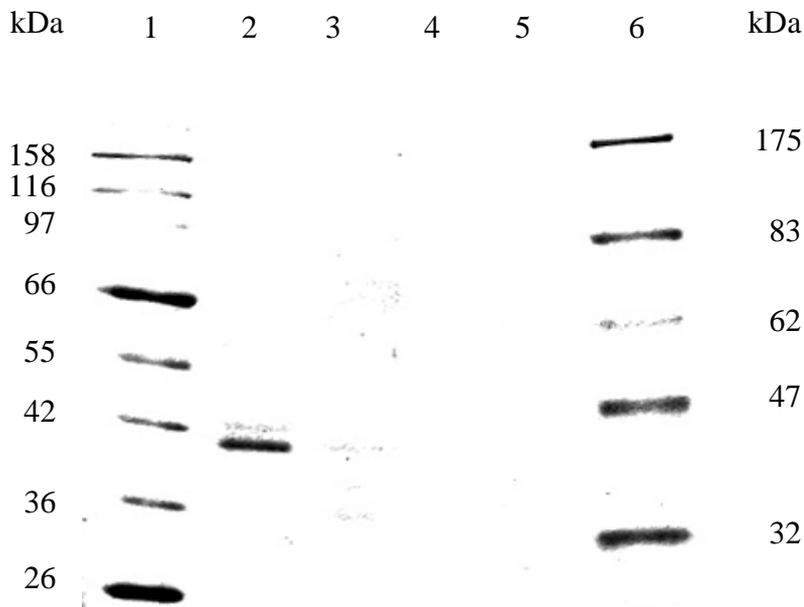


Abb. 8: Antikörpernachweis des ZAT1-STREPTAG-Fusionsproteins

Spur 1: *Broad Range Protein Marker* (#7702), Spur 2: Membranfraktion, Spur 3: lösliche Proteine, Spur 4: Membranfraktion (Kontrolle), Spur 5: lösliche Proteine (Kontrolle), Spur 6: *Prestained Broad Range Protein Marker*.

3.2.2 Reinigung des ZAT1-STREPTAG-Fusionsproteins

Das in der Membranfraktion enthaltene ZAT1p mußte aus den Membranen solubilisiert werden, was sich als Hauptproblem der Reinigung herausstellte. Dazu wurden verschiedene Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (siehe Tab. 6), wobei letztendlich n-Dodecylmaltosid als effizientestes und schonendes Detergenz zum Einsatz kam.

Tabelle 6: Detergenzien zur Solubilisierung von ZAT1p aus der Membranfraktion

Name	Eigenschaften	Konzentration im Ansatz	Solubilisierungseffizienz
Chaps	hydrophob: Steroidgerüst	1 mg/mg Gesamtprotein	keine
	hydrophil: ionische Gruppe	2 mg/mg Gesamtprotein	keine
Tween 20	hydrophob: aliphatische Kette	1 mg/mg Gesamtprotein	keine
	hydrophil: Polyethylenoxid	2 mg/mg Gesamtprotein	keine
Triton-X-100	hydrophob: Phenylderivat	1 mg/mg Gesamtprotein	keine
	hydrophil: Polyethylenoxid	2 mg/mg Gesamtprotein	keine
n-Dodecylmaltosid	hydrophob: aliphatische Kette hydrophil: Zucker	1 mg/mg Gesamtprotein	80 %

3. Experimente und Ergebnisse

n-Laurylsarcosin	hydrophob: aliphatische Kette hydrophil: ionische Gruppe	1 mg/mg Gesamtprotein	80 %
Octylglucopyranosid	hydrophob: aliphatische Kette hydrophil: Zucker	1 mg/mg Gesamtprotein	keine

Die Solubilisierung erfolgte durch Zugabe von 1 mg n-Dodecylmaltosid und 3.5 mg Phosphatidylcholin je mg Gesamtprotein und einstündiges Rühren im Eisbad. Nach Ultrazentrifugation des Ansatzes (100000 g, 4 °C, 30 min) befanden sich ca. 80 % des Zat1p in Lösung.

Das Solubilisat wurde direkt auf eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule gegeben, wobei unter Schwerkraftfluß im Eisbad gearbeitet wurde. Nach dem Auftragen des Solubilisates wurde die Säule mit Puffer W gewaschen und anschließend mit Desthiobiotin das Zat1p eluiert. Alle Puffer enthielten 0.1 % n-Dodecylmaltosid und Phosphatidylcholin, um das Protein stabil in Lösung zu halten. In den Elutionsfraktionen 2-5 konnte mittels Proteinbestimmung das meiste Protein detektiert werden. Das SDS-PAA-Gel dieser Reinigung ist in der Abbildung 9 dargestellt.

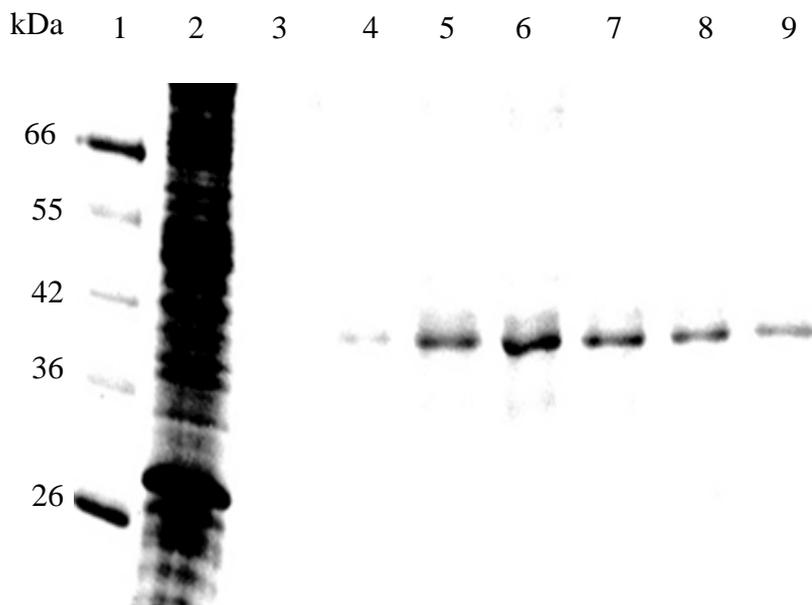


Abb. 9: Reinigung des Zat1p (12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel, Coomassiefärbung)

Es wurden je 5 µl Proteinmarker und 10 µl der entsprechenden Fraktionen aufgetragen.

Spur 1: *Broad Range Protein Marker* (#7702), Spur 2: Waschfraktion 1, Spur 3: Waschfraktion 3, Spur 4: Elutionsfraktion 3, Spur 5: Elutionsfraktion 4, Spur 6: Elutionsfraktion 5, Spur 7: Elutionsfraktion 6, Spur 8: Elutionsfraktion 7, Spur 9: Elutionsfraktion 8

3.2.4.2 Metallaufnahme-Experimente mit Zat1p-Proteoliposomen

Mit diesen Experimenten sollte aufgeklärt werden, ob und wie das Zat1p in den Metalltransport involviert ist. Bei der Herstellung der Proteoliposomen stellt sich ein Gleichgewicht zwischen *inside out* und *rightside out* Vesikeln ein. Das bedeutet, daß Zat1p gleichmäßig verteilt in beiden Orientierungen in die künstlichen Membranen integriert wird. Demzufolge kann ein Transport von Metallionen durch das Zat1p als Anhäufung der Metalle in den Proteoliposomen nachgewiesen werden. Als Kontrolle bei allen Messungen dienten gleich behandelte Liposomen.

A) Metallaufnahme in ungeladene Zat1p-Proteoliposomen

Die Aufnahmeversuche fanden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, in einem Gesamtvolumen von 30 µl, temperiert bei 25 °C statt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Metalle gestartet und nach definierten Zeiten wurden Proben (5 µl) entnommen. Der $^{65}\text{Zn}^{2+}$ -Gehalt in den Proteoliposomen/Liposomen wurde durch Filtrieren und mehrmaliges Waschen der Proben letztendlich durch die Radioaktivität des Filters bestimmt. Der $^{65}\text{Zn}^{2+}$ -Gehalt im Reaktionsansatz (100 %) entspricht der Radioaktivität einer nicht filtrierte Probe. Bei Zugabe von 1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ zum Ansatz (Abb. 11B) wird die Hälfte des Metalls in die Zat1p-Proteoliposomen transportiert, während die Kontroll-Liposomen fast kein Metall aufnehmen. Wurden nur 0.1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ zugegeben, so konnte diese 50%ige Aufnahme rate nicht bestimmt werden, obwohl der Metallgehalt in den Zat1p-Proteoliposomen gegenüber den Liposomen etwas erhöht ist (Abb. 11A). Die Zugabe von 10 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ (Abb. 11C) führt nicht zu einer weiteren Erhöhung der Aufnahme rate.

3. Experimente und Ergebnisse

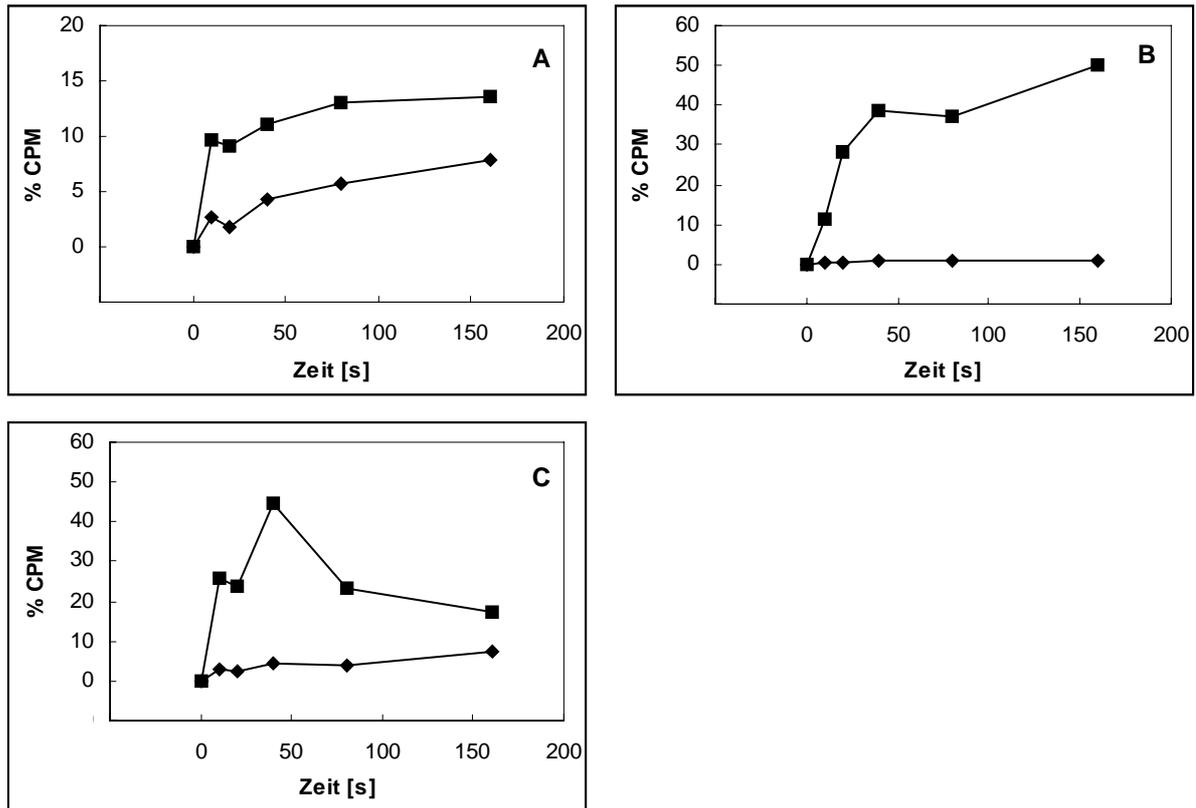


Abb. 11: $^{65}\text{ZnCl}_2$ Aufnahme in ZAT1p-Proteoliposomen (■) und Kontroll-Liposomen (◆)

Dargestellt ist der in den Proteoliposomen/Liposomen enthaltene $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Gehalt (100 % im Ansatz) in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden gleiche Konzentrationen an Liposomen und Proteoliposomen eingesetzt. Die ZAT1p-Konzentration der Proteoliposomen betrug $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und wurde im Reaktionsansatz auf $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Die Experimente wurden mehrmals unabhängig voneinander mit verschiedenen $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Konzentrationen (A: $0.1 \text{ mM } ^{65}\text{ZnCl}_2$, B: $1 \text{ mM } ^{65}\text{ZnCl}_2$, C: $10 \text{ mM } ^{65}\text{ZnCl}_2$) durchgeführt.

Im Gegensatz zu der festgestellten Zink-Aufnahme in ZAT1p-Proteoliposomen wurde keine ZAT1p-vermittelte Aufnahme von Cadmium und Cobalt festgestellt (Abb. 12). In Anwesenheit von $1 \text{ mM } ^{57}\text{CdCl}_2$ und $^{109}\text{CoCl}_2$ wurde ungefähr 1 % der Metalle in den ZAT1p-Proteoliposomen/Liposomen nachgewiesen, was im Toleranzbereich dieser Methode begründet liegt und nicht mit spezifischer Aufnahme beschrieben werden kann.

3. Experimente und Ergebnisse

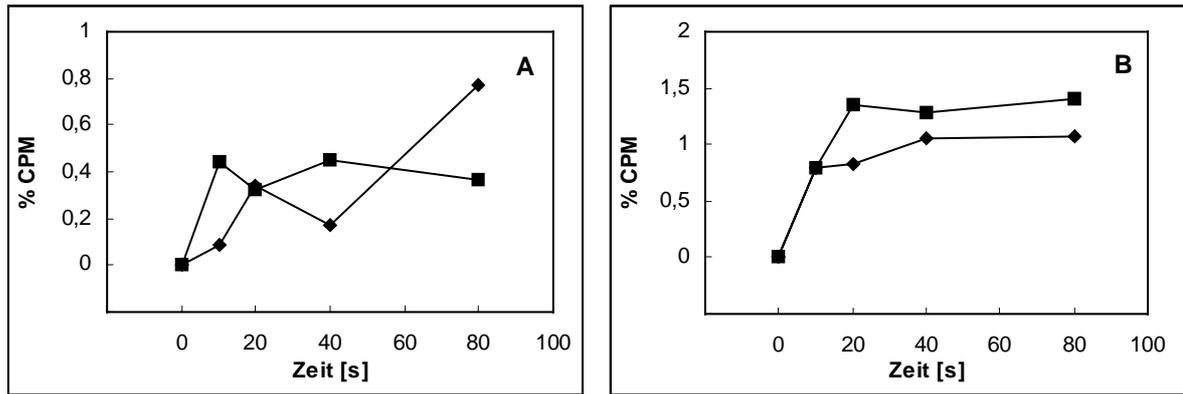


Abb. 12: Aufnahme von 1 mM $^{57}\text{CoCl}_2$ (A) und 1 mM $^{109}\text{CdCl}_2$ (B) in Zat1p-Proteoliposomen (■) und Kontroll-Liposomen (◆)

Dargestellt ist der in den Proteoliposomen/Liposomen enthaltene $^{57}\text{CoCl}_2$ - bzw. $^{109}\text{CdCl}_2$ -Gehalt (100 % im Ansatz) in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden gleiche Konzentrationen an Liposomen und Proteoliposomen eingesetzt. Die Zat1p-Konzentration der Proteoliposomen betrug 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und wurde im Reaktionsansatz auf 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Die Experimente wurden mehrmals unabhängig voneinander durchgeführt.

B) Metallaufnahme in H^+ -geladene ZAT-Proteoliposomen

Um zu testen, ob der Zat1p vermittelte Transport möglicherweise an einen Protonengradienten über der Membran gekoppelt ist, wurde mit NH_4Cl ein künstlicher Protonengradient aufgebaut. Das Beladen der Liposomen/Proteoliposomen erfolgte durch 30-minütige Inkubation der Proben mit 0.5 M NH_4Cl und wurde vor den Aufnahmeexperimenten durch die Fluoreszenzlöschung von Acridin-Orange nachgewiesen (siehe 2.8.10.3). Die Metallaufnahme-Messungen erfolgten anschließend wie unter A) beschrieben. Es wurden die gleichen Ergebnisse erhalten, die auch mit den ungeladenen Proteoliposomen/Liposomen beobachtet wurden (Abb. 13).

3. Experimente und Ergebnisse

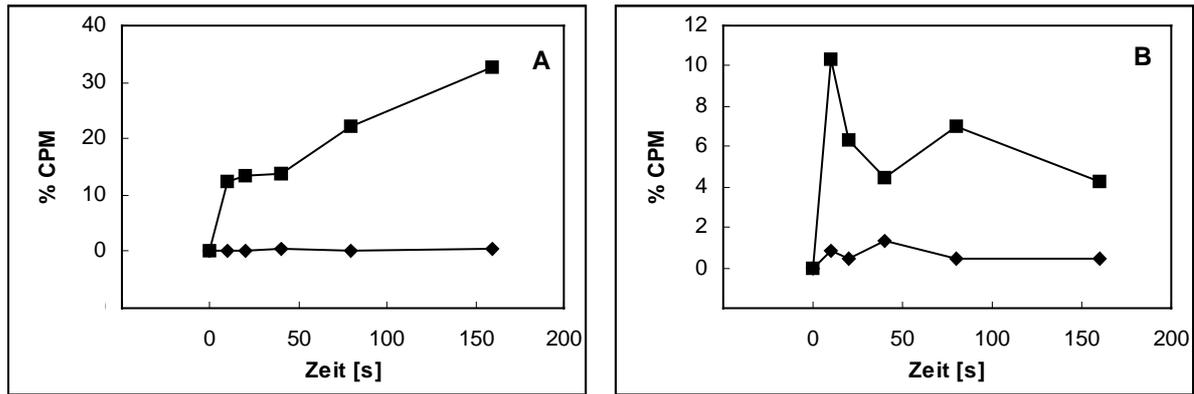


Abb. 13: $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Aufnahme in H^+ -geladene ZAT1p-Proteoliposomen (■) und Kontroll-Liposomen (◆)

Dargestellt ist der in den Proteoliposomen/Liposomen enthaltene $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Gehalt (100 % im Ansatz) in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden gleiche Konzentrationen an Liposomen und Proteoliposomen eingesetzt. Die ZAT1p-Konzentration der H^+ -geladenen Proteoliposomen betrug $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und wurde im Reaktionsansatz auf $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Die Experimente wurden mehrmals unabhängig voneinander mit verschiedenen $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Konzentrationen (A: $1 \text{ mM } ^{65}\text{ZnCl}_2$, B: $10 \text{ mM } ^{65}\text{ZnCl}_2$) durchgeführt.

3.2.5 Konstruktion einer ΔZAT -Mutante

Die Sekundärstruktur der CDF-Proteine ist durch 6 transmembrane Helices gekennzeichnet (Abb. 15). Zwischen den Helices IV und V befindet sich eine große cytoplasmatische Domäne. Im Falle des ZAT1p ist diese Domäne 80 Aminosäuren groß und enthält eine Anhäufung von 25 Histidinresten, die möglicherweise in die Metallbindung involviert sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine Mutante konstruiert, bei der die ersten 51 AS der cytoplasmatischen Domäne zwischen den Helices IV und V deletiert sind. Für die Konstruktion wurden der N-Terminus mit dem Primerpaar Streptag ZnTp *SacII* / ΔZAT up und der C-Terminus mit dem Primerpaar Streptag ZnTp *PstI* / ΔZAT down mittels PCR vom Expressionsplasmid pECD 698 amplifiziert und in einer 3-Arm-Ligation in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert (Abb. 14). Der N- und der C-Terminus wurden durch eine eingeführte *KpnI*- Schnittstelle verknüpft. Das deletierte ZAT1-Gen wurde als *SacII/PstI*-Fragment in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert und in dem Expressionsstamm VS 126 exprimiert.

3. Experimente und Ergebnisse

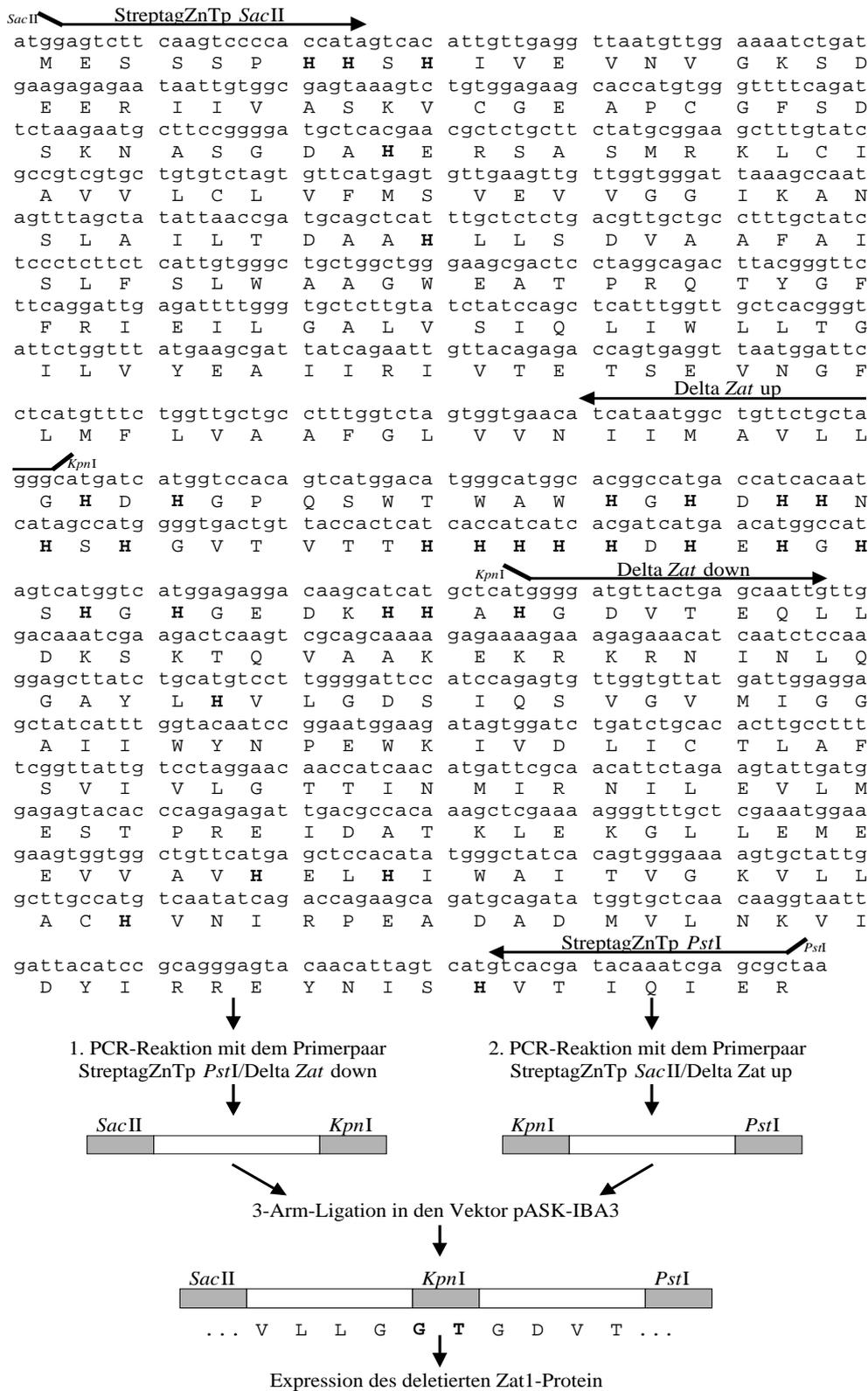


Abb. 14: Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz des *Zat1p* mit markierten Histidin-Resten und Konstruktion der Δ *ZAT1*-Mutante

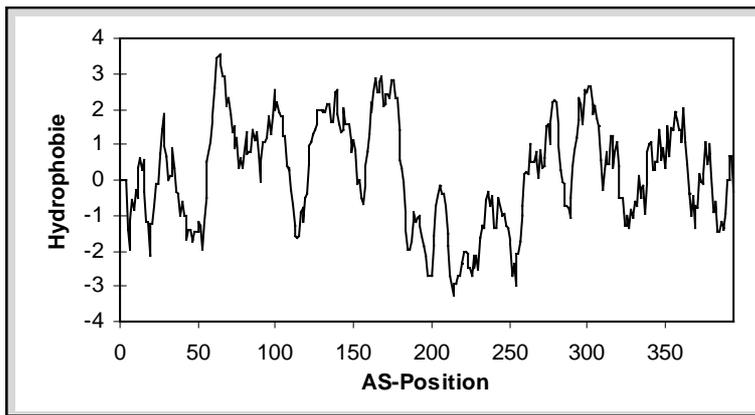


Abb. 15: Hydrophathie-Profil des ZAT1p aus *A. thaliana* nach Kyte und Doolittle (1982).

Die Hydrophobie (y-Achse) ist als Funktion der Position der einzelnen Aminosäuren (x-Achse) dargestellt. Positive Werte: hydrophobe AS, negative Werte: hydrophile AS.

3.2.6 Expression und Reinigung des Δ ZAT1-STREPTAG-Fusionsproteins

Bei der Reinigung des Δ ZAT1-STREPTAG-Fusionsproteins wurde in Analogie zur ZAT1p-Reinigung vorgegangen. Vorversuche zeigten, daß das verkürzte Protein in *E. coli* exprimiert wird und in der Membranfraktion enthalten ist (Abb. 16). Die Solubilisierung des Proteins aus der Membran erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben mit n-Dodecylmaltosid. Jedoch war die Effizienz der Solubilisierung mit 40 % wesentlich geringer als bei der ZAT1p-Reinigung. Deshalb wurde der Solubilisierungsschritt zweimal wiederholt, was aber nicht zu der erwarteten Steigerung der Ausbeute führte. 50 % des verkürzten ZAT1p wurden maximal solubilisiert und mittels Chromatographie an Strep-Tactin-Sepharose gereinigt. In diesem Fall gelang keine Reinigung bis zur Homogenität. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, die Reinigung des deletierten ZAT1p zu optimieren. Aus diesem Grund wurden mit dem angereicherten Δ ZAT1p bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Lediglich für die im Folgenden beschriebenen Bindungsuntersuchungen wurde das angereicherte Δ ZAT1p eingesetzt.

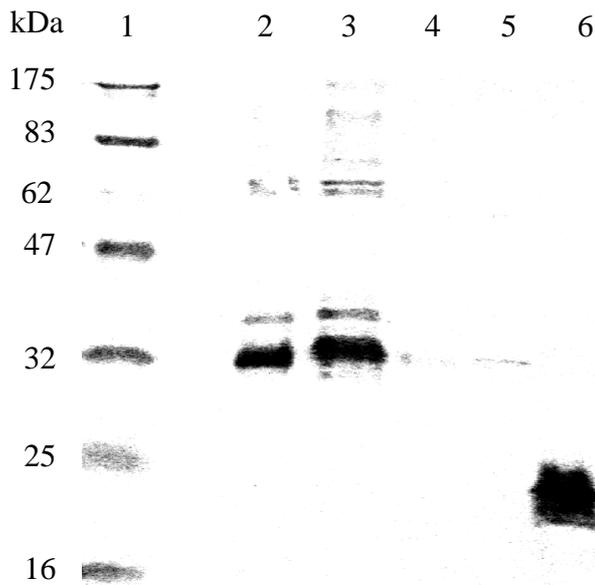


Abb. 16: Antikörpernachweis des Δ Zat1p

Es wurden je 10 μ l der einzelnen Fraktionen auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet.

In den Spuren 2 und 3 ist das Δ Zat1p auf Höhe der 32 kDa Markerbande als Doppelbande angefärbt. In der Spur 6 wurde das lösliche biotinylierte Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Protein (22 kDa) aus *E. coli* detektiert.

Spur 1: *Prestained Broad Range Protein Marker*, Spur 2: Membranfraktion vor der Solubilisierung, Spur 3: Überstand nach der 1. Solubilisierung, Spur 4: Überstand nach der 2. Solubilisierung, Spur 5: Membranpellet nach der 2. Solubilisierung, Spur 6: lösliche Proteine

3.2.7 Vergleichende ^{65}Zn -Bindungsuntersuchung an Zat1p und Δ Zat1p

Da einige CDF-Proteine direkt am Zink-Transport beteiligt sind und für Zat1p ebenfalls ein Zink-Transport postuliert wird, wurde untersucht, ob $^{65}\text{ZnCl}_2$ am gereinigten Protein gebunden wird. Als mögliche Zink-Bindestelle kommt eine Histidinreiche Region der cytosolischen Domäne zwischen den Helices IV und V in Betracht. Das gereinigte Zat1p wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran wurde nach einem Waschschrift mit $^{65}\text{ZnCl}_2$ (spez. Aktivität 185 GBq/g) inkubiert. Nach erneutem Waschen des nicht gebundenen Metalls wurde die Membran auf einem Röntgenfilm exponiert. Auf dem entwickelten Film konnte dem Zat1p ein eindeutiges Signal zugeordnet werden (Abb. 17). Das bedeutet, daß Zat1p in der Lage ist, Zink zu binden und wahrscheinlich auch zu transportieren. Interessant war nun herauszufinden, ob die Zinkbindung an der postulierten Bindestelle erfolgt. Dazu wurde das angereicherte Δ Zat1p ebenfalls auf eine Membran geblottet und diese mit $^{65}\text{ZnCl}_2$ inkubiert. Es konnte kein Signal detektiert werden, so daß man man davon ausgehen kann, daß die Deletion wirklich die Zink-Bindestelle enthielt (Abb. 17).

3. Experimente und Ergebnisse

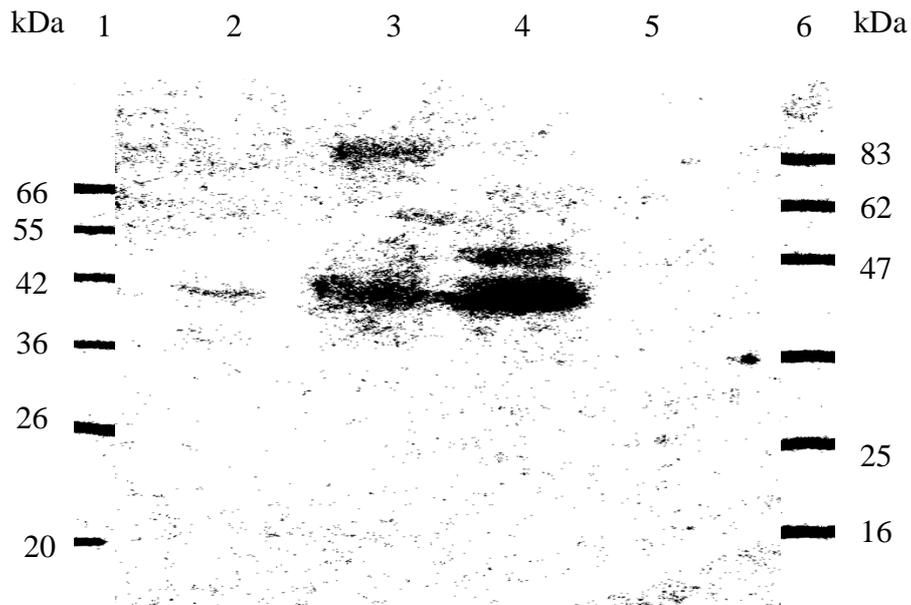


Abb. 17: Autoradiogramm der mit $^{65}\text{ZnCl}_2$ inkubierten Proteine Zat1p und ΔZat1p

Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen (20 μg) auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Blot wurde mit 3 μl $^{65}\text{ZnCl}_2$ (spez. Aktivität 185GBq/g) inkubiert.

Spur 1: *Broad Range Protein Marker*, Spur 2: gereinigtes Zat1p nach Solubilisierung mit N-Laurylsarkosin, Spur 3: Zat1p-Membranfraktion, Spur 4: gereinigtes Zat1p nach Solubilisierung mit n-Dodecylmaltosid, Spur 5: ΔZat1p -Membranfraktion, Spur 6: *Prestained Broad Range Protein Marker*

3.3 Untersuchungen mit *Ralstonia metallidurans*

Als bakterielles System für Untersuchungen mit dem *Zat1p* diente das Gram-negative Bakterium *R. metallidurans*. Es besitzt eine plasmidkodierte Resistenz gegenüber den Schwermetallen Cadmium, Zink und Cobalt (*czc*-Determinante). Das *CzcD*-Protein dieser Resistenzdeterminante gehört zu den ersten Mitgliedern der CDF-Proteinfamilie, deren Funktion in dieser Arbeit charakterisiert werden sollte. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden der metallsensitive, plasmidfreie Stamm AE104, der metallresistente Stamm AE128 sowie der *czcD*-deletierte Stamm DN182 eingesetzt.

3.3.1 Vergleich des metallsensitiven *R. metallidurans*-Stammes AE104 mit dem *ZATI*-Gen enthaltenden *R. metallidurans* Stamm AE104

Für diese Untersuchungen wurde das *ZATI*-Gen aus *A. thaliana* mit der Ribosomenbindestelle des *czcD*-Gens aus *R. metallidurans* gekoppelt und in den Weitwirtsbereichsvektor pVDZ 2 kloniert, in den Donorstamm S17/1 transformiert und durch Konjugation in den *R. metallidurans*-Stamm AE104 übertragen. Die Zellen der zu untersuchenden Stämme wurden bei ungefähr 200 Klett-Einheiten geerntet, mit 10 mM Tris, pH 7.0 gewaschen und auf ca. 170 Klett-Einheiten eingestellt. Zum Meßansatz wurden 0.2 % Na-Gluconat als C-Quelle zugegeben. Nach Zugabe von $^{65}\text{ZnCl}_2$ (spez. Aktivität 185 GBq/g), $^{57}\text{CoCl}_2$ (spez. Aktivität 315 MBq/ μg) und $^{109}\text{CdCl}_2$ (spez. Aktivität 37 MBq/ μg) in den Konzentrationen 0.1 mM, 0.5 mM und 1 mM wurden über einen Zeitraum von 60 min regelmäßig Proben entnommen, gewaschen und der Gehalt an $^{65}\text{ZnCl}_2$, $^{57}\text{CoCl}_2$ bzw. $^{109}\text{CdCl}_2$ in einem Flüssigszintillationssystem ausgezählt. Während bei der $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Aufnahme ein Unterschied zwischen dem *ZATI* komplementierten AE104 und der Kontrolle zu sehen ist (Abb. 18), erfolgt die Aufnahme von $^{57}\text{CoCl}_2$ und $^{109}\text{CdCl}_2$ in beiden Stämmen gleich (Abb. 19, 20). Bei der Zugabe von $^{65}\text{ZnCl}_2$ zum Versuchsansatz kommt es zu einer verstärkten Aufnahme des $^{65}\text{ZnCl}_2$ im *ZATI* komplementierten *R. metallidurans*-Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm AE104. Mit steigender $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Konzentration im Ansatz kommt es zu einer proportional erhöhten Aufnahme, wobei der *ZATI* komplementierte Stamm jeweils ungefähr doppelt so viel $^{65}\text{ZnCl}_2$ aufnimmt wie der Kontrollstamm (Abb. 18).

3. Experimente und Ergebnisse

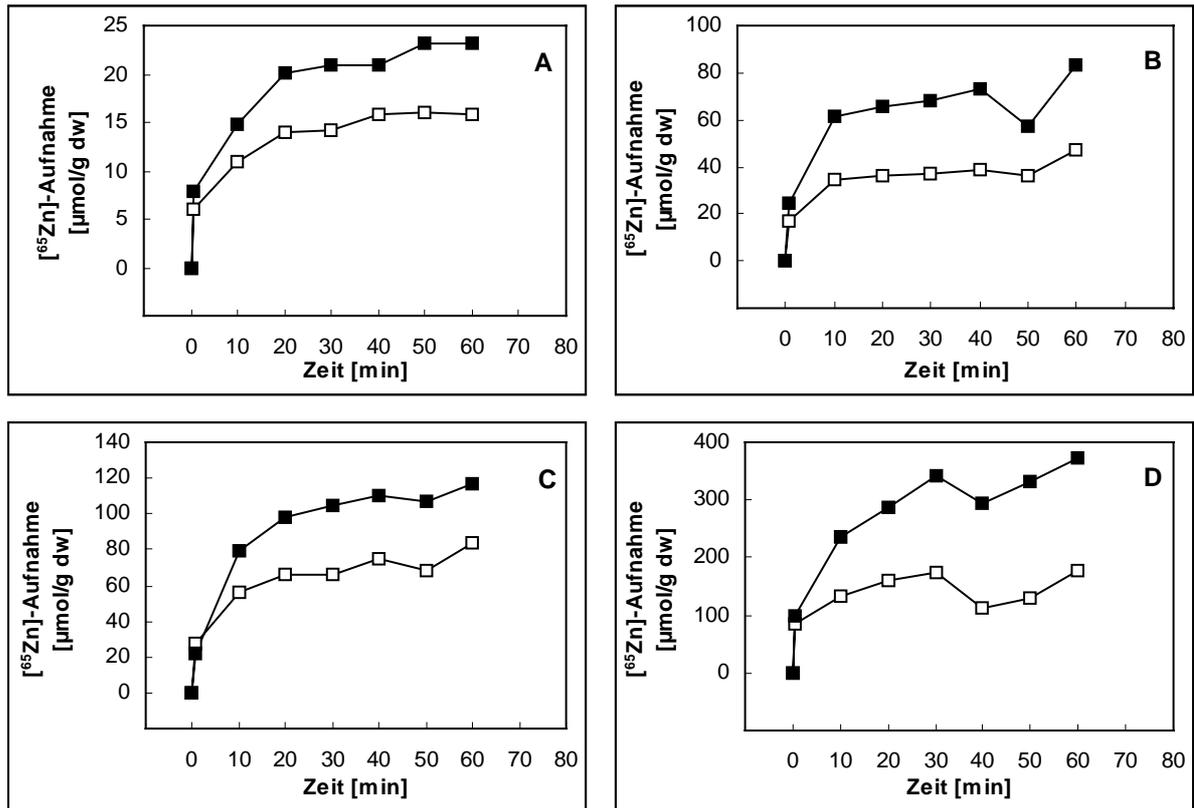


Abb. 18: $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Aufnahme des metallsensitiven *R. metallidurans*-Stammes AE104 (\square) und des *ZATI* komplementierten Stammes (\blacksquare).

Die Zellen wurden mit 100 μM (A), 300 μM (B), 500 μM (C) und 1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ (D) inkubiert und die Menge an aufgenommenem $^{65}\text{ZnCl}_2$ wurde in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

Im Gegensatz zur unterschiedlichen Aufnahme von $^{65}\text{ZnCl}_2$ wurde kein Unterschied bei der Aufnahme von $^{57}\text{CoCl}_2$ zwischen dem *ZATI* enthaltenden Stamm und dem Kontroll-Stamm festgestellt. Die Erhöhung der $^{57}\text{CoCl}_2$ -Konzentration im Meßansatz ist nicht proportional zur Aufnahme in beiden Stämmen (Abb. 19).

3. Experimente und Ergebnisse

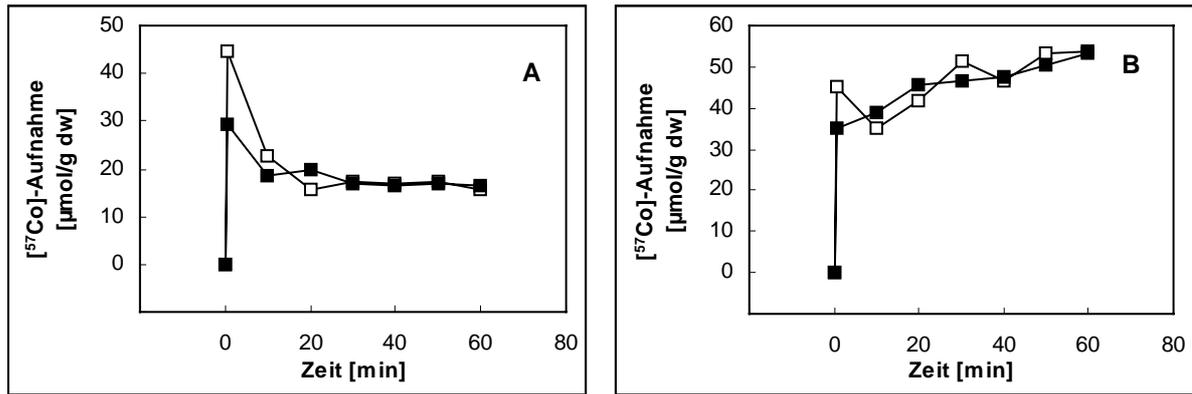


Abb. 19: $^{57}\text{CoCl}_2$ -Aufnahme des metallsensitiven *R. metallidurans*-Stammes AE104 (\square) und des *ZATI* komplementierten Stammes (\blacksquare).

Die Zellen wurden mit 100 μM (A) und 1 mM $^{57}\text{CoCl}_2$ (B) inkubiert und der Betrag an aufgenommenem $^{57}\text{CoCl}_2$ wurde in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

Wurde dem Versuchsansatz 100 μM $^{109}\text{CdCl}_2$ zugegeben, so war die $^{109}\text{CdCl}_2$ -Aufnahme der beiden untersuchten Stämme gleich. Beim Einsatz von 500 μM $^{109}\text{CdCl}_2$ wurde eine leicht erhöhte $^{109}\text{CdCl}_2$ -Aufnahme des Kontrollstammes AE104 im Vergleich zum *ZATI* komplementierten Stamm festgestellt (Abb. 20).

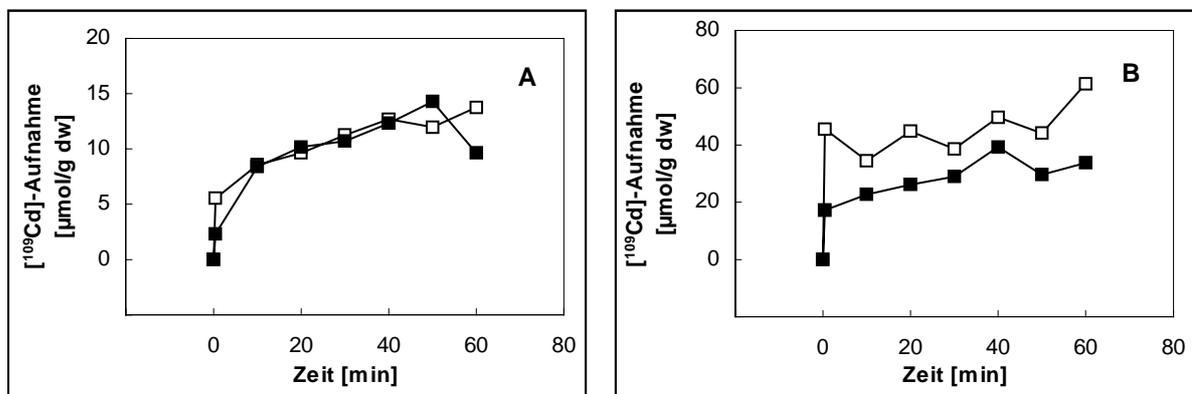


Abb. 20: $^{109}\text{CdCl}_2$ -Aufnahme des metallsensitiven *R. metallidurans*-Stammes AE104 (\square) und des *ZATI* komplementierten Stammes (\blacksquare).

Die Zellen wurden mit 100 μM (A) und 500 μM $^{109}\text{CdCl}_2$ (B) inkubiert und der Betrag an aufgenommenem $^{109}\text{CdCl}_2$ wurde in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

3.3.2 Einfluß des *ZATI*-Gens auf die Metallresistenz der *R. metallidurans*-Stämme AE104, AE128 und DN182

Für diese Untersuchungen wurde das *ZATI*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* mit der natürlichen Ribosomenbindestelle in die drei *R. metallidurans*-Stämme AE104, AE128 und DN182 übertragen. Diese konstruierten, *ZATI* enthaltenden Stämme und die zugehörigen Kontrollen (nur pVDZ² enthaltend) wurden mittels Toxizitätstest auf einen veränderten Phänotyp

untersucht. Dazu wurden die einzelnen Stämme in Anwesenheit unterschiedlicher Schwermetallkonzentrationen für 24 h bei 30 °C inkubiert und das Wachstum als OD₆₀₀ bestimmt. Es wurden sehr geringe Unterschiede im Wachstum der Stämme in An- oder Abwesenheit des *ZATI*-Gens festgestellt (Abb. 21).

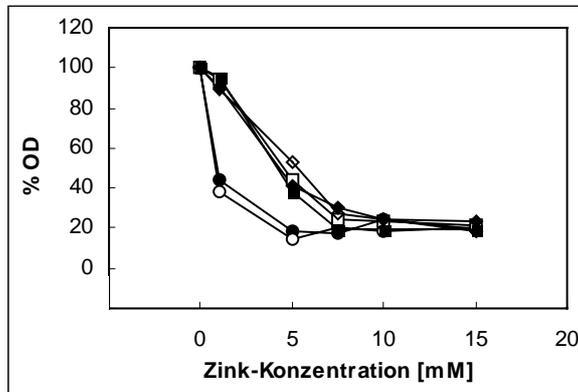


Abb. 21: Zink-Toxizität der *R. metallidurans* Stämme AE104, AE128 und DN182 in An- und Abwesenheit des *ZATI*-Gens.

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener ZnCl₂-Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD₆₀₀ bestimmt. Der OD₆₀₀-Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum. Die verschiedenen Stämme sind wie folgt symbolisiert: AE104 (○), AE104 mit *ZATI* (●), AE128 (□), AE128 mit *ZATI* (■), DN128 (◇) und DN128 mit *ZATI* (◆).

Desweiteren wurde die ⁶⁵ZnCl₂-Aufnahme des Stammes DN182 in An- und Abwesenheit des *ZATI*-Gens mit dem metallresistenten Stamm AE128 verglichen. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich ist, kommt es durch das Vorhandensein des *ZATI*-Gens zu einer erhöhten Zink-Aufnahme im Vergleich zum *czcD* deletierten Stamm DN182. Diese erhöhte Zink-Aufnahme wurde ab 200 μM ⁶⁵ZnCl₂ im Ansatz sichtbar und entspricht ungefähr der Größe der *czc* vermittelten Aufnahme in *R. metallidurans* AE128.

Die erhöhte ⁶⁵ZnCl₂-Aufnahme des metallsensitiven Stammes AE104 in Anwesenheit des *ZATI*-Gens (siehe Abb. 18) konnte auch mit dem hier verwendeten *ZATI*-Konstrukt nachgewiesen werden.

3. Experimente und Ergebnisse

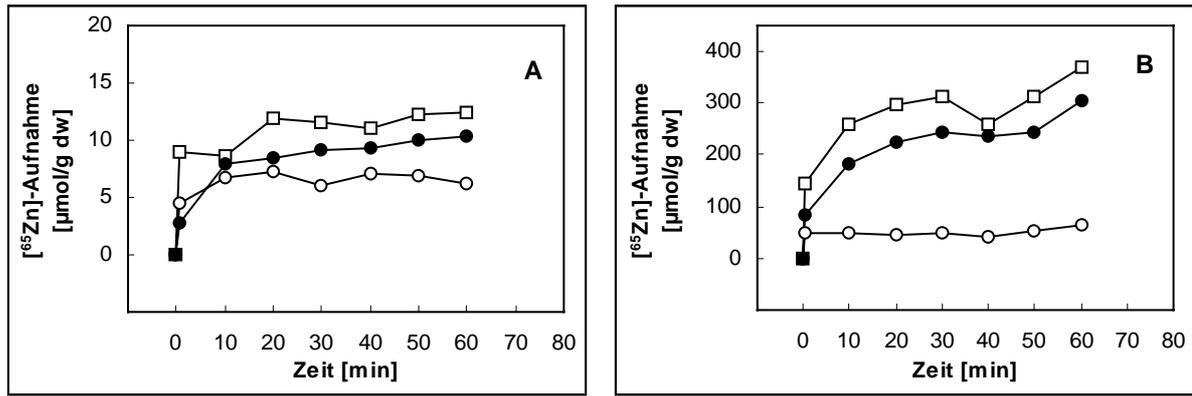


Abb. 22: $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Aufnahme der *R. metallidurans*-Stämme AE128 (□), DN182 (○) und des *ZAT1* komplementierten Stammes DN182 (●).

Die Zellen wurden mit 100 μM (A) und 1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ (B) inkubiert und die Menge an aufgenommenem $^{65}\text{ZnCl}_2$ wurde in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

3.4 Untersuchungen an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

3.4.1 Konstruktion einer *cot1/zrc1*-Doppelmutante von *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* mit den CDF-Proteinen Cot1p und Zrc1p wurde als Untersuchungsobjekt ausgewählt, um weitere Informationen zur CDF-Proteinfamilie zu erhalten. Für diese Untersuchungen wurden Mutanten hergestellt, mit denen die Komplementierbarkeit mit anderen CDF-Proteinen getestet werden sollte.

3.4.1.1 Herstellung der *cot1*-und *zrc1*-Einzelmutanten

Die Konstruktion der Mutanten erfolgte mittels *gene disruption cassettes* (nach Güldener *et al.*, 1996). Dazu wurde das *Kan^r*-Gen durch PCR vom Plasmid pUG6 amplifiziert, wobei die verwendeten Primer (F12 und G01 für *cot1*-Mutante, GA962 und GA963 für *zrc1*-Mutante) am 5`Ende jeweils 40 Basen des N-bzw. C-Terminus des zu deletierenden Gens enthielten. Das *Kan^r*-Gen der beiden PCR-Produkte wird beidseitig von einer *loxP*-Sequenz flankiert, was das Entfernen des *Kan^r*-Gens zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht. Die PCR-Produkte wurden direkt in den *S. cerevisiae*-Stamm YK37 transformiert und auf YPD/Geneticin-Platten selektiert. Durch homologe Rekombination der „deletierten Gene“ mit den chromosomalen Genen konnten mehrere *cot1*-und *zrc1*-Einzelmutanten isoliert werden. Um aus den Einzelmutanten eine Doppelmutante zu konstruieren, wurde in einem weiteren Schritt das Markergen (*Kan^r*) entfernt. Dafür wurde das Plasmid pSH47, welches das Cre-Recombinase-Gen unter Kontrolle des *GALI*-Promotors und das *URA3* Markergen enthält, in die zwei Einzelmutanten transformiert. Die Induktion der *cre*-Expression erfolgte durch Überführen der Transformanten von YPD (Glucose) in YPG (Galactose)-Medium. Nach 2-stündigem Wachstum sollten ca. 80 % der Zellen das *Kan^r*-Markergen verloren haben. Die Zellen wurden auf YPD-Platten ausplattiert und die Kolonien auf YPD- und YPD/Geneticin-Platten überimpft. Im Falle der *cot1*-Mutante wuchsen von 100 untersuchten Klonen noch 16 Klone auf YPD/Geneticin-Platten (84 % Effizienz), während das bei der *zrc1*-Mutante 32 Klone von 100 betraf (Effizienz 64 %). Durch Wachstum der beiden Einzelmutanten auf YPD-Platten mit 5`Fluor-Orotsäure wurde das Plasmid pSH47 verloren. Mit jeweils 2 Klonen beider Mutanten wurde für die Konstruktion der *cot1/zrc1*-Doppelmutante weitergearbeitet. Wachstumsversuche mit den beiden Einzelmutanten mit bzw. ohne *Kan^r*-Gen zeigten keine Unterschiede.

3.4.1.2 Herstellung der *cot1/zrc1*-Doppelmutante

Die beiden Einzelmutanten wurden mit dem jeweils anderen PCR-Produkt (*Kan^r*-Gen flankiert von „deletiertem Gen“) transformiert und auf YPD/Geneticin-Platten selektiert. Ein positiver Klon (*cot1/zrc1:Kan*) erhielt zum Entfernen des Markergens durch Transformation das Plasmid pSH47, und die Expression der Cre-Recombinase wurde durch Wachstum in YPG induziert. Die Effizienz des *Marker rescue* betrug 89 %. Durch Wachstum auf YPD-

3. Experimente und Ergebnisse

Platten mit 5'Fluor-Orotsäure wurde das Plasmid pSH47 entfernt. Die entstandene *cot1/zrc1*-Doppelmutante wurde, wie auch die Einzelmutanten, mittels PCR und Southern-Hybridisierung überprüft (Abb. 24 und 25).

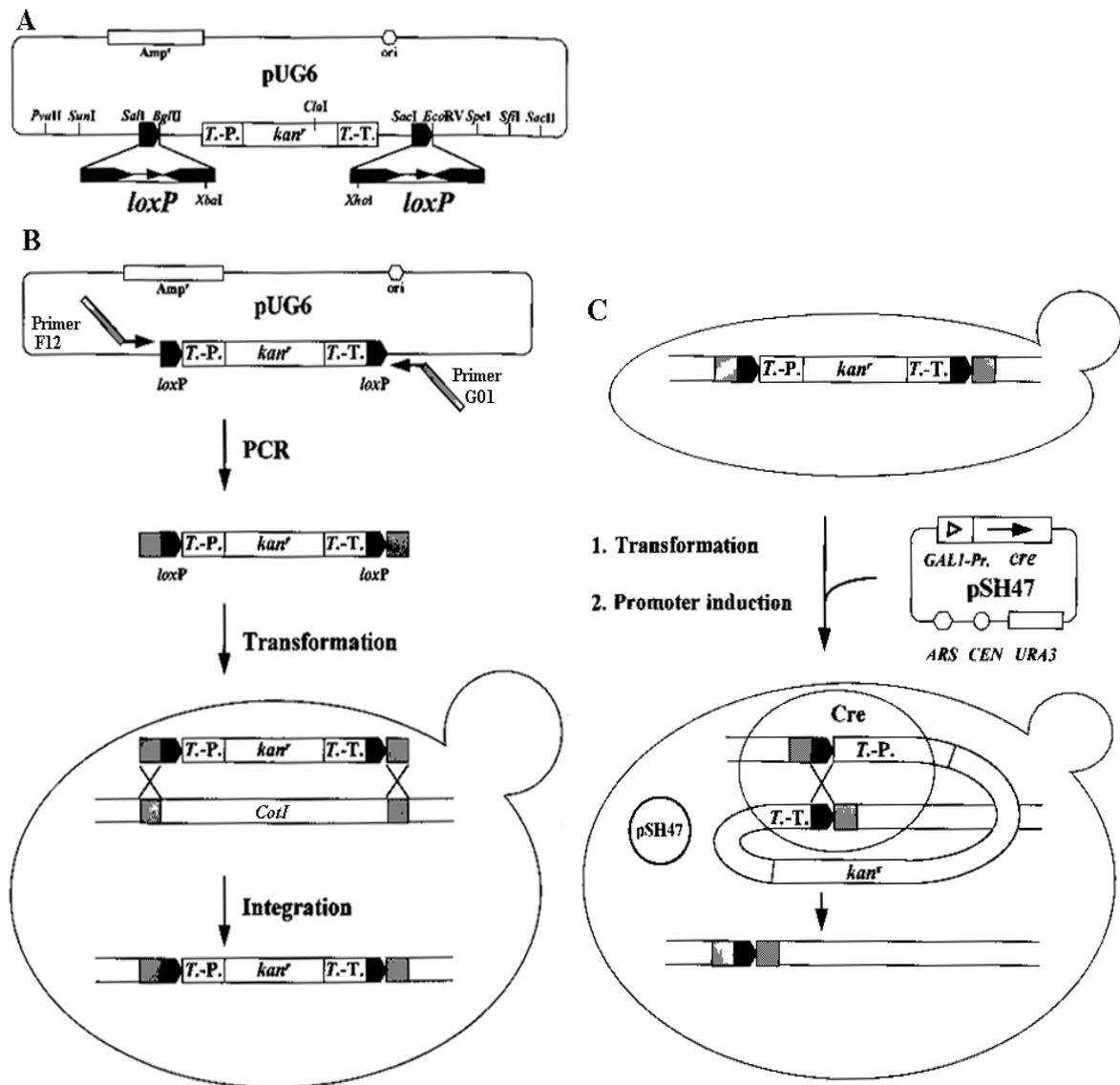


Abb. 23: Konstruktion der *S. cerevisiae*-Mutanten am Beispiel der *cot1*-Mutante

A) Karte des Plasmids pUG6, welches als *Template* für die Amplifikation der *gene disruption cassettes* verwendet wurde.

B) Für die Unterbrechung des *COT1* Gens wurden zwei Primer (F12 und G01) verwendet, die an ihrem 3'Ende homologe Sequenzen von der linken und rechten Seite des *loxP-kanMX-loxP*-Moduls von pUG6 (Pfeile), und am 5'Ende die Sequenzen vom 3'- und 5'-Ende des zu unterbrechenden Gens (graue Box) enthalten.

C) Der *kan^r*-Hefestamm YK38 mit dem Genotyp *Cot1::loxP-kanMX-loxP* wurde mit dem Plasmid pSH47 transformiert. Transformanten wuchsen in Glucose-Medium und wurden zur Induktion der Expression der Cre-Rekombinase in Galaktose-Medium überführt. Die Cre induzierte zwischen den beiden *loxP*-Sites führt zur Entfernung des Markergens bei entstehendem Genotyp *Cot1::loxP* (YK40).

3. Experimente und Ergebnisse

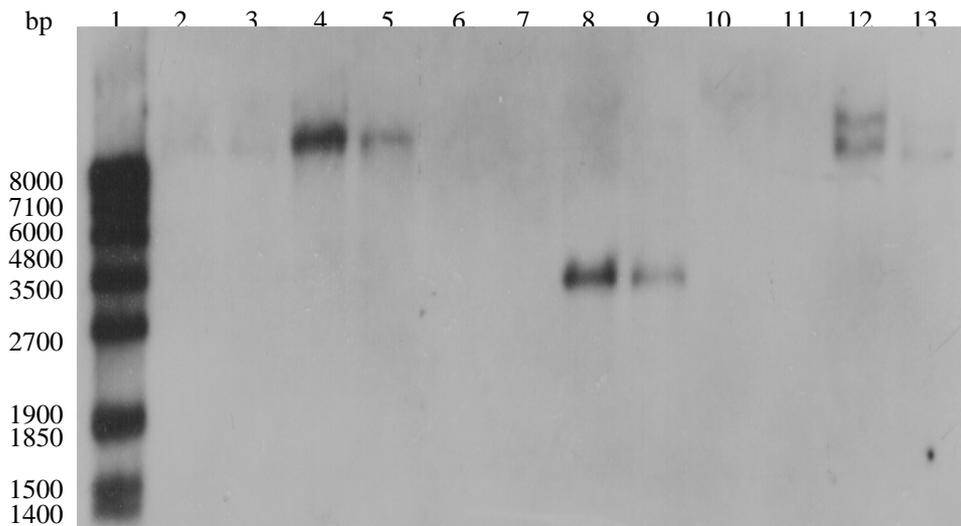


Abb. 24: Southern-Hybridisierung chromosomaler *S. cerevisiae* DNA mit der *ZRCI*-Sonde (1370 bp) bei 65 °C.

Es wurden jeweils 20 µg chromosomaler DNA der einzelnen Mutanten mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Bgl*III bzw. *Eco*RI geschnitten aufgetragen und auf eine Nylonmembran transferriert.

Spur 1: DIG-Marker VII (Roche), Spur 2: YK40 *Eco*RI geschnitten, Spur 3: YK41 *Eco*RI geschnitten, Spur 4: YK40 *Eco*RI geschnitten, Spur 5: YK37 *Eco*RI geschnitten, Spur 6: YK44 *Bgl*III geschnitten, Spur 7: YK41 *Bgl*III geschnitten, Spur 8: YK40 *Bgl*III geschnitten, Spur 9: YK37 *Bgl*III geschnitten, Spur 10: YK44 *Bam*HI geschnitten, Spur 11: YK41 *Bam*HI geschnitten, Spur 12: YK40 *Bam*HI geschnitten, Spur 13: YK37 *Bam*HI geschnitten.

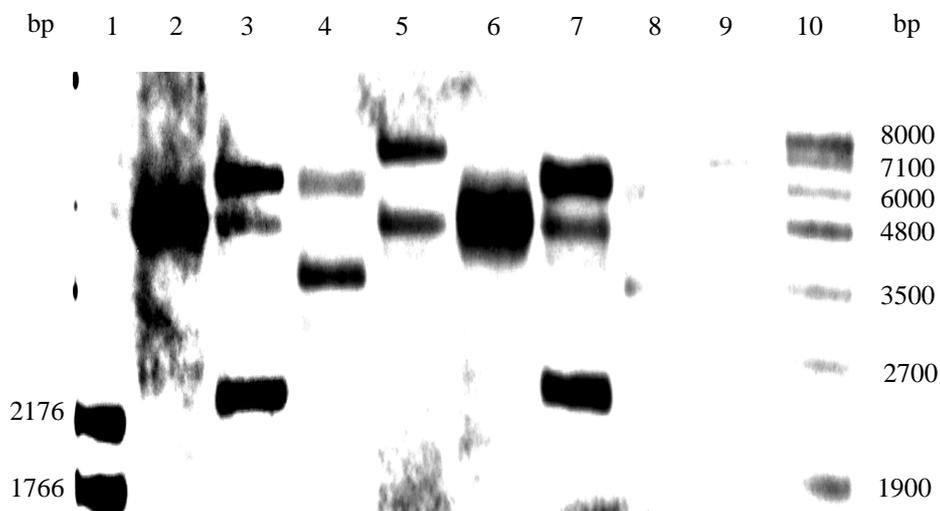


Abb. 25: Southern-Hybridisierung chromosomaler *S. cerevisiae* DNA mit der *COTI*-Sonde (1600 bp) bei 68 °C.

Es wurden jeweils 20 µg chromosomaler DNA der einzelnen Mutanten mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*III bzw. *Eco*RI geschnitten auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und auf eine Nylonmembran transferriert.

Spur 1: DIG-Marker VI (Roche), Spur 2: YK37 *Eco*RI geschnitten, Spur 3: YK37 *Bgl*III geschnitten, Spur 4: YK40 *Eco*RI geschnitten, Spur 5: YK3740 *Bgl*III geschnitten, Spur 6: YK3741 *Eco*RI geschnitten, Spur 7: YK3741 *Bgl*III geschnitten, Spur 8: YK44 *Eco*RI geschnitten, Spur 9: YK44 *Bgl*III geschnitten, Spur 10: DIG-Marker VII (Roche).

3.4.2 Bestimmung der Minimalen InhibitorKonzentration (MIC) von Schwermetallen für die beiden Einzelmutanten sowie die Doppelmutante

Um den Phänotyp der hergestellten Mutanten zu charakterisieren, wurde für die Metalle Cadmium, Zink und Cobalt die Minimale InhibitorKonzentration ermittelt. Dazu wurden der Wildtyp und die Mutanten 5 Tage auf SMM-Platten kultiviert, die die Metallsalze ZnCl₂, CdCl₂ und CoCl₂ in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten (Abb. 26). Als minimale InhibitorKonzentration wurde die niedrigste Konzentration bestimmt, bei der kein Wachstum mehr festgestellt werden konnte (Tab. 7).

Die Deletion des *ZRCI*-Gens führt zu einer Verringerung der MIC für ZnCl₂ auf im Vergleich zum Wildtyp, während die *COTI*-Deletion keinen Einfluß hat. Interessant ist die MIC für ZnCl₂ der Doppelmutante, die nur 1 mM im Vergleich zum Wildtyp (12 mM) beträgt. Während die *COTI*-Deletion alleine ohne Effekt bleibt, kommt es beim Vorhandensein von *COTI*-und *ZRCI*-Deletion zur weiteren Verringerung der MIC für ZnCl₂ im Vergleich zur *ZRCI*-Deletion.

Tabelle 7: Minimale InhibitorKonzentrationen der *S. cerevisiae* Mutanten

Stamm	ZnCl ₂ (mM)	CdCl ₂ (mM)	CoCl ₂ (mM)
YK37	12	0.2	2.0
YK40	12	0.1	0.8
YK41	7.5	0.15	1.2
YK44	1	0.075	0.8

Für Cadmium wurde ebenfalls eine Verringerung der MIC durch die verschiedenen Mutationen festgestellt. Während die MIC für CdCl₂ der *COTI*-Deletion nur der Hälfte der des Wildtyps entspricht, unterscheidet sich die MIC der *ZRCI*-Deletion nur sehr gering vom Wildtyp. Bei der Doppelmutante ist zu vermuten, daß sich die Effekte beider Einzelmutationen summieren.

Auch für Cobalt konnten die erwarteten Ergebnisse bestätigt werden. Die Deletion des *COTI*-Gens führt in der Einzel- sowie in der Doppelmutante zu einer Verringerung der MIC auf 0.8 mM CoCl₂ im Vergleich zum Wildtyp (2 mM). Auch bei der *zrcI*-Mutante kommt es zu einer verringerten MIC, was aber wahrscheinlich ohne Einfluß auf die Doppelmutante bleibt.

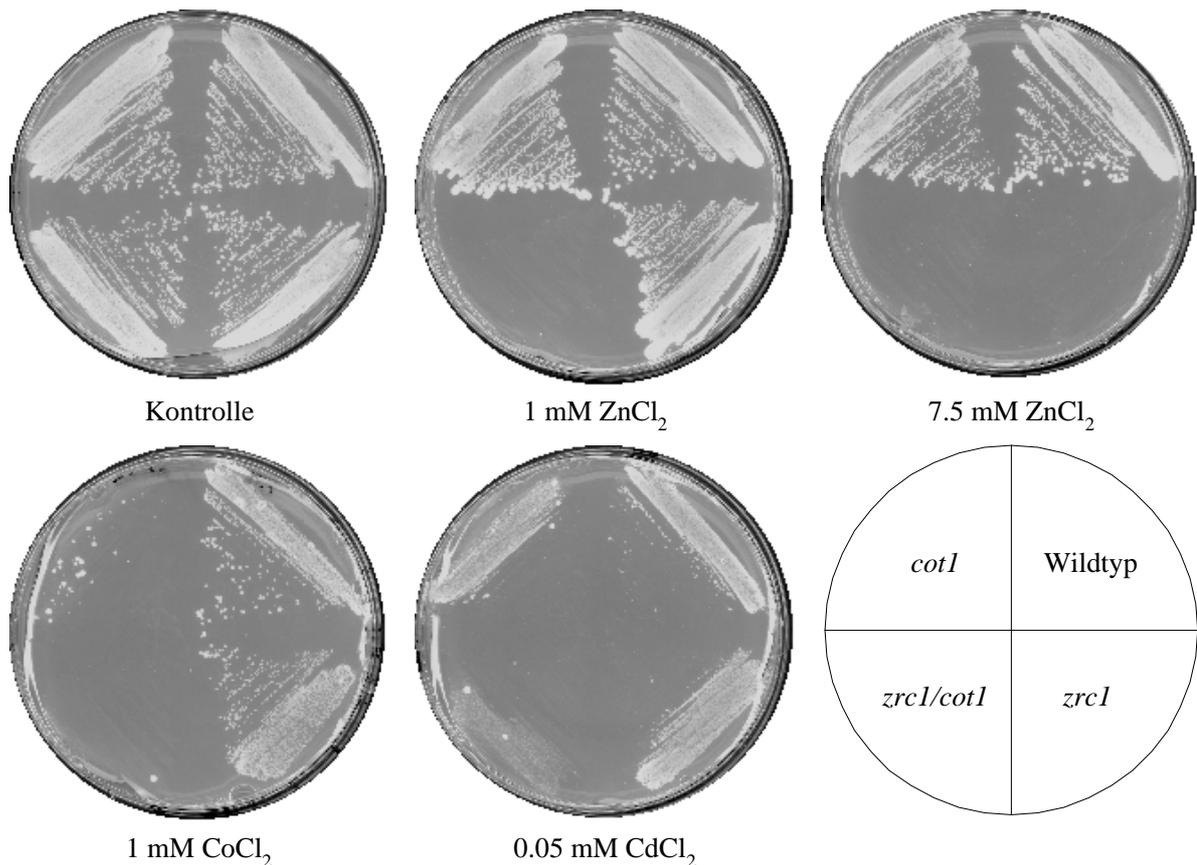


Abb. 26: Bestimmung der minimalen Inhibitorkonzentration der *S. cerevisiae*-Stämme YK37, YK40, YK41 und YK44 für die Schwermetallsalze ZnCl₂, CdCl₂ und CoCl₂.

Die Stämme wurden 5 Tage bei 30 °C auf SMM-Platten mit den angegebenen Metall-Konzentrationen inkubiert.

3.4.3 Toxizitätstest in Flüssigkulturen

Die Toxizität der Metalle Zink, Cadmium und Cobalt für die verschiedenen *S.cerevisiae*-Stämme wurde als Wachstum in SMM-Flüssigmedium unter Zusatz verschiedener Metallkonzentrationen bestimmt. Die Ansätze wurden gleichmäßig aus einer Vorkultur angeimpft, 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert und die OD₆₀₀ gemessen. Als Referenz (100 %) diente jeweils eine Kultur ohne Metallzusatz. Die Ergebnisse dieses Tests stimmen weitestgehend mit den vorangegangenen MIC-Bestimmungen überein. In Anwesenheit von Zink konnte nochmals gezeigt werden, daß sich die *cot1*-Mutante genauso wie der Wildtyp verhält (5 mM ZnCl₂), während die *zrc1*-Mutante im Wachstum gestört ist (1 mM ZnCl₂). Sind beide Gene in der Doppelmutante deletiert, so kommt es zu einer noch ausgeprägteren Störung des Wachstums, so daß beim Vorhandensein von Zink kaum noch Wachstum der Zellen möglich ist (0.1 mM ZnCl₂). Das heißt, daß beide Genprodukte direkt in die Zink-Homöostase involviert sind, und ein Verlust beider Gene für *S. cerevisiae* toxisch ist, wenn die Zinkkonzentration im Medium größer 0.1 mM ist.

3. Experimente und Ergebnisse

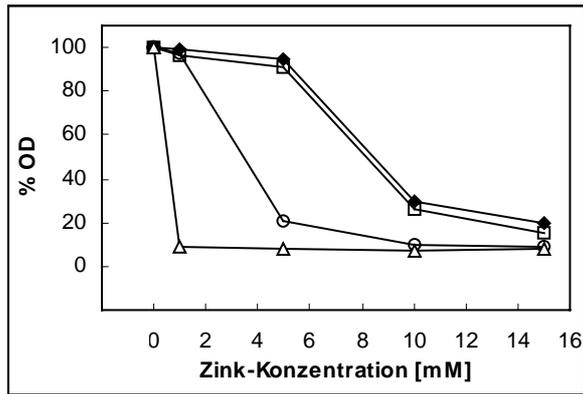


Abb. 27: Zink-Toxizität von *S. cerevisiae* Wildtyp (◆) und Mutanten: *cotI*-Mutante (□), *zrcI*-Mutante (○) und *cotI/zrcI*-Mutante (Δ)

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener $ZnCl_2$ -Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD_{600} bestimmt. Der OD_{600} -Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum.

Das Vorhandensein von Cobalt im Medium wirkt sich unterschiedlich auf das Wachstum der verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämme aus. Während sich die beiden Einzelmutanten identisch verhalten und nur unwesentlich schlechter wachsen als der Wildtyp, konnte bei der *cotI/zrcI*-Doppelmutante ein toxischer Effekt bei Cobaltkonzentrationen $>100 \mu M$ festgestellt werden. Dieses Ergebnis entspricht nicht genau den ermittelten MIC-Werten, was aber durch den Fehlerbereich der verschiedenen Methoden erklärt werden kann.

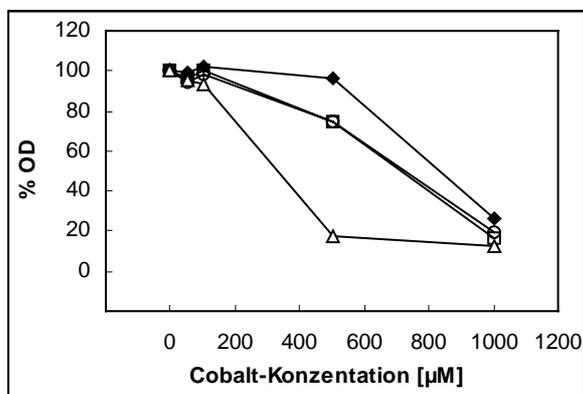


Abb. 28: Cobalt-Toxizität von *S. cerevisiae* Wildtyp (◆) und Mutanten: *cotI*-Mutante (□), *zrcI*-Mutante (○) und *cotI/zrcI*-Mutante (Δ)

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener $CoCl_2$ -Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD_{600} bestimmt. Der OD_{600} -Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum.

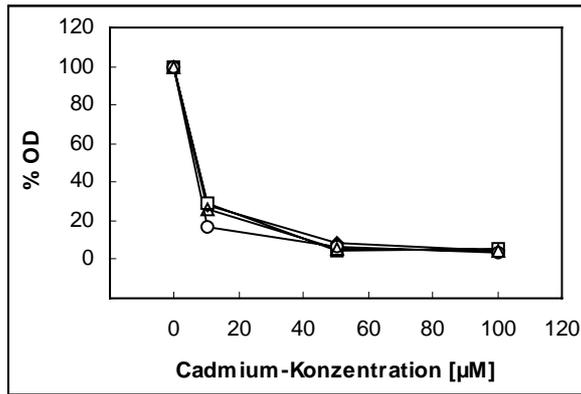


Abb. 29: Cadmium-Toxizität von *S. cerevisiae* Wildtyp (◆) und Mutanten: *cot1*-Mutante (□), *zrc1*-Mutante (○) und *cot1/zrc1*-Mutante (Δ)

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener CdCl₂-Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD₆₀₀ bestimmt. Der OD₆₀₀-Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum.

3.4.4 Komplementation der Mutationen

Nachdem der Phänotyp (Wachstum unter Metallstreß) der beiden Einzelmutanten *cot1* und *zrc1* sowie der *cot1/zrc1*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht wurde, konnte jetzt eine Komplementation der Mutanten mit anderen CDF-Proteinen bearbeitet werden. Zuerst sollte untersucht werden, ob die drei Mutanten durch Komplementation mit *COT1* bzw. *ZRC1* wieder die Resistenzen des Wildtyps erlangen. Da sich das *COT1*-Gen nicht in den Hefevektor pYES2 klonieren ließ, beschränken sich diese Untersuchungen auf *ZRC1*.

Anschließend wurden die CDF codierenden Gene *czcD* aus *Ralstonia metallidurans* sowie *ZAT1* und *Δzat1* aus *Arabidopsis thaliana* in den Hefevektor pYES2 kloniert und in die *S. cerevisiae* Mutanten-Stämme transformiert.

3.4.4.1 *ZRC1* komplementiert die *zrc1*-Mutante

Es wurden zwei unterschiedlich große, *ZRC1* enthaltende DNA-Fragmente in den Hefevektor pYES2 kloniert und diese dann in die verschiedenen Mutanten-Stämme transformiert. Das erste Konstrukt enthält nur das *ZRC1*-Gen (pECD 702), während das zweite Konstrukt (pECD 703) noch zusätzlich 700 bp stromaufwärts des *ZRC1*-Gens enthält. Bei Wachstumsversuchen mit beiden Konstrukten wurde kein Unterschied festgestellt, so daß alle folgenden Experimente nur noch mit pECD 702 durchgeführt wurden. Zur Induktion der Genexpression wurden die Wachstumsversuche in Galactose-Medium durchgeführt.

Wie in der Abbildung 30 zu erkennen ist, komplementiert das *ZRC1*-Gen in trans sowohl die *zrc1*-Mutation als auch die *cot1/zrc1*-Doppelmutation. Während sich die komplementierte *zrc1*-Mutante in Anwesenheit von Zink wie der Wildtyp verhält, konnte bei der komplementierten Doppelmutante nur das Niveau der *zrc1*-Mutante erreicht werden. Auch

daran wird wieder sehr deutlich, daß Zrc1p nicht alleine die Zink-Homöostase reguliert, sondern ein Zusammenhang zwischen den beiden Genprodukten Cot1p und Zrc1p besteht.

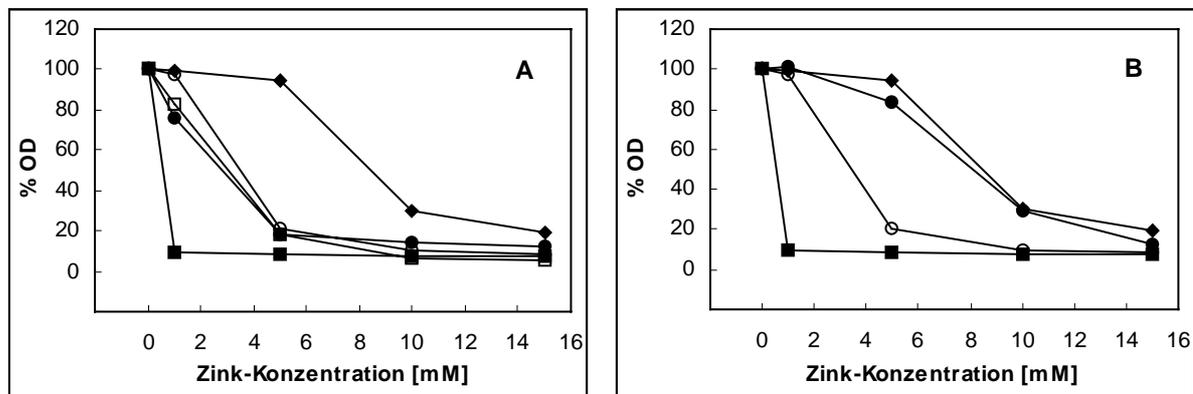


Abb. 30: Toxizitätstest zum Nachweis der Komplementation der *cot1/zrc1*-Doppelmutation (A) und der *zrc1*-Mutation (B) durch *ZRCI* (●)

Den verschiedenen Mutanten sind folgende Symbole zugeordnet: YK37-WT (◆), *zrc1*-Mutante1 (□), *zrc1*-Mutante2 (○) und *cot1/zrc1*-Mutante (■)

3.4.4.2 *ZATI* komplementiert die Mutanten nicht

In Analogie zur Komplementation mit *ZRCI* wurde das *Zat1p* aus *A. thaliana* in der *zrc1*-Mutante sowie der Doppelmutante untersucht. Dafür standen das komplette *ZATI*-Gen sowie das deletierte Gen ohne die putative Zinkbindestelle zwischen den Helices IV und V ($\Delta zat1$) zur Verfügung. Die klonierten *ZATI* und $\Delta zat1$ enthaltenden Genfragmente wurden aus den entsprechenden Expressionsvektoren (pECD 699 bzw. pECD 700) herausgeschnitten und in den Hefevektor pYES2 kloniert. Die Induktion erfolgte in diesem Fall, wie bei der *ZATI*-Expression beschrieben, durch Zugabe von Anhydrotetracyclin oder durch Galaktose. Jedoch konnte weder bei der *zrc1*-Mutation noch bei der Doppelmutation eine Komplementation durch *ZATI* bzw. $\Delta zat1$ festgestellt werden. Ein Nachweis der *ZATI* oder $\Delta zat1$ mRNA-Transkripte durch Northern-Hybridisierung gelang nicht. Es konnte deshalb nicht eindeutig geklärt werden, ob *ZATI* und $\Delta zat1$ nicht zur Komplementation der Hefe-Mutanten befähigt sind oder nicht exprimiert werden.

3. Experimente und Ergebnisse

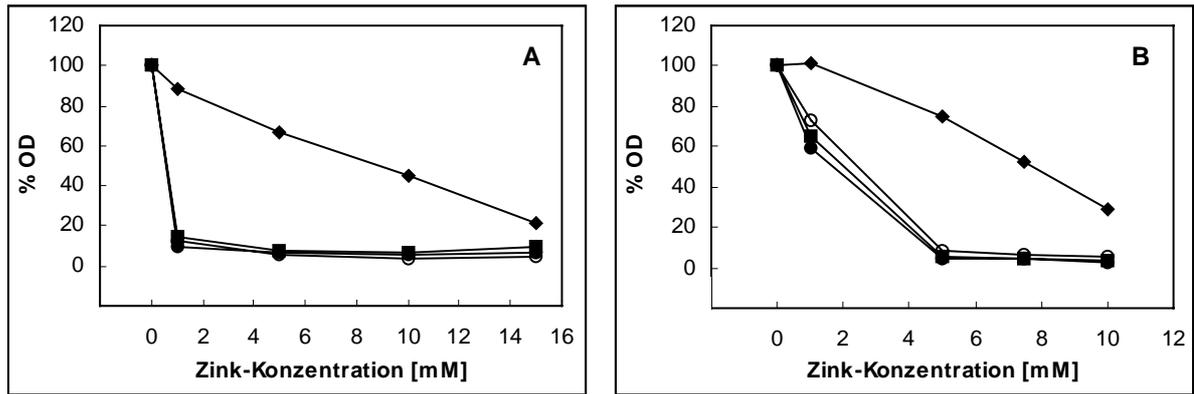


Abb. 31: Toxizitätstest zum Nachweis der Komplementation der *cot1/zrc1*-Doppelmutation (A) und der *zrc1*-Mutation (B) durch *ZAT1* und *Δzat1*

Den Mutanten sind folgende Symbole zugeordnet: A) YK37-WT (◆), *cot1/zrc1*-Mutante (■), *cot1/zrc1*-Mutante mit *ZAT1* (●), *cot1/zrc1*-Mutante mit *Δzat1* (○) und B) YK37-WT (◆), *zrc1*-Mutante (■), *zrc1*-Mutante mit *ZAT1* (●), *zrc1*-Mutante mit *Δzat1* (○)

3.4.4.3 *czcD* komplementiert die Mutanten nicht

Auch mit *CzcD*, dem CDF-Protein aus *R. metallidurans* konnte die erwartete Komplementation der *S. cerevisiae*-Mutanten nicht nachgewiesen werden. Die *zrc1*-Mutante und die *cot1/zrc1*-Doppelmutante verhielten sich bei allen Wachstumsversuchen mit Metallen genauso wie der jeweils zugehörige mit *czcD* komplementierte Stamm. Auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, daß *czcD* nicht exprimiert wird, da der Nachweis der mRNA durch Northern-Hybridisierung nicht zum Erfolg führte.

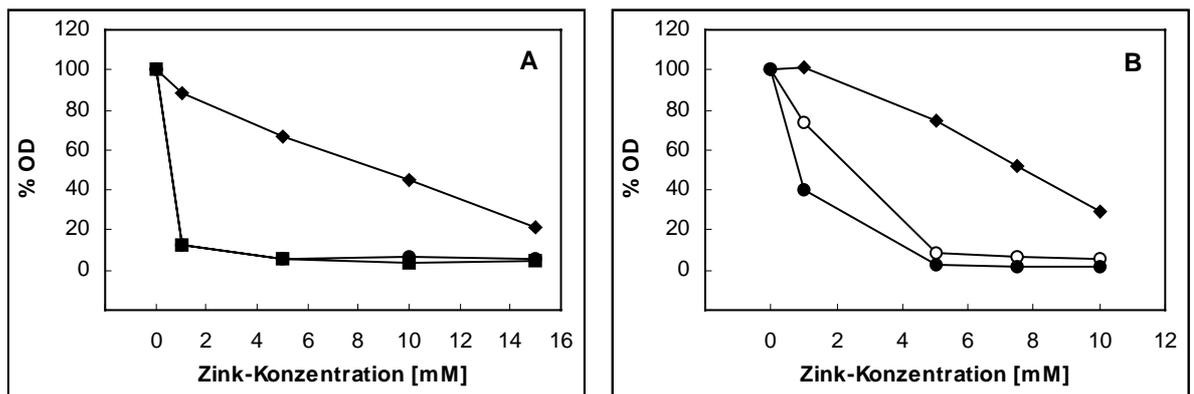


Abb. 32: Toxizitätstest zum Nachweis der Komplementation der *cot1/zrc1*-Doppelmutation (A) und der *zrc1*-Mutation (B) durch *czcD*

Den Mutanten sind folgende Symbole zugeordnet: A) YK37-WT (◆), *cot1/zrc1*-Mutante (■), *cot1/zrc1*-Mutante mit *czcD* (●) und B) YK37-WT (◆), *zrc1*-Mutante (○), *zrc1*-Mutante mit *czcD* (●).

3.4.5 Metallakkumulation der *S. cerevisiae*-Mutanten

Beim Wachstum unter Metallstress konnten nur zwischen den drei *S. cerevisiae*-Mutanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, wobei die Mutanten eine Beeinträchtigung im Wachstum zeigten. Die mit anderen CDF codierenden Genen (*czcD*, *ZAT1*, $\Delta zat1$) komplementierten Hefe-Mutanten zeigten kein verändertes Wachstumsverhalten. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob es möglicherweise zu einer unterschiedlichen Akkumulation der Metalle in den Hefezellen kommt. Das würde bedeuten, daß intrazelluläre Transport-oder Komplexierungsprozesse stattfinden, die, wenn sie nicht toxisch sind, mit dem vorher beschriebenen Toxizitätstest nicht erfaßt werden konnten.

Die zu untersuchenden Hefe-Stämme wuchsen in SMM-Galactose-Medium bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase. Zu diesem Zeitpunkt wurde direkt zum Medium das radioaktive Metall ($100 \mu\text{M } ^{65}\text{ZnCl}_2$, $100 \mu\text{M } ^{57}\text{CoCl}_2$, $50 \mu\text{M } ^{109}\text{CdCl}_2$) zugegeben und nochmals für 20 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ schüttelnd inkubiert. Nach definierten Zeiten wurden Proben entnommen, die optische Dichte bestimmt und die Radioaktivität der gewaschenen Zellen im Flüssigszintillationsmeßgerät gezählt.

In Anwesenheit von $^{65}\text{ZnCl}_2$ wurde eine erhöhte Akkumulation des Metalls in den YK37 Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den Mutanten festgestellt (Abb. 33A). Dieser Unterschied in der Akkumulation konnte für die Metalle $^{109}\text{CdCl}_2$ und $^{57}\text{CoCl}_2$ nicht festgestellt werden (Abb. 33B,C).

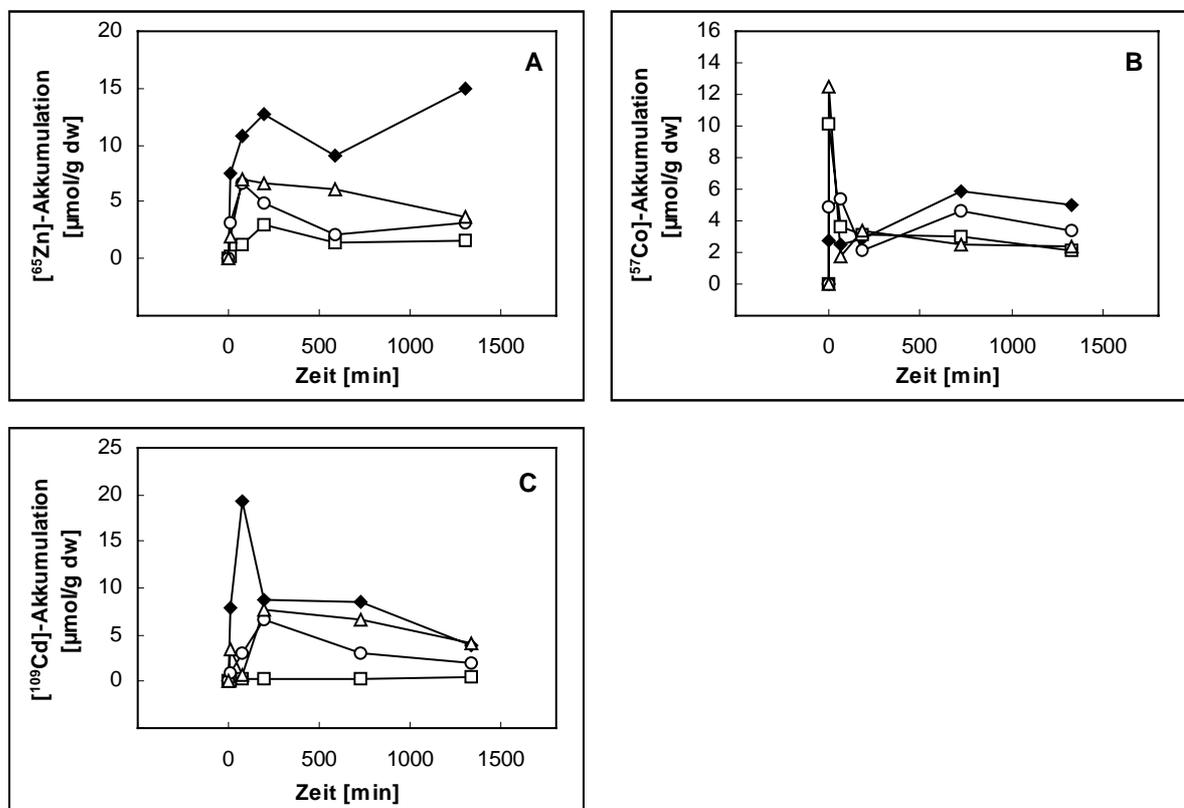


Abb. 33: Akkumulation von $100 \mu\text{M } ^{65}\text{ZnCl}_2$ (A), $100 \mu\text{M } ^{57}\text{CoCl}_2$ (B) und $50 \mu\text{M } ^{109}\text{CdCl}_2$ (C) in den *S. cerevisiae*-Stämmen YK37 (◆), YK40 (□), YK41 (○) YK44 (Δ).

3. Experimente und Ergebnisse

Analog wurde die Akkumulation von $^{65}\text{ZnCl}_2$ in den Stämmen der *cot1/zrc1*-Doppelmutante gemessen, die zusätzlich noch die Gene *ZRC1*, *ZAT1*, Δ *zat1* und *czcD* enthielten. Wenn diese Gene zur funktionellen Komplementation der *cot1/zrc1*-Doppelmutante in der Lage wären, so sollte dies zu einer erhöhten Zn-Akkumulation dieser Stämme im Vergleich zur Doppelmutante führen. Wie aber in der Abbildung 34 zu erkennen ist, komplementieren die zusätzlichen Gene die *cot1/zrc1*-Doppelmutante nicht.

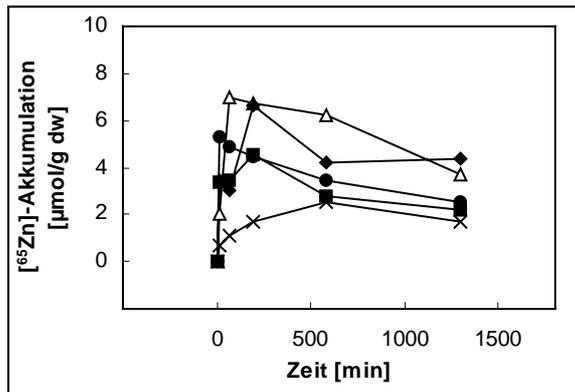


Abb. 34: Akkumulation von $^{65}\text{ZnCl}_2$ in der *cot1/zrc1*-Doppelmutante und komplementierten *cot1/zrc1*-Stämmen.

Die *cot1/zrc1*-Doppelmutante (Δ) wurde mit folgenden Genen komplementiert: *ZAT1* (\blacksquare), Δ *zat1* (\blacklozenge), *ZRC1* (\bullet) und *czcD* (x).

3.5 Untersuchungen an der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*

Im Vergleich zur Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit den CDF-Genen *COT1* und *ZRC1* besitzt die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* nur das *ZRC1*-Gen. Deshalb wurde *Schizosaccharomyces pombe* ausgewählt, um weitere Hinweise auf die Funktion von Zrc1p zu erhalten. Für die Untersuchungen standen der Wildtyp (FY261) und eine *zrc1*-Mutante (Insertion des Leu2-Markers) von Dr. Clemens (IPB, Halle) zur Verfügung.

3.5.1 Toxizitätsbestimmung der *zrc1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp

Um den Phänotyp der *zrc1*-Mutante und des Wildtyps zu bestimmen, wurde zuerst das Wachstum in Flüssigmedium (EMM2) unter Zugabe einiger Metallsalze in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Dazu wurden beide Stämme aus einer Vorkultur in je 5 ml Flüssigmedium mit Metall überimpft und 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils 1 Ansatz ohne Metall angeimpft.

A) Einfluß von $ZnCl_2$ auf das Wachstum von *S. pombe*-Stämmen

Die Zugabe von $ZnCl_2$ zum Medium ist für die *zrc1*-Mutante schon ab 1 mM toxisch, während der Wildtyp bis 10 mM wachsen kann (Abb. 35). Die minimale Inhibitorkonzentration (MIC) wurde für den Wildtyp mit 10 mM bestimmt, während sie bei der *zrc1*-Mutante 0.5 mM $ZnCl_2$ beträgt.

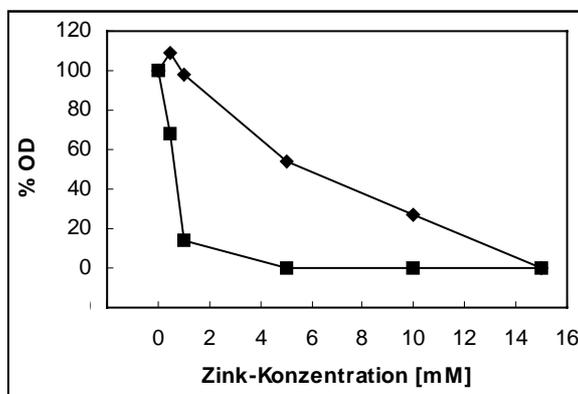


Abb. 35: Zink-Toxizität von *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener $ZnCl_2$ -Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD_{600} bestimmt. Der OD_{600} -Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum

B) Einfluß von $CoCl_2$ auf das Wachstum von *S. pombe*-Stämmen

Auch das Vorhandensein von Cobalt zeigt einen toxischen Effekt auf die *zrc1*-Mutante (Abb. 36). Während für den Wildtyp eine MIC von 5 mM bestimmt wurde, beträgt die MIC für die *zrc1*-Mutante 1 mM.

3. Experimente und Ergebnisse

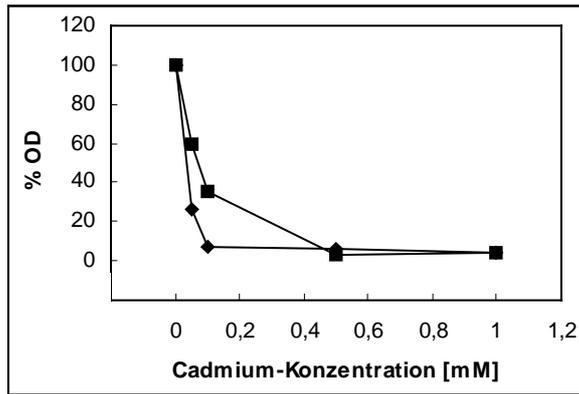


Abb. 36: Cobalt-Toxizität von *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener CoCl_2 -Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD_{600} bestimmt. Der OD_{600} -Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum

C) Einfluß von CdCl_2 auf das Wachstum von *S. pombe*-Stämmen

Ein interessanter Effekt konnte bei der Zugabe von CdCl_2 beobachtet werden. Während die *zrc1*-Mutante in Anwesenheit von ZnCl_2 und CoCl_2 ein verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigt, konnte bei CdCl_2 ein umgekehrtes Verhalten beobachtet werden (Abb. 37). Die MIC für CdCl_2 des Wildtyps beträgt 50 μM , die der *zrc1*-Mutante 100 μM .

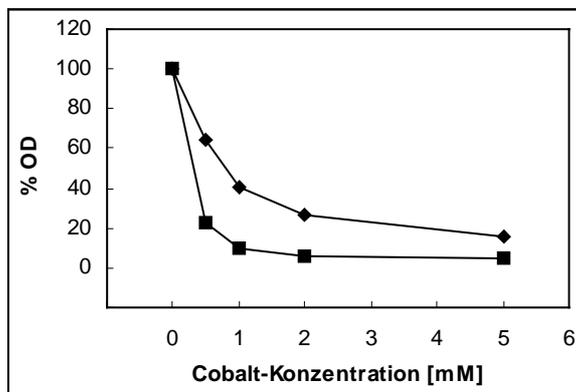


Abb. 37: Cadmium-Toxizität von *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener CdCl_2 -Konzentrationen für 24 h kultiviert und anschließend das Wachstum durch Messung der OD_{600} bestimmt. Der OD_{600} -Wert ohne Metallzusatz entspricht 100 % Wachstum

Zur Charakterisierung des Phänotyps von Wildtyp und *zrc1*-Mutante wurden beide Stämme für 5 Tage bei 30 °C auf EMM 2-Platten mit verschiedenen Metallkonzentrationen inkubiert. In Anwesenheit von 1 mM ZnCl_2 und 1 mM CoCl_2 wurde kein Wachstum der *zrc1*-Mutante mehr festgestellt, während der Wildtyp ohne sichtbare Veränderungen gewachsen ist (Abb. 38). In Gegenwart von 0.05 mM CdCl_2 wurde ein vermindertes Wachstum des Wildtyps im Vergleich zur *zrc1*-Mutante festgestellt.

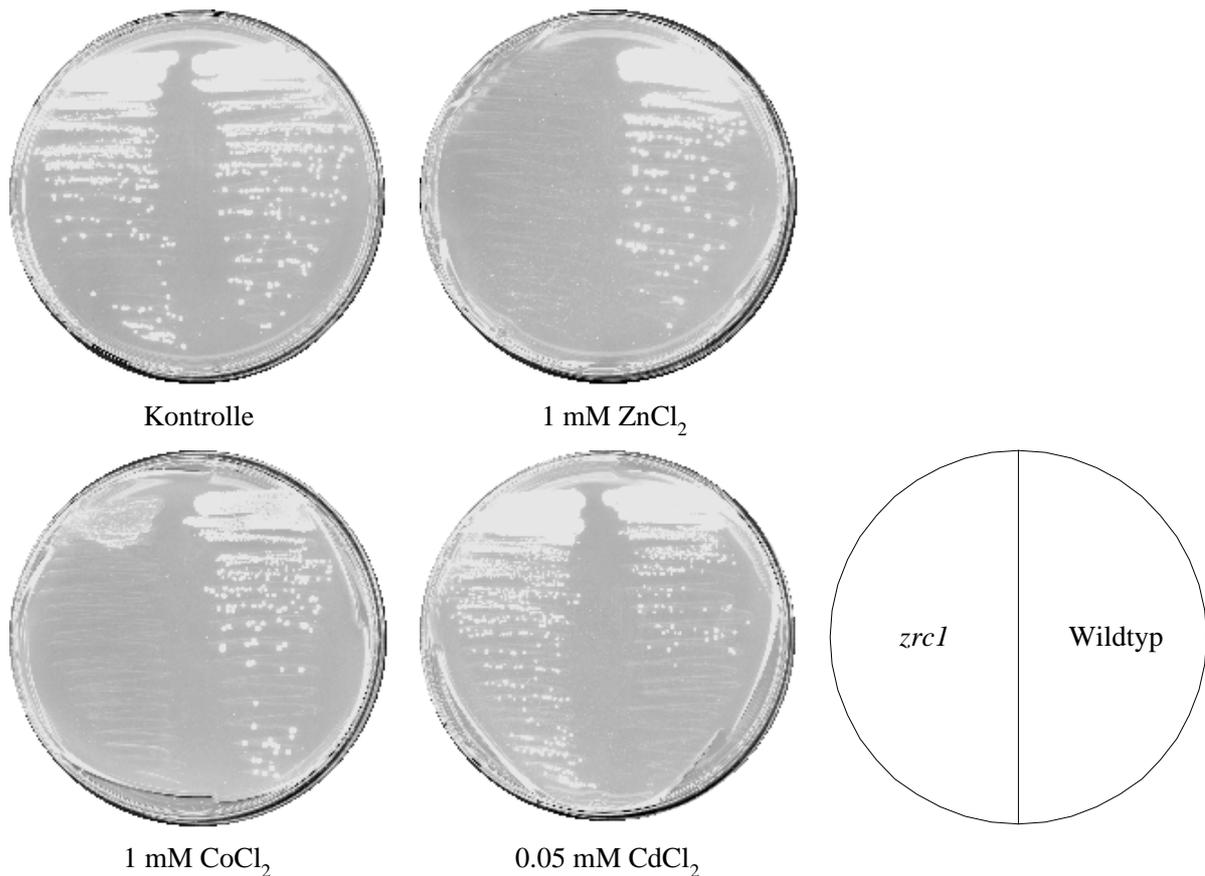


Abb. 38: Bestimmung der minimalen InhibitorKonzentration vom *S. pombe*-Wildtyp und der *zrc1*-Mutante für die Schwermetallsalze ZnCl₂, CdCl₂ und CoCl₂.

Die Stämme wurden 5 Tage bei 30 °C auf EMM2-Platten mit den angegebenen Metall-Konzentrationen inkubiert.

3.5.2 Aufnahme radioaktiver Metalle durch *S. pombe zrc1*-Mutante und Wildtyp

Da der *S. pombe* Wildtyp und die *zrc1*-Mutante in Anwesenheit von Schwermetallen unterschiedliches Wachstumsverhalten aufweisen, wurde untersucht, ob dieser Effekt mit einer veränderten Aufnahme dieser Metalle durch die Hefezellen korreliert. Die Zellen beider Stämme wurden dazu in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in Uptake-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0.1 mM und 1 mM ⁶⁵ZnCl₂ (spez. Aktivität 185 GBq/g) bzw. ¹⁰⁹CdCl₂ (spez. Aktivität 37 MBq/μg) wurden über einen Zeitraum von 6 min regelmäßig Proben entnommen, gewaschen und der Gehalt an ⁶⁵ZnCl₂ bzw. ¹⁰⁹CdCl₂ in einem Flüssigszintillationssystem ausgezählt. Die Mutation des *ZRC1*-Gens hat keinen Einfluß auf die Aufnahme der Schwermetallionen. Wildtyp und die *zrc1*-Mutante zeigen keine Unterschiede bei der Aufnahme der Metalle (Abb. 39, 40). Die Zugabe von höheren Metallkonzentrationen führte zu einer verstärkten Aufnahme der Metalle. Desweiteren wurde bei allen Experimenten die meiste Aufnahme innerhalb der ersten Minute beobachtet.

3. Experimente und Ergebnisse

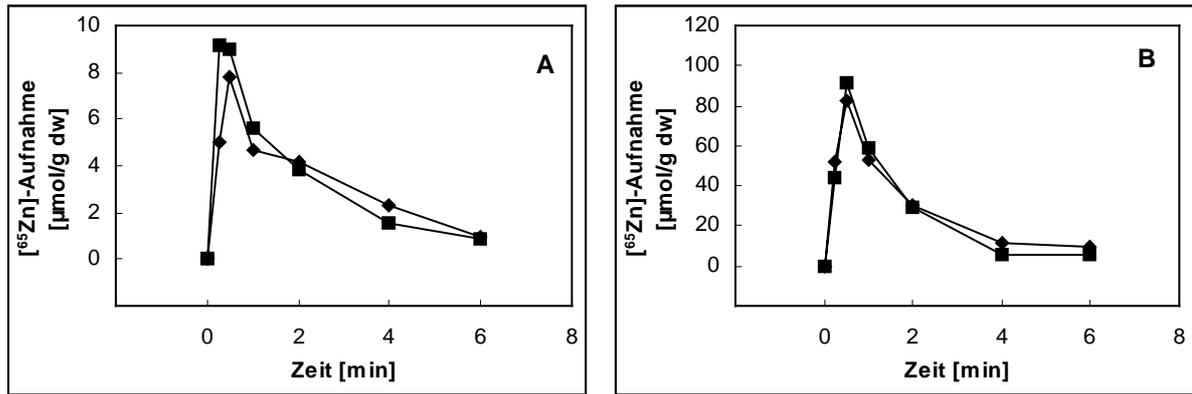


Abb. 39: $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Aufnahme von *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

Die Zellen wurden mit 100 μM (A) und 1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ (B) inkubiert und die Menge an aufgenommenem $^{65}\text{ZnCl}_2$ wurde in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

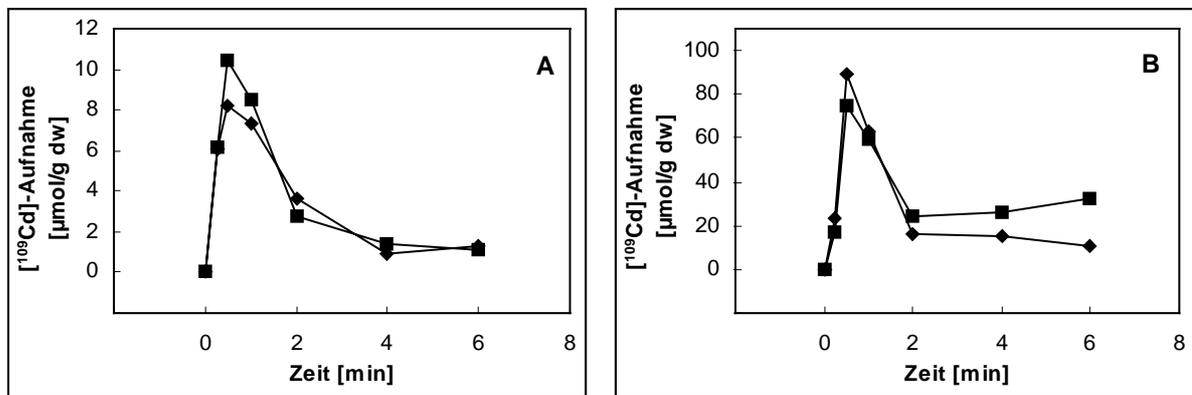


Abb. 40: $^{109}\text{CdCl}_2$ -Aufnahme von *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

Die Zellen wurden mit 100 μM (A) und 1 mM $^{109}\text{CdCl}_2$ (B) inkubiert und die Menge an aufgenommenem $^{109}\text{CdCl}_2$ wurde in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

3.5.3 Akkumulation radioaktiver Metalle in *S. pombe zrc1*-Mutante und Wildtyp

Um festzustellen, worauf das unterschiedliche Wachstum von *S. pombe* Wildtyp und der *zrc1*-Mutante beruht, wurde die Akkumulation radioaktiver Metalle über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Da die Aufnahmemessungen beider Stämme keinen Unterschied zeigten, könnte möglicherweise ein intrazellulärer Transport mit anschließender Komplexierung der Metalle eine Erklärung sein. Dazu wurden die Zellen beider Stämme bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Zugabe des radioaktiven Metalls zum Medium und in regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen, gewaschen und die Radioaktivität mit einem Flüssigszintillationssystem bestimmt. Das zugehörige Trockengewicht wurde durch Messung der OD_{600} unter Verwendung einer Eichkurve bestimmt. Das Vorhandensein von 100 μM $^{65}\text{ZnCl}_2$, $^{57}\text{CoCl}_2$ und $^{109}\text{CdCl}_2$ führte in diesen 3 Ansätzen zu einer erhöhten Akkumulation der Metalle im Wildtyp verglichen mit der *zrc1*-Mutante (Abb. 41).

3. Experimente und Ergebnisse

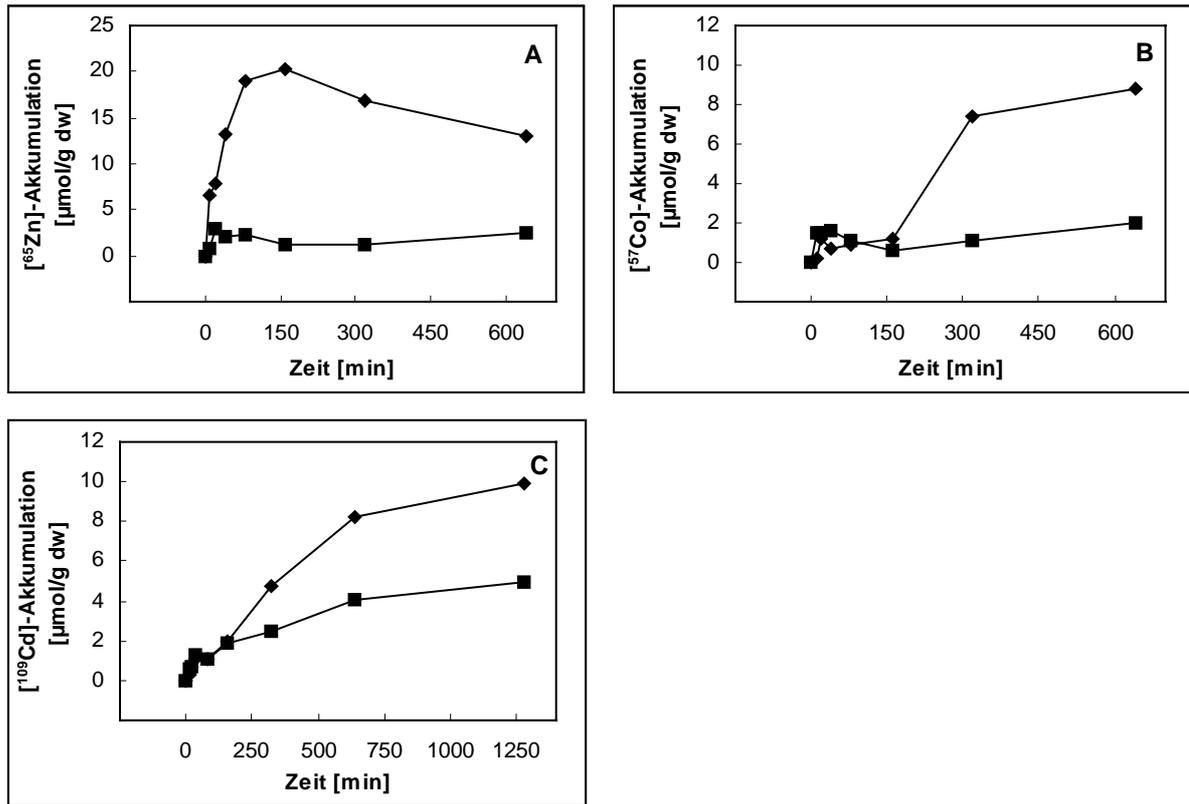


Abb. 41: Akkumulation von $100 \mu\text{M } ^{65}\text{ZnCl}_2$ (A), $^{57}\text{CoCl}_2$ (B) und $^{109}\text{CdCl}_2$ (C) in *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

Durch die Zugabe der Metallsalze $^{65}\text{ZnCl}_2$, $^{57}\text{CoCl}_2$ und $^{109}\text{CdCl}_2$ in verschiedenen Konzentrationen wurde festgestellt, daß die erhöhte Metall-Akkumulation des *S. pombe* Wildtyps im Vergleich zur *zrc1*-Mutante konzentrationsunabhängig ist. In der Abbildung 42 ist dieser Effekt, der für die drei genannten Metallsalze bestätigt wurde, für 10 und $50 \mu\text{M } ^{65}\text{ZnCl}_2$ dargestellt.

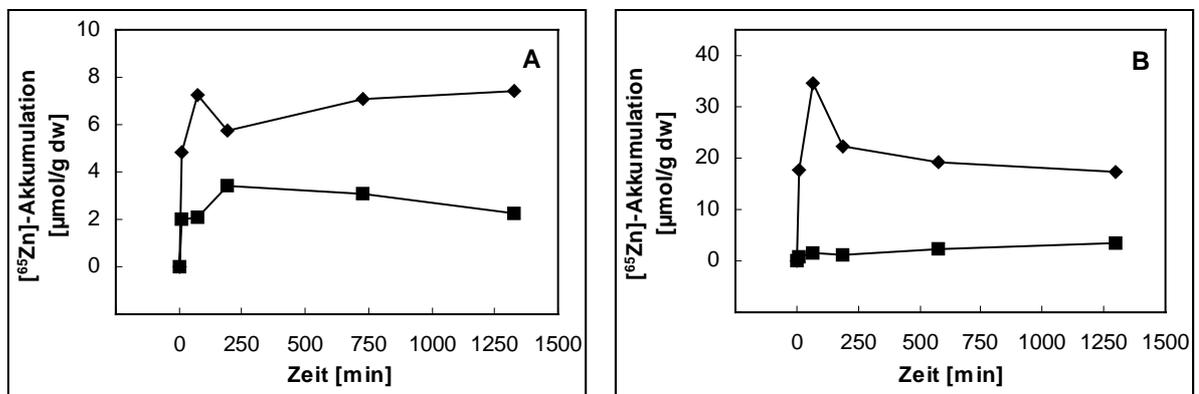


Abb. 42: Akkumulation von $10 \mu\text{M}$ (A) und $50 \mu\text{M}$ (B) $^{65}\text{ZnCl}_2$ in *S. pombe* Wildtyp (◆) und *zrc1*-Mutante (■).

4. DISKUSSION

4.1 Der Zink-Transporter *Zat1p* aus *Arabidopsis thaliana* ist der erste pflanzliche Vertreter der CDF-Proteinfamilie

Die Regulation der Schwermetall-Homöostase, gekennzeichnet durch Aufnahme, intra- und interzelluläre Transportprozesse, Detoxifikation und Kompartimentierung sowie Efflux der Metall-Ionen, ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung essentieller Stoffwechselprozesse der Organismen. Im Mittelpunkt der Forschung steht dabei die Komplexität der verschiedenen Transport-Systeme. Am Schwermetall-Transport beteiligte Proteine der Pro- und Eukaryoten können den folgenden Proteinfamilien zugeordnet werden:

- A.) P-tyr-ATPasen, die Aufnahme und Efflux katalysieren (Cd, Cu)
- B.) ABC-Transporter (*ATP binding cassette*), die Aufnahme und Kompartimentierung katalysieren (Ni, Mn, Fe, Phytochelatine-Cd²⁺-Komplexe)
- C.) RND-Proteine (*Resistance Nodulation Cell Division*), die Efflux von Ni, Co, Cd, Zn katalysieren
- D.) CDF-Proteine (*cation diffusion facilitator*), die Efflux und Kompartimentierung katalysieren (Zn, Co, Cd)
- E.) Nramp-Familie (*natural resistance-associated macrophage protein*), die Aufnahme katalysiert (Mn, Fe, Zn)
- F.) ZIP-Proteine (*ZRT, IRT like protein*), die Aufnahme und Kompartimentierung katalysieren (Zn, Fe, Mn).

Die Funktion der zwei ersten Proteinfamilien ist an die Energie der ATP-Hydrolyse gekoppelt, während die anderen Proteinfamilien keine Nukleotid-Bindestellen enthalten und deren Transportaktivität zum Teil an Protonengradienten gekoppelt ist.

Zur Familie der P-tyr-ATPasen gehören die Schwermetall-ATPasen, die bereits in einer großen Zahl von Organismen identifiziert sind. Sie nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse für den Transport geladener Substrate über biologische Membranen. Merkmale dieser Proteine sind eine Nukleotid-Bindestelle und ein spezifischer konservierter Aspartat-Rest, der während des Reaktionszyklus phosphoryliert wird. Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens eines konservierten transmembranen Cys-Pro-Cys, Cys-Pro-His oder Cys-Pro-Ser-Motivs (CPX-Motiv) definierten Solioz und Vulpe (1996) die Schwermetall-P-tyr-ATPasen als CPX-ATPasen, deren erster pflanzlicher Vertreter PAA1 mit bisher unbekannter Funktion in *A. thaliana* identifiziert wurde (Tabata *et al.*, 1997). Die erste bakterielle Schwermetall-Efflux-ATPase war CadA aus *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al.*, 1989). CadA vermittelt Cadmium-Resistenz durch einen ATP-abhängigen Export der toxischen Cd²⁺-Ionen. ZntA ist eine Efflux-ATPase aus *Escherichia coli*, die Zn²⁺-, Cd²⁺-, Pb²⁺- und Hg²⁺-Ionen durch

Thiolatbildung mit Cystein oder Glutathion entgiftet (Rensing *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2000). Die erhöhte Kupfer-Toleranz der pathogenen Hefe *Candida albicans* beruht auf dem Crp1p vermittelten Efflux der Cu^{2+} -Ionen aus dem Cytoplasma (Weissman *et al.*, 2000). Während Crp1p aus *C. albicans* in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, befindet sich die homologe Cu^{2+} -ATPase Ccc2p aus *S. cerevisiae* im Post-Golgi-Kompartiment des sekretorischen Systems und ist für den intrazellulären Cu^{2+} -Transport essentiell (Fu *et al.*, 1995). Ähnliche Proteine wurden auch im Menschen lokalisiert. Defekte der humanen intrazellulären Cu-Transporter MNKp und WDP führen zur Menkes-bzw. Wilson-Krankheit (Yuan *et al.*, 1995). Während die Menkes-Krankheit durch eine verringerte Cu^{1+} -Aufnahme durch ungenügende Absorption im Magen-Darm-Trakt gekennzeichnet ist (Vulpe *et al.*, 1993; Voskoboinik *et al.*, 1998), kommt es bei der Wilson-Krankheit zu einer Cu^{2+} -Akkumulation in der Leber (Bull *et al.*, 1993).

Hauptbestandteil der ABC-Transporter ist neben der transmembranen Domäne die *ATP-binding cassette*, eine hochkonservierte Domäne von ungefähr 215 Aminosäuren, die für die Übertragung der Energie der ATP-Bindung und -Hydrolyse auf verschiedene physiologische Prozesse essentiell ist (Higgins, 1992). Dabei handelt es sich hauptsächlich um den Transport von Substraten über biologische Membranen, einerseits durch aktive Pumpen oder andererseits durch Proteine mit intrinsischer Kanal-Aktivität. Nur wenige ABC-Proteine haben keine Transportfunktion, wie das *uvrA* kodierte DNA-Reparaturenzym (Doolittle *et al.*, 1986). Während bakterielle ABC-Transporter vorwiegend mit der Virulenz und dem Überleben unter verschiedenen Umweltbedingungen in Einklang gebracht werden, sind humane ABC-Transporter oftmals mit Krankheitsbildern assoziiert. Das *mdr1* kodierte humane P-Glycoprotein, das Resistenz gegenüber vielen cytotoxischen Substanzen vermittelt, ist bisher am besten charakterisiert (Gottesman and Pastan, 1993), und homologe Proteine sind in vielen Organismen nachgewiesen worden. Das Ycf1p aus *S. cerevisiae* verleiht Resistenz gegenüber Cadmium (Szczycka *et al.*, 1994), die auf dem Transport der Glutathion-komplexierten Cd^{2+} -Ionen in die Vakuole durch die Glutathion-S-Konjugat-Pumpe Ycf1p beruht (Li *et al.*, 1996 und 1997). Das homologe Protein Mrp3p aus *A. thaliana* transportiert neben Glutathion-Konjugaten auch Chlorophyll-Katabolite (Tommasini *et al.*, 1998).

Die ubiquitär verbreiteten Proteine der RND-Familie vermitteln einen Protonen-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran und sind durch 12 transmembrane Domänen gekennzeichnet (Paulsen *et al.*, 1996). Neben dem Efflux von hydrophoben und amphiphilen Substanzen in Bakterien und der Aufrechterhaltung der Sterol-Homöostase in Eukaryoten steht der Efflux von Schwermetallen in Gram-negativen Bakterien im Mittelpunkt dieser Protein-Familie (Tseng *et al.*, 1999). CzcA aus *R. metallidurans* ist die zentrale Kationen-Efflux-Pumpe des *czc*-Effluxsystems, welches Resistenz gegenüber Cadmium, Zink und Cobalt vermittelt (Goldberg *et al.*, 1999). Das homologe CnrA katalysiert den Efflux von Nickel und Cobalt im selben Organismus (Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993).

Proteine der ZIP-Familie (ZRT, IRT ähnliche Proteine) sind in den Eisen und Zink-Transport involviert (Eng *et al.*, 1998). Während Irt1p (Iron regulierter Transporter) aus *A. thaliana* unter Eisen-Mangel in den Wurzeln synthetisiert wird (Eide *et al.*, 1996), handelt es sich bei Zrt1p und Zrt2p (Zn regulierte Transporter) um hoch- und niedrigaffine Zn-Transporter der Hefe *S. cerevisiae* (Zhao and Eide, 1996a; Zhao and Eide, 1996b).

Obwohl die Funktion der noch jungen Nramp (natural resistance-associated macrophage protein) Proteinfamilie (Cellier *et al.*, 1995) nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte der Transport divalenter Kationen für die Vertreter der Hefe Smf1p, Smf2p und Smf3p bereits nachgewiesen werden. Smf1p und Smf2p scheinen als hoch- und niedrigaffine Transporter für die Aufnahme von Mangan zu fungieren (West *et al.*, 1992; Supek *et al.*, 1996; Supek *et al.*, 1997), deren Vorkommen Gadd and Laurence (1996) nach Mn^{2+} -Transportstudien in *S. cerevisiae* bereits postulierten. Liu *et al.* (1997) beschreiben einen ebenfalls *SMF1* vermittelten Cadmium- und Kupfer-Transport. Dct1p der Ratte vermittelt bei Expression in Oocyten einen pH-abhängigen Transport von Eisen, Mangan und Zink, was einen Protonen gekoppelten Carrier vermuten läßt (Gunshin *et al.*, 1997). Auch die pflanzlichen Nramp-Proteine aus *Oryza sativa* und *A. thaliana* scheinen in den Metalltransport involviert zu sein. Die *AtNramp*-Gene 1, 3 und 4 komplementieren Hefemutanten mit veränderter Mn- und Fe-Aufnahme (*smf1*, *fet3/fet4*). Experimente mit *A. thaliana*-Pflanzen zeigen, daß die *AtNramp*-Gene Metall-Transporter kodieren, die sowohl Cd^{2+} als auch Fe^{2+} -Ionen transportieren (Thomine *et al.*, 2000).

Die Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, gehören zur CDF (cation diffusion facilitator) Proteinfamilie (Paulsen and Saier, 1997; Nies and Silver, 1995). Deren Vertreter sind ebenfalls in die Regulation der Metall-Homöostase involviert, die jedoch auf sehr unterschiedliche Funktionsmechanismen der einzelnen Proteine zurückzuführen ist. CzcD aus *Ralstonia metallidurans* (früher *Alcaligenes eutrophus*; Brim *et al.*, 1999) ist der erste prokaryotische Vertreter dieser Familie. Während van der Lelie *et al.* (1997) eine Funktion als membrangebundenen Sensor für die Metalle Cadmium, Zink und Cobalt postulierten, beschreiben Anton *et al.* (1999) CzcD als Regulator des CzcCBA Efflux-Komplexes. Durch Bindung und Efflux der induzierenden Metall-Kationen ins Periplasma wird möglicherweise das *czc*-Efflux-System reprimiert, welches Resistenz gegenüber Cd^{2+} -, Zn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen vermittelt. Andererseits ist CzcD wie auch alle anderen CDF-Proteine nicht essentiell, und damit verbunden wurde im *czcD* deletierten Stamm DN182 eine 10fache Erhöhung der *czcCBA* mRNA-Konzentration mit und ohne Zn-Induktion im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Anton *et al.*, 1999). Das bedeutet, daß das komplexe CzcCBA-Effluxsystem den Ausfall des „Frühwarnsystems“ CzcD durch verstärkte Anwesenheit kompensieren kann.

Das erste eukaryotische Mitglied dieser Proteinfamilie ist Zrc1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Überexpression des nicht essentiellen *ZRC1* in der Hefe führt zu Resistenz

gegenüber 40 mM Zn und 0.2 mM Cd im Vergleich zu 10 mM Zn und 0.05 mM Cd des Wildtyps mit einer *ZRC1*-Kopie (Kamizono *et al.*, 1989). Demgegenüber beschreiben Inoue *et al.* (1993a,b) eine erhöhte Resistenz gegenüber Hydroperoxiden bei Überexpression des *OSRI*-Gens, welches mit dem *ZRC1*-Gen identisch ist. Diese Hydroperoxide entstehen bei der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit den Doppelbindungen der Fettsäuren der Zellmembran, und eine Anhäufung der Hydroperoxide führt zur Zell-Lyse (Voet und Voet, 1994). Die Reduktion dieser Peroxide ist wiederum an metallabhängige Enzyme gebunden (Halliwell and Gutteridge, 1989). Die erhöhte Resistenz gegenüber Hydroperoxiden geht verloren, sobald das *ZRC1/OSRI*-Gen ausgeschaltet wird. Neben Schwermetallresistenz und erhöhter Resistenz gegenüber Hydroperoxiden beeinflusst das Ausschalten auch den cytoplasmatischen Glutathion-Gehalt, der beim Verlust des *ZRC1/OSRI*-Gens um 60 % sinkt (Kobayashi *et al.*, 1996). Der direkte Zusammenhang dieser unterschiedlichen, sich möglicherweise bedingenden Effekte für ein und das selbe Gen, ist jedoch noch nicht vollständig hergestellt.

60 % AS-Identität besteht zwischen Zrc1p und Cot1p aus *S. cerevisiae*. Das *COT1* Genprodukt wurde als dosisabhängiger Suppressor der Cobalt-Toxizität isoliert (Conklin *et al.*, 1992), dessen Überexpression zu erhöhter Toleranz gegenüber Cobalt (20 mM CoCl₂ im Medium) führt. Beide Proteine sind strukturell und funktionell sehr ähnlich und unterscheiden sich in ihrer Größe nur um drei Aminosäuren. Conklin *et al.* (1994) postulierten deshalb, daß Cot1p und Zrc1p Konzentration von Zn²⁺- und Co²⁺-Ionen im Cytoplasma verringern; sei es durch Kompartimentierung in der mitochondrialen Matrix oder aber direkt durch Bindung der Metallionen. Neuere Untersuchungen zeigten hingegen, daß beide Proteine bei Überexpression in der Vakuolenmembran lokalisiert sind (Li and Kaplan, 1998).

Große Homologie der beiden Hefeproteine besteht auch zu den Zink-Transportern (ZnT-1 bis ZnT-4) der Säugetiere. Während ZnT-1 von Maus und Ratte in der Plasmamembran lokalisiert und in den Zn-Efflux involviert ist (Palmiter and Findley, 1995; McMahon and Cousins, 1998), scheint ZnT-2 im intrazellulären Membransystem (Endosomen) die vesikuläre Sequestration der Zn²⁺-Ionen zu begünstigen (Palmiter *et al.*, 1996a; Kobayashi *et al.*, 1999). ZnT-3 erleichtert den Zn-Transport in die synaptischen Vesikel und ist somit in die Freisetzung der Neurotransmitter involviert (Palmiter *et al.*, 1996b; Cole *et al.*, 1999). Ein weiterer Zn-Transporter, ZnT-4, wurde in Darmzellen (Murgia *et al.*, 1999) und Milchdrüsen von Säugetieren nachgewiesen (Huang and Gitschier, 1997).

Doch welche Gemeinsamkeiten weist das Zat1p aus *Arabidopsis thaliana* mit den bisher vorgestellten Proteinen auf, um der CDF-Proteinfamilie zugeordnet zu werden ?

Obwohl die Größe der Proteine dieser Familie sehr variabel ist (300 AS-750 AS), werden für alle Mitglieder 6 transmembrane Helices vorhergesagt, die auch die Bereiche mit den größten Homologien sind. Durch die Verwendung von *lacZ* und *phoA*-Fusionen konnte die Topologie

von CzcD aus *R. metallidurans* teilweise aufgeklärt werden. Aktivitätsmessungen von β -Galaktosidase und alkalischer Phosphatase als Marker für cytoplasmatische bzw. periplasmatische Lage, lokalisierten den N-Terminus des Proteins im Cytoplasma, gefolgt von 4 eindeutig identifizierten transmembranen Helices (Anton *et al.*, 1999). Die restlichen 2 putativen Helices konnten mit dieser Methode jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Für alle anderen Proteine der CDF-Familie sind bisher keine Daten zur Bestätigung der Computervorhersagen bekannt. Diese Berechnung der Sekundärstruktur der Proteine beruht auf der unterschiedlichen Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren und wird in den Hydropathie-Profilen dargestellt (Abb. 14). Darauf aufbauend haben Paulsen and Saier (1997) das folgende Modell der CDF-Proteine entwickelt. Während die 4 amphiphatischen Helices I, II, V und VI den inneren Kern eines Kanals durch die Membran bilden, sind die restlichen zwei hydrophoben Helices III und IV in der äußeren Hülle des Kanals lokalisiert. Die konservierten Aspartat-Reste der Helices II, V und VI könnten für die Bindung der Kationen im Inneren des Kanals essentiell sein. Ein Austausch dieser konservierten Asp-Reste und sich anschließende Transportstudien werden diese Hypothese sicherlich in kürzester Zeit untermauern bzw. widerlegen. Größte Divergenz in der AS-Zusammensetzung und Größe bestimmt die im Cytosol lokalisierte Region zwischen den transmembranen Helices IV und V. Während sie in den prokaryotischen CDF-Proteinen mit 10-13 AS sehr klein ist, variiert die Größe in den eukaryotischen Proteinen von 25 bis 141 AS (Paulsen and Saier, 1997). Desweiteren ist diese Region der eukaryotischen Proteine durch das Vorhandensein vieler Histidin-Reste gekennzeichnet. Inwieweit diese Region in die Bindung der Metallionen involviert ist und damit funktionell oder regulatorisch eine entscheidende Rolle spielt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch völlig offen. Möglicherweise unterscheidet sich genau darin die Funktionsweise der CDF-Proteine in Pro- und Eukaryoten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Pflanzengenome nach Sequenzen durchsucht, die Homologie zu den CDF-Protein kodierenden Genen aufweisen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren CDF-Proteine von vielen Organismen außerhalb des Pflanzenreiches bekannt. Unsere Hypothese beruhte darauf, daß auch diese in den Metalltransport involvierte Proteinfamilie ubiquitär verbreitet sein sollte. Bereits charakterisierte sowie putative CDF-Proteine verschiedener Organismen sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt.

4. Diskussion

Tab. 8: Ubiquitäre Verbreitung der CDF-Proteinfamilie

Protein	Organismus	Funktion	Größe (AS)	Molekulargewicht (Da)	Accession-Nr.	Referenz
Zat1p	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putativer Zink-Transporter	398	43827	AC005310	Rounsley <i>et al.</i> , 1998
hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putativer Zink-Transporter	378	41221	AL353032	D'Angelo <i>et al.</i> , 2000
hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putativer Zink-Transporter	334	37344	AL138642	Choisne <i>et al.</i> , 2000
hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putativer Zink-Transporter	385	43534	AC004561	Rounsley <i>et al.</i> , 1998
123.pep (Fragment)	<i>Solanum tuberosum</i>	unbekannt	164	17904	U60071	Leister <i>et al.</i> , 1996
Znt1p	<i>Mus musculus</i>	Zink-Transporter 1	503	54716	U17132	Palmiter and Findley, 1995
Znt1p	<i>Mus musculus</i>	Zink-Transporter 1 ähnlich	492	54459	AF233321	Zhu and Mager, 2000
Znt2p	<i>Mus musculus</i>	Zink-Transporter 2 ähnlich	378	41790	AF233322	Zhu and Mager, 2000
Znt3p	<i>Mus musculus</i>	Zink-Transporter 3	388	41824	U76007	Palmiter <i>et al.</i> , 1996b
ZnT4p	<i>Mus musculus</i>	Zink-Transporter 4	430	47791	AF004099	Huang and Gitschier 1997
Znt1p	<i>Rattus norvegicus</i>	Zink-Transporter 1	507	55142	U17133	Palmiter and Findley, 1995
Znt2p	<i>Rattus norvegicus</i>	Zink-Transporter 2	359	39276	U50927	Palmiter <i>et al.</i> , 1996a
Znt4p	<i>Rattus norvegicus</i>	Zink-Transporter 4	430	47702	Y16774	Murgia <i>et al.</i> , 1999
Znt3p	<i>Homo sapiens</i>	Zink-Transporter 3	388	41944	U76010	Palmiter <i>et al.</i> , 1996b
Znt4p	<i>Homo sapiens</i>	Zink-Transporter 4	429	47496	AF025409	Huang and Gitschier 1997
hypothetisches Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	unbekannt	472	51036	AE003646	Adams <i>et al.</i> , 2000
hypothetisches Protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	unbekannt	382	42237	Z68119	Wilson <i>et al.</i> , 1994
hypothetisches Protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	unbekannt	391	42389	AL021480	Wilson <i>et al.</i> , 1994
Cot1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cobalt-Aufnahme-Protein	439	48154	M88252	Conklin <i>et al.</i> , 1992

4. Diskussion

Zrc1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zink-Cadmium-Resistenz-Protein	442	48344	X17537	Kamizono <i>et al.</i> , 1989
hypothetisches Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	putatives Zink-Cadmium-Resistenz-Protein	387	42941	Z98559	Brown <i>et al.</i> , 1997
CzcD	<i>Ralstonia metallidurans</i>	Cobalt-Zink-Cadmium-Resistenz-Protein	316	33707	X98451	van der Lelie <i>et al.</i> , 1997
CzcD	<i>Bacillus subtilis</i>	Kationen-Transport-Protein	311	34162	U93876	Kunst <i>et al.</i> , 1997
CzcD	<i>Zymomonas mobilis</i>	Kationen-Efflux-System-Protein	294	31755	AF203881	Um, 1999
CzcD	<i>Aquifex aeolicus</i>	Kationen-Efflux-System	308	34009	AE000721	Deckert <i>et al.</i> , 1998

Aufgrund der geringen Distanz zwischen Hefen und Pflanzen orientierten wir uns größtenteils an den *S. cerevisiae* Genen *COT1* und *ZRC1*. Diese Gene bzw. abgeleitete Sequenzen dienten als Sonden oder Primer für unterschiedliche Versuchsansätze. Es wurde chromosomale DNA von Tomate, Tabak, *Arabidopsis* und *Silene* getestet. Lediglich bei *Silene* handelt es sich um eine Schwermetall tolerante Pflanze, während die anderen Pflanzen gängige Objekte der Grundlagenforschung sind und in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung standen.

Durch positive Signale bei der heterologen *Southern*-Hybridisierung wurde das Vorhandensein möglicher CDF-Protein kodierender Gene erstmals indirekt bestätigt. Das anschließende Screening von Gen-Banken verschiedener Pflanzen (Tomate, *Silene*) blieb jedoch erfolglos. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, daß die Homologie der pflanzlichen Proteine auf DNA-Ebene nicht so hoch ist wie angenommen wurde oder die gesuchten Gene in den verwendeten Gen-Banken wirklich nicht enthalten waren. Ein möglicher Einfluß von Intron-Strukturen wurde durch die Verwendung von cDNA-Banken ausgeschlossen. Die heterologen Hybridisierungen erfolgten unter sehr wenig stringenten Bedingungen (niedrige Temperatur, hohe Salzkonzentration), was die Detektion „falsch positiver Signale“ auf jedem Fall begünstigt und das „Hintergrund-Rauschen“ erhöht.

Leister *et al.* (1996) beschrieben ein PCR-Produkt, welches auf der Suche nach Pathogen-Resistenzgenen der Kartoffel mit degenerierten Primern amplifiziert, kloniert und sequenziert wurde. Das von diesem 494 bp großen 123pep PCR-Produkt (Acc.Nr.U60071) abgeleitete Protein besitzt große Homologie zum N-Terminus der bisher bekannten CDF-Proteine. Aufgrund der geringen Größe trat dieses PCR-Produkt der Kartoffel bei Sequenzvergleichen

in den Hintergrund und wurde von uns lange Zeit ignoriert. Dabei handelte es sich doch um eine Teilsequenz des möglicherweise ersten pflanzlichen CDF-Proteins. Die Homologie betraf vorwiegend die transmembranen Helices I bis IV, wie beim Vergleich mit den Genen *czcD* (*R. metallidurans*) und *ZRC1* (*S. cerevisiae*) zu erkennen ist (Abb. 4). Mit abgeleiteten Primern der am höchsten konservierten Regionen wurden 123pep homologe Produkte von Tomate und *Silene* aus den cDNA-Banken oder durch RT-PCR-Reaktionen amplifiziert. Das vollständige Gen zu identifizieren gelang aber auch in diesem Fall nicht.

Eine putative Sequenz, die für ein CDF-Protein kodieren könnte, fanden wir innerhalb der ersten 68000 sequenzierten Basen (Acc.Nr. AC005310) des *A. thaliana* Genoms. Ein hypothetisches Gen (1275 Basen) sollte möglicherweise ein aus 398 AS bestehendes CDF-Protein kodieren. Die entsprechende Sequenzanalyse ist in der Abbildung 7 dargestellt. Für das abgeleitete Protein wurden mit Hilfe von Hydropathie-Profilen die charakteristischen 6 transmembranen Helices berechnet sowie eine 79 AS große cytoplasmatische Domäne zwischen den Helices IV und V bestimmt. Die Größe dieser Domäne sowie die Existenz von 25 Histidin-Resten innerhalb dieser Region korreliert mit der von Paulsen and Saier (1997) definierten Struktur eukaryotischer CDF-Proteine. Unser Ziel war es nun, dieses erste pflanzliche CDF-Protein aus *A. thaliana* zu charakterisieren, um Einblicke in die Funktionsweise dieses Proteins zu erhalten und damit vielleicht die Funktion der CDF-Proteinfamilie besser zu verstehen.

1999 beschrieben van der Zaal *et al.* mit *Zat1p* einen Zink-Transporter aus *A. thaliana*, der dem in dieser Arbeit untersuchten CDF-Protein aus *A. thaliana* entspricht und daraufhin in dieser Arbeit dementsprechend benannt wurde. Die Überexpression des *ZATI* Genes führt zu erhöhter Zink-Resistenz, verbunden mit einer steigenden Zink-Akkumulation in den Wurzeln von *A. thaliana*. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung wird die *ZATI* mRNA konstitutiv in der gesamten Pflanze exprimiert und nicht in Abhängigkeit von der Zink-Konzentration induziert (van der Zaal *et al.*, 1999).

Eine kürzliche Recherche der Proteindatenbanken ergab, daß bereits eine Vielzahl weiterer pflanzlicher CDF-Proteine aufgrund der Homologie zu *Zat1p* identifiziert wurde. Das heißt, daß nun der erste Schritt getan ist, um die Bedeutung dieser Proteinfamilie im Pflanzenreich zu ergründen.

4.2 In Liposomen funktionell rekonstituiertes *Zat1p* transportiert Zn^{2+} -Ionen

Pro- und Eukaryoten enthalten eine Vielzahl von Membran-Transport-Systemen, die der Aufnahme essentieller Nährstoffe, der Exkretion toxischer Bestandteile sowie der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dienen.

Der Metall-Transport über biologische Membranen setzt das Vorhandensein eines transportierenden Membranproteins voraus. Beim passiven Transport ist ein Konzentrationsunterschied zwischen beiden Seiten der Diffusionsbarriere ausreichend, während aktive Transporter durch Energiekopplung angetrieben werden. Diese Energie kann entweder aus der ATP-Hydrolyse stammen oder sie entspricht der protonenmotorischen Kraft (PMF), die durch den elektrochemischen Protonengradienten über einer Membran entsteht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Zat1p* (*A. thaliana*) in *E. coli* heterolog exprimiert, gereinigt und funktionell in Proteoliposomen rekonstituiert. Es galt herauszufinden, durch welche Art der Energie der *Zat1p* katalysierte Transport angetrieben wird. Wie aus dem Namen der Proteinfamilie bereits hervorgeht, wird eine Erleichterung der Diffusion der Metalle vermutet, da die Sequenzen der Proteine keine Motive für ATP-getriebenen Transport aufweisen. Möglich wäre auch ein Konzentrationsgradient getriebener Transport. Dazu wurde ein Protonengradient mit NH_4Cl künstlich hergestellt und der Metalltransport gemessen.

Es konnte gezeigt werden, daß die *Zat1p*-Proteoliposomen ohne das Vorhandensein eines pH-Gradienten im Gegensatz zu den gleichbehandelten Kontroll-Liposomen $^{65}\text{ZnCl}_2$ aufnehmen. Die Aufnahmerate stieg mit der Konzentrationserhöhung von 0.1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ auf 1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ (Abb. 11a,b), während die nochmalige Konzentrationssteigerung auf 10 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ nicht mit erhöhter Aufnahme korrelierte (Abb. 11c). Veränderte Aufnahmegeschwindigkeiten wurden mit diesen Versuchsansätzen nicht festgestellt. Möglicherweise ist die Aufnahme der Metall-Ionen durch die Anzahl der *Zat1p* Transporter in den Liposomen limitiert. Da diese Ergebnisse jedoch weder an ATP-Hydrolyse, noch an einen Protonengradienten gekoppelt waren, kann man die $^{65}\text{ZnCl}_2$ Aufnahme auch mit der Diffusion durch einen *Zat1p* vermittelten Zn spezifischen Kanal beschreiben. Diese Diffusion wird durch den Konzentrationsgradienten der Zn^{2+} -Ionen außerhalb und im Inneren der Proteoliposomen angetrieben. Kommt es zum Konzentrationsausgleich auf beiden Seiten der Membran, dann kann keine weitere Zn-Aufnahme beobachtet werden. Bezogen auf die beschriebenen Ergebnisse bedeutet dies, daß bei 1 mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ bereits ein Gleichgewicht zwischen Innen- und Außenkonzentration hergestellt ist. Wurden diese Aufnahmeexperimente mit H^+ -geladenen Proteoliposomen und Kontroll-Liposomen durchgeführt, war das gleiche Ergebnis wie mit den ungeladenen Proteoliposomen zu sehen (Abb. 13). Damit wurde unsere Vermutung nicht bestätigt, daß *Zat1p* einen Protonen gekoppelten Zink-Transport katalysiert. Hingegen kann die Hypothese der erleichterten Diffusion für *Zat1p* bestätigt werden.

Interessant erscheint die Beobachtung, daß die *Zat1p* vermittelte erleichterte Diffusion für Zn^{2+} -Ionen spezifisch ist. Während *Cot1p* aus *S. cerevisiae* neben Co^{2+} -Ionen auch Zn^{2+} -Ionen transportieren kann (Conklin *et al.*, 1994) und *CzcD* aus *R. metallidurans* Resistenz gegenüber Cadmium, Zink und Cobalt vermittelt (Anton *et al.*, 1999), wurde keine *Zat1p* katalysierte Aufnahme von Cd^{2+} - und Co^{2+} -Ionen festgestellt (Abb. 12). Auch van der Zaal *et al.* (1999) beschreiben eine Erhöhung der Zink-Resistenz bei *ZAT*-Überexpression in transgenen Pflanzen, jedoch keinen Einfluß auf die Cd-Resistenz.

Es erweist sich jedoch als sehr kompliziert, diese Ergebnisse eines künstlichen Systems auf die intakte Pflanzenzelle zu übertragen. Allein durch Diffusion kann die Schwermetall-Entgiftung des Cytoplasma nicht erreicht werden. Diese CDF-Protein vermittelte Entgiftung beruht auf einem Transport der Metall-Ionen in zelluläre Kompartimente oder dem Efflux der Metalle. In Prokaryoten (CzcD aus *R. metallidurans*) wird dafür das Periplasma favorisiert (Anton *et al.*, 1999), während in Eukaryoten (Cot1p und Zrc1p aus *S. cerevisiae*) die Vakuole sehr geeignet erscheint (Li and Kaplan, 1998). Die Überexpression von *ZRC1* in *S. cerevisiae* führt zu einer Erhöhung der Resistenz von 20 mM ZnCl₂ auf 40 mM ZnCl₂ (Kamizono *et al.*, 1989). Diese Konzentrationen korrelieren keineswegs mit der in Proteoliposomen gemessenen Zat1p vermittelten Zink-Aufnahme. Völlig anders sieht die Zink-Resistenz in *A. thaliana* aus. Bei Zugabe von 0.25 mM ZnCl₂ zum Medium war die *ZAT* überexprimierende Pflanze noch resistent, während der Wildtyp bereits verzögertes Wachstum und Chlorosis aufwies. Höhere Konzentrationen inhibierten das Wachstum beider Pflanzen (van der Zaal *et al.*, 1999). Diese Beobachtung stimmt mit der erhöhten Zink-Aufnahme der Proteoliposomen in Anwesenheit von 1 mM ZnCl₂ im Vergleich zu 0.1 mM ZnCl₂ überein (Abb. 11a,b).

Es scheint also sehr wahrscheinlich, daß die verschiedenen CDF-Proteine den Metall-Transport mit unterschiedlicher Effizienz katalysieren.

4.3 Zat1p bindet Zn²⁺-Ionen an der putativen Bindestelle zwischen den transmembranen Helices IV und V

Mit den Aufnahme-Experimenten der rekonstituierten Proteoliposomen wurde gezeigt, daß nur die Zn²⁺-Ionen durch das Zat1p transportiert werden. Für Co²⁺- und Cd²⁺-Ionen konnte keine Aufnahme nachgewiesen werden. Das führt zu der Annahme, daß Zat1p eine spezifische Bindestelle für Zn²⁺-Ionen enthält. Bei der Analyse der AS-Zusammensetzung des Proteins fällt sofort eine Histidin-reiche Region ins Auge, die für die Zink-Bindung prädestiniert zu sein scheint. Im Allgemeinen erfolgt die Komplexierung der Zn²⁺-Ionen durch eine Kombination der Aminosäuren Histidin, Cystein und Asparaginsäure/Glutaminsäure mit Wasser und vereinzelt mit den AS Tyrosin, Asparagin, Serin und Threonin (Karlin and Zhu, 1997). Entsprechend der Liganden-Zusammensetzung und der Geometrie werden die Zink-Bindestellen verschiedenen Klassen zugeordnet. Eine große Bedeutung haben die Zink-Proteine, die mit den Nukleinsäuren interagieren. Prominenter Vertreter dieser Proteine ist der Transkriptionsfaktor TFIIIA aus *Xenopus laevis*, dessen DNA/RNA-Bindung bereits 1984 nachgewiesen wurde (Ginsberg *et al.*, 1984). Miller *et al.* (1985) bezeichneten die aus ungefähr 30 AS bestehende Sequenz, mit einer konservierten Anordnung von 2 Cystein-Resten und 2 Histidin-Resten, als „Zink-Finger“. Diese DNA-Bindedomäne ist so gefaltet, daß das zentrale Zn²⁺-Ion mit einer tetraedrischen Anordnung aus 2 His-Resten und 2 Cys-Resten koordiniert ist. Zink-Finger-Proteine bestehen meistens aus Clustern mit mehreren

C₂H₂-Domänen und sind größtenteils durch die Interaktion mit DNA-Molekülen oder Protein/Protein-Wechselwirkungen an deren Regulation beteiligt.

Im Gegensatz dazu gibt es bei den Pilzen eine Familie von regulatorischen Proteinen, deren DNA-Bindemotiv aus 6 Cysteinen in der Anordnung CX₂CX₆CX₆CX₂CX₆C besteht und einen Zn(II)₂Cys₆-Komplex bildet (Pfeifer *et al.*, 1989). Dazu gehören die Transkriptionsaktivatoren Gal4p (Johnston, 1987; Carey *et al.*, 1989) und Leu3p (Zhou and Kohlhaw, 1990) neben 54 weiteren Proteinen aus *S. cerevisiae* (Schjerling and Holmberg, 1996).

Die putative Zink-Bindestelle des Zatl1p aus *A. thaliana* enthält keine Cystein-Reste, aber 21 Histidin-Reste, die für die Ligandierung der Zn²⁺-Ionen in Frage kommen (Abb. 15). Die Bindung von ⁶⁵ZnCl₂ an Zatl1p wurde mittels Zink-Blot bestätigt (Abb. 17). Bei dem in der putativen Bindedomäne deletierten Zatl1p konnte im Zink-Blot kein Signal detektiert werden. Das bestätigt die Annahme, daß die deletierte Domäne für die Zink-Bindung essentiell ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht geklärt, welche der 21 Histidin-Reste an der Komplexierung beteiligt sind, wieviele Zn²⁺-Ionen gebunden sind und wie die Geometrie des Komplexes aussieht. Durch Modifikationen der freien Histidin-Reste z.B. mit DEPC kann die Anzahl der durch Zink-Bindung geschützten Histidine ermittelt werden. Um die exakte Lokalisation der an der Bindung beteiligten Histidine zu bestimmen, sollten Mutanten der His-Reste erstellt und die Proteine wie beschrieben analysiert werden. Mittels Atomabsorptionsspektroskopie des gereinigten Proteins kann die Anzahl der Zn²⁺-Ionen genau bestimmt werden.

Keine Homologie besteht zur Zink-Bindestelle der Zink-Proteasen, die durch ein HEXXH Motiv charakterisiert ist. Die zwei Histidin-Reste und ein weiter C-terminal lokalisierter His-, Cys- oder Glu-Rest koordinieren das Zn²⁺-Ion, während die Glutaminsäure als Nukleophil in die Katalyse involviert ist. Das Zn²⁺-Ion fungiert als *Lewis-Säure*, indem es in Wechselwirkung mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Substrates den elektrophilen Charakter des Carbonyl-C-Atoms der C-terminalen Amidbindung erhöht (Schellenberger, 1989). Während einige Zink-Metalloproteasen das gebundene Metall in der Umgebung des Organismus für die Aufnahme verfügbar machen, beruht der Effekt vieler toxischer Verbindungen auf der Aktivität von Metalloproteasen. Die wirksamsten bakteriellen Protein-Toxine sind die Botulinum-Neurotoxine, die in verschiedenen Serotypen (A-G) von *Clostridium botulinum* produziert werden. Die L-Kette dieser Toxine enthält das charakteristische Zink-Bindemotiv, welches ein Zn-Atom komplexiert. Schiavo *et al.* (1992) gehen davon aus, daß die Neurotoxine durch die Fusion eines Metalloprotease-Gens mit einem für ein Protein mit spezifischer Bindung an die präsynaptische Membran kodierten Gen entstanden und an der Kontrolle der Neurotransmitter-Freisetzung beteiligt sind. Auch das Tetanus- und Diphtherie-Toxin scheinen aufgrund der Sequenzhomologie Metalloproteasen zu sein (Schiavo *et al.*, 1992).

Calreticulin, das wahrscheinlich an der Regulation der intrazellulären Zn^{2+} und Ca^{2+} -Konzentration beteiligt ist, besitzt eine hoch- und eine niedrigaffine Bindestelle für die Ca^{2+} -Ionen, während potentielle Zink-Bindestellen noch unbekannt sind. Baksh *et al.* (1995) konnten jedoch zeigen, daß 5 Histidin-Reste in die Zink-Bindung involviert sind, und diese 5 Histidin-Reste vom pflanzlichen bis zum humanen Calreticulin konserviert sind.

Auch die meisten Proteine der ZIP-Familie (Grotz *et al.*, 1998) enthalten eine potentielle Metall-Bindedomäne mit mehreren Histidin-Resten in der im Cytoplasma lokalisierten variablen Region zwischen den transmembranen Helices III und IV. Irt1p aus *A. thaliana*, ein Kationen-Transporter, der unter Eisenmangel in den Wurzeln exprimiert wird, enthält ein HGHGHGH-Motiv, das der Zink-Bindestelle des Zat1p sehr ähnlich ist (Eide *et al.*, 1996). Anders als das Zat1p weist das Irt1p ein breites Substratspektrum auf. Neben Fe^{2+} -Ionen werden unter anderem auch Mn^{2+} -, Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen durch Irt1p aufgenommen. Erst kürzlich beschrieben Rogers *et al.* (2000) wie die Substratspezifität des Irt1p kodiert ist. Durch den Austausch konservierter Aminosäuren des Irt1p und die Komplementation verschiedener *S. cerevisiae*-Mutanten (*fet3/fet4*, *zrt1/zrt2*, *smf1*) mit den Irt1p-Mutanten wurden für den Transport der einzelnen Metalle essentielle Aminosäuren identifiziert. Während Glu (103) in der extrazellulären Domäne zwischen den Membrandurchgängen II und III nur für den Zink-Transport essentiell ist, führt ein Austausch des Asp (100) zu Ala zum Verlust von Eisen- und Mangan-Aufnahme. Es wird angenommen, daß Asp (100) und Glu (103) zusammen mit den His-Resten (96 und 116) das entsprechende Metall-Ion der äußeren Umgebung binden. Für die Bindung der Metalle während des Transports sind die Aminosäuren Ser (198) und His (197) der transmembranen Helix IV sowie His (224) und Glu (228) der transmembranen Helix V notwendig, die möglicherweise den inneren Kern des transmembranen Kanals bilden. Welche Rolle jedoch das HGHGHGH-Motiv der variablen Region bei der Bindung und dem Transport von Metallen spielt, ist zum jetzigen Zeitpunkt völlig unbekannt. Möglicherweise besteht ein funktioneller Zusammenhang der variablen Region der Proteine der ZIP-Familie mit der His-reichen Domäne der eukaryotischen CDF-Proteine.

Beim Vergleich der Zat1p Zink-Bindestelle mit anderen Zink-Bindemotiven findet man zu den putativen Zink-Bindestellen der eukaryotischen Vertreter der CDF-Proteine die größte Ähnlichkeit. Die Zink-Transporter Znt1p bis Znt4p, die in Maus, Ratte und Mensch lokalisiert sind, sowie die Hefeproteine Cot1p und Zrc1p enthalten ein HXHX (X entspricht meistens Gly oder Ser) Motiv unterschiedlicher Länge, gefolgt von einer variablen Region (6-17 AS) und einem weiteren HXHX Motiv (Abb. 43).

Protein	Start	Sequenz
Zat1p (<i>A. thaliana</i>)	182	HDHGHSHGHGHGHGHDDHHNHSH - (X) ₆ - HHHHHDDEHGHSHGH
ZnT1p (<i>R. norvegicus</i>)	145	HGHSHGHGHGH
ZnT2p (<i>R. norvegicus</i>)	183	HGHSHGHSH
ZnT3p (<i>R. norvegicus</i>)	204	HSH - (X) ₁₄ - H
ZnT4p (<i>R. norvegicus</i>)	240	HHHSHAHSH - (X) ₁₃ - HSH
Cot1p (<i>S. cerevisiae</i>)	139	HGHGHGHSH - (X) ₁₄ - HTHTHAH
Zrc1p (<i>S. cerevisiae</i>)	140	HSHSH - (X) ₁₇ - HSHSH

Abb. 43: Vergleich der putativen Metall-Binde-Domänen eukaryotischer CDF-Proteine

Dargestellt ist jeweils die Histidin-reiche Domäne des entsprechenden Proteins, wobei der Startpunkt die erste Aminosäure der His-reichen Domäne innerhalb der Primärsequenz des Proteins markiert

Das Zat1p aus *A. thaliana* mit 21 Histidin-Resten in diesem Bereich weist mit Abstand das größte HXHX-Motiv auf. Murgia *et al.* (1999) konnten mit Hilfe einer GST-Fusion der Histidin-reichen Domäne des Znt4p der Ratte (8 Histidin-Reste) erstmals die Bindung von Zink an diese Domäne *in vitro* nachweisen. Im Gegensatz zur spezifischen Zink-Bindestelle des Zat1p war die Histidin-reiche Domäne des Znt4p in der Lage, auch die Ionen Cu²⁺, Ni²⁺ und Co²⁺ zu binden. Interessant ist auch die Identifizierung eines Leucin-Zipper-Motivs im cytoplasmatischen N-Terminus, welches ausschließlich im Znt4p vorhanden ist (Murgia *et al.*, 1999). Inwieweit dieses Motiv, das charakteristisch für viele Transkriptionsfaktoren ist, für die Funktion des Znt4p verantwortlich ist, bleibt momentan völlig unklar. Die Deletion des homologen Znt4p der Maus führt bei weiblichen Tieren zur Produktion Zink-defizienter Milch, die einen frühzeitigen Tod der Säuglinge herbeiführt (Ackland and Mercer, 1992; Huang and Gitschier, 1997).

4.4 Zat1p aus *A. thaliana* komplementiert die Funktion von CzcD in *R. metallidurans* DN182

CzcD aus *R. metallidurans* war der erste prokaryotische Vertreter der CDF-Proteinfamilie. Das kodierende *czcD* Gen ist Bestandteil der *czc*-Determinante, die eine erhöhte Resistenz

gegenüber den Schwermetallen Zink, Cadmium und Cobalt vermittelt, welche auf dem aktiven Efflux dieser Metall-Ionen beruht. Zentrale Komponenten dieses Systems sind der Protonen/Metallkationen-Antiporter CzcA, das Membran-Fusionsprotein CzcB und das Protein der äußeren Membran CzcC. Das in der *Downstream Regulatory Region* (DRR) lokalisierte *czcD* Gen ist für den aktiven Efflux der Metall-Ionen nicht essentiell, stellt aber wahrscheinlich selbst eine eigenständige Homöostase-Efflux-Pumpe (Anton *et al.*, 1999) dar. Während van der Lelie *et al.* (1997) eine Funktion als membrangebundener Sensor für die Metalle Cadmium, Zink und Cobalt postulierten, beschreiben Anton *et al.* (1999) CzcD als Regulator des CzcCBA Efflux-Komplexes. Durch Bindung und Efflux der induzierenden Metall-Kationen ins Periplasma wird möglicherweise das *czc*-Efflux-System reprimiert, welches Resistenz gegenüber Cadmium, Zink und Cobalt vermittelt. Es wird spekuliert, daß *czcD* als „Schwermetall-Puffer“ für die Zelle bei niedrigen (nicht toxischen) Konzentrationen fungiert. Desweiteren führt die Expression von *czcD* im plasmidfreien, sensitiven *R. metallidurans*-Stamm AE104 zu einer geringen Erhöhung der Resistenz, was mit der verringerten Metallakkumulation dieses Stammes im Vergleich zum plasmidfreien Stamm AE104 in Einklang steht. Andererseits wurde im *czcD* deletierten Stamm DN182 eine 10fache Erhöhung der *czcCBA* mRNA-Konzentration mit und ohne Zn-Induktion im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Anton *et al.*, 1999). Das bedeutet, daß das komplexe CzcCBA-Effluxsystem den Ausfall des „Frühwarnsystems“ CzcD durch verstärkte Anwesenheit kompensieren kann.

Anton *et al.* (1999) zeigten, daß die Expression von *COT1*, *ZRC1* und *czcD* in dem metallsensitiven *R. metallidurans*-Stamm AE104 zu einer geringen Erhöhung der Resistenz gegenüber Zink, Cadmium und Cobalt führt. Dies entspricht auch der Tatsache, daß die *COT1*, *ZRC1* und *czcD* enthaltenden AE104 Stämme in unterschiedlichen Konzentrationen die einzelnen Metalle akkumulieren. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluß des ersten pflanzlichen CDF-Proteins, Zat1p aus *A. thaliana*, auf die Metallresistenz des sensitiven *R. metallidurans*-Stammes AE104 in dieser Arbeit untersucht. In Analogie zum *COT1* enthaltenden Stamm AE104 führt das zusätzliche *ZATI*-Gen in AE104 zu erhöhter Zink-Aufnahme, verglichen mit dem Kontrollplasmid enthaltenden AE104-Stamm (Abb. 18). Möglicherweise wird diese erhöhte Zn^{2+} -Aufnahme durch eine Komplexierung der Ionen durch das Zat1p ausgelöst. Daß Zat1p Zn^{2+} -Ionen bindet, wurde am gereinigten Protein nachgewiesen (Abb. 17). Im Gegensatz dazu führt die Expression von *ZRC1* in AE104 zu einer verringerten Aufnahme von Zn^{2+} , Cd^{2+} und Co^{2+} -Ionen, was möglicherweise auf einem Zrc1p vermittelten Efflux dieser Metalle beruht. Bekannte Efflux-Systeme sind zum einen Energie-abhängig und zum anderen bestehen sie meistens aus einem Komplex mehrerer Proteine. Gut untersucht ist zum Beispiel der Export des *hlyA* kodierten Toxins in *E. coli*. Durch das Vorhandensein des Toxins HlyA kommt es zu einer Überbrückung beider Membranen durch das Porin-ähnliche TolC der äußeren Membran und das HlyD der inneren Membran (Thanabalu *et al.*, 1998). In der inneren Membran bilden das

Membranfusionsprotein HlyD und die *hlyD* kodierte Transport-ATPase die Translokase-Komponente dieses Transport-Systems. In Anwesenheit von HlyA und ATP kommt es zu einer reversiblen Konformationsänderung von HlyD, was den Export des Toxins über beide Membranen durch den Translokase/TolC-Komplex ermöglicht. Man kann spekulieren, daß im plasmidfreien, metallsensitiven Stamm AE104 chromosomal kodierte Proteine vorhanden sind, die diesen Zrc1p vermittelten Transport der Metall-Ionen über zwei Membranen (*Transenvelope Transport*) katalysieren. Doch worin besteht dann der Unterschied zwischen dem plasmidfreien, metallsensitiven AE104 und dem *czc* enthaltenden, metallresistenten Stamm AE128? Für das *Czc*-System wurde der aktive Efflux der Metall-Kationen (Nies and Silver, 1989) vom Cytoplasma über beide Membranen ins Außenmedium bereits beschrieben (Saier *et al.*, 1994; Nikaido, 1996). In der Hefe *S. cerevisiae* ist das Zrc1p in der Vakuolenmembran lokalisiert (Li and Kaplan, 1998) und fungiert wahrscheinlich als Zink-Transporter in die Vakuole. Auch das Cot1p wurde in der Vakuolenmembran nachgewiesen und scheint Co^{2+} -Ionen in die Vakuole zu transportieren. Da die Richtung des Transports dieser CDF-Proteine noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann auch die Vermittlung von Metallaufnahme nicht ganz ausgeschlossen werden.

Bei der Cobalt- und Cadmium-Aufnahme gibt es keine Unterschiede zwischen den AE104-Stämmen mit und ohne *ZATI*-Gen (Abb. 19, 20). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen der *Zat1p* rekonstituierten Proteoliposomen, mit denen nur ein spezifischer Zink-Transport, aber kein Transport von Co^{2+} - bzw. Cd^{2+} -Ionen nachgewiesen werden konnte. Lediglich beim Einsatz von 500 μM CdCl_2 wurde eine erhöhte Aufnahme von AE104 gegenüber dem *ZATI* enthaltenden Stamm gemessen (Abb. 20b). Dies scheint ein toxischer Effekt zu sein, da AE104 bei dieser Konzentration nicht mehr lebensfähig ist.

Unentbehrlich für die Aufklärung von Proteinfunktionen ist die Verwendung von Deletionsmutanten. Durch Komplementation solcher Mutanten mit ähnlichen Genen verschiedener Herkunft und ohne bekannte Funktion des kodierten Proteins, können oftmals funktionell verwandte Proteine lokalisiert und charakterisiert werden. Komplette DNA-Banken werden auf diese Weise nach unbekanntem Proteinen mit einer spezifischen Funktion durchsucht. Die hier eingesetzte *czcD*-Deletionsmutante (DN182) weist unter den beschriebenen Versuchsbedingungen keinen signifikant veränderten Phänotyp im Vergleich zum Ausgangsstamm AE128 auf. In Anwesenheit hoher Metallkonzentrationen wurde jedoch ein vermindertes Wachstum im Vergleich zum Ausgangsstamm festgestellt (Anton *et al.*, 1999). Desweiteren konnten Große *et al.* (1999) nachweisen, daß die Konzentration der *czcCBA* mRNA von der An- bzw. Abwesenheit von *CzcD* abhängig ist. Die Deletion von *czcD* führt zu einer 10fach erhöhten Transkription der *czcCBA*-Gene.

Beim Zink-Toxizitätstest wurden nur sehr geringe Veränderungen im Wachstum der verschiedenen *R. metallidurans*-Stämme festgestellt, die auf die Anwesenheit des *ZATI*-Gens zurückzuführen sind (Abb. 21). Der Metall-sensitive Stamm AE104 mit *ZATI* komplementiert zeigte in mehreren unabhängigen Experimenten ein gering verbessertes

Wachstum im Vergleich zum Kontroll-Stamm. Diese Beobachtung korreliert mit der erhöhten Zink-Aufnahme des *ZATI* komplementierten Stammes (Abb. 18). Das Wachstum der Metall-resistenten Stämme AE182 und DN182 zeigte keine reproduzierbaren Veränderungen in An- und Abwesenheit des *ZATI*- Gens. Demgegenüber wurden bei der Aufnahme von $^{65}\text{ZnCl}_2$ in diesen Stämmen Unterschiede sichtbar. Während die Zink-Aufnahme in Gegenwart von $100\ \mu\text{M}$ $^{65}\text{ZnCl}_2$ bei den 3 untersuchten Stämmen AE128, DN182 und DN182 mit *ZATI* komplementiert keine signifikanten Unterschiede aufwies (Abb. 22a), führte die 10fache $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Konzentration zu veränderten Aufnahme-Kurven. Die $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Konzentration der *czcD*-Deletionsmutante DN182 blieb während der gesamten Messung auf einem konstanten Niveau. Im Gegensatz dazu wurde eine Zeit-abhängige Zink-Aufnahme der *ZATI* komplementierten *czcD*-Deletionsmutante und des resistenten Stammes AE128 festgestellt (Abb. 22b), wobei die Aufnahmerate der komplementierten *czcD*-Deletionsmutante etwas geringer ist, als die des Ausgangsstammes AE128. Ob diese erhöhte Zink-Aufnahme auf einer Komplexierung oder Kompartimentierung (Periplasma) der Zn^{2+} -Ionen beruht, ist zum jetzigen Zeitpunkt völlig offen. Es wurde jedoch gezeigt, daß das *A. thaliana* Protein Zat1p eine *R. metallidurans czcD*-Deletionsmutation komplementiert.

4.5 Die Hefemutanten *cot1*, *zrc1* und *cot1/zrc1* reagieren mit verändertem Resistenzverhalten auf die Anwesenheit der Schwermetallsalze ZnCl_2 , CoCl_2 und CdCl_2 .

Eine Doppelmutante von *Saccharomyces cerevisiae*, bei der die Gene für die Proteine Cot1p und Zrc1p deletiert sind, sollte für die Charakterisierung bakterieller und pflanzlicher CDF-Proteine eingesetzt werden. Conklin *et al.* (1994) konstruierten bereits eine Doppelmutante, die uns jedoch für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand.

Für die Konstruktion dieser Doppelmutante wurde eine Methode angewandt, mit der die Gene ohne komplizierte Klonierungsschritte deletiert werden können. Es wird dabei eine *gene-disruption-cassette* verwendet, welche die Vorteile des heterologen *kan^r*-Markers mit denen des Cre-*loxP*-Rekombinationssystem vereint (Abb. 23). Mit 70%iger Wahrscheinlichkeit integrieren diese *gene-disruption-cassettes* in die zu deletierende Gensequenz. Außerdem erlaubt dieses System die wiederholte Benutzung des *kan^r*-Marker-Genes, da durch die Expression der Cre-Rekombinase der *kan^r*-Marker wieder entfernt wird (Güldener *et al.*, 1996). Durch Southern-Analyse konnte die Integration der *gene-disruption-cassettes* für die verschiedenen Mutanten nachgewiesen werden. Auch die Deletionen von *COT1* und *ZRC1* wurden mittels Southern-Hybridisierung eindeutig nachgewiesen (Abb. 24, 25). Die Ergebnisse der durchgeführten Wachstumsversuche zur Charakterisierung von *COT1* und *ZRC1* weisen ebenfalls darauf hin, daß die Gene in den Einfach- und Doppelmutanten deletiert sind (Tab. 7). Die Mutanten sind wesentlich sensitiver gegenüber den getesteten

Schwermetallen als der Wildtyp. Vergleicht man jedoch die Phänotypen der neu konstruierten Mutanten mit den von Conklin *et al.* (1994) und Kamizono *et al.* (1989) beschriebenen Phänotypen, so werden beachtliche Unterschiede sichtbar. Die minimalen Inhibitorkonzentrationen (MIC) für Cd^{2+} (0.2 mM), Zn^{2+} (15 mM) und Co^{2+} (2 mM) liegen bei den verwendeten *S. cerevisiae* Wildtyp-Stämmen ungefähr auf gleichem Niveau. Während die neu konstruierte *zrc*-Mutante noch 66 % Resistenz gegenüber ZnCl_2 und 75 % gegenüber CdCl_2 im Vergleich zum Wildtyp aufweist, sinkt die Resistenz der von Kamizono *et al.* (1989) und Conklin *et al.* (1994) beschriebenen *zrc*-Mutanten auf 10 % gegenüber ZnCl_2 und 50 % gegenüber CdCl_2 . Ähnlich verhalten sich die von Conklin *et al.* (1992) charakterisierte und die neu konstruierte *cot*-Mutante, deren MIC für Cadmium mit 1 mM bzw. 0.8 mM bestimmt wurden. Aufgrund der großen Homologie der beiden Gene *COT* und *ZRC* vermuteten Conklin *et al.* (1994) einen funktionellen Zusammenhang bei der Ausprägung der Metalltoleranz. Dieser konnte jedoch bei der Charakterisierung der *cot/zrc*-Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten nicht gezeigt werden. Stattdessen war die Metallsensitivität der Einzelmutanten unabhängig von der Anzahl an Kopien des jeweils anderen Gens (Conklin *et al.*, 1994).

Im Gegensatz dazu wurde mit Hilfe der neu konstruierten Mutanten ein Zusammenwirken der *COT* und *ZRC* Genprodukte bei der Ausprägung von Resistenz gegenüber Cd^{2+} -, Zn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen beobachtet. So verringert sich die Resistenz der *cot/zrc*-Doppelmutante gegenüber ZnCl_2 im Vergleich zur *zrc*-Mutante. Während die MIC der *zrc*-Mutante 7.5 mM ZnCl_2 beträgt, wurde für die Doppelmutante eine MIC von 1 mM ZnCl_2 ermittelt. Das bedeutet, daß Cot1p ebenfalls an der Ausprägung der Zn-Toleranz beteiligt ist. Ein solcher Effekt wurde auch bei der Cd^{2+} -Resistenz beobachtet. Die beiden Einzelmutanten haben etwas geringere Resistenz als der Wildtyp (MIC beträgt 0.1 bzw. 0.15 mM CdCl_2), und die Doppelmutante ist mit der MIC von 0.075 mM nochmals sensitiver. Die MIC für CoCl_2 beträgt bei der *cot*-Mutante sowie bei der Doppelmutante 0.8 mM, während die *zrc*-Mutante mit einer MIC von 1.2 mM weniger sensitiv gegenüber Cobalt ist. Interessant erscheint dabei das Ergebnis von Conklin *et al.* (1994), daß Cot1p und Zrc1p unabhängig voneinander eine mit der Kopienzahl steigende Akkumulation von Cobalt in den Zellen bewirken. Während die *zrc/cot*-Doppelmutante nur 5 % des CoCl_2 im Vergleich zum Wildtyp akkumuliert, führt jeweils ein Kopie von *COT* oder *ZRC* zur Erhöhung der CoCl_2 -Akkumulation auf 60 % verglichen mit dem Wildtyp. Dieses Ergebnis konnte mit den Experimenten dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Mutanten akkumulierten genauso viel Metall wie der Wildtyp, was die Interpretation der Funktion der beiden Proteine Cot1p und Zrc1p nicht vereinfacht. Möglicherweise handelt es sich um einen Konzentrationseffekt, den auch MacDiarmid *et al.* (2000) beobachtet haben. Dabei wurde die Akkumulation von Zn in einer *zrt3* Mutante von *S. cerevisiae* im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Zrt3p ist ein vakuolärer Zink-Transporter und nur bei einer Konzentration von 10-1000 μM ZnCl_2 im Medium wurde,

entgegen aller Erwartungen, eine erhöhte Zink-Konzentration der Mutante nachgewiesen. Keine Unterschiede wurden hingegen bei niedrigeren Konzentrationen beobachtet.

Es ist bewiesen, daß Metallkonzentrationen, wie 15 mM ZnCl₂ oder 2 mM CoCl₂ im Medium, für die Hefezellen extrem toxisch sind, wenn sie ins Zellinnere gelangen. Durch spezifische Aufnahmesysteme, Detoxifikation, Sequestrierung oder Kompartimentierung der Metalle sowie Efflux der Metalle aus der Zelle wird die Anhäufung toxischer Metallkonzentrationen in der Zelle verhindert.

Für sehr viele Metalle sind bereits hoch- und niedrigaffine Aufnahmesysteme bekannt. So wird in der Hefe *S. cerevisiae* bei Zinkmangel das *ZRT1* kodierte hochaffine Aufnahmesystem ($K_m = 0.5-1 \mu\text{M}$) induziert (Zhao and Eide, 1996a), während der niedrigaffine Zn-Transporter Zrt2p ($K_m = 10 \mu\text{M}$) in Zn-gesättigten Zellen nachgewiesen wurde (Zhao and Eide, 1996b). Diese beiden in der Plasmamembran lokalisierten Transporter sind jedoch nicht essentiell, so daß das Vorhandensein weiterer Aufnahmesysteme sehr wahrscheinlich ist. Zrt1p und Zrt2p besitzen 8 transmembrane Helices, und zwischen den Helices 3 und 4 befindet sich eine potentielle Metall-Bindestelle. Gemeinsam mit dem *IRT1* kodierten Eisen-Transporter aus *A. thaliana* (Eide *et al.*, 1996) und den Zink-Transportern ZIP1, ZIP2, ZIP3 und ZIP4 aus *A. thaliana* (Grotz *et al.*, 1998) gehören die Zrt1p und Zrt2p Transporter zur ZIP-Proteinfamilie (ZRT, IRT ähnliche Proteine). Die Zink-Aufnahme der Hefen wird in Abhängigkeit von der intrazellulären Zink-Konzentration auf transkriptioneller oder posttranslationaler Ebene reguliert. Gitan *et al.* (1998) konnten zeigen, daß Zrt1p in Zink-limitierten Zellen N-glykosyliert und sehr stabil ist, während hohe Zink-Konzentrationen zur Endocytose und Proteinabbau in der Vakuole führen (Gitan *et al.*, 1998). Diese Regulationsebene wurde bereits für verschiedene Nährstoff-Transporter in Abhängigkeit vom Substrat beschrieben. So ist zum Beispiel Glucose, bevorzugte C-Quelle der Hefen, Auslöser für die Endocytose der *GAL2* kodierten Galaktose-Permease (Horak and Wolf, 1997) und der *MAL61* kodierten Maltose-Permease (Riballo *et al.*, 1995; Medintz *et al.*, 1996).

Die Regulation der Zink-Transporter auf Transkriptionsniveau erfolgt durch den Zap1p Transkriptionsaktivator (Zhao and Eide, 1997). Dieser mißt den Zink-Status der Zelle und aktiviert die Expression seiner Zielgene (*ZRT1*, *ZRT2*, *ZRT3* und *ZAP1* selbst) unter Zink-Mangel. Durch den Einsatz von *DNA-Microarrays*, kombiniert mit der computergestützten Sequenzanalyse identifizierten Lyons *et al.* (2000) 46 potentielle Zap1p regulierte Gene in *S. cerevisiae*. Der Transkriptionsaktivator Zap1p bindet an der konservierten ZRE-Sequenz (*zinc-responsive element*) in der Promotorregion des Zielgens. Ein ZRE ist ausreichend, um Zap1p abhängige Expression zu vermitteln.

Ein weiterer Aspekt der Homöostase ist die Detoxifikation und Kompartimentierung der Metalle. White and Gadd (1987) konnten zeigen, daß 56 % der Zn²⁺ Ionen aus *S. cerevisiae* in der Vakuolen-Fraktion enthalten sind, während 39 % an unlösliche Komponenten gebunden sind und nur 5 % im Cytosol vorkommen. Auch andere Metall-Ionen (Ca²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺,

Ni^{2+}) werden in der Vakuole kompartimentiert (Bode *et al.*, 1995), so daß diese auch für die Zink-Detoxifikation hervorragend geeignet erscheint. Außerdem ist bekannt, daß Hefemutanten mit Defekten in der Biogenese oder der Ansäuerung der Vakuole eine erhöhte Zink-Sensitivität aufweisen (Eide *et al.*, 1993; Ramsay and Gadd, 1997). Es liegt die Vermutung nahe, daß die Akkumulation von Zn^{2+} -Ionen in der Vakuole mit einer Entladung des Protonengradienten über der Vakuolenmembran korreliert. Mit Zrt3p identifizierten MacDiarmid *et al.* (2000) einen potentiellen Zink-Transporter der Vakuole. *ZRT3* wird ebenfalls Zap1p reguliert und führt zu einer Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen aus der Vakuole bei Zinklimitation. Im Gegensatz dazu scheinen die Proteine Cot1p und Zrc1p in den Transport von Zink in die Vakuole involviert zu sein. Während Conklin *et al.* (1992) das *COT1* Genprodukt in den Mitochondrien lokalisierten, konnten Li and Kaplan (1998) zeigen, daß sowohl Zrc1p als auch Cot1p in der Vakuolenmembran verankert sind. Im Gegensatz zu *COT1* enthält *ZRC1* eine ZRE ähnliche Sequenz, die eine Zap1p-abhängige Regulation vermuten läßt. Untersuchungen einer *lacZ*-Fusion mit dem *ZRC1*-Promotor bestätigten, daß *ZRC1* durch Zap1 unter Zinkmangel induziert wird (Lyons *et al.*, 2000). Es erscheint paradox, daß die Proteine für den Zink-Influx (Zrc1p) in und den Zink-Efflux (Zrt3p) aus der Vakuole auf die gleiche Art und Weise reguliert werden. Möglicherweise wird somit ein ausreichender Zink-Fluß gewährleistet, um auch unter Zinkmangel-Bedingungen die Versorgung vakuolärer Zink-abhängiger Enzyme mit Zn^{2+} -Ionen zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit untersuchten *cot1*, *zrc1* und *cot1/zrc1*-Mutanten zeigten keine veränderte Akkumulation von Zn^{2+} -Ionen gegenüber dem Wildtyp (Abb. 33). Demgegenüber akkumuliert die *zrt3*-Mutante in einem Konzentrationsbereich von 10-1000 μM ZnCl_2 bis zu 2.5mal mehr Zink als der Wildtyp (Lyons *et al.*, 2000). Bei niedrigeren Konzentrationen wurde kein Unterschied festgestellt. Diese Beobachtungen können jedoch nicht mit der Zap1p abhängigen Regulation der beiden Proteine Zrt3p und Zrc1p in Einklang gebracht werden. Es erscheint sehr wahrscheinlich, daß noch weitere Zink-Transporter und Regulatoren in den Zink-Stoffwechsel der Vakuole involviert sind.

Auch der Einfluß von Cadmium und Cobalt auf den Phänotyp der *S. cerevisiae* Mutanten *zrc1*, *cot1* und *zrc1/cot1* wurde bereits erwähnt. Die Interpretation dieser Untersuchungen ist recht schwierig, da über den Stoffwechsel dieser beiden Metalle in der Hefe *S. cerevisiae* wenig bekannt ist, was wiederum mit der geringen Bedeutung dieser Metalle in Einklang steht. Während Cobalt als Bestandteil des Vitamin B12 essentiell ist, sind für Cadmium keine biologischen Funktionen bekannt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden keine spezifischen Aufnahmesysteme für diese Metalle beschrieben, und man geht davon aus, daß die Aufnahme in die Zellen unkontrolliert über unspezifische Systeme erfolgt. Da diese Aufnahme wahrscheinlich nicht verhindert werden kann, schützen sich viele Organismen durch Komplexbildung der Metalle mit niedermolekularen, cysteinreichen Proteinen, den sogenannten Metallothioneinen. Tiere, Pflanzen und Hefen detoxifizieren Xenobiotika

außerdem durch Komplexierung mit Glutathion (GSH), welches die Struktur γ Glu-Cys-Gly aufweist. Metallionen werden als Thiolate an Glutathion gebunden und durch spezifische GS-X-Pumpen aus dem Cytosol entfernt. Ycf1p (*yeast cadmium factor*) aus *S. cerevisiae* ist ein GS-X-Transporter, der neben verschiedenen organischen GS-Komplexen auch Cadmium-GS₂-Komplexe in die Vakuole transportiert (Szczyepka *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997). Auch Kupfer wird bei hohen Konzentrationen durch die *CUP1* und *CRS5* kodierten Metallothioneine (Butt *et al.*, 1984; Culotta *et al.*, 1994) oder Glutathion (Lin *et al.*, 1993a; Lin *et al.*, 1993b) komplexiert, und durch intrazelluläre Transporter (z.B. Ccc2p) kompartimentiert (Fu *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist für Cobalt bisher keine Komplexierung und Kompartimentierung durch Metallothioneine/Glutathion und spezifische Transporter beschrieben worden.

Die erhöhte Cobalt-Sensitivität der *cot1*-Mutante (Abb. 28) und die Lokalisation von Cot1p in der Vakuolenmembran (Li and Kaplan, 98) deuten darauf hin, daß Cot1p die Co²⁺-Ionen in die Vakuole transportieren könnte. In welcher Form das Metall innerhalb der Hefezelle zur Vakuole gelangt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch völlig offen.

Die Cd-Sensitivität der *zrc1*-Mutante scheint ein Nebeneffekt der Deletion des Zink-Transporters zu sein. Es ist für mehrere Metall-Transporter bekannt, daß sie neben dem eigentlichen Substrat auch Affinitäten zu anderen Metallen besitzen. Das gleiche trifft für die *cot1*-Mutante sowie die Doppelmutante zu. Conklin *et al.* (1992) beschrieben eine Cot1p vermittelte Rhodium-Toleranz neben der eigentlichen Cobalt-Resistenz und die Überexpression von *ZRC1* führt zu erhöhter Resistenz gegenüber Zink und Cadmium. Das Metallothionein Cup1p kann neben seinem primären Substrat Kupfer auch Cadmium komplexieren, was zu einer sekundären Cadmium-Resistenz der Hefe führt (Jeyaprakash *et al.*, 1991). Daneben besteht die Möglichkeit, daß der verminderte Glutathion-Gehalt der *zrc*-Mutante (Kobayashi *et al.*, 1996) den Ycf1p vermittelten Transport der Cadmium-GS₂-Komplexe in die Vakuole beeinträchtigt.

Interessant ist jedoch, daß der Cot1p vermittelte Cobalt-Transport völlig anders als der GS-X-Pumpen vermittelte Transport funktioniert. Die beiden Cadmium-Toleranz vermittelnden Transporter Ycf1p aus *S. cerevisiae* und Hmt1p aus *Schizosaccharomyces pombe* (Ortiz *et al.*, 1994) gehören zur Familie der ABC-Transporter. Der Transport wird durch die Energie der Mg²⁺/ATP-Hydrolyse ermöglicht. Im Gegensatz dazu gehört Cot1p zur CDF-Proteinfamilie, deren Charakteristika 6 transmembrane Helices und potentielle Metallbindestellen zwischen den Helices IV und V sind. Während bisher eine erleichterte Diffusion von Kationen als Funktion dieser Proteine postuliert wurde (und der Familie den Namen gab), weisen neuere Untersuchungen eindeutig auf eine Transport-Funktion hin. MacDiarmid *et al.* (2000) formulierten einen Cot1p vermittelten Co²⁺/H⁺-Antiport der Co²⁺-Ionen in die Vakuole, der durch den Protonengradienten über der Vakuolenmembran angetrieben wird. Voraussetzung für diesen Transport ist die Ansäuerung der Vakuole durch die vakuoläre H⁺-ATPase. Für die Akkumulation von Zink und Kupfer in der Vakuole von

S. cerevisiae ist der direkte Zusammenhang mit der vakuolären H^+ -ATPase bereits bekannt (Eide *et al.*, 1993; MacDiarmid *et al.*, 2000).

Ein weiterer Unterschied zwischen den ABC-Transportern und den CDF-Proteinen besteht in der Substratspezifität. Während die bisher bekannten CDF-Proteine ausschließlich zweiwertige Metall-Ionen (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+}) transportieren, sind Metall-Ionen nur ein Teil des umfangreichen Substratspektrums der ABC-Transporter. Zum einen fungieren ABC-Transporter zur Aufnahme von notwendigen Nährstoffen, zum anderen dienen sie aber auch dem Efflux und der Kompartimentierung schädlicher Xenobiotika (Farbstoffen, Detergenzien, Antibiotika usw.). Zentrale Komponente vieler Efflux-Systeme sind ABC-Transporter, die im Komplex mit einem Membran-Fusionsprotein (MFP) und einem Protein der äußeren Membran (OMP) den Transport bewerkstelligen.

4.6 Zrc1p der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* ist ein Metall-Transporter der Vakuolenmembran, der Resistenz gegenüber Zink und Cobalt vermittelt

Die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* ist ein gut charakterisierter und einfach zu handhabender eukaryotischer Organismus. Im Mittelpunkt der Untersuchungen vieler Arbeitsgruppen steht die Toleranz einiger *S. pombe*-Stämme gegenüber verschiedenen Schwermetallen. Sehr gut untersucht ist die Komplexierung von Cadmium-Ionen durch die aus Glutathion synthetisierten Phytochelatine (Murasugi *et al.*, 1985; Grill *et al.*, 1986; Cobbett, 2000). Durch die Fähigkeit zur Synthese von Phytochelatinen unterscheidet sich *S. pombe* einerseits von der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und besitzt andererseits eine enge Verknüpfung zu den Pflanzen. Phytochelatine sind kleine Peptide mit der Primärstruktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, wobei $n > 1$ ist und meistens zwischen 2 und 5 liegt. Die Synthese der Phytochelatine aus dem Glutathion wird durch die Phytochelatin-Synthase katalysiert. Die Gene, die diese Enzyme kodieren, wurden erst kürzlich in Arabidopsis, Weizen und *S. pombe* identifiziert und charakterisiert (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999). Ihre Expression wird durch Metalle induziert und führt zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen. Die Cd^{2+} -Ionen werden als Thiolate an die Cystein-Reste der Phytochelatine gebunden. Dabei entstehen PC-Cd-Komplexe mit niedrigem Molekulargewicht (3-4 kDa). Die so komplexierten Cd^{2+} -Ionen werden hauptsächlich in die Vakuole transportiert und sequestriert. Ortiz *et al.* (1992, 1995) charakterisierten mit dem Hmt1p aus *S. pombe* einen ABC-Transporter der Vakuolenmembran, der für die Cd^{2+} -Toleranz essentiell ist. Durch Transportstudien an Vakuolenmembranvesikeln von Stämmen, die *HMT1* überexprimieren oder nicht enthalten, konnte gezeigt werden, daß der Transport sowohl von Apo-Phytochelatinen als auch von Phytochelatin-Cd-Komplexen in die Vakuole ATP-abhängig durch Hmt1p vermittelt wird. In *S. cerevisiae* werden Cd^{2+} -Ionen an Glutathion gebunden und

durch die *YCF1* kodierte vakuoläre Glutathion-S-Konjugat-Pumpe in die Vakuole transportiert (Li *et al.*, 1996). Ycf1p ist, wie auch Hmt1p, ein Mg-ATP-abhängiger ABC-Transporter. Li *et al.* (1997) konnten nachweisen, daß die Cadmium-Resistenz von *S. cerevisiae* auf dem Ycf1p vermittelten Transport von bis-(Glutathionato)-Cadmium-Komplexen (Cd-GS₂) in die Vakuole beruht.

Neben dem Hmt1p vermittelten Transport von PC-Cd-Komplexen in die Vakuole existiert mindestens noch ein weiterer Transportmechanismus für Cd²⁺- und Glutathion-Konjugate in *S. pombe* (Ortiz *et al.*, 1995). Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Cd²⁺/H⁺-Antiporter, der durch den pH-Gradienten über der Vakuolenmembran angetrieben wird (Cobbett, 2000). Salt and Wagner (1993) haben so einen Cadmium-Transport über den Tonoplasten von Haferwurzel-Vesikeln bereits beschrieben. Die auf diesem Wege in die Vakuole transportierten Cd²⁺-Ionen sowie ebenfalls in die Vakuole transportierte Sulfide werden in die PC-Cd-Komplexe mit niedrigem Molekulargewicht integriert, und es entstehen die PC-Cd-S²⁻-Komplexe mit hohem Molekulargewicht (6-9 kDa). Diese Komplexe mit hohem Molekulargewicht bestehen aus einem CdS-Kristall, der von den Phytochelatinen umhüllt wird (Dameron *et al.*, 1989). Der Einbau der Sulfide erhöht den Gehalt an Cd²⁺-Ionen sowie die Stabilität der Komplexe (Reese and Winge, 1988). Clemens *et al.* (1999) postulierten, daß die PC-Cd-S²⁻-Komplexe mit hohem Molekulargewicht das stabile Endprodukt der Cadmium-Entgiftung in *S. pombe* darstellen.

Durch in vitro Experimente konnte gezeigt werden, daß PC-Zn²⁺- und PC-Cu²⁺-Komplexe die Apo-Formen von Kupfer- und Zink-abhängigen Enzymen reaktivieren können (Thumann *et al.*, 1991). Jedoch wurden bisher in vivo nur Phytochelatin-Komplexe mit Cd²⁺-, Ag²⁺- und Cu²⁺-Ionen nachgewiesen, während auch andere Metalle die Synthese der Phytochelatine induzieren können (Ha *et al.*, 1999). Während der Mechanismus der Cadmium-Entgiftung sehr gut beschrieben ist, gibt es für die Entgiftung anderer Schwermetalle (z.B. Cd²⁺-, Co²⁺- und Zn²⁺-Ionen) in *S. pombe* fast keine Indizien.

Die Hefe *S. cerevisiae* enthält die vakuolären Transporter Cot1p und Zrc1p, die an der Ausprägung von Cobalt- sowie Cadmium- und Zink-Resistenz beteiligt sind (Li and Kaplan, 1998; Conklin *et al.*, 1992; Kamizono *et al.*, 1989). Die erhöhte Resistenz gegenüber Co²⁺-, Zn²⁺- und Cd²⁺-Ionen beruht wahrscheinlich auf einem Metall²⁺/H⁺-Antiport der Metallionen in die Vakuole, der durch den Protonengradienten über der Vakuolenmembran angetrieben wird (MacDiarmid *et al.*, 2000). *S. pombe* enthält ein homologes *ZRC1* Gen, jedoch kein homologes Gen zu *Cot1*. Um herauszufinden, ob *ZRC1* aus *S. pombe* in Analogie zu *COT1* und *ZRC1* aus *S. cerevisiae* in den Metall-Transport involviert ist, wurden vergleichende Untersuchungen mit dem *ZRC1* deletierten *S. pombe* Stamm FY261/ Δ *zrc1* und dem Wildtyp FY261 durchgeführt. Der Verlust des *ZRC1* Gens verändert das Wachstum dieses *S. pombe*-Stammes in Anwesenheit von Schwermetallen auf unterschiedliche Weise. Die gravierendste Veränderung im Wachstum wurde durch die Zugabe von ZnCl₂ zum Medium beobachtet.

Während der Wildtyp bis zu einer Konzentration von 7.5 mM ZnCl₂ im Medium gut wachsen kann, wurde für die *zrc1*-Mutante bei 1 mM ZnCl₂ im Medium kein Wachstum beobachtet. Dieser Effekt wurde sowohl im Flüssigmedium (Abb. 35) als auch bei Kultivierung auf Agarplatten festgestellt (Abb. 38) und bestätigt die Vermutung, daß *ZRC1* in die Ausprägung einer Zink-Toleranz in *S. pombe* involviert ist. Bei der Aufnahme von ⁶⁵ZnCl₂ in intakte *S. pombe*-Zellen wurde kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *zrc1*-Mutante sichtbar. Das führte zu der Annahme, daß der Verlust der Zink-Resistenz durch die *ZRC1*-Deletion nicht mit veränderter Zn-Aufnahme einhergeht, und somit der putative *ZRC1* kodierte Zink-Transporter nicht in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, wie es für andere Zink-Transporter der CDF-Proteinfamilie bekannt ist. Zum Beispiel sind die ZnT-1p von Maus und Ratte in der Plasmamembran lokalisiert und in den Zink-Efflux involviert (Palmiter and Findley, 1995; McMahon and Cousins, 1998). Im Gegensatz dazu wurden die *S. cerevisiae* Proteine Cot1p und Zrc1p in der Vakuolenmembran lokalisiert (Li and Kaplan, 1998). Es lag die Vermutung nahe, daß auch das putative Zrc1p aus *S. pombe* in der Vakuolenmembran verankert ist und einen Transport der Zn²⁺-Ionen in die Vakuole vermittelt. Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten, daß das Zrc1p in der Vakuolenmembran lokalisiert ist (S. Clemens, pers. Mitteilung). Für die Hypothese der Zrc1p vermittelten Akkumulation von Zn²⁺-Ionen in der Vakuole spricht auch der Befund, daß der *S. pombe* Wildtyp eine 10fach erhöhte Akkumulation von ⁶⁵ZnCl₂ im Vergleich zur *zrc1*-Mutante aufweist (Abb. 41). MacDiarmid *et al.* (2000) konnten in *zrc1*- und *cot1*-Mutanten von *S. cerevisiae* ebenfalls eine verringerte Zink-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp feststellen.

Ob die akkumulierten Zn²⁺-Ionen möglicherweise als Thiolate an Metall-bindende Proteine, wie Glutathion, Metallothioneine oder Phytochelatine gebunden sind, kann nur spekuliert werden, da solche Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Während die Komplexbildung der Zn²⁺-Ionen durch Phytochelatine sehr unwahrscheinlich ist, sollten die anderen Metall-bindenden Proteine weiterführend untersucht werden. Bei Experimenten mit dem prokaryotischen CDF-Protein CzcD aus *R. metallidurans* wurde festgestellt, daß die erhöhte Zink-Toleranz nicht mit einer Erhöhung des Glutathiongehaltes korreliert (A. Anton, pers. Mitteilung). Jedoch kann man diese Beobachtung nicht direkt mit der Zink-Resistenz in *S. pombe* vergleichen, da die Resistenz dieser Eukaryoten hauptsächlich auf Kompartimentierung und Sequestrierung der toxischen Metalle beruht (Rea *et al.*, 1998), während die Metall-Toleranz von Prokaryoten (z. B. *R. metallidurans*) überwiegend durch den Efflux der toxischen Ionen vermittelt wird (Nies, 1999).

Während in *S. cerevisiae* der Cobalt-Transport in die Vakuole durch das Cot1p katalysiert wird, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, daß die Co²⁺-Ionen in *S. pombe* durch den putativen *ZRC1* kodierte Zink-Transporter in die Vakuole transportiert werden, da kein *COT1* homologes Gen in *S. pombe* bekannt ist. Die untersuchte *zrc1*-Mutante wächst in Anwesenheit von CoCl₂ im Medium schlechter als der *S. pombe* Wildtyp. Die minimale

Inhibitorkonzentration für CoCl_2 liegt bei 0.5 mM für die *zrc1*-Mutante im Vergleich zu 5 mM des Wildtyps (Abb. 38). Dieser Effekt wird jedoch nicht durch veränderte Aufnahme der Ionen in *zrc1*-Mutanten-Zellen hervorgerufen (Abb. nicht gezeigt). Die Aufnahme von $^{57}\text{CoCl}_2$ ist in der *zrc1*-Mutante und dem Wildtyp identisch. Demgegenüber wurden bei der Akkumulation von $^{57}\text{CoCl}_2$ über einen längeren Zeitraum (700 min) Unterschiede zwischen der *zrc1*-Mutante und dem Wildtyp sichtbar (Abb. 41). Während der $^{57}\text{CoCl}_2$ -Gehalt der *zrc1*-Mutante während der gesamten Messung ungefähr konstant geblieben ist, wurde beim Wildtyp nach langer lag-Phase ein Anstieg der zellulären Cobalt-Konzentration festgestellt. Es ist vorstellbar, daß diese erhöhte Akkumulation von Cobalt im *S. pombe* Wildtyp durch den Zrc1p vermittelten Transport der Ionen in die Vakuole und die dortige Sequestrierung ausgelöst wird. Die in diesem Zusammenhang ebenfalls beschriebene erhöhte Akkumulation von $^{65}\text{ZnCl}_2$ im *S. pombe* Wildtyp im Vergleich zur *zrc1*-Mutante weist keine lag-Phase auf (Abb. 41). Das Maximum der Zink-Aufnahme ist bereits nach 150 min erreicht, während bei der Cobalt-Akkumulation erst mit diesem Zeitpunkt eine erhöhte Akkumulation beobachtet wurde. Dieses Ergebnis, das auch bei Verwendung von $^{109}\text{CdCl}_2$ im Ansatz erhalten wurde, deutet darauf hin, daß Zn^{2+} -Ionen das bevorzugte Substrat des *ZRC1* kodierten Zink-Transporters in *S. pombe* sind, dieser Transporter aber auch andere Metall-Ionen (Co^{2+} , Cd^{2+}) wahrscheinlich in die Vakuole „entgiftet“. Die lange lag-Phase, die bei der Akkumulation von $^{57}\text{CoCl}_2$ und $^{109}\text{CdCl}_2$ beobachtet wurde, könnte dem bevorzugten Transport von Zn^{2+} -Ionen zugeschrieben werden, da 1.4 μM ZnSO_4 als Mineralien im Test-Medium enthalten sind. Daß Transport-Proteine neben dem eigentlichen Substrat auch andere Substanzen relativ unspezifisch transportieren, ist nicht ungewöhnlich. So vermittelt Zrc1p aus *S. cerevisiae* neben der Zink-Resistenz auch Resistenz gegenüber Cd^{2+} -Ionen, während eine Cobalt-Resistenz nicht festgestellt werden konnte (Kamizono *et al.*, 1989).

Die Cadmium-Resistenz in *S. pombe* ist mit einer erhöhten Cadmium-Akkumulation verbunden (Ortiz *et al.*, 1992; Clemens *et al.*, 1999). Diese erhöhte Cadmium-Akkumulation resultiert zum einen von einer erhöhten Aktivität der *SpPCS* kodierten Phytochelatin-Synthase (Clemens *et al.*, 1999) und zum anderen vom Hmt1p vermittelten Transport der PC-Cd-Komplexe in die Vakuole (Ortiz *et al.*, 1992). Ein dritter Aspekt, der die erhöhte Cadmium-Konzentration im *S. pombe* Wildtyp erklärt, wurde in dieser Arbeit festgestellt. In Anwesenheit des putativen Zink-Transporters Zrc1p in *S. pombe* Wildtyp-Zellen kommt es zu einer vermehrten Akkumulation von $^{109}\text{CdCl}_2$ im Vergleich zur *zrc1*-Mutante. Das bedeutet, daß *ZRC1* wahrscheinlich die Kompartimentierung der Cd^{2+} -Ionen in die Vakuole selbst katalysiert oder aber die Phytochelatin-Synthase bzw. den Hmt1p vermittelten Transport der PC-Cd-Komplexe in die Vakuole induziert.

Demgegenüber wurde ein ungewöhnliches Wachstumsverhalten der *zrc1*-Mutante und des *S. pombe* Wildtyps beim Zusatz von CdCl_2 zum Medium festgestellt. Während die *zrc1*-Mutante in Anwesenheit von 50 μM CdCl_2 gut wachsen kann, weist der Wildtyp vermindertes Wachstum auf (Abb. 37, 38). Diese Beobachtung wurde sowohl in Flüssigmedium als auch

bei Wachstum auf festem Medium gemacht. Das bedeutet, daß das *ZRC1* Genprodukt in *S. pombe* eine erhöhte Akkumulation von Cd^{2+} -Ionen vermittelt, die an einen Verlust der Cd-Toleranz des Wildtypes gekoppelt ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Proteine der CDF-Familie (Cation Diffusion Facilitator) sind am Transport von Schwermetall-Ionen beteiligt und bewirken dadurch oftmals eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen Ionen. Neben *CzcD* aus *Ralstonia metallidurans*, dem ersten Vertreter dieser Familie, gehören zu dieser Familie die Hefe-Proteine *Zrc1p* und *Cot1p*, die Zink-, Cadmium- bzw. Cobaltresistenz vermitteln, sowie die Zink-Transporter *Znt1p* bis *Znt4p* der Säugetiere (Ratte, Maus, Mensch). Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen der Nachweis und die funktionelle Charakterisierung von pflanzlichen Proteinen, die Homologie zu dieser neuen Familie von Schwermetall-Transport-Proteinen aufweisen.

1. Durch Southern-Hybridisierung genomischer Pflanzen-DNA (Tomate, Tabak) mit den Sonden *COT1* und *ZRC1* wurden erstmals im Pflanzengenom Sequenzen nachgewiesen, die Homologie zu CDF-Proteinen aufweisen.
2. Eine 449 bp große Kartoffel-Sequenz (123pep), die Homologie zur CDF-Familie besitzt, wurde in cDNA-Banken von Tomate und *Silene* mittels PCR und Hybridisierung nachgewiesen. Das komplette CDF-Protein kodierende Gen konnte jedoch nicht isoliert werden.
3. Im *A. thaliana* Genom identifizierten wir eine Sequenz, die ein putatives CDF-Protein kodiert. Dieses *ZATI*-Gen wurde mittels PCR amplifiziert, in Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli* exprimiert.
4. Das überexprimierte *Zat1*-STREptag-Fusionsprotein wurde mittels Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepharose gereinigt und anschließend aktiv in Detergenz destabilisierten Liposomen rekonstituiert. Es konnte gezeigt werden, daß die *Zat1p*-Proteoliposomen Zn^{2+} -Ionen aufnehmen, jedoch keine Cd^{2+} - und Co^{2+} -Ionen.
5. Anhand eines Δ *Zat1*-STREptag-Fusionsproteins wurde nachgewiesen, daß die Bindung der Zn^{2+} -Ionen innerhalb der Histidinreichen Region der cytosolischen Domäne zwischen den Helices IV und V erfolgt.
6. Die Expression des *ZATI*-Gens im metallsensitiven *R. metallidurans*-Stamm AE104 führt zu erhöhter Aufnahme von Zn^{2+} -Ionen. Diese erhöhte Zink-Aufnahme korreliert jedoch nicht mit erhöhter Zink-Resistenz.

7. Die Komplementation der *czcD*-Mutation des metallresistenten Stammes DN 182 mit dem *ZATI*-Gen führt zur erhöhter Aufnahme von Zn^{2+} -Ionen entsprechend dem Ausgangsstamm AE128, während sich die Zink-Aufnahme der Mutante nicht ändert.
8. Es wurden *zrcI*- und *cotI*-Einzelmutanten sowie eine *cotI/zrcI*-Doppelmutante der Bäckerhefe *S. cerevisiae* konstruiert. Die Mutationen wurden durch Southern-Hybridisierung und veränderten Phänotyp (Änderung der Minimalen Inhibitor-konzentrationen der Schwermetall-Salze $ZnCl_2$, $CdCl_2$ und $CoCl_2$) nachgewiesen.
9. Das *ZRCI*-Gen in trans komplementiert sowohl die *zrcI*-Mutation als auch die *zrcI/cotI*-Doppelmutation. Während die *zrcI*-Mutante (MIC 7.5 mM) wieder die vollständige Zink-Resistenz des Wildtyps (MIC 12 mM) erlangt, erhöht sich die Zink-Resistenz der *zrcI/cotI*-Doppelmutante (MIC 1 mM) auf das Niveau der *zrcI*-Mutante.
10. Die Spaltheefe *S. pombe* enthält nur das *ZRCI*-Gen. Die Deletion des *ZRCI*-Gens führt zum Verlust der Zink-Resistenz und zu verminderter Cobalt-Resistenz, während die Cadmium-Resistenz erhöht ist.
11. Die Deletion des *ZRCI*-Gens in *S. pombe* führt zu einer verminderten Akkumulation der Metalle $ZnCl_2$, $CdCl_2$ und $CoCl_2$.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Ackland, M. L. and J. F. B. Mercer. 1992. The murine mutation, lethal milk, results in production of zinc-deficient milk. *J. Nutr.* 122: 1214-1218

Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides, S.E. Scherer, P.W. Li, R.A. Hoskins, R.F. Galle, R.A. George, S.E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S.N. Henderson, G.G. Sutton, J.R. Wortman, M.D. Yandell, Q. Zhang, L.X. Chen, R.C. Brandon, Y.-H.C. Rogers, R.G. Blazej, M. Champe, B.D. Pfeiffer, K.H. Wan, C. Doyle, E.G. Baxter, G. Helt, C.R. Nelson, G.L.G. Miklos, J.F. Abril, A. Agbayani, H.-J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R.M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E.M. Beasley, K.Y. Beeson, P.V. Benos, B.P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M.R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K.C. Burtis, D.A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J.M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L.B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A.D. Mays, I. Dew, S.M. Dietz, K. Dodson, L.E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B.C. Dunkov, P. Dunn, K.J. Durbin, C.C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A.E. Gabrielian, N.S. Garg, W.M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J.H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N.L. Harris, D. Harvey, T.J. Heiman, J.R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K.A. Houston, T.J. Howland, M.-H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G.H. Karpen, Z. Ke, J.A. Kennison, K.A. Ketchum, B.E. Kimmel, C.D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A.A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T.C. McIntosh, M.P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N.V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S.M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D.M. Muzny, D.L. Nelson, D.R. Nelson, K.A. Nelson, K. Nixon, D.R. Nusskern, J.M. Pacleb, M. Palazzolo, G.S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M.G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R.D.C. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B.C. Shue, I. Siden-Kiamos, M. Simpson, M.P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A.C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A.H. Wang, X. Wang, Z.-Y. Wang, D.A. Wassarman, G.M. Weinstock, J. Weissenbach, S.M. Williams, T. Woodage, K.C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q.A. Yao, J. Ye, R.-F. Yeh, J.S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X.H. Zheng, F.N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H.O. Smith, R.A. Gibbs, E.W. Myers, G.M. Rubin, J.C. Venter. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195

Akada, R. 1994. Quick-check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *BioTechniques* 17: 58

Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl, 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: 6876-6881

Askwith, C., D. Eide, A. V. Ho, P. S. Bernard, L. Li. 1994. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76: 403-410

Baksh, S., C. Spamer, C. Heilmann, M. Michalak. 1995. Identification of the Zn²⁺ binding region in calreticulin. *FEBS Letters* 376: 53-57

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

- Birnboim, J. C. and J. Doly. 1978. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523
- Böhm, S., D. Frishman, H. W. Mewes. 1997. Variations of the C₂H₂ zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 25: 2464-2469
- Brinkmann, U. 1990. Expression der cDNA von humanem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) in *Escherichia coli*. Dissertationsschrift. Universität Stuttgart
- Brown, D., C.M. Churcher, B.G. Barrell, M.A. Rajandream, V. Wood. 1997. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- Brown, G. E., A. L. Foster, J. D. Ostergren. 1999. Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3388-3395
- Bull, P. C., G. R. Thomas, J. M. Rommes, J. R. Forbes, D. W. Cox. 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.* 5: 327-336
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, J. M. Short. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-378
- Butt, T. R., E. J. Sternberg, J. A. Gorman, P. Clark, D. Hamer, *et al.* 1984. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3332-3336
- Carty, F. J., B. M. Babior, R. H. Abeles. 1974. The mechanism of action of Ethanolamine Ammonia Lyase, a B₁₂-dependent Enzyme. Evidence for two intermediates in the catalytic process. *J. Biol. Chem.* 269: 1683-1688
- Casas, C., M. Aldea, C. Espinet, C. Gallego, R. Gil. 1997. The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 621-137
- Cellier, M., G. Prive, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodrigues, W. Chia, P. Gros. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10089-10093
- Choisne, N., C. Robert, P. Brottier, P. Wincker, L. Cattolico, F. Artiguenave, W. Saurin, J. Weissenbach, H.W. Mewes, K. Lemcke, K.F.X. Mayer, F. Quetier, M. Salanoubat. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- Clarke, N. D. and J. M. Berg. 1998. Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: Finding Families and Probing Pathways. *Science* 282: 2018-2022
- Clemens, S., E. J. Kim, D. Neumann, J. I. Schroeder. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18: 3325-3333

- Cole, T. B., H. J. Wenzel, K. E. Kafer, P. A. Schwartzkroin, R. D. Palmiter. 1999. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the *ZnT3* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1716-1721
- Coleman, J. E. 1998. Zinc enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 222-234
- Conklin, D. S., J. A. McMaster, M. R. Culbertson, C. Kung. 1992. *COT1*, a Gene Involved in Cobalt Accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3678-3688
- Conklin, D. S., M. R. Culbertson, C. Kung. 1994. Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 244: 303-311
- Culotta, V. C., W. R. Howard, X. F. Liu. 1994. CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 25295-25302
- Dameron, C. T., R. N. Reese, R. K. Mehra, A. R. Kortan, P. J. Carroll, M. L. Steigerwald, L. E. Brus, D. R. Winge. 1989. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338: 596-597
- D'Angelo, M., A. Vezzi, D. Modesto, M. Pigazzi, G. Valle, H.W. Mewes, S. Rudd, K. Lemcke, K.F.X. Mayer, F. Quetier, M. Salanoubat. 2000. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- Deckert, G., P.V. Warren, T.Gaasterland, W.G. Young, A.L. Lenox, D.E. Graham, R. Overbeek, M.A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R.A. Feldman, J.M. Short, G.J. Olson, R.V. Swanson. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358
- Dellaporta, S. L., J. Wood, J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21
- de Miranda, J. R., M. A. Thomas, D. A. Thurman, A. B. Tomsett. 1990. Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Letters* 260: 277-280
- Deretic, V., S. Chandrasekharappa, J. F. Gill, D. K. Chatterje, A. M. Chakrabarty. 1987. A set of cassettes and improved vectors for genetic and biochemical characterization of *Pseudomonas* genes. *Gene* 57: 61-72
- Doolittle, R. F., M. S. Johnson, I. Husain, H. B. Van, D. C. Thomas, A. Sancar. 1986. Domainal evolution of a prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active-transport proteins. *Nature* 323: 451-453
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay, D. Nies. 1985. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* 93: B27-B28
- Dressler, C., U. Kües, D. H. Nies, B. Friedrich. 1991. Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3079-3085

- Eide, D., J. T. Bridgham, Z. Zhong, J. Mattoon. 1993. The vacuolar H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 241: 447-456
- Eide, D., M. Broderius, J. Fett, M. L. Guerinot. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5624-5628
- Eng, D. H., M. L. Guerinot, D. Eide, M. H. Saier. 1998. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 166: 1-7
- Freedman, J. H., M. R. Ciriolo, J. Peisach. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264: 5598-5605
- Fu, D., T. J. Beeler, T. M. Dunn. 1995. Sequence mapping and disruption of CCC1, a gene that cross-complements the Ca²⁺-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu²⁺-ATPase subfamily. *Yeast* 11: 283-292
- Gadd, G. M. 1993. Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60
- Gadd, G. M. and O. S. Laurence. 1996. Demonstration of high-affinity Mn²⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: specificity and kinetics. *Microbiol.* 142: 1159-1167
- Georgatsou, E., L. A. Mavrogiannis, G. S. Fragiadakis, D. Alexandraki. 1997. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272: 13786-13792
- Gitan, R. S., H. Luo, J. Rodgers, M. Broderius, D. Eide. 1998. Zinc-induced Inactivation of the Yeast ZRT1 Zinc Transporter Occurs through Endocytosis and Vacuolar Degradation. *J. Biol. Chem.* 273: 28617-28624
- Gleba, D., N. V. Borisjuk, L. G. Borisjuk, R. Kneer, A. Poulev, M. Skarzhinskaya, S. Dushenkov, S. Logendra, Y. Y. Gleba, I. Raskin. 1999. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5973-5977
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke. 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. *J. Biol. Chem.* 274: 26065-26070
- Gottesman, M. M. and I. Pastan. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 385-427
- Grill, E., E. L. Winnacker, M. H. Zenk. 1986. Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Letters* 197: 115-120
- Grill, E. and M. H. Zenk. 1989. Wie schützen sich Pflanzen vor toxischen Schwermetallen? *Chemie in unserer Zeit* 23: 193-199

- Große, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. Navarrete Santos, B. Lawley, N. L. Brown, D. H. Nies. 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 181: 2385-2393
- Grotz, N., T. Fox, E. Connolly, W. Park, M. L. Guerinot, D. Eide. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7220-7224
- Güldener, U., S. Heck, T. Fiedler, J. Beinhauer, J. H. Hegemann. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 24 (13): 2519-2524
- Guerinot, M. L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 190-198
- Gunshin, H., B. Mackenzie, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488
- Ha, S. B., A. P. Smith, R. Howden, W. M. Dietrich, S. Bugg, M. J. O'Connell, P. B. Goldsbrough, C. S. Cobbett. 1999. Phytochelatin Synthase Genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153-1163
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press
- Hanada, K., I. Yamamoto and Y. Anraku. 1988. Purification and reconstitution of *Escherichia coli* proline carrier using a specifically cleavable fusion protein. *J. Biol. Chem.* 263: 7181-7185
- Harris, E. L. V. and S. Angal. 1989. *Protein purification methods- a practical approach*. IRL Press, Oxford
- Harrison, P. M. and P. Arosio. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochem. Biophys. Acta* 1275: 161-203
- Hess, H. H. and 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
- Horak, J. and D. H. Wolf. 1997. Catabolite Inactivation of the Galactose Transporter in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Ubiquitination, Endocytosis, and Degradation in the Vacuole. *J. Bacteriol.* 179: 1541-1549
- Huang, L. P. and J. Gitschier. 1997. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat. Genet.* 17: 292-297
- Hultberg, M. 1998. Rhizobacterial glutathione levels as affected by starvation and cadmium exposure. *Curr. Microbiol.* 37: 301-305

- Inoue, Y. 1994. Methylglyoxal and lipid hydroxperoxide as endogenous cytotoxic molecular species: detoxification and regulation of gene expression in yeasts. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 12: 467-508
- Inoue, Y., S. Kobayashi, K. Yoshikawa, L. Tran, A. Kimura. 1993. Lipid hydroperoxide-resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: utilization as a selectable marker gene for yeast transformation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 305-310
- Jeyaprakash, A., J. P. Welch, S. Fogel. 1991. Multicopy *CUP1* plasmids enhance cadmium and copper resistance levels in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 225: 363-368
- Jungmann, J., H. Reins, J. Lee, A. Romeo, R. Hassett. 1993. MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* 12: 5051-5056
- Kamizono, A., M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata, A. Kimura. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 161-167
- Kampfenkel, K., S. Kushnir, E. Babiychuk, D. Inze, M. van Montagu. 1995. Molecular Characterization of a Putative *Arabidopsis thaliana* Copper Transporter and Its Yeast Homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479-28486
- Karlin, S. and Z. Y. Zhu. 1997. Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14231-14236
- Klimpel, K. R., N. Arora, S. H. Leppla. 1994. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol.* 13 (6): 1093-1100
- Knauf, V. C., E. W. Nester. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8: 45-54
- Kobayashi, M. and S. Shimizu. 1998. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 16: 733-736
- Kobayashi, S., S. Miyabe, S. Izawa, Y. Inoue, A. Kimura. 1996. Correlation of the *OSRI/ZRC1* gene product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23: 3-6
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R. D. Palmiter, H. Sakuraba, R. G. Parton, J. Gruenberg. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol.* 1: 113-118
- Köck, M., A. Löffler, S. Abel, K. Glund. 1995. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant. Mol. Biol.* 27: 477-485
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M.G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S.C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C.V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N.M. Carter, S.K. Choi, J.J.

Codani, I.F. Connerton, N.J. Cummings, R.A. Daniel, F. Denizot, K.M. Devine, A. Dusterhoft, S.D. Ehrlich, P.T. Emmerson, K.D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E.J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B.J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C.R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M.F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S.M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R.P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.H. Park, V. Parro, T.M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A.M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S.J. Seror, P. Serror, B.S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandebol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa, A. Danchin. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256

Kuroda, M., H. Hayashi, T. Ohta. 1999. Chromosome-determined zinc responsible operon *czr* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol. Immunol.* 0: 0-0

Kyte, J. and 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

Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini, C. Gebhardt. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genetics* 14: 421-429

Li, L. and J. Kaplan. 1998. Defects in the Yeast High Affinity Iron Transport System Result in Increased Metal Sensitivity because of the Increased Expression of Transporters with a Broad Transition Metal Specificity. *J. Biol. Chem.* 273: 22181-22187

Li, Z. S., M. Szczycka, Y. P. Lu, D. J. Thiele, P. A. Rea. 1996. The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) is a Vacuolar Glutathione S-Conjugate Pump. *J. Biol. Chem.* 271: 6509-6517

Li, Z. S., Y. P. Lu, R. G. Zhen, M. Szczycka, D. J. Thiele, P. A. Rea. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis (glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 42-47

Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, H. G. Schlegel. 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 175: 767-778

Lin, C. M., B. F. Crawford, D. J. Kosman. 1993a. Distribution of ⁶⁴Cu in *Saccharomyces cerevisiae*: cellular locale and metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1605-1615

- Lin, C. M., B. F. Crawford, D. J. Kosman. 1993b. Distribution of ^{64}Cu in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic analyses of partitioning. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1617-1626
- Lin, S. J. and V. C. Culotta. 1995. The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3784-3788
- Lin, S. J., R. A. Pufahl, A. Dancis, T. V. O'Halloran, V. C. Culotta. 1997. A role for the *Saccharomyces cerevisiae ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272: 9215- 9220
- Liu, X. F., F. Supek, N. Nelson, V. C. Culotta. 1997. Negative Control of Heavy Metal Uptake by the *Saccharomyces cerevisiae BSD2* Gene. *J. Biol. Chem.* 272: 11763-11769
- Lowry, O. H., A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Lyons, T. J., A. P. Gasch, L. A. Gaither, D. Botstein, P. O. Brown, D. J. Eide. 2000. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7957-7962
- MacDiarmid, C. W., L. A. Gaither, D. Eide. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19: 2845-2855
- Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162
- McMahon, R. J. and R. J. Cousins. 1998. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4841-4846
- Medintz, I., H. Jiang, E.-K. Han, W. Cui, C. A. Michels. 1996. Characterization of the Glucose-Induced Inactivation of Maltose Permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178: 2245-2254
- Mergeay, M. 2000. Bacteria Adapted to Industrial Biotopes: Metal-Resistant *Ralstonia*. pp. 403-414. In: G. Storz and R. Hengge-Aronis (eds.). *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington
- Mergeay, M., D. H. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, F. van Gijsegem. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotrophe with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162: 328-334
- Murasugi, A., C. Wada, Y. Hayashi. 1985. Cadmium-binding peptide induced in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem.* 96: 1561-1564
- Murgia, C., I. Vespignani, J. Cerase, F. Nobili, G. Perozzi. 1999. Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am. J. Physiol.* 277: 1231-1239

- Nesterenko, M. V., M. Tilley, 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: 239-242
- Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730-750
- Nies, D. H., M. Mergeay, B. Friedrich, H.G. Schlegel. 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 169: 4865-4868
- Nies, D. H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch, M. H. Saier. 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. and S. Silver. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171: 896-900
- Nies, D. H. and S. Silver. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Indust. Microbiol.* 14: 186-199
- Nucifora, G., L. Chu, T. K. Misra, S. Silver. 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3544-3548
- Ortiz, D. F., L. Kreppel, D. M. Speiser, G. Scheel, G. McDonald, D. W. Ow. 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* 11: 3491-3499
- Ortiz, D. F., T. Ruscitti, K. F. McCue, D. W. Ow. 1995. Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein. *J. Biol. Chem.* 270: 4721-4728
- Palmiter, R. D. and S. D. Findley. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14: 639-649
- Palmiter, R. D., T. B. Cole, S. D. Findley. 1996a. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J.* 15: 1784-1791
- Palmiter, R. D., T. B. Cole, C. J. Quaipe, S. D. Findley. 1996b. ZnT3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14934-14939
- Paulsen, I. T. and M. H. Saier, Jr. 1997. A Novel Family of Ubiquitous Heavy Metal Ion Transport Proteins. *J. Membrane Biol.* 156: 99-103
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, R. A. Skurray. 1996. Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Microbiol. Rev.* 60: 575-608
- Peitzsch, N. 1999. Der Chromatstoffwechsel des schwermetallresistenten Bakteriums *Alcaligenes eutrophus* CH34. Dissertationsschrift. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

- Peitzsch, N., G. Eberz, D. H. Nies. 1998. *Alcaligenes eutrophus* as a Bacterial Chromate Sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 453-458
- Pence, N. S., P. B. Larsen, S. D. Ebbs, D. L. D. Letham, M. M. Lasat, D. F. Garvin, D. Eide, L. V. Kochian. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4956-4960
- Rabilloud, T., G. Carpentier, P. Tarrowx. 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9: 288-291
- Racker, E. 1979. Reconstitution of membrane processes. *Methods Enzymol.* 55: 699-711
- Ragan, H. A. and T. J. Mast. 1990. Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 114: 1-22
- Rea, P. A., Z. S. Li, Y. P. Lu, Y. M. Drozdowicz, E. Martinoia. 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 772-760
- Reese, R. N. and D. R. Winge. 1988. Sulfide Stabilization of the Cadmium- γ -Glutamyl Peptide Complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263: 12832-12835
- Reidlinger, J. and V. Müller. 1994. Purification of ATPsynthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F1/F0-type enzyme. *Eur. J. Biochem.* 226 (3): 1079
- Reinbothe, C., A. Tewes, M. Luckner, S. Reinbothe. 1992. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis. *Plant J.* 2: 917-926
- Rensing, C., B. Mitra, B. P. Rosen. 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn (II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14326-14331
- Riballo, E., M. Herweijer, D. H. Wolf, R. Lagunas. 1995. Catabolite Inactivation of the Yeast Maltose Transporter Occurs in the Vacuole after Internalization by Endocytosis. *J. Bacteriol.* 177: 5622-5627
- Rogers, E. E., D. J. Eide, M. L. Guerinot. 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12356-12360
- Rounsley, S.D., X. Lin, S. Kaul, T.P. Shea, C.Y. Fujii, T.M. Mason, M. Shen, C.M. Ronning, Fraser, V.C., R. Somerville, J.C. Venter. 1998. *Arabidopsis thaliana* chromosome II BAC F19D11 genomic sequence. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- Rugh, C. L., H. D. Wilde, N. M. Stack, D. M. Thompson, A. O. Summers, R. B. Meagher. 1996. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified *merA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3182-3187
- Saier, M. H., R. Tam, A. Reizer, J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11: 841-847

- Salt, D. E. and G. J. Wagner. 1993. Cadmium Transport across Tonoplast of Vesicles from Oat Roots; Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiport Activity. *J. Biol. Chem.* 268: 12297-12302
- Salt, D. E., R. D. Smith, I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5463-5467
- Schaeffer, H. and G. von Jagow. 1994. *A practical guide to membrane protein purification.* Academic Press, Inc.
- Schellenberger, A. (Hrsg.) and G. Fischer. 1989. *Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme.* Gustav Fischer Verlag, Jena
- Schiavo, G., O. Rossetto, A. Santucci, B. R. DasGupta, C. Montecucco. 1992. Botulinum Neurotoxins Are Zinc Proteins. *J. Biol. Chem.* 267: 23479-23483
- Schiering, N., W. Kabsch, M. J. Moore, M. D. Distefano, C. T. Walsh, E. F. Bai. 1991. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607. *Nature* 352: 168-172
- Schjerling, P. and S. Holmberg. 1996. Comparative amino acid sequence analysis of the C_6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 24: 4599-4607
- Schuldiner, S., H. Rottenberg, A. Avron. 1972. Determination of ΔpH in chloroplasts. 2. Fluorescent amines as a probe for the determination of ΔpH in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 25: 64-70
- Sharma, R., C. Rensing, B. P. Rosen, 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: 3873-3878
- Siddiqui, R. A., K. Benthin, 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
- Simon, R., U. Priefer, A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology* 1: 784-791
- Smith, R. L., L. J. Thompson, M. E. Maguire. 1995. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg^{2+} transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol.* 177:1233-1238

- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, A. Dancis. 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271: 1552- 1557
- Stover, C.K., X.-Q.T. Pham, A.L. Erwin, S.D.Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R.M. Lim, K.A. Smith, D.H. Spencer, G.K.-S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S. Lory, M.V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964
- Supek, F., L. Supekova, H. Nelson, N. Nelson. 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5105-5110
- Supek, F., L. Supekova, H. Nelson, N. Nelson. 1997. Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *J. Exp. Biol.* 200: 321-330
- Szczyпка, M. S., J. A. Wemmie, W. Scott Moye-Rowley, D. J. Thiele. 1994. A Yeast Metal Resistance Protein Similar to Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and Multidrug Resistance-associated Protein. *J. Biol. Chem.* 269: 22853-22857
- Tabata, K., S. Kashiwagi, H. Mori, C. Ueguchi, T. Mizuno. 1997. Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1326: 1-6
- Taghavi, S., M. Mergeay, D. Nies, 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 (TIMM). *Plasmid* 37: 22-34
- Takata, H., T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi, T. Imanaka. 1994. Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3096-3104
- Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes, 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: 6487-6496
- Thomine, S., R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford, J. I. Schroeder. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4991-4996
- Thumann, J., E. Grill, E. L. Winnacker, M. H. Zenk. 1991. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Letters* 284: 66-69
- Tillmann, H. and K. Eschrich. 1997. cDNA-Klonierung aus Banken mittels Vektor-Insert-PCR. *Biospektrum* 6.97: 31-33

- Tommasini, R., E. Vogt, M. Fromenteau, S. Hörtensteiner, P. Matile, N. Amrhein, E. Martinoia. 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* 13: 773-780
- Traina, S. J. and V. Laperche. 1999. Contaminant bioavailability in soils, sediments and aquatic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3365-3371
- Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, M. H. Saier. 1999. The RND Permease Superfamily: An Ancient, Ubiquitous and Diverse Family that Includes Human Disease and Development Proteins. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.*
- Turner, J. S., A. P. Morby, B. A. Whitton, A. Gupta, N. J. Robinson. 1993. Construction of Zn²⁺/Cd²⁺ hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J. Biol. Chem.* 268: 4494-4498
- Um, H.W. 1999. Sequence analysis of 43F4 fosmid clone of *Zymomonas mobilis*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay, D. H. Nies. 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* 23: 493-503
- van der Zaal, B. J., L. W. Neuteboom, J. E. Pinas, A. N. Chardonens, H. Schat, J. A. C. Verkleij, P. J. J. Hooykaas. 1999. Overexpression of a Novel Arabidopsis Gene Related to Putative Zinc-Transporter Genes from Animals Can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1047-1055
- van Wuytswinkel, O., G. Vansuyt, N. Grignon, P. Fourcroy, J. F. Briat. 1998. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J.* 17: 93-97
- Vatamaniuk, O. K., S. Mari, Y. P. Lu, P. A. Rea. 1999. AtPCS1, a phytochelatase synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7110-7115
- Verkleij, J. A. C., P. L. M. Koevoets, M. M. A. Blake-Kalf, A. N. Chardonens. 1998. Evidence for an important role of the tonoplast in the mechanism of naturally selected zinc tolerance in *Silene vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 153: 188-191
- Vieira, J. and J. Messing. 1982. the pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 3: 259-268
- Voskoboinik, I., H. Brooks, S. Smith, P. Shen, J. Camakaris. 1998. ATP-dependent copper transport by the Menkes protein in membrane vesicles isolated from cultured Chinese hamster ovary cells. *FEBS Letters* 435: 178-182
- Vulpe, C., B. Levinson, S. Whitney, S. Packman, J. Gitschier. 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat. Genet.* 3: 7-13

- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of the molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412
- Weissman, Z., I. Berdicevsky, B. Z. Cavari, D. Kornitzer. 2000. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3520-3525
- Wessel, D. and V. J. Flügge. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143
- West, A. H., D. J. Clark, J. Martin, W. Neupert, F. U. Hartl, A. L. Horwich. 1992. Two Related Genes Encoding Extremely Hydrophobic Proteins Suppress a Lethal Mutation in the Yeast Mitochondrial Processing Enhancing Protein. *J. Biol. Chem.* 267: 24625-24633
- White, C. and G. M. Gadd. 1987. The Uptake and Cellular Distribution of Zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 727-737
- White, O., J.A. Eisen, J.F. Heidelberg, E.K. Hickey, J.D.Peterson, R.J. Dodson, D.H. Haft, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.L. Richardson, K.S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J.J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K.S. Makarova, L. Aravind, M.J. Daly, K.W. Minton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, K.E. Nelson, S. Salzberg, H.O. Smith, J.C. Venter, C.M. Fraser. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286: 1571-1577
- Wilson R., R. Ainscough, K. Anderson, C. Baynes, M. Berks, J. Bonfield, J. Burton, M. Connell, T. Copsey, J. Cooper, A. Coulson, M. Craxton, S. Dear, Z. Du, R. Durbin, A. Favello, L. Fulton, A. Gardner, P. Green, T. Hawkins, L. Hillier, M. Jier, L. Johnston, M. Jones, J. Kershaw, J. Kirsten, N. Laister, P. Latreille, J. Lightning, C. Lloyd, A. McMurray, B. Mortimore, M. O'Callaghan, J. Parsons, C. Percy, L. Rifken, A. Roopra, D. Saunders, R. Shownkeen, N. Smaldon, A. Smith, E. Sonnhammer, R. Staden, J. Sulston, J. Thierry-Mieg, K. Thomas, M. Vaudin, K. Vaughan, R. Waterston, A. Watson, L. Weinstock, J. Wilkinson-Sproat, P. Wohldman. 1994. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368: 32-38
- Xiong, A. and R. K. Jayaswal. 1998. Molecular Charakterization of a Chromosomal Determinant Conferring Resistance to Zinc and Cobalt Ions in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 180: 4024-4029
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119
- Yuan, D. S., R. Stearman, A. Dancis, T. Dunn, T. Beeler, R. D. Klausner. 1995. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2632-2636
- Zhao, H., D. Eide. 1996a. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2454-2458
- Zhao, H., D. Eide. 1996b. The *ZRT2* gene encodes the Low Affinity Zinc Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 23203-23210

Zhao, H. and D. Eide. 1997. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5044-5052

Zhou, J. and P. B. Goldsbrough. 1994. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884

Zhou, K. and G. B. Kohlhaw. 1990. Transcriptional Activator *LEU3* of Yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 17409-17412

Zhu, W. and S. Mager. 2000. Cloning of new mammalian zinc transporter like genes. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen !

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

Grit Schleuder und Ute Lindenstrauß danke ich für ihre Zuverlässigkeit bei den DNA-Sequenzierarbeiten und die aufmunternden Gespräche in den freien Minuten.

Herrn Dr. P. Rücknagel gilt mein Dank für die Durchführung der Proteinsequenzierung.

Herrn S. Clemens danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit bei den Experimenten mit den *S. pombe*-Stämmen.

Bei Frau Dr. Köck bedanke ich mich für die Überlassung der Tomaten-Zellkulturen und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Martina, Susi, Nicki, Astrid und Grit, für das angenehme Arbeitsklima in unserem Labor. Es war eine schöne Zeit! Ich danke Euch für Eure Hilfe, vor allem, daß Ihr mir so manchen Arbeitsschritt abgenommen habt, wenn die Zeit mal wieder nicht reichte.

Martina, Susi, Ede und Antje danke ich für die vielen Tips zur Proteinreinigung.

Ede danke ich dafür, daß er immer zur Stelle war, wenn es Probleme mit den Rechnern und ähnlichen Gerätschaften gab. Deine humorvolle Art hat über manches Tief hinweggeholfen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für die harmonische Arbeitsatmosphäre; vor allem Prof. Dr. J. R. Andreesen danke ich, daß er stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte.

Mein Dank gilt außerdem den guten Freunden und Bekannten, die mich oftmals unterstützt und entlastet haben und mich immer wieder motivierten, diese Arbeit erfolgreich zum Abschluß zu bringen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie ganz lieb danken. Andreas danke ich für seine unermessliche Geduld während der gesamten Zeit. Er hat mich immer wieder angestachelt, diese Arbeit zu beenden und sich deshalb viel Zeit für unsere Kinder genommen. Ohne sein Verständnis für meine Arbeit hätte es nicht funktioniert, diese Promotion zu schreiben und „nebenbei“ eine Familie mit zwei Kindern zusammenzuhalten. Erik und Anne - ihr beiden habt mir immer wieder Kraft gegeben und seid die größte Motivation!

Meinen Eltern möchte ich danken, daß sie immer für mich da sind, und daß sie es mir ermöglichten, diesen Weg zu gehen.

ERKLÄRUNG

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

Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), Februar 2001

Tanja Bloß

Lebenslauf

Name: Tanja Bloß, geb. Schwuchow

Geburtsdatum: 9.3.1972

Geburtsort: Jena

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

09/1978-07/1979 Polytechnische Oberschule „Bertolt Brecht“ in Jena
09/1979-07/1980 Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ in Jena
09/1980-07/1988 Polytechnische Oberschule „Otto Grotewohl“ in Jena
09/1988-07/1990 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Institut zur
Vorbereitung auf das Auslandsstudium)
Abschluß: Abitur (Prädikat: Auszeichnung)

Studium:

08/1990-03/1991 Auslandsstudium an der Universität Sofia
1 Semester in der Fachrichtung Biotechnologie
04/1991-10/1995 Direktstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
in der Fachrichtung Biochemie
Diplomarbeit mit dem Titel „Expression der *czcD*-Genregion
von *Alcaligenes eutrophus* CH34“ am Institut für Mikrobiologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluß: Diplom-Biochemikerin (Prädikat: sehr gut)

Beruf:

11/1995-6/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mirobiologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Rahmen des
Sonderforschungsbereichs 363 “Molekulare Zellbiologie
pflanzlicher Systeme”