

# Genetische und biochemische Charakterisierung von CzcD und anderen Regulatoren der *czc*-vermittelten Schwermetallresistenz in *Ralstonia metallidurans*

Dissertation



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

vorgelegt der

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

von Andreas Anton,  
geboren am 02. Februar 1973 in Erfurt

Gutachter:

Prof. Dr. D. H. Nies, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Prof. Dr. D. Scheel, Institut für Pflanzenbiochemie Halle

Prof. Dr. K. Hantke, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Verteidigung am 23.11.2001 Halle/Saale

**urn:nbn:de:gbv:3-000002965**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002965>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	1
<b>II. Material und Methoden</b> .....	8
<b>2.1. Bakterienstämme und Plasmide</b> .....	8
<b>2.2. Kultivierungsbedingungen</b> .....	12
2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien .....	12
2.2.2. Anzucht und Zellernte .....	15
2.2.3. Stammhaltung .....	15
2.2.4. Reinheitskontrolle .....	16
<b>2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA</b> .....	16
2.3.1. Isolierung von DNA .....	16
2.3.1.1. Analytische Megaplasmidisolierung .....	16
2.3.1.2. Mikroplasmidpräparation .....	17
2.3.1.3. Minipräparation von Plasmid-DNA .....	17
2.3.1.4. Plasmidisolierung mittels <i>QIAprep Spin</i> Säulen .....	17
2.3.2. Standard-DNA-Techniken .....	18
2.3.2.1. Agarosegel-Elektrophorese .....	18
2.3.2.2. DNA-Größenstandards .....	18
2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung .....	18
2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	19
2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Phenol-Extraktion und Fällung ..	19
2.3.2.6. Reinigung von DNA durch Mikrodialyse .....	19
2.3.2.7. Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels <i>QIAquick PCR Purification Kit</i> ..	19
2.3.2.8. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels <i>QIAquick Gel</i> <i>Extraction Kit</i> .....	20
2.3.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten .....	20
2.3.2.10. Ligation von DNA mit dem <i>Rapid DNA Ligation Kit</i> .....	20
2.3.2.11. Transformation nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode .....	20
2.3.2.12. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation .....	21
2.3.2.13. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> - Klone .....	21
2.3.2.14. Plasmidtransfer durch Konjugation .....	21
2.3.2.15. Selektion von Rekombinanten .....	22
2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	22
2.3.3.1. Auswahl der <i>Primer</i> .....	22
2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	26

2.3.3.3. <i>Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis-PCR</i> .....	27
2.3.4. DNA-Sequenzierung.....	27
2.3.4.1. Sequenzierung mit dem <i>SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™</i> .....	27
2.3.4.2. Sequenzierung unter Verwendung des <i>dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits</i> .....	28
2.3.4.3. Das Sequenziergel.....	29
2.3.4.4. Auswertung von Sequenzdaten.....	29
<b>2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung</b> .....	<b>30</b>
2.4.1. Herstellung der Sonden.....	30
2.4.1.1. Synthese von DNA-Fragmenten.....	30
2.4.1.2. Digoxigenin-Markierung der Sonden.....	30
2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards.....	30
2.4.3. DNA:DNA-Hybridisierung.....	30
2.4.3.1. Gelelektrophorese und <i>DNA-Blotting</i> .....	30
2.4.3.2. Hybridisierung.....	31
2.4.4. Chemilumineszenz-Nachweis.....	31
<b>2.5. Versuche zum Zellwachstums</b> .....	<b>32</b>
2.5.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien.....	32
2.5.1.1. Das <i>Klett-Summerson-Colorimeter</i> .....	32
2.5.1.2. Zellanzucht von <i>R. metallidurans</i> -Stämmen bei Wachstumsversuchen.....	32
2.5.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Schwermetallsalzen.....	32
<b>2.6. Enzymologische Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.6.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	33
2.6.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte.....	33
2.6.1.2. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	33
2.6.2. Topologie-Untersuchung von Protein-Carboxytermini.....	34
2.6.3. Glutathion-Messungen.....	35
<b>2.7. Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.7.1. Analytische T7-Expression und radioaktive Markierung von Proteinen mit [ $^{35}$ S]-Methionin.....	36
2.7.2 Protein-Expression und -Reinigung über das <i>IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System</i> .....	36
2.7.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte.....	37
2.7.2.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Membranproteinfraktionen.....	37

2.7.2.3. Native Proteinreinigung über Chitin - Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins .....	38
2.7.3. Protein-Expression und -Reinigung über das <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> <i>Protein Purification System</i>	38
2.7.3.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte .....	38
2.7.3.2. Native Proteinreinigung mittels Streptactinchromatographie .....	39
2.7.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	39
2.7.4.1. Proteinbestimmung von Membranproteinen .....	39
2.7.4.2. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm .....	40
2.7.4.3. Analyse von Sekundärstrukturen mittels Circular Dichroismus .....	40
2.7.5. Elektrophoretische Methoden .....	40
2.7.5.1. Probenvorbereitung .....	40
2.7.5.2. Protein Marker .....	40
2.7.5.3. SDS-PAGE .....	41
2.7.5.4. SDS-Tricin-PAGE .....	42
2.7.5.5. Native PAGE .....	43
2.7.5.6. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran .....	43
2.7.5.7. <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> Detektionssystem .....	44
2.7.5.8. Proteinnachweis durch Immunopräzipitation auf PVDF-Membranen .....	44
2.7.6. Färbung und Trocknung von PAA-Gelen .....	46
2.7.6.1. Coomassie-Färbung von Proteinen .....	46
2.7.6.2. Silberfärbung .....	46
2.7.6.3. Autoradiographie .....	46
2.7.7. <i>in vitro</i> Metallbindestudien .....	47
2.7.7.1. Tryptische Verdauung von CzcD .....	47
2.7.7.2. Modifikation von Cysteinen mittels DTNB (Dithionitrobenzoesäure) .....	48
2.7.7.3. Modifikation von Histidinen mittels DEPC (Diethylpyrocarbonat) .....	48
2.7.7.4. Regeneration von modifizierten Histidinen mittels HA (Hydroxylamin) .....	48
2.7.7.5. Gelshiftexperimente mittels Nativer PAGE .....	48
2.7.7.6. Bindung von CzcD an <i>Metal chelating sepharose</i> .....	49
2.7.7.7. Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) .....	49
2.7.8. <i>In vitro</i> -Vernetzungsexperimente .....	49
2.7.8.1. Tris-2,2'-bipyridylruthenium(II)chlorid .....	49
2.7.8.2. Glutaraldehyd .....	50
2.7.8.3. Formaldehyd .....	50
<b>2.8. Transportstudien mit radioaktiven Metallisotopen .....</b>	<b>50</b>
2.8.1. Vesikelpräparation .....	50
2.8.2. Nachweis eines künstlichen pH-Gradienten durch Fluoreszenzlöschung .....	51

2.8.3. Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen .....	51
<b>2.9. Kristallisation von CzcD</b> .....	<b>52</b>
<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1. Eine <math>\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})</math> Operon-Fusion zur Untersuchung induktiver Ereignisse</b> ... 53	
3.1.1. Die Induktion der $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ Operon-Fusion erfolgt durch Zink, Kobalt und Kadmium.....	53
3.1.2. Die Induktion der $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ Operon-Fusion erfolgt nur durch die Schwermetallionen $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ und $\text{Cd}^{2+}$ .....	56
<b>3.2. Deletionsmutanten der regulatorischen Genbereiche</b> .....	<b>57</b>
3.2.1. Die Deletionen der Gene der DRR ( <i>downstream regulatory region</i> ) zeigten nur geringe Effekte auf die <i>czc</i> -vermittelte Resistenz .....	59
3.2.2. Einfluss der Deletionen regulatorischer Gene auf die Induktion der <i>czc</i> -Strukturgene in DN175[pMOL30-9, $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ ] .....	60
3.2.3. CzcD reprimiert die Expression der <i>czc</i> -Determinante .....	62
<b>3.3. Welche Aktivität zeigt CzcD?</b> .....	<b>63</b>
3.3.1. CzcD vermittelt erhöhte Zink-Resistenz im sensitiven <i>E. coli</i> GG48 .....	63
3.3.2. Worauf beruht die durch CzcD vermittelte Resistenz?.....	64
3.3.3. Aspartate innerhalb des transmembranen Kanals sind am Transport beteiligt .....	67
<b>3.4. Reinigung des Membranproteins CzcD</b> .....	<b>69</b>
3.4.1. Das Impact <sup>®</sup> -Expressionssystem ist ungeeignet, um CzcD zu reinigen.....	69
3.4.2. Das CzcD Protein konnte mittels des <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> -Systems mit guter Ausbeute gereinigt werden .....	71
<b>3.5. Nachweis des nativen CzcD-Proteins durch Western-Blot</b> .....	<b>73</b>
<b>3.6. Wie ist CzcD in der Lage, Metalle zu binden?</b> .....	<b>74</b>
3.6.1. Drei Domänen von CzcD werden durch Zink und Kobalt vor dem Verdau durch Trypsin geschützt.....	74
3.6.2. Cystein291 ist für die chemische Modifikation durch DTNB zugänglich.....	75
3.6.3. Bindung von divalenten Metall-Kationen an CzcD.....	76
3.6.4. Die Metallbindung von CzcD erfolgt über die im Protein vorhandenen Histidine .....	78
3.6.5. CzcD bindet 2-3 Zink-Atome.....	79
3.6.6. Die lösliche, zytoplasmatische Domäne bindet Metalle <i>in vitro</i> .....	79
3.6.7. Mindestens zwei der sieben Histidine in der löslichen Domäne sind in die Metallbindung involviert.....	81
<b>3.7. Welche Struktur weist CzcD <i>in vitro</i> auf?</b> .....	<b>81</b>
3.7.1. CzcD ist ein Protein mit eindeutig $\alpha$ -helikalen Strukturen .....	81
3.7.2. CzcD neigt zur Bildung einer oligomeren Struktur .....	82
3.7.3. Unter Einfluss chemischer Vernetzer wird das potentielle Dimer bevorzugt gebildet... 83	
3.7.4. Erste Schritte, eine dreidimensionale Struktur von CzcD zu erhalten.....	85

---

<b>3.8. Untersuchung der weiteren Regulatoren der <i>czc</i>-Determinante</b> .....	86
3.8.1. <i>czcR</i> , <i>czcS</i> , <i>czcE</i> , <i>czcN</i> und <i>czcI</i> ließen sich mittels T7-Expression als Proteine nachweisen.....	86
3.8.2. CzcE und CzcI sind im Periplasma lokalisiert.....	88
<b>3.9. Zwei chromosomal kodierte P-Typ-ATPasen vermitteln in <i>R. metallidurans</i> AE104     Schwermetallresistenz</b> .....	91
3.9.1. <i>R. metallidurans</i> verfügt über Glutathion als intrazellulären Chelator.....	94
<b>IV. Diskussion</b> .....	95
<b>4.1. Membrangebundene Efflux-Komplexe und ihre regulatorischen Netzwerke</b> .....	95
<b>4.2. Die Regulation der <i>czc</i>-Determinante</b> .....	98
4.2.1. <i>czcN</i> , <i>czcI</i> und <i>czcE</i> - Gene mit unbekanntem Funktionen!.....	98
4.2.2. Was wird vom Zweikomponentensystem CzcR und CzcS reguliert?.....	102
<b>4.3. CzcD - die zentrale Homöostasepumpe in der Regulation der <i>czcCBA</i>-Expression?</b> ..	106
4.3.1. Die CDF-Proteinfamilie.....	106
4.3.2. CzcD: ein Transportprotein mit regulatorischen Funktionen.....	110
4.3.3. CzcD – Transport durch die PMF ( <i>Proton-Motiv-Force</i> ).....	113
4.3.4. Die Bindung von Schwermetallionen an CzcD.....	118
4.3.5. CzcD – ein Modell.....	123
<b>4.4. Ausblick und weiterführende Experimente</b> .....	125
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	127
<b>VI. Literaturverzeichnis</b> .....	129

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP-Binding Cassette Transporter</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger AS-Rest
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CCCP	Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> (Familie von Transportproteinen)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDP- <i>Star</i> <sup>™</sup>	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cpm	<i>counts per minute</i>
CY5	Fluoresceinmarkierung
d	Tag(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRR	<i>Downstream Regulatory Region</i> (Regulatorgen-Region, stromabwärts)
DSP	Dithiobis-(succinimidylpropionat) (auch Lomant's Reagenz genannt)
DTNB	Dithionitrobenzoesäure

---

DTT	Dithioeritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fluoresceinmarkierung
FCCP	Carbonylcyanid (p-trifluoromethoxy)phenylhydrazon
G	Guanin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	doppelt destilliert (Reinstwasser)
HA	Hydroxylamin
I <sub>max</sub>	maximale Stromstärke
ind.	induziert
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
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> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messengerRNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger AS-Rest
NA	Nähragar
NB	Nährbouillon
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OM	<i>Outer Membrane</i> (äußere Membran)
OMF	<i>Outer Membrane Factor</i> (Proteinfamilie)
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PEP	<i>Periplasmic Efflux Proteins</i> (Proteinfamilie)

---

pers.	persönliche (Mitteilung)
PMF	<i>Protonen Motive Force</i> (protonenmotorische Kraft)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
PP	Periplasma
PPO	2,5-Diphenyloxazol (Szintillator)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
RBS	Ribosomenbindestelle
RGR	Regulatorgen-Region
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RND	<i>Resistance, Nodulation, Cell Division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>Rotations Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	<i>Signal Anchor</i> (topogenes Signal)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGR	Strukturgen-Region
sol.	solubilisiert
spez.	spezifisch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TB	Terrific Broth
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-HCl/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TMS	transmembranes Segment
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U <sub>max</sub>	maximale Spannung
unind.	uninduziert
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Regulatorgen-Region, stromaufwärts)
UV	ultraviolett
Vers.	Version (des Computerprogramms)
VIS	<i>Visible</i> (sichtbares Licht)
Vol.	Volumen
vorink.	vorinkubiert

---

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
X-P	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (auch BCIP genannt)
z. B.	zum Beispiel
ZP	Zytoplasma
ZPM	Zytoplasmamembran
z. Z.	zur Zeit

## Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

## **I. Einleitung**

Vor kurzem wurde im australischen Pilbara-Krater eine der ältesten Gesteinsschichten entdeckt, die auf mikrobiologischen Aktivitäten basiert. Die Verursacher waren möglicherweise Zellen, die vor ca. 3.2 Milliarden Jahren in großer Tiefe und in einem Bereich hoher vulkanischer Aktivität lebten. Die Anwesenheit sogenannter *black smoker* Kamine, unterseeischer Vulkane, verursachte in diesen Tiefen eine hohe Konzentration toxischer Schwermetalle (Rasmussen, 2000).

Bereits früh in der Evolution des Lebens auf der Erde waren hohe Schwermetallkonzentrationen in der Umgebung eine Herausforderung an die jungen Lebewesen. Dieser Selektionsdruck hat dann auch zur Entwicklung verschiedenster Mechanismen der Schwermetallhomöostase und Detoxifikation geführt (Gatti *et al.*, 2000).

Schwermetalle haben aufgrund ihrer starken Bindung an schwache Lewis-Basen in Form von Sulfhydryl- oder Imidazol-Gruppen wichtige biologische Funktionen als Kofaktoren in enzymatischen Reaktionen. Diese Komplex-Bindung ist allerdings auch einer der Gründe für die Toxizität dieser Elemente (Gatti *et al.*, 2000).

Zur Verringerung der Entropie in einem biologischen System war die Abgrenzung vom Außenmedium notwendig. Durch die Entstehung von biologischen Membranen, die nicht permeabel für geladene Substanzen und größere Moleküle sind, konnte eine klare Abtrennung der Zellen vom Außenmedium vollzogen werden (Nikaido & Saier, 1992). Exogene Substanzen sind jedoch für jeden Stoffwechsel essentiell. Deshalb müssen Transport über diese neu entstandene Barriere und Metabolismus eng miteinander gekoppelt sein (Saier, 2000).

Für diesen Transport über Membranen sind in der Regel Proteine notwendig, die spezifisch Substanzen aus der Umgebung in den zytoplasmatischen Raum transportieren (Saier, 2000). Besonders deutlich sichtbar ist diese Problematik bei der gezielten Aufnahme und dem aktivem Efflux von Schwermetallionen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ . Auf der einen Seite sind sie als Spurenelemente essentielle Kofaktoren für Enzyme, auf der anderen Seite führt ein Überangebot an Schwermetallionen aber auch zu toxischen Zuständen innerhalb der Zelle (Nies, 1999).

Der erste Schritt, den die Zelle regulieren muss, ist die Aufnahme der Ionen. Die strukturelle Ähnlichkeit vieler Übergangsmetalle ist dabei ein entscheidendes Problem. Viele Schwermetallionen verfügen über eine divalent positive Ladung [Ausnahmen  $Ag^+$ ,  $Cu^+$  (in der Zelle),  $Fe^{3+}$  (außerhalb der Zelle),  $Cr^{5+}$ ] und einen ionischen Durchmesser von 138 pm bis 160 pm (Weast *et al.*, 1984). Eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Ionen würde die Zelle aufgrund sehr enger und hochaffiner Bindung an das entsprechende Transportsystem sehr viel Zeit und Energie kosten. Durch die Expression von zwei unabhängigen Aufnahmesystemen wird dieses Problem gelöst. Ein unspezifisches System wird konstitutiv mit einem weiten Substratspektrum exprimiert. Ein weiteres, hochaffines System wird spezifisch unter Mangelbedingungen aktiviert (Nies, 1999).

Mehrere spezifische Aufnahmesysteme sind in den letzten Jahren beschrieben worden, die unter Mangelbedingungen exprimiert werden (Westernberg & Guerinot, 1997). Diese Transporter

gehören unter anderem zur Gruppe der ABC-Transporter (*ATP-Binding Cassette Transporter*). Ein Beispiel hierfür ist das ZnuABC-System aus *Escherichia coli* (Patzner & Hantke, 1998; Patzner & Hantke, 2000), das spezifisch  $Zn^{2+}$  in die Zelle transportiert. Neben  $Mn^{2+}$ , das durch MntABC in *Bacillus subtilis* (Que & Helmann, 2000) und TroABC in *Treponema pallidum* (Lee *et al.*, 1999) aufgenommen wird, wurde auch ein Proteinkomplex für den spezifischen Transport von  $Ni^{2+}$ -Ionen, das NikABC-System aus *E. coli* (Wu *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1993; Eitinger & Mandrand-Berthelot, 2000), beschrieben. Ein weiterer ABC-Transporter FeoABC katalysiert in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* die Aufnahme des biologisch schwer zugänglichen Eisens (Kammler *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996). Vor kurzem wurde ein weiteres Eisenaufnahmesystem, das YfuABC-System in *Yersinia pestis*, identifiziert (Gong *et al.*, 2001).

Im Fall von Kupfer konnten bisher nur wenige putative Systeme gefunden werden, die spezifisch für die Aufnahme verantwortlich sein sollen. Ein beschriebenes Kupferaufnahmesystem ist eine P-Typ-ATPase, CopA aus *Enterococcus hirae* (Odermatt *et al.*, 1993; Wunderli-Yet & Solioz, 2001). Bei ABC-Transportern und P-Typ-ATPasen ist die Spaltung von ATP die treibende Kraft zur Aufnahme von Metallen (Nies & Silver, 1995).

Neben den primären Transportern gibt es auch Beispiele für chemiosmotisch getriebene Aufnahmesysteme. Die Vertreter der NiCoT-Proteinfamilie (Saier *et al.*, 1999b) katalysieren den Transport von Nickel und Kobalt. Der am besten charakterisierte Vertreter dieser Systeme ist HoxN aus *Ralstonia eutropha* (Eitinger *et al.*, 1997), ein Aufnahmesystem für Nickel, das eine hohe Affinität, aber auch eine geringe Transportleistung aufweist (Degen *et al.*, 1999). Während Aufnahmesysteme der ZIP-Familie (*ZRT/IRT like protein*) in Eukaryoten bereits in vielen Beispielen beschrieben wurden (Zhao & Eide, 1996a; Zhao & Eide, 1996b; Grotz *et al.*, 1998; Gitan & Eide, 2000; Guerinot, 2000; MacDiarmid *et al.*, 2000; Gaither & Eide, 2001a; Rogers *et al.*, 2001; Vert *et al.*, 2001), ist bisher nur von Grass *et al.* (2001d) ZupT aus *E. coli* als prokaryotischer Vertreter benannt, der neben Zink auch Kupfer transportiert.

Unter „normalen“ Bedingungen, nicht Mangelbedingungen, gelangen die Schwermetalle hauptsächlich durch das CorA-System in die Zelle (Nelson & Kennedy, 1971; Smith *et al.*, 1995; Smith & Maguire, 1998). CorA, das konstitutiv exprimierte Aufnahmesystem für  $Mg^{2+}$  in vielen bakteriellen Systemen, verfügt über ein weites Substratspektrum, das neben  $Mg^{2+}$  auch  $Ni^{2+}$  und  $Co^{2+}$  umfasst (Snavelly *et al.*, 1989). Inwieweit  $Zn^{2+}$  unter diesen Bedingungen in die Zelle gelangt, ist bisher weitgehend unklar. Snavelly *et al.* (1989) beschrieben, dass der Transport von Magnesium durch das CorA-System nicht durch Zink inhibiert wird. Nies und Silver (1989) zeigten aber im Gegensatz dazu die schnelle, unspezifische Aufnahme von Zink durch ein Magnesium-Aufnahmesystem in *Ralstonia metallidurans* CH34. Weitere Magnesium-Aufnahmesysteme wurden beschrieben, die möglicherweise Zink unspezifisch in die Zelle transportieren. MgtE, ein nicht ubiquitär verbreiteter chemiosmotischer Transporter aus *Providencia stuartii*, transportiert neben Magnesium auch Kobalt, aber kein Nickel, Mangan, Kalzium oder Zink (Smith *et al.*, 1995; Moncrief & Maguire, 1999). Neben den genannten Systemen gibt es noch MgtA und MgtB,  $Mg^{2+}$ -transportierende P-Typ-ATPasen, die auch für die Aufnahme von Zink in *Salmonella typhimurium* verantwortlich sein könnten (Snavelly *et al.*, 1989;

Snavely *et al.*, 1991a; Snavely *et al.*, 1991b; Townsend *et al.* 1995; Tao *et al.*, 1998). Allerdings wird nur die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme über MgtA durch Zink inhibiert, die Transportaktivität vom MgtB bleibt durch Zink unbeeinflusst (Moncrief & Maguire, 1999).

Es gibt in letzter Zeit auch Hinweise auf weitere Systeme, über die Schwermetalle in die Zelle aufgenommen werden können. Die wichtigste Rolle spielen hierbei Phosphataufnahmesysteme, wobei das Pit-System aus *E. coli* am besten charakterisiert ist. Neben dem Transport von  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$  als neutrale  $MeHPO_4$ -Komplexe (Van Veen *et al.*, 1994) konnte inzwischen auch die Aufnahme von  $Zn^{2+}$  durch das PitA-Protein experimentell bestätigt werden (Beard *et al.*, 2000). Ein Pit homologes System aus *Bacillus subtilis*, CysPTWA, kodiert für ein Sulfataufnahmesystem, das in den Transport von Chromat in die Zelle involviert sein könnte (Mansilla & Mendoza, 2000).

Die wichtige Rolle von Magnesium und Phosphat im Metabolismus ist der entscheidende Faktor, warum unspezifische Aufnahmesysteme wie CorA und das Pit-System konstitutiv exprimiert werden. So führt eine Unterversorgung mit Magnesium zum Zerfall der Ribosomen, die Zellwände werden instabil, und in vielen Fällen fehlt das Magnesium als Kofaktor im ATP-Pool der Zelle (Smith & Maguire, 1998). Dieser ständige Zufluss von Metallen und von Phosphat/Sulfat ist also für die Zelle so notwendig, wie er schädlich sein kann. Dieses „open gate“ führt sehr schnell zur Akkumulation der beschriebenen Schwermetallionen, sobald diese in hohen Konzentrationen in der Umgebung auftauchen (Nies, 1999). Outten & O'Halloran beschrieben die Gradwanderung einer Zelle in Bezug auf die Regulation der Zinkhomöostase anhand der beiden Regulatoren für Mangel- bzw. Stresssituationen in *E. coli*, Zur und ZntR. Sie zeigen, dass sich die regulatorische Balance dieser beiden Zustände in der Zelle anhand des „freien“ Zinks nur im femtomolaren Bereich bewegt (Outten & O'Halloran, 2001).

Doch wie schützt sich eine Zelle vor der ständigen Gefahr, das eigene Zytoplasma durch unkontrollierte Aufnahme von Schwermetallen zu vergiften? Mutationen in den Aufnahmesystemen wie z.B. CorA erhöhen zwar die Schwermetalltoleranz, jedoch sind die resultierenden Mutanten aufgrund ihrer verringerten Vitalität gegenüber Revertanten unterlegen und dadurch evolutionär ohne Bedeutung (Nelson & Kennedy, 1971; Park *et al.*, 1976; Nies, 1999). Auch der Einsatz extrazellulärer Chelatoren wie z.B. von Polysacchariden in *Neurospora crassa* verhindert die Aufnahme von Schwermetallionen (Germann & Lerch, 1987). Für *Ralstonia metallidurans* wird ebenfalls die Exkretion extrazellulärer, zuckerhaltiger Polymere unter Schwermetallstress beschrieben, die die biologische Verfügbarkeit von Metallen senken (Diels *et al.*, 1995). Inwieweit es sich jedoch um einen gezielten Abwehrmechanismus handelt, wurde bisher nicht näher untersucht.

Erreichen die Schwermetallionen das Zytoplasma, gibt es zwei Möglichkeiten, wie sich die Zelle vor toxischen Effekten schützen kann. Neben der Komplexierung von Ionen kann nur aktiver Efflux die Konzentrationen zytoplasmatischer Schwermetallionen senken. Dabei kann auch die Änderung des Redoxzustandes des Schwermetalls zu einer weniger toxischen Form und die Komplexierung des Metalls in Verbindung mit aktivem Efflux die intrazelluläre Schwermetallionenkonzentration verringern (Dameron & Harrison, 1998; Nies, 1999). Aufgrund

der hohen Affinität von Schwermetallen zu Sulfhydryl-Gruppen werden die meisten Schwermetalle in Gram-negativen Bakterien intrazellulär an Glutathion oder Metallothioneine gebunden. Aber auch die Komplexbildung von Schwermetallen in Form von Polyphosphaten wird diskutiert (Keasling & Hupf, 1996; Boswell *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2000). Die Rolle von Glutathion in der Schwermetallresistenz ist jedoch noch unklar. Neben einer protektiven Wirkung, die nur durch Glutathion erhalten werden soll (Hultberg, 1998), wird auch der hohe oxidative Stress diskutiert, der durch die Bindung von Schwermetallen an Glutathion entsteht (Kachur *et al.*, 1998; Nies 1999). Allerdings wurde gezeigt, dass Schwermetall-Glutathion-Komplexe als Substrat für die P-Typ-ATPase ZntA aus *E. coli* dienen und Schwermetallionen in Anwesenheit von Thiolen besser transportiert werden (Sharma *et al.*, 2000). Metallothioneine, kleine cysteinreiche Proteine, wurden in einigen Bakterien beschrieben (Turner *et al.*, 1993; Turner & Robinson, 1995; Silver & Phung, 1996), jedoch ist der Energieaufwand, diese Proteine zu synthetisieren, für die Zelle immens. Da zusätzlich die Speicherkapazität einer Bakterienzelle beschränkt ist, und es keine Kompartimentierung und Lagerung in Organellen wie z.B. in *S. cerevisiae* gibt, kann die Antwort auf Schwermetallstress in Bakterien letztendlich nur Efflux sein (Silver & Phung, 1996; Nies, 1999; Nies, 2000).

Eine Ausnahme bildet hierbei lediglich das Schwermetall Quecksilber. Die  $Hg^{2+}$ -Ionen gelangen über ein spezifisches Aufnahmesystem MerP und MerT in die Zelle (Misra *et al.*, 1984; Walsh *et al.*, 1988). Dort werden diese Ionen von der Quecksilberreduktase MerA vom  $Hg^{2+}$  zum  $Hg^0$  reduziert. Aufgrund des niedrigen Dampfdruckes von elementarem Quecksilber diffundiert  $Hg^0$  über die Membranen aus dem Zellinneren (Morby *et al.*, 1995; Hobman & Brown, 1996; Wilson *et al.*, 2000).

Die Aufrechterhaltung der Schwermetallhomöostase durch aktiven Efflux senkt die intrazelluläre Schwermetallionenkonzentration und stellt ein Gleichgewicht von Aufnahme und Efflux ein (Silver & Phung, 1996). Eine wichtige Rolle kommt hierbei den P-Typ-ATPasen vom CPx-Typ (Solioz & Vulpe, 1996) bzw. der Klasse IB (Axelsen & Palmgren, 1998) zu. Diese Proteine nutzen die hydrolytische Spaltung von ATP, um spezifisch Schwermetalle aus dem Zytoplasma ins Periplasma zu transportieren (Rensing *et al.*, 1999; Gatti *et al.*, 2000). Die am besten charakterisierten Vertreter dieser Proteinfamilie sind CadA aus *Staphylococcus aureus* (Tsai *et al.*, 1992), CopA aus *E. coli* (Rensing *et al.*, 2000), CopB aus *Enterococcus hirae* (Solioz & Odermatt, 1995) und ZntA aus *E. coli* (Rensing *et al.*, 1997b; Rensing *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2000).

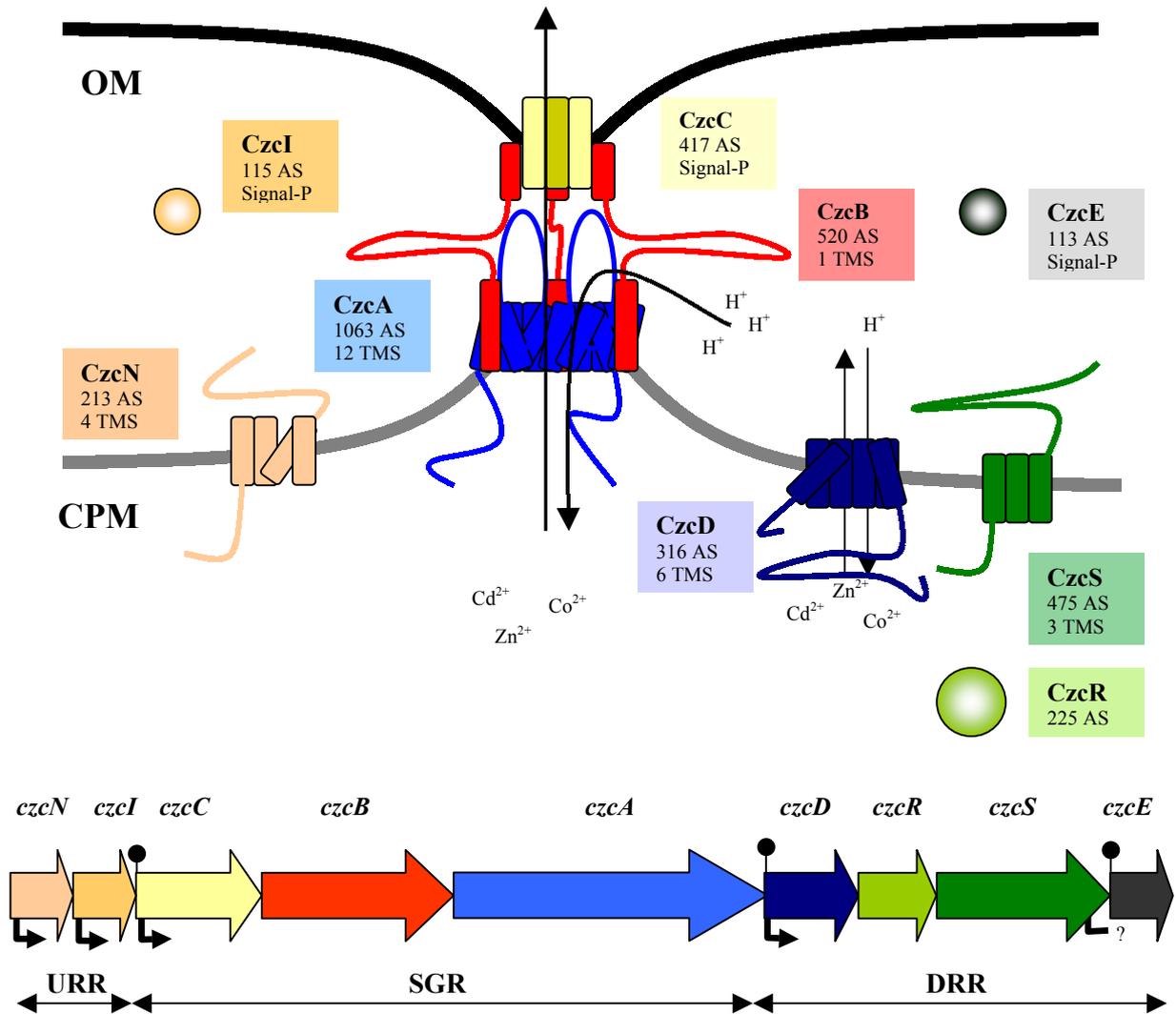
Eine weitere Proteinfamilie, die in die Schwermetallhomöostase involviert ist, ist die CDF-Proteinfamilie (Cation Diffusion Facilitator). Es handelt sich um chemiosmotische Transporter, die bisher in allen lebenden Organismen mit sehr divergenten Funktionen, aber immer als Metalltransporter gefunden werden konnten (Nies, 1992b; Nies & Silver, 1995; Paulsen & Saier, 1997). Eine dritte Proteingruppe, die durch die *Proton Motive Force* (PMF) angetrieben wird, ist die RND-Protein-Familie (Resistance Nodulation and Cell Division) (Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1999; Tseng *et al.*, 1999). Die Vertreter dieser Proteingruppe vermitteln in einem membrangebundenen Komplex verschiedene Schwermetallresistenzen wie z.B. die Kobalt/Zink/Kadmium-Resistenz (*czc*) (Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989b; Nies & Silver, 1989)

und die Kobalt/Nickel-Resistenz (*cnr*) (Sidiqi *et al.*, 1988; Sidiqi *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993; Grass *et al.*, 2000). Der Efflux-Komplex, der für die vollständige Ausbildung der Resistenz notwendig ist, wird zusammen mit den Proteinen zweier weiterer Proteinfamilien, den MFP (*Membrane Fusion Protein*) (Dinh *et al.*, 1994; Saier *et al.*, 1994; Zgurskaya & Nikaido, 2000) und den OMF (*Outer Membrane Factor*) (Paulsen *et al.*, 1998) gebildet. In vielen Fällen werden von Bakterien verschiedene Resistenzsysteme kombiniert bzw. Transporter werden unter unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert.

Als Prototyp eines schwermetallresistenten Bakteriums wurde in dieser Arbeit *Ralstonia metallidurans* CH34 (Brim *et al.*, 1999; Mergeay, 2000; Goris *et al.*, 2001) verwendet. *R. metallidurans* ist ein Gram-negatives Wasser- und Bodenbakterium, das über ein großes Netzwerk verschiedenster Schwermetallresistenzen verfügt. Isoliert wurde dieses Bakterium 1974 aus einem Zink-Dekantationstank einer Zinkhütte in Belgien, also unter Umweltbedingungen, unter denen die Ausbildung oder der Erwerb verschiedenster Resistenzmechanismen z. B. durch horizontalen Gentransfer essentiell für das Überleben war (Mergeay *et al.*, 1978). Erst nach vollständiger Sequenzierung des bakteriellen Genoms wurde klar, über welche Vielzahl von Schwermetallresistenzen bzw. Homöostase-Determinanten *R. metallidurans* verfügt ([http://spider.jgi-psf.org/JGI\\_microbial/html/ralstonia/ralston\\_homepage.html](http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/ralstonia/ralston_homepage.html)).

Dabei befinden sich die verschiedensten Determinanten, von denen bisher acht näher charakterisiert worden sind, auf allen genetischen Elementen. *R. metallidurans* CH34 verfügt neben dem bakteriellen Chromosom über zwei zusätzliche Megaplasmide pMOL30 (238 kb; Mergeay *et al.*, 1985) und pMOL28 (180 kb; Taghavi *et al.*, 1997). Auf dem kleineren der beiden Megaplasmide pMOL28 (180 kb) befinden sich drei Resistenz-Determinanten. Die *chr*-Determinante (Nies *et al.*, 1989a; Nies *et al.*, 1990; Peitzsch 1999) mit den Genen *chrA*, *chrB* und *chrC* vermittelt eine erhöhte Resistenz gegenüber Chromat. Stromaufwärts von *chr* befindet sich eine zweite Schwermetallresistenz-Determinante: das *cnr*-Operon (Sidiqi *et al.*, 1988; Sidiqi *et al.*, 1989, Liesegang *et al.*, 1993; Grass *et al.*, 2000). Die Genprodukte von *cnrCBA* bilden einen membrangebundenen Efflux-Komplex, der erhöhte Resistenz gegenüber Kobalt und Nickel vermittelt (Liesegang *et al.*, 1993). Die Strukturgene werden stromaufwärts von den regulatorischen Genen *cnrYXH* begrenzt, die einen Sigma-Antisigmafaktor-Komplex bilden (Grass *et al.*, 2000; Grass *et al.*, 2001a). Neben den beiden genannten Resistenzen gibt es auch eine Quecksilber-Resistenz *mer* auf pMOL28 (Diels *et al.*, 1985).

Eine weitere Quecksilberresistenz ist auf pMOL30 zu finden (Diels *et al.*, 1985). Außerdem sind auch Resistenzen gegen  $Pb^{2+}$ -Ionen *pbr* (Corbisier *et al.*, 1999, Borremans *et al.*, 2001) und  $Cu^{2+}$ -Ionen *cop* (Dressler *et al.*, 1991) beschrieben. In Homologie zur *cnr*-Determinante auf pMOL28 gibt es auf pMOL30 eine strukturell ähnliche Determinante (Silver & Phung, 1996), die allerdings Resistenz gegenüber Kobalt, Zink und Kadmium vermittelt, die *czc*-Determinante (Abb. 1.; Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989b). Eine dritte Quecksilber-Resistenz befindet sich auf dem Chromosom (Dressler *et al.*, 1991).



**Abb. 1: *czc*-Determinante aus *R. metallidurans* CH34 mit Lokalisation der einzelnen Proteine des Resistenzsystems**

Die *czc*-Determinante vermittelt Resistenz gegen  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  (*czc*) über einen membrangebundenen Effluxkomplex, der durch CzcCBA gebildet wird. Neben der Strukturgenregion, die für CzcCBA kodiert, gibt es zwei akzessorische Genbereiche: die *Upstream Regulatory Region* (URR) und die *Downstream Regulatory Region* (DRR). Die URR kodiert für CzcN, ein membrangebundenes Protein, und CzcI, ein periplasmatisch lokalisierter Regulator. Die DRR kodiert für CzcD eine weitere Homöostase-Pumpe, die unabhängig Schwermetalle über die Zytoplasmamembran transportiert. CzcR und CzcS bilden ein Zweikomponentensystem mit CzcS als Histidinkinase und CzcR als Response-Regulator. Ein weiteres Protein unbekannter Funktion bildet CzcE, welches im Periplasma lokalisiert ist. Durch Pfeile in Transkriptionsrichtung werden Promotoren gekennzeichnet. Durch • werden Terminatoren dargestellt.

Auf die *czc*-Determinante, eines der zentralen Forschungsprojekte unserer Arbeitsgruppe, soll im Folgenden näher eingegangen werden. Die Kobalt/Zink/Kadmium-Resistenzdeterminante besteht aus mindestens neun Genen. Die Determinante unterteilt sich in drei Bereiche: die *Strukturgenregion* (SGR), *Downstream Regulatory Region* (DRR) und *Upstream Regulatory Region* (URR). Der membrangebundene Efflux-Komplex CzcCBA wird von der SGR kodiert. Der Komplex setzt sich dabei aus den Proteinen CzcA, der zentralen Pumpe, die als Protonen/Kationen-Antiporter fungiert (Nies, 1995; Goldberg *et al.*, 1999), dem MFP CzcB (Rensing *et al.*, 1997a) und dem OMF CzcC (Diels *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 1997a) zusammen. Durch den Gesamtkomplex werden die Schwermetallionen mittels des *Transenvelope*-Transports

über beide Membranen aus dem Zytoplasma direkt ins Außenmedium geschleust (Saier *et al.*, 1994).

Die URR kodiert für die Gene *czcN* und *czcI* und die DRR für die Gene *czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE*. Alle regulatorischen Gene werden in gleicher Orientierung wie die Strukturgenregion transkribiert (Große *et al.*, 1999). Den beiden Genprodukten der URR CzcN (Schmidt & Schlegel, 1994; Diels *et al.*, 1995) und CzcI (Diels *et al.*, 1995, Große *et al.*, 1999) konnten bisher allerdings keine eindeutigen Funktionen zugeordnet werden.

Neben CzcA gibt es eine zusätzliche Schwermetall-Homöostase-Pumpe CzcD, die von der DRR kodiert wird. Als einer der ersten beschriebenen Vertreter der CDF-Proteinfamilie (*Cation Diffusion Facilitator*) (Nies, 1992b; Paulsen & Saier, 1997) vermittelt CzcD eine geringe Schwermetallresistenz und beeinflusst dadurch auch die Induktion des CzcCBA-Efflux-Komplexes (Anton *et al.*, 1999). CzcR und CzcS bilden ein Zwei-Komponentenregulationssystem mit CzcS als Histidinkinase und CzcR als *Response*-Regulator (van der Lelie *et al.*, 1997; Große *et al.*, 1999). CzcR bindet an den *czcNp*-Promotor und aktiviert dabei möglicherweise die Expression des CzcCBA-Efflux-Komplexes (Große *et al.*, 1999). Stromabwärts von *czcS* findet sich ein weiterer ORF, *czcE* (früher ORF 131). CzcE weist eine eindeutig periplasmatische Lokalisation auf und zeigt eine Homologie zu CopH, ein Protein der Kupferresistenzdeterminante *copRSABCDGHI* aus *R. metallidurans* (Mergeay, 2000). Die Rolle von CzcE in der Regulation der *czc*-vermittelten Resistenz ist bisher ebenfalls noch unklar. Allerdings wird die Proteinexpression durch Zink induziert (Große, pers. Mitteilung). Das Protein ist in der Lage, *in vitro* verschiedene Schwermetalle zu binden (Hoffmann, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Ergebnisse über die Regulation der *czc*-Determinante vor (Große *et al.*, 1999). Aufgrund der hohen Anzahl putativer Regulatoren war es jedoch notwendig, einzelne Gene zu deletieren. Insbesondere sollte die Rolle von CzcD in der Regulation der Schwermetallhomöostase aufgeklärt werden.

Eine Grundvoraussetzung für die Bearbeitung von CzcD war die Etablierung eines Reinigungsprotokolls, mit dem das Protein heterolog gereinigt werden konnte. Um das Protein biochemisch zu charakterisieren, sollten verschiedene biochemische Methoden etabliert und angewandt werden. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit CzcD überhaupt in der Lage ist, Metalle zu binden und zu transportieren. Zusätzlich sollte auch die Energetisierung des Metalleffluxes geklärt werden und mittels chemischer *Crosslinker* versucht werden, etwas über die Struktur von CzcD auszusagen. Für weiterführende Experimente sollte damit begonnen werden, CzcD zu kristallisieren, um letztendlich seine dreidimensionale Struktur (als Erstem der CDF-Proteine) aufzuklären.

## II. Material und Methoden

### 2.1. Bakterienstämme und Plasmide

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

**Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide**

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Ralstonia metallidurans</i>			
AE104	plasmidfrei		Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN424	plasmidfrei	$\Delta$ -P-Typ-ATPase 649	diese Arbeit
DN425	plasmidfrei	$\Delta$ -P-Typ-ATPase 691	diese Arbeit
AE128	pMOL30	<i>czc</i> , <i>mer</i> , <i>cop</i> , <i>pbr</i>	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN432	pMOL30-38	$\Delta$ <i>czcA</i>	Stammsammlung Franke
DN430	pMOL30-38	Derivat von DN432; $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649	diese Arbeit
DN431	pMOL30-38	Derivat von DN432; $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691	diese Arbeit
DN428	pMOL30-14	Derivat von DN182; $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649	diese Arbeit
DN429	pMOL30-14	Derivat von DN182; $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691	diese Arbeit
DN426	pMOL30	Derivat von AE128; $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649	diese Arbeit
DN427	pMOL30	Derivat von AE128; $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691	diese Arbeit
DN175	pMOL30-9	$\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	Grosse <i>et al.</i> , 1999
DN182	pMOL30-14	$\Delta$ <i>czcD</i>	Anton <i>et al.</i> , 1999
DN178	pMOL30-10	$\Delta$ <i>czcR</i>	Grosse <i>et al.</i> , 1999
DN179	pMOL30-11	$\Delta$ <i>czcS</i>	Grosse <i>et al.</i> , 1999
DN191	pMOL30-22	$\Delta$ <i>czcE</i>	diese Arbeit
DN193	pMOL30-24	$\Delta$ <i>czcDRSE</i>	diese Arbeit
DN183	pMOL30-15	$\Delta$ <i>czcD</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	Anton <i>et al.</i> , 1999
DN180	pMOL30-12	$\Delta$ <i>czcR</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	Grosse <i>et al.</i> , 1999
DN181	pMOL30-13	$\Delta$ <i>czcS</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	Grosse <i>et al.</i> , 1999
DN194	pMOL30-25	$\Delta$ <i>czcDRSE</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	diese Arbeit
DN401	pMOL30-27	$\Delta$ <i>czcDR</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	diese Arbeit
DN403	pMOL30-29	$\Delta$ <i>czcDS</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	diese Arbeit
DN405	pMOL30-31	$\Delta$ <i>czcDE</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	diese Arbeit
DN407	pMOL30-33	$\Delta$ <i>czcRE</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	diese Arbeit
DN409	pMOL30-35	$\Delta$ <i>czcSE</i> , $\Phi$ ( <i>czcC-lacZ-BA</i> )	diese Arbeit

## Fortsetzung Tab. 1

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i>			
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac</i> [F', <i>proAB, lacI<sup>f</sup>ZΔM15, Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Bullock <i>et al.</i> , 1987, Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue MRF'	plasmidfrei	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB, lacIfZΔM15, Tn5 (Kanr)]$	Jerpseth <i>et al.</i> , 1993, Stratagene GmbH, Heidelberg
XL2-Blue	plasmidfrei	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac</i> [F', <i>proAB, lacI<sup>f</sup>ZΔM15, Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ), Amy, Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene GmbH, Heidelberg
JM83	plasmidfrei	<i>ara, \Delta(lac-proAB), rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ), $\phi 80, lacZ\Delta M15$	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BL21	pLys3	F <i>dcm, omp, hsdS, (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), lon<sup>-</sup>, gal<math>\lambda</math>, DE3, [pLysS, Cam<sup>r</sup>], Überexpressionsstamm für <i>Strep-tag II<sup>®</sup></i>-System</i>	Stratagene Europe, Amsterdam
ER2566	plasmidfrei	F $\lambda$ <i>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]</i> , T7-Expressionsstamm	New England BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
CC118	pGP1-2	<i>araD139, (ara-leu)7697, lacX74, recA1, rpsE, phoA20, galE15, galK16, thi, rpoB, argE</i> (Am), Stamm zur T7-Expression von Reporterfusionen (Kan <sup>r</sup> )	Manoil & Beckwith, 1985; Tabor & Richardson, 1985
K38	pGP1-2	HfrC, $\lambda, thi-1, leuB6, thr-1, supE44, tonA21$ , Wildtyp, T7-Expressionsstamm (Kan <sup>r</sup> )	Appleyard, 1954; Tabor & Richardson, 1985
S17-1		<i>pro, Tra<sup>+</sup> recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
GG 48		$\Delta zntA, \Delta zitB$ , Zink sensitiver Expressionsstamm	Grass <i>et al.</i> , 2001b
	pT7-5	T7-Expressionsplasmid (Amp <sup>r</sup> )	Tabor, 1990
	pECD110	<i>czcCBAD'</i> kloniert in pT7-5	Nies <i>et al.</i> , 1989b
	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	<i>lacPOZ'</i> , Klonierungsvektor für PCR-Produkte (Amp <sup>r</sup> )	Promega, Madison (USA)
	pECD636	pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>p<sub>T7</sub></i> (Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> ),	Pribyl, 2001

**Fortsetzung Tab. 1**

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
	pECD637	pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Derivat für Translationsfusionen mit <i>'phoA</i> unter Kontrolle von <i>p<sub>T7</sub></i> (Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> ),	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD618	<i>'blaM'</i> - <i>'phoA</i> , verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD637 (Amp <sup>r</sup> ), zytoplasmatische PhoA-Kontrolle, pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Derivat	Pribyl, 2001
	pECD619	<i>blaM'</i> - <i>'phoA</i> , verkürztes <i>blaM</i> mit Signalsequenz in pECD637 (Amp <sup>r</sup> ), periplasmatische PhoA-Kontrolle, pGEM <sup>®</sup> -T Easy-Derivat	Pribyl, 2001
	pECD499	pBR322-Derivat für Translations-fusionen mit <i>'lacZ</i> unter Kontrolle von <i>p<sub>T7*</sub></i> (Tet <sup>r</sup> )	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD500	pBR322-Derivat für Translations-fusionen mit <i>'phoA</i> unter Kontrolle von <i>p<sub>T7*</sub></i> (Tet <sup>r</sup> )	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pECD502	<i>'blaM'</i> - <i>'lacZ</i> , verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD499 (Tet <sup>r</sup> ), zytoplasmatische LacZ-Kontrolle	Rensing <i>et al.</i> , 1997a
	pEC11	<i>czcCBAD</i> als 9 kb <i>EcoRI</i> Fragment, Tet <sup>r</sup>	Nies <i>et al.</i> , 1987
	pEC162	<i>BamHI</i> -Fragment der <i>czc</i> -Determinante, Derivat von pUC18	Stammsammlung des Labors
EC926	pECD729	<i>PstI</i> -Fragment der URR, <i>czcN</i> , <i>czcI</i> , Derivat von pT7-5, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC927	pECD730	<i>SacI-PstI</i> -Fragment der URR, <i>czcN</i> , <i>czcI</i> , Derivat von pECD729, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC928	pECD731	<i>SacI-PstI-PstI</i> -Fragment der URR, <i>czcN</i> , <i>czcI</i> , <i>czcC</i> , Derivat von pECD730, (Amp <sup>r</sup> )	Grosse <i>et al.</i> , 1999
EC891	pECD714	<i>czcR</i> , kloniert hinter T7-Promotor, Derivat von pGEM <sup>®</sup> -T Easy, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC862	pECD685	<i>czcS</i> mit künstl. RBS, kloniert hinter T7-Promotor, Derivat von pGEM <sup>®</sup> -T Easy, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC904	pECD715	<i>czcN</i> mit künstl. RBS, kloniert hinter T7-Promotor, Derivat von pGEM <sup>®</sup> -T Easy, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit

**Fortsetzung Tab. 1**

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
EC905	pECD716	<i>czcI</i> mit künstl. RBS, kloniert hinter T7-Promotor, Derivat von pGEM <sup>®</sup> -T Easy, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC906	pECD717	<i>czcE</i> , kloniert hinter T7-Promotor, Derivat von pT7-5, (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
	pMOL1085	<i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment der DRR, <i>czcE</i> , Derivat von pUC18, (Amp <sup>r</sup> )	van der Lelie, Laborstamm
EC919	pECD721	pECD636-Derivat mit <i>czcI-lacZ</i> , (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC907	pECD718	pECD636-Derivat mit <i>czcE-lacZ</i> , (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC918	pECD720	pECD637-Derivat mit <i>czcI-phoA</i> , (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
EC908	pECD719	pECD637-Derivat mit <i>czcE-phoA</i> , (Amp <sup>r</sup> )	diese Arbeit
	pLO2	<i>Suicid</i> -Rekombinationsvektor in <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34, <i>sacB</i> , (Kan <sup>r</sup> )	Lenz <i>et al.</i> , 1994
	pTYB2	Expressionsvektor für Fusions-Proteine mit C-terminalem Intein mit CBD, (Amp <sup>r</sup> )	New England BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
EC920	pECD722	<i>czcD</i> kloniert hinter T7-Promotor, Derivat von pTYB2	diese Arbeit
	pASK-IBA5	Expressionsvektor mit <i>Strep-Tag II</i> <sup>®</sup> (N-terminal), (Amp <sup>r</sup> )	IBA-GmbH, Göttingen
EC921	pECD723	<i>czcD</i> kloniert hinter Tet-Promotor, Derivat von pASK-IBA5	diese Arbeit
EC922	pECD725	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp <sub>53</sub> Asn, Derivat von pECD723	diese Arbeit
EC923	pECD726	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp <sub>158</sub> Asn, Derivat von pECD723	diese Arbeit
EC924	pECD727	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp <sub>181</sub> Asn, Derivat von pECD723	diese Arbeit
EC925	pECD728	<i>czcD</i> , Gen ohne für den C-Terminus kodierenden Teil (1-203), Derivat von pASK-IBA5	diese Arbeit
EC922	pECD724	<i>czcD</i> , C-terminaler Teil (203-316) kloniert hinter Tet-Promotor, Derivat von pASK-IBA5	diese Arbeit
	pVDZ'2	Tet <sup>r</sup> IncP1 lacZ' Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup>	Deretic <i>et al.</i> , 1987
	pDNA176	CzcD, Derivat von pVDZ'2	Anton <i>et al.</i> , 1999

**Fortsetzung Tab. 1**

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
	pDNA177	COTI, Derivat von pVDZ'2	Anton <i>et al.</i> , 1999
	pDNA178	ZRCI, Derivat von pVDZ'2	Anton <i>et al.</i> , 1999

**2.2. Kultivierungsbedingungen****2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien****A.) Nährbouillon I** (SIFIN GmbH, Berlin)

25 g Nährbouillon I  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

**B.) Nähragar** (SIFIN GmbH, Berlin)

36.5 g Nähragar I bzw. 26 g Nähragar II  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

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

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

**D.) Terrific Broth (TB-Medium)** (Tartof und Hobbs, 1987)

12 g Bacto-Trypton  
24 g Hefeextrakt  
4 ml Glyzerin  
ad 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Nach der Sterilisation durch Autoklavieren wurden dem Medium 100 ml 0.5 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7.0 hinzugegeben. Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen für Proteinexpressions-Experimente im quantitativen Maßstab.

E.) M9-Minimalmedium bzw. M19-Glukose-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989)5x M9-Puffer:

64 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  (0.25 M)  
15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1 M)  
2.5 g  $\text{NaCl}$  (0.05 M)  
5.0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.1 M)  
ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

M19-Glukose-Minimalmedium:

0.2 l 5x M9 Puffer  
4 ml 0.5 M  $\text{MgSO}_4$   
1 ml 0.1 M  $\text{CaCl}_2$   
20 ml 20 % (w/v) Glukose  
1 ml Thiamin (20 mg/ml)  
10 ml von den 1 % (w/v) AS-Stammlösungen (18 AS, außer Cys und Met)  
ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Die Stammlösungen von  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  und Glukose wurden separat autoklaviert und die AS-Stammlösungen sterilfiltriert.

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

900 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$   
0.1 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   
0.03 g  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$   
0.3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
0.2 g  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$   
0.01 g  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
0.188 g  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$   
0.03 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

G.) Tris-gepuffertes Minimal-Medium (Mergeay *et al.*, 1985)Komponente A (20 x):

800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$   
121.1 g Tris-HCl  
HCl ad pH 7.0  
93.6 g  $\text{NaCl}$   
29.8 g  $\text{KCl}$   
21.4 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
4.0 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

Komponente B (20 x):

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

0.60 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat  
 2 ml Spurenelementlösung SL6 (10x) (Pfennig, 1974)  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

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

#### H.) Medienzusätze

##### • Schwermetallsalze

Es wurden 1 M bzw. 0.1 M wässrige Stammlösungen der Schwermetallsalze ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> und CdCl<sub>2</sub> verwendet. Die Lösungen wurden in sterilem Medium auf Endkonzentration verdünnt.

##### • Antibiotika

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

**Tab. 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Medium**

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 g/l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	25 mg/l ( <i>E. coli</i> ) 1500 mg/l ( <i>R. metallidurans</i> )
Tetracyclin	12.5 g/l Ethanol (50 % v/v)	12.5 mg/l
Rifampicin	20 g/l Methanol	200 mg/l

##### • Weitere Medienzusätze

Als weitere Zusätze in den Nährmedien dienen der künstliche Induktor IPTG sowie das chromogene Substrat X-Gal.

Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei -20°C gelagert. IPTG lag als wässrige Stammlösung von 20 % (w/v) vor und wurde in einer Endkonzentration von 40 mg/l den sterilen Medien zugesetzt. Von X-Gal wurde eine Stammlösung von 5 % (w/v) in DMF hergestellt. Die Endkonzentration im Medium betrug 50 mg/l.

### **2.2.2. Anzucht und Zellernte**

#### **A.) *R. metallidurans***

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

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

#### **B.) *E. coli***

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in NB-, LB-Medium oder TB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C oder 37°C (Brutraum) in schräg eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (*HS500*, IKA Labortechnik) oder auf einem Rotationsschüttler (*HI*, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (*Ultrospec II*, LKB Biochrom Ltd., England) oder mit dem *Klett-Summerson Colorimeter* (Klett MFG Co., USA) in Kletteinheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder in der Hettich-Zentrifuge, in der Sigma-Laborzentrifuge oder in der Sigma-Tischzentrifuge wie für *R. metallidurans* beschrieben.

### **2.2.3. Stammhaltung**

Die Kultivierung von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimal-Medium-Agar-Platten, wobei den plasmidtragenden Stämmen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt wurden bzw. Kanamycin (1500 mg/l) bei der Insertion von Kanamycinkassetten in das bakterielle Genom oder Tetracyclin bei der Verwendung des Weitwirtsplasmids pVDZ'2. Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so dass zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand.

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

Außerdem wurden von Stämmen mit neu konstruierten Plasmiden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet, mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80°C eingefroren.

#### **2.2.4. Reinheitskontrolle**

Die Überprüfung der Reinheit der Kulturen erfolgte regelmäßig durch Vereinzlungsausstriche auf den entsprechenden Agar-Platten, wobei eine einheitliche Koloniemorphologie als Reinheitskriterium galt.

### **2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA**

#### **2.3.1. 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.

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

Es wurden 25 ml einer *R. metallidurans*-Übernachtskultur abzentrifugiert und in 2 ml E-Puffer [75 mM Tris-Acetat (pH 7.3), 1 mM EDTA] resuspendiert. Nach vorsichtiger Zugabe von 1 ml Lysispuffer [5 Vol. 1 N NaOH, 6 Vol. 200 g/l SDS, 9 Vol. steriles H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st] 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. Zur besseren Abtrennung von Proteinen durch Präzipitation mit SDS wurde der Ansatz anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die Oberphase 1 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde diese Phase in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, mit 100 µl steriler 10 % (v/v) 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 für 30 min bei 5000 rpm und 4°C führte zur Sedimentation der DNA, die dann in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st 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 luftgetrocknet. Das Megaplasmid-DNA-Pellet wurde in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st aufgenommen und 1 h bei 50°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **2.3.1.2. Mikroplasmidpräparation** (nach Akada, 1994)

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

Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 50 µl 1:1 (v/v) Phenol/Chloroform sowie 10 µl 5 x Stopp-Mix [40 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 M EDTA, 0.2 % (w/v) BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels *Vortex Shaker* [*Vortex Genie2<sup>TM</sup>*, Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz)] und Zentrifugation für 3 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden ca. 25 µl der wässrigen Oberphase im 0.6-1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

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

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

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

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

Diese Methode diente der Gewinnung sehr reiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silicagel-Membran gebunden (Vogelstein & Gillespie, 1979) und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Es war keine Fällung der DNA nötig.

Bis zu 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 12000 rpm pelletiert (*Sigma 112*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die anschließende Präparation der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.3.2. Standard-DNA-Techniken**

#### **2.3.2.1. Agarosegel-Elektrophorese**

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

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

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

#### **2.3.2.2. DNA-Größenstandards**

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

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

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

#### **2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung**

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

#### **2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen**

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

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

#### **2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Phenol-Extraktion und Fällung**

Zur Entfernung von Proteinen wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)] extrahiert und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde mit 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) oder 5 M NaCl-Lösung versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2.5 Vol. eiskaltem 96 %igem (v/v) Ethanol für 1 h bei -20°C. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 12000 rpm und 4°C wurde die DNA mit 0.5 ml 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut kurz zentrifugiert. Die Trocknung des Sediments erfolgte im Vakuum (*SpeedVac<sup>®</sup> SVC 100*, Savant). Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] oder sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

#### **2.3.2.6. Reinigung von DNA durch Mikrodialyse**

Um die DNA-Lösung zu entsalzen oder den Puffer zu wechseln, wurde eine Mikrodialyse durchgeführt. Dazu wurden ca. 25 ml steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in eine Petrischale gefüllt und ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0.025 µm (Millipore GmbH, Eschborn) auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die DNA-Probe wurde auf den Filter getropft und nach ca. 30 min wieder abgenommen.

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

Diese Reinigungsmethode basierte auf der Eigenschaft der DNA, bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Membran zu adsorbieren (Vogelstein & Gillespie, 1979), während Verunreinigungen (z. B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution der DNA mittels sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (niedrige Salzkonzentration).

Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen und die DNA mit 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

### **2.3.2.8. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels *QIAquick Gel Extraction Kit*** (QIAGEN GmbH, Hilden)

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

### **2.3.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten**

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

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

Mit dieser Variante der Ligation konnte innerhalb kürzester Zeit ein DNA-Fragment mit einem Vektor ligiert werden. Dabei wurden Vektor- und Fragment-DNA mit 2 µl 5 x DNA-Verdünnungspuffer versetzt (10 µl Endvolumen) und mit 10 µl 2 x T4-DNA-Ligationspuffer gemischt, 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz konnte dann sofort transformiert werden.

### **2.3.2.11. Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode**

#### A.) Herstellung kompetenter Zellen

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

Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. Diese Kultur wurde in eine 50 ml-Hauptkultur 1:100 in frischem LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, vorgekühltes Greiner-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm und 4°C in der *Universal RF* (Hettich GmbH, Tuttlingen). Das Pellet wurde vorsichtig in ca. 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis gestellt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80°C gelagert.

### B.) Transformation

Je 100-200  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der DNA (z. B. Ligation) vorsichtig gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock von 90 s bei  $42^\circ\text{C}$  wurden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0.3-0.5 ml NB oder LB-Medium und Inkubation für 30-45 min bei  $37^\circ\text{C}$  bzw.  $30^\circ\text{C}$  wurde auf Selektionsagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  bzw.  $30^\circ\text{C}$  inkubiert.

### **2.3.2.12. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation** (nach Dower *et al.*, 1988)

#### A. Herstellung kompetenter Zellen

200 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach Abkühlung auf Eis (15 min) zentrifugiert (15 min 5000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) und das Zellpellet zweimal mit je 50 ml eiskaltem, 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 30 ml 10 % Glycerin (v/v) gewaschen, vereinigt und die Zellen nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 5000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) in 500  $\mu\text{l}$  10 % Glycerin (v/v) aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden als 40  $\mu\text{l}$ -Aliquote bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### B. Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem *Gene-Pulser* der Fa. Biorad (München). Pro Ansatz wurden 40  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25  $\mu\text{F}$ , 2.5 KV und 200  $\Omega$ , wodurch eine Feldstärke von 12.5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3.5-4.5 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. 50-200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden auf Selektionsagar ausplattiert.

### **2.3.2.13. Selektion rekombinanter *E. coli* - Klone**

Die Transformanten wurden auf Nähragar-Platten mit IPTG und X-Gal unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums selektiert. Rekombinante Klone konnten in der Regel durch Test auf  $\alpha$ -Komplementation identifiziert werden. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal (weiße Kolonien) zugrunde.

### **2.3.2.14. Plasmidtransfer durch Konjugation**

Der konjugative Plasmidtransfer wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) und *R. metallidurans*-Zellen aus NB-Übernachtskulturen durchgeführt. Je 150  $\mu\text{l}$  der konjugierenden Stämme wurden auf einer NA-Platte zusammen ausplattiert und 1-2 Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Konjuganten wurden direkt mit einer Impföse von der bewachsenen Platte entnommen und auf Tris-Minimal-Medium-

Agar-Platten mit Tetracyclin bzw. mit 1.5 mg/ml Kanamycin ausgestrichen. Ein Wachstum von *E. coli*-Zellen auf diesen Medien wurde aufgrund von Auxotrophien bzw. zu hohen Konzentrationen an Antibiotikum verhindert.

### **2.3.2.15. Selektion von Rekombinanten**

Hierzu wurde eine Methode von Lenz *et al.*, 1994 in leicht veränderter Form eingesetzt.

Der auszutauschende DNA-Bereich wurde dazu in den Vektor pLO2 umkloniert, der in *R. metallidurans* nicht repliziert. Entscheidend ist dabei, dass sich von dieser Region eine homologe Kopie in *R. metallidurans* finden lässt. Der Vektor pLO2 trägt zum einen eine Kanamycin-Kassette und zum anderen das *sacB*-Gen. Ist Saccharose im Medium, sorgt dessen Genprodukt dafür, dass die Zellen absterben, da das Periplasma mit dem aus dem Zucker synthetisierten Levan-Polymer verstopft wird.

Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E. coli*-Stamm mit *R. metallidurans* konjugiert werden. Es kommt zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, die durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden können. Durch die Insertion von zentralen Teilen des Genes (ca. 300 bp) bei den ausgeschalteten p-Typ-ATPasen war es nicht notwendig, einen zweiten Rekombinationsschritt anzuschließen. Alle weiteren Deletionen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Die Zellen wurden zwei Tage in Tris-Minimal-Medium angezogen, wobei die Cointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten und es dabei zur Plasmid-*Excision* kam. Wurden die Kulturen dann in ein Medium überführt, das zum einen durch den Gehalt an Kupfer (1 mM) auf pMOL30 selektierte, zum anderen durch die Zugabe von 15 % (w/v) Rohrzucker die Cointegrate abtötete, konnten die gewünschten Doppel-Rekombinanten durch negative Selektion auf Kanamycin identifiziert werden. Dieser letzte Schritt war wichtig, da sich gezeigt hat, dass nicht alle Cointegrate durch Saccharose-Zugabe abstarben. Zur zusätzlichen Überprüfung wurde eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment und eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

## **2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### **2.3.3.1. Auswahl der Primer**

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

Die verwendeten Oligonukleotid-*Primer* wurden von verschiedenen Anbietern (Gibco BRL, Eggenstein, Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst (Stammlösung mit 100 pmol/μl) und auf eine Endkonzentration von ca. 10 pmol/μl in der Arbeitslösung verdünnt.

**Tab. 3: Übersicht über die verwendeten *Primer***

Name/Orientierung		Sequenz 5' ->3' Position <sup>a)</sup>	Bemerkungen
LOOP-OUT-PRIMER			
ORF131 OD	→	AAA <u>CAT ATG</u> GTG AGC GGC TTG GAT GGG AAG	Bindet ca. 300 bp. stromaufwärts vom ATG <sub>czcE</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
ORF131 OU	←	AAA <u>CAA TTG</u> CAA GGC GTG TTT CTT CGT TTT CAT	Bindet direkt am ATG <sub>czcE</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
ORF131 UD	→	AAA <u>CAA TTG</u> GAC CTC TTC ACA GGT GGC TGA ACG	Bindet direkt am TAG <sub>czcE</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
ORF131 UU	←	AAA <u>CAT ATG</u> ATG GCG CC GCG GAA TTT	Bindet ca. 300 bp. stromabwärts vom TAG <sub>czcE</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
<i>czcS</i> OD	→	AAA <u>CAT ATG</u> GGA GTC CGA GCG ATT GCG C	Bindet ca. 300 bp. stromaufwärts vom ATG <sub>czcS</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
<i>czcS</i> OU	←	AAA <u>CAA TTG</u> GGG TTA TCG AAG TCC CGG GC	Bindet direkt am ATG <sub>czcS</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>czcS</i> UD	→	AAA <u>CAA TTG</u> CCG AGT CAG GAC CGA CCA GTC	Bindet direkt am TAG <sub>czcS</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>czcS</i> UU	←	AAA <u>CAT ATG</u> TGG ATC GCC ATA CAA GGT CGC	Bindet ca. 300 bp. stromabwärts vom TAG <sub>czcS</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
<i>czcR</i> OD	→	AAA <u>CAT ATG</u> AAA TTC TGG CGA CGC CCG G	Bindet ca. 300 bp. stromaufwärts vom ATG <sub>czcR</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
<i>czcR</i> OU	←	AAA <u>CAA TTG</u> GCG GTT CGT CTT CTA CAA CAA GTA CC	Bindet direkt am ATG <sub>czcR</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>czcR</i> DU	→	AAA <u>CAA TTG</u> GTC CTC GAC CCA GAG CGC G	Bindet direkt am TAG <sub>czcR</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>czcR</i> UU	←	AAA <u>CAT ATG</u> CCG TGC GAA ACA AAA GCC G	Bindet ca. 300 bp. stromabwärts vom TAG <sub>czcR</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
<i>czcD</i> OD	→	AAA <u>CAT ATG</u> GCG ACT GCG TCC GGT GCT	Bindet ca. 300 bp. stromaufwärts vom ATG <sub>czcD</sub> , <i>NdeI</i> -Restriktionschnittstelle
<i>czcD</i> OU	←	AAA <u>CAA TTG</u> GTC GTG TGA GTG ACC TGC GCC	Bindet direkt am ATG <sub>czcD</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>czcD</i> DU	→	AAA <u>CAA TTG</u> GGA TCG AAG TCG CTT GCT GCA	Bindet direkt am TAG <sub>czcD</sub> , <i>MunI</i> -Restriktionsschnittstelle

**Fortsetzung Tab. 3**

Name/Orientierung		Sequenz 5' -> 3' <sup>a)</sup>	Bemerkungen
<i>czcD</i> UU	←	AAA <u>CAT ATG</u> GTA ATC GTC TGC CCC CAA CTC G	Bindet ca. 300 bp. stromabwärts vom TAG <sub><i>czcD</i></sub> , NdeI-Restriktionsschnittstelle
<i>cadA</i> -691-5	→	AAA <u>CAT ATG</u> CGC ACG CTC ACG GTT CGG	Knock-out-Primer für chromosomale P-Typ-ATPase 691
<i>cadA</i> -691-3'	←	AAA <u>CAT ATG</u> GCC GCT GAC GAT GGT GAC	Knock-out-Primer für chromosomale P-Typ-ATPase 691
<i>zntA</i> -649-5'	→	AAA <u>CAT ATG</u> GCA AGG GCT GGA TCG CAG	Knock-out-Primer für chromosomale P-Typ-ATPase 649
<i>zntA</i> -649-3'	←	AAA <u>CAT ATG</u> CCA CGC CAT CGG TTT CGG	Knock-out-Primer für chromosomale P-Typ-ATPase 649
<b>PRIMER FÜR T7-EXPRESSION UND TOPOLOGIE</b>			
Eco 330	→	<u>GAA TTC</u> CGA GCC CAA TGT GCG	Primer zur Amplifikation von <i>czcN</i> für pGEM-Teasy-Vektor
Primer 611	←	CGC CTG CTC GTT TTG GGG TGC	Primer zur Amplifikation von <i>czcN</i> für pGEM-Teasy-Vektor
500 up <i>czcC</i>	→	TTC GGC GAC GGC CCA GCC GTT	Primer zur Amplifikation von <i>czcI</i> für pGEM-Teasy-Vektor
Primer in <i>czcC</i>	←	GCT ACC GCC AGC CCG AGC GGC	Primer zur Amplifikation von <i>czcI</i> für pGEM-Teasy-Vektor
<i>czcS</i> <sub>RBS</sub> -Primer	→	CGG <u>CCA GGA</u> GG <sub>RBS</sub> T GAC GGA ATG AGG	Künstl. Ribosomenbindestelle stromaufwärts von <i>czcS</i>
<i>czcN</i> <sub>RBS</sub> -Primer	→	<u>AGG AGA</u> <sub>RBS</sub> ACC GCA TGA CCG ATT CTT C	Künstl. Ribosomenbindestelle stromaufwärts von <i>czcN</i>
<i>czcI</i> <sub>RBS</sub> -KpnI-Primer	→	AAA <u>GGT ACC</u> <u>AGG AGA</u> <sub>RBS</sub> AAG GAA TGC GAC G	Künstl. Ribosomenbindestelle stromaufwärts von <i>czcI</i> , KpnI-Restriktionsschnittstelle
<i>czcI</i> -PhoA-Primer	←	AAA <u>TCT AGA</u> AGC GAG ACG CTG CCA C	Klonierung in Reportersystem, XbaI-Restriktionsschnittstelle, C-terminal
<i>czcE</i> -KpnI-Primer	→	AAA <u>GGT ACC</u> <u>AGG AGA</u> <sub>RBS</sub> TGA CTA TGA AAA C	KpnI-Restriktionsschnittstelle, Klonierung in Reportersystem

**Fortsetzung Tab. 3**

Name/Orientierung		Sequenz 5' -> 3' <sup>a)</sup>	Bemerkungen
<i>czcE</i> -PhoA-Primer	←	AAA <u>TCT AGA</u> GCC ACC TGT GAA GAG GTC	Klonierung in Reportergensystem, <i>Xba</i> I-Restriktionsschnittstelle, C-terminal
<b>PRIMER FÜR ÜBEREXPRESSION</b>			
D:pTYB2-5'	→	GTT <u>CAT ATG</u> GGC GCA GGT CAC TCA CAC	Expressionssystem Impact, <i>Nde</i> I-Restriktionsschnittstelle
D:pTYB2-3'	←	GGT TCC TCC TGC AGC AAG CGA	Expressionssystem Impact
D-pASK 5-3'	←	AAA <u>CCA TGG</u> TTT CCT CCT GCA GCA AGC GAC	Expressionssystem Strep-tag II <sup>®</sup> , <i>Nco</i> I-Restriktionsschnittstelle
D-pASK 5- 5'	→	AAA <u>GAA TTC</u> GGG CGC AGG TCA CTC ACA C	Expressionssystem Strep-tag II <sup>®</sup> , <i>Eco</i> RI-Restriktionsschnittstelle
CTh-CzcD-pASK5-5'	→	AAA <u>GAA TTC</u> AGC CTG AAT GTG CTG CTC	Expressionssystem Strep-tag II <sup>®</sup> , <i>Eco</i> RI-Restriktionsschnittstelle
Asp53Asn-5'	→	CGC ACA TGC TCA <u>CGA</u> ACA CCG TCG CAC TG	Quick-Change Primer für Asp <sub>53</sub> Asn-Austausch
Asp53Asn-3'	←	CAG TGC GAC GGT <u>GTT</u> CGT GAG CAT GTG CG	Quick-Change Primer für Asp <sub>53</sub> Asn-Austausch
Asp158Asn-5'	→	CTT ATC TGG AAG TCT GGA <u>GCA</u> ATC TGC TCG GGT CGG	Quick-Change Primer für Asp <sub>158</sub> Asn-Austausch
Asp158Asn-3'	←	CCG ACC CGA GCA GAT <u>TGC</u> TCC AGA CTT CCA GAT AAG	Quick-Change Primer für Asp <sub>158</sub> Asn-Austausch
Asp181Asn-5'	→	GCT GGG CGT GGG <u>TCA</u> ACT CCG CCA TTG CG	Quick-Change Primer für Asp <sub>181</sub> Asn-Austausch
Asp181Asn-3'	←	CGC AAT GGC GGA <u>GTT</u> GAC CCA CGC CCA GC	Quick-Change Primer für Asp <sub>181</sub> Asn-Austausch
<b>SEQUENZIERPRIMER</b>			
Upr-CY'5	←	CY'5-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	<i>Universal Primer</i> , CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pUC- und pGEM-Teasy-Konstrukte
Rpr-CY'5	→	CY'5-CAG GAA ACA GCT ATG AC	<i>Reverse Primer</i> , CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pUC- und pGEM-Teasy-Konstrukte
Cy5- <i>phoA</i> -Primer	←	Cy5-ATC GCT AAG AGA ATC ACG CAG A	Cy5-markierte Sequenzier-Primer (ALF) für ' <i>phoA</i> - bzw. ' <i>lacZ</i> -Fusionen
Cy5- <i>lacZ</i> -Primer	←	Cy5-CTT TCC GGC ACC GCT TCT GG	

**Fortsetzung Tab. 3**

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3' <sup>a)</sup>	Bemerkungen
Seq Primer pTYB2	← CY' 5-TCT TTA CCC ATG ACC TTA TTA CCA ACC TC	Sequenzier- primer (ALF) für pTYB2- Konstrukte
Upr-ABI	← CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	Universal-Primer, Sequenzierprimer für ABI
Rpr-ABI	→ CAG GAA ACA GCT ATG AC	Reverse-Primer, Sequenzierprimer für ABI

a) Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die teilweise neu eingeführt wurden, sind unterstrichen dargestellt.

**2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von durch Transformation erzeugten 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* verwendet. Die Zellen wurden mittels sterilem Zahnstocher von der Agar-Oberfläche in steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> überführt. Nach Erhitzung für 2 min auf 96°C 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 2.5 mM Mg<sup>2+</sup>-Stammlösung  
 1 µl 20 mM dNTP-Mix  
 1 µl Primer 1 (10 pmol)  
 1 µl Primer 2 (10 pmol)  
 1 µl *Template*-DNA (ca.100 ng /µl)  
 ad 50 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

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

- |   |          |         |                            |
|---|----------|---------|----------------------------|
| 1.  | 2 min    | 96°C    | <i>Hot-Start</i>           |
| Zugabe von Polymerase (0.3-2 U). Dabei wurde die Mineralölschicht mit der Pipettenspitze durchstoßen. |          |         |                            |
| 2.  | 30 s     | 96°C    | Denaturierung              |
| 3.  | 30 s     | x°C     | <i>Annealing</i>           |
| 4.  | 1 min/kb | 68/72°C | <i>Extension (Pwo/Taq)</i> |

	Schritt 2-4 :	25-30 Zyklen	
5.	5 min	68/72°C	Nachsynthese ( <i>Pwo/Taq</i> )
6.	Pause	4°C	

Das Temperaturprotokoll wurde dem jeweiligen Primer-Paar (*Annealing*-Temperatur) und *Template* (*Extension*-Zeit) sowie der verwendeten Polymerase (*Extension*-Temperatur: 68°C/72°C) angepasst.

### **2.3.3.3. Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis-PCR** (Stratagene *Cloning Systems*, Heidelberg)

Diese Methode diente zur Mutagenese eines oder mehrerer nebeneinander liegender Basenpaare. Wichtig hierfür ist das Vorliegen der zu mutierenden Sequenz in einem relativ kleinen doppelsträngigen, *supergecoilten* Vektor (z.B. pUC18, pGEM®-T Easy), der aus einem *dam*<sup>+</sup>-*E. coli*-Stamm isoliert wurde. Zwei Mutagenese-Primer, je einer für jeden Strang, die zueinander komplementär sind, dienten zum Einführen der gewünschten Mutation. Die Primer wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt, die dann das gesamte Plasmid mit Insert amplifizierte. Um *second-site*-Reversionen zu begegnen, wurde die *Pwo*-Polymerase (mit Korrekturlesefunktion) eingesetzt. Wichtig war außerdem, nur wenige Zyklen zu durchlaufen (16 + 1 pro Basenaustausch). Anschließend wurde der Reaktionsansatz gereinigt und mit *DpnI* behandelt. Dieses Enzym verdaut spezifisch die parentale, *dam*-methylierte DANN, nicht aber das PCR-Produkt. Der mutierte Vektor konnte dann für Transformationsexperimente mittels Elektroporation eingesetzt werden, ohne dass er vorher ligiert werden musste.

### **2.3.4. DNA-Sequenzierung**

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

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

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

Zuerst wurde auf Eis ein *Premix* pipettiert:

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

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

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

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

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

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

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

- |          |                                    |
|----------|------------------------------------|
| 2 µl     | Plasmid-DNA (0.5 µg)               |
| 1 µl     | <i>Primer</i> (ca. 10 pmol)        |
| 2 µl     | <i>ABI-Sequencing-Mix</i>          |
| ad 10 µl | H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> |

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

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

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

### **2.3.4.3. Das Sequenziergel**

Die Sequenzreaktionen (von 2.3.4.1.) wurden am *Automated Laser Fluorescent A.L.F.<sup>TM</sup> DNA-Sequencer* (Pharmacia & Upjohn Diagnostica GmbH & Co. KG, Freiburg) in einem denaturierenden 7 %igem Harnstoff-PAA-Gel in 1 x TBE als Laufpuffer [10x TBE: 0.89 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.89 M Borsäure, 20 mM EDTA] aufgetrennt.

Das verwendete Gel hatte folgende Zusammensetzung:

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

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

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

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

### **2.3.4.4. Auswertung von Sequenzdaten**

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des *A.L.F.<sup>TM</sup>-Manager* Vers. 2.5 bzw. des *A.L.F.win<sup>TM</sup>-Manager* Vers. 1.10 (Pharmacia, Freiburg). Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Programmen *Clone Manager* Vers. 4.0 [Scientific & Educational Software (USA)] und *DNASIS* Vers. 5.0 ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken *EMBL* und *SWISS-PROT* enthaltenen DNA- und Protein-Sequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information (NCBI)* im Internet bereitgestellten Programm *Basic Logic Alignment Search Tool - BLAST* (Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem im Internet verfügbaren Programm *Clustal W* Vers. 1.8 vom *European Biotechnology Institut (EBI)* erstellt. Die Bestimmung von Sequenz-Motiven in Proteinen, die Errechnung von Molekulargewichten anhand der AS-Sequenzen sowie multiple *Alignments* verschiedener Proteinsequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen *Simple Modular Architecture Research Tool - SMART* Vers.3.1 (Schultz *et al.*, 1998, Schultz *et al.*, 2000), *Peptid-Mass* (<http://www.expasy.ch/peptide-mass.html>), *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) und *Clustal W* (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) des *Expasy Molecular Biology Server* [Institut für Bioinformatik, Genf (Schweiz)].

## **2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung**

### **2.4.1. Herstellung der Sonden**

#### **2.4.1.1. Synthese von DNA-Fragmenten**

Durch PCR wurden ca. 300 bp DNA-Fragmente aus pMOL30 amplifiziert (Primer variierten je nach zu untersuchender Gendeletion), die als Sonden für den Nachweis von Nukleinsäuren dienen sollten. Die so gewonnenen Fragmente dienten zur Kontrolle der Deletion der einzelnen Gene bzw. des Austausches des ATG-Startcodons von *czcN* gegen ein TAG-Stoppcodon.

#### **2.4.1.2. Digoxigenin-Markierung der Sonden** (DIG DNA LABELING Kit, Roche, Mannheim)

Die durch PCR amplifizierten 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 PCR-Produkt wurde in 15 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen und 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) zum Ansatz pipettiert. Nach Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) beendet.

#### **2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards**

Um die Größe der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde ein Digoxigenin-markierter Größenstandard 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. Der Marker wurde mit im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht. Als nachteilig bei dieser Methode ist allerdings die Instabilität der Markierung anzusehen.

#### **2.4.3. DNA:DNA-Hybridisierung** (nach Southern, 1975)

##### **2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA-Blotting**

Plasmid-DNA der zu untersuchenden pMOL30-Derivate wurde nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für mindestens 2 h in 1 x TAE-Puffer. Das Agarosegel wurde unter leichtem Schwenken (auf einer Laborwippe) wie folgt für den DNA-Transfer auf die Membran vorbereitet:

Depurinieren: 5 min in 0.25 N HCl

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

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

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gespült.

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 20 min in sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  und anschließend in 10x SSC [0.15 M Na-Citrat (pH 7.0), 1.5 M NaCl] geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Membran erfolgte mittels Druck-Blot in einer Blotting-Apparatur (Posi Blot<sup>TM</sup> Pressure Blotter, Stratagene, Heidelberg). Die vorbereitete Membran wurde auf ein mit 10x SSC benetztes Filterpapier in der Blotting-Apparatur gelegt, darüber die Maske und schließlich das Gel. Darauf wurde ein mit 10x SSC getränkter Schwamm gelegt, die Apparatur geschlossen und ein Druck von 75 mm Hg-Säule angelegt. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Position des Geles auf der Membran markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch 3 minütige Bestrahlung mit UV (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und zwischen Filterpapier bei RT aufbewahrt werden.

#### **2.4.3.2. Hybridisierung**

Die Membran mit der fixierten DNA wurde zur Entfernung von Salzresten kurz in sterilem 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-Laurylsarcosin, 0.2 g/l SDS] im Hybridisierungssofen (OV4, Biometra) bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (68°C) prähybridisiert. Die markierte Sonde wurde in 10 ml neuer Hybridisierungslösung aufgenommen und 10 min im Wasserbad denaturiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde sie gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht.

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

2 x 5 min bei RT in 2 x SSC mit 1 g/l SDS

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

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

#### **2.4.4. Chemilumineszenz-Nachweis** (DIG-Luminescent Detection Kit, Roche Mannheim)

Alle Schritte zum Chemilumineszenz-Nachweis wurden unter leichtem Schwenken (Laborwippe) bei RT durchgeführt. Alle Lösungen wurden in solchen Mengen eingesetzt, dass die Membran bedeckt war.

Die Membran wurde zuerst 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 über 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 2 mal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min in Puffer 3 [0.1 M Tris-HCl, 0.1M NaCl (pH 9.5)] äquilibriert, vorsichtig abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt. Die Membran wurde gleichmäßig mit der verdünnten Substratlösung (CSPD in Puffer 3 1:100) benetzt, mit einer zweiten Folie abgedeckt und 5 min inkubiert. Die Membran wurde auf sauberem Filterpapier

soweit abgetrocknet, dass keine überschüssige Flüssigkeit mehr vorhanden war und anschließend 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 1 h bis 12 h auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch Inkubation in Entwicklerlösung, bis durch die Lichtreaktion geschwärzte Bereiche sichtbar wurden. Entwicklerreste wurden durch kurzes Spülen im Wasserbad entfernt. Die Fixierung des Filmes erfolgte 10 min in Fixierlösung. Anschließend wurde der Film 10 min in Wasser gespült.

## **2.5. Versuche zum Zellwachstums**

### **2.5.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien**

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

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

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

#### **2.5.1.2. Zellanzucht von *R. metallidurans*-Stämmen bei Wachstumsversuchen**

Die Versuche wurden in Tris-gepuffertem Minimal-Medium mit 0.2 % (w/v) Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle und  $\text{MeCl}_2$  unterschiedlicher Konzentration durchgeführt.

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

Für die Anzucht der Hauptkultur wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 20 ml Tris-Minimal-Medium [0.2 % (w/v) Natriumgluconat,  $\text{MeCl}_2$ ] mit der entsprechenden Vorkultur ca. 1 %ig beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 30°C unter ständigem Schütteln in einem *Gyrotory*-Wasserbad oder im 30°C Brutraum inkubiert. Das Zellwachstum wurde mit dem *Klett-Summerson-Colorimeter* verfolgt.

### **2.5.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Schwermetallsalzen**

Als MIC wird die niedrigste Metallkonzentration bezeichnet, bei der ein Stamm kein Wachstum mehr zeigt. Die Ermittlung der MIC erfolgte bei *R. metallidurans*-Stämmen auf Tris-Minimal-Agar

(Mergeay *et al.*, 1985). Es wurden Platten mit steigender Konzentration an Schwermetallsalzen gegossen. Die Stämme wurden Vorkulturen entnommen, auf den Platten in Sektoren ausgestrichen und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

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

## **2.6. Enzymologische Methoden**

### **2.6.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität** (verändert nach Miller, 1972, Ullmann, 1984)

#### **2.6.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte**

Die für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *Ralstonia metallidurans* wurden in Tris-Minimal-Medium mit Natriumgluconat bei 30°C inkubiert. Aus einer 48-Stunden Vorkultur wurden 20 ml Hauptkulturen angeimpft und unter Schütteln bis zu einer Zelldichte von ca. 70 Klett (Klett-Summerson-Colorimeter) inkubiert. Bei dieser Zelldichte wurden die Kulturen geteilt und eine Hälfte mit Metallionen inkubiert. Als Proben für den Enzymtest zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden zu verschiedenen Zeiten je 0.2 ml Kultur in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 12000 rpm, 4°C) in der Sigma 2K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Auch wurde zu jedem Zeitpunkt der Probennahme die Zelldichte ermittelt, da dieser Wert für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität notwendig war.

#### **2.6.1.2. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

Das Zellpellet wurde in 950  $\mu$ l Z-Puffer [0.6 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer [2.5 g/l CTAB, 5 g/l Natriumdesoxycholat] für die Substrataufnahme vorbereitet. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Substratlösung [4 g/l o-Nitrophenylgalactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz gemischt und bis zur Gelbfärbung bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des ONPG zu o-Nitrophenol durch die  $\beta$ -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung abgestoppt. Natriumcarbonat erhöhte den pH-Wert des Reaktionsansatzes auf 11, wodurch die  $\beta$ -Galaktosidase inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Mit Hilfe der Extinktion [ $E_{420}$ ] und der Reaktionszeit [Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion] konnte die Gesamt-Enzymaktivität in U nach folgender Gleichung berechnet werden:

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

Dabei ist 1 U definiert als Substratumsatz in nmol pro min bei 30°C.

Die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde durch Division der errechneten Gesamtaktivität durch die Zelltrockenmasse des Reaktionsansatzes bestimmt. Die Zelltrockenmasse wurde aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet.

### **2.6.2. Topologie-Untersuchung von Protein-Carboxytermini** (nach Rensing *et al.*, 1997a)

Zur Bestimmung der Lokalisation von CzcE und CzcI im Zytoplasma oder Periplasma wurden die zu untersuchenden Proteine C-terminal mit der Alkalischen Phosphatase ohne natives Signalpeptid (PhoA') und  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) fusioniert, zwei Reporterproteine mit reziproken Enzymaktivitäten in Bezug auf ihre Lokalisation innerhalb der Zelle. Für die Enzymaktivität von PhoA' ist seine Lokalisierung im Periplasma notwendig. Nur wenn der C-Terminus mit dem PhoA'-Anteil des Fusionsproteins ins Periplasma transportiert wird, kann durch einen Enzymtest eine Aktivität nachgewiesen werden. Währenddessen ist die  $\beta$ -Galaktosidase ein Enzym, das nur im Zytoplasma enzymatisch aktiv ist. Periplasmatisch lokalisierte Fusionsproteine werden durch Blocksequenzen innerhalb der  $\beta$ -Galaktosidase am Export gehindert und sind daher enzymatisch inaktiv.

Vorkulturen der *E. coli* CC118-Stämme mit Fusionsplasmiden (und Kontrollen) wurden über Nacht bei 30°C in 3 ml LB-Medium mit Antibiotika (Ampicillin und Kanamycin) unter Schütteln angezogen. 20 ml Hauptkulturen wurden 3 %ig aus den Vorkulturen angeimpft und ca. 2 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Das Fusionsprotein wurde durch Temperaturerhöhung auf 42°C für 30 min induziert und über einen Zeitraum von einer weiteren Stunde bei 37°C exprimiert, bis zu einer optischen Dichte von etwa 100 Klett. 1 ml Kultur wurde bei 2 min 4°C und 12000 rpm geerntet. Während die Fusionsproteine mit der  $\beta$ -Galaktosidase, wie unter 2.6.1.2. beschrieben, behandelt wurden, wurden Fusionskonstrukte mit alkalischer Phosphatase nach folgendem Protokoll weiterbehandelt.

Das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l Waschpuffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 1 mM Jodazetamid, nach dem Autoklavieren zugeben zu 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)] resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 1ml *Assay*-Puffer [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> und 1 mM Jodazetamid [nach dem Autoklavieren zu 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) geben] resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1 g/l SDS-Lösung und 50  $\mu$ l Chloroform permeabilisiert. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Substratlösung [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.4 % Paranitrophenol, frisch herstellen!] und Mischen gestartet. Die Zeit, bis sich die Probe bei 37°C im Wasserbad durch Nitrophenolbildung leicht gelb färbte, wurde bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von 120  $\mu$ l Stoppmix [5 Vol. 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 Vol. 0.5 mM EDTA (pH 8.0)] und Inkubation auf Eis beendet. Der Ansatz wurde 4 min bei 12000 rpm und bei 4°C

pelletiert, der Überstand vorsichtig in eine Küvette gegossen und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit Hilfe der Extinktion ( $E_{420}$ ) und der Reaktionszeit (Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion) nach folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität [U]} = 72.131 * E_{420} / \text{Reaktionszeit}$$

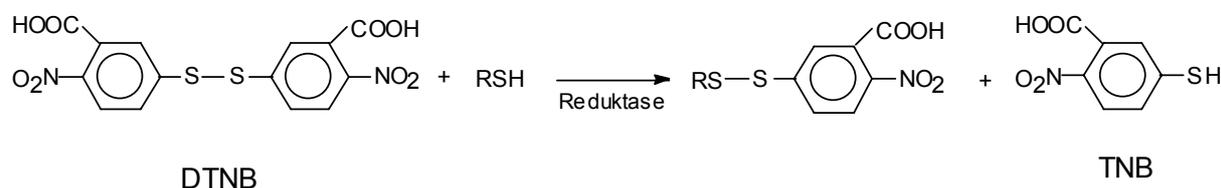
Dabei ist 1 U definiert als pro min bei 37°C gebildetes Nitrophenol (in nmol).

Die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch Division der errechneten Gesamtaktivität durch die Zelltrockenmasse des Reaktionsansatzes bestimmt. Die Zelltrockenmasse wurde aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet.

### **2.6.3. Glutathion-Messungen**

Eine Übernachtskultur wurde 1:100 in 100 ml Tris-Minimal-Medium verdünnt und anschließend mit und ohne Schwermetallinduktion bei 30°C schüttelnd inkubiert, bis sie eine Optische Dichte von 200 Klett erreicht hatte. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 5000 rpm, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml 0.1 N HCl resuspendiert und anschließend durch 10 minütige Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Entstandene Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, 4°C) entfernt. Der so gewonnene Rohextrakt wurde in einem Enzymtest eingesetzt.

Der Enzymtest wurde in Puffer C, einem Puffergemisch aus den Puffern A (143 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) und B (143 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), die im Verhältnis 1:5.25 mit 6.3 mM EDTA gemischt wurden, durchgeführt. Dafür wurden 450  $\mu\text{M}$   $\text{NADPH} + \text{H}^+$  in 700  $\mu\text{l}$  Puffer C gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  6 mM DTNB und 10  $\mu\text{l}$  Glutathionreduktase (20 U/ml) gegeben. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Rohextrakt gestartet.



**Abb. 2.:** Enzymatische Reaktion des DTNB (Di-5,5'-thio-2,2'-Nitrobenzoesäure) durch den Umsatz mit thiolhaltigen Verbindungen zu TNB (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure), deren Bildung durch ihre maximale Absorption bei 412 nm spektroskopisch detektiert werden kann.

Die Entstehung der gelben TNB (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure) aus DTNB (Di-5,5'-Thio-2,2'-Nitrobenzoesäure) wurde spektroskopisch bei 412 nm über 10 min verfolgt. Dabei war die Extinktionsänderung pro min ( $\Delta E/\text{min}$ ) das Maß der Menge an eingesetztem thiolhaltigen Verbindungen.

Parallel zu den gemessenen Proben wurde eine Eichkurve mit definierten Mengen Glutathion (33.5 µg – 125 µg) aufgenommen. Alle ermittelten Werte wurden auf die eingesetzte Menge an Gesamtprotein bezogen.

## **2.7. Proteinchemische Methoden**

### **2.7.1. Analytische T7-Expression und radioaktive Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin** (Tabor & Richardson, 1985, Tabor, 1990)

Die Anzucht der Vorkulturen von *E. coli* K38 (pGP1-2) mit verschiedenen Konstrukten erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 30°C in LB-Medium mit Antibiotika (je nach Plasmid Kan/Amp oder Kan/Tet). Die 15 ml-Hauptkultur wurde 2-3 %ig aus der Übernachtskultur beimpft. Das Wachstum der Hauptkulturen wurde bei 30°C bis zu einer Zelldichte von ca. 75 KE verfolgt und die Zelltrockenmasse aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet. Anschließend wurden 0.5 ml Hauptkultur (ca. 100 µg Zellen bei 75 KE) 1 min bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen zentrifugiert. Bei abweichender Zelldichte wurden äquivalente Zellmengen eingesetzt. Das Pellet wurde mit 2 x 0.5 ml M9-Puffer (2.2.1.) gewaschen und anschließend in 1 ml M19-Medium (2.2.1.) resuspendiert.

Die Kulturen wurden auf einem Schüttler (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) 2 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeinduktion bei 42°C für 15 min zur Dereprimierung der Expression der von pGP1-2 kodierten T7-RNA-Polymerase. Durch die Zugabe von 10 µl Rifampicin [20 mg/ml Methanol] wurden prokaryotische RNA-Polymerasen inaktiviert, so dass lediglich Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors standen, durch die verbliebene T7-RNA-Polymerase transkribiert werden konnten. Die Zellen wurden weitere 20 min bei 42°C inkubiert. Schließlich wurden die Kulturen auf 30°C abgekühlt und weitere 45 min geschüttelt.

Es wurden 5 µCi [<sup>35</sup>S]-Methionin pro Ansatz für eine Markierung der Proteine eingesetzt. Um einen effektiven Einbau des radioaktiv markierten Methionins zu gewährleisten, wurden die Kulturen 30 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (1 min, 12000 rpm, 4°C) in der Sigma-Tischzentrifuge. Zum Zellaufschluss wurde das Pellet in 40 µl 1 x *Cracking*-Puffer [1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM EDTA, 0.01 % (w/v) BPB, 10 % (w/v) Saccharose] aufgenommen und anschließend 3-5 min auf 95°C erhitzt. Eine Zelltrümmersedimentation wurde 1 min bei 12000 rpm und 4°C durchgeführt.

Es wurden 15 µl Überstand auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und die Proteine wie unter 2.7.5.3. aufgetrennt. Es schloss sich eine unter 2.7.6.3. beschriebene Autoradiographie an.

### **2.7.2 Protein-Expression und -Reinigung über das IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System** (NEW ENGLAND BioLabs<sub>inc.</sub> GmbH, Schwalbach i. Taunus)

Die Reinigung von Proteinen über das IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System (NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus) beruhte auf der Überexpression eines

Fusionsproteins aus Target und Intein mit Chitin-Binde-Domäne. Durch diese Methode war es möglich, in einer Einschnittchromatographie Proteine nativ zu reinigen. Das Fusionsprotein bindet dabei spezifisch an eine Chitinsäule, während andere Proteine durch Waschschriffe von der Säule entfernt werden. Der *self-cleavage*-Prozess des Inteins erfolgt durch die Zugabe von DTT oder Hydroxylamin und Inkubation über Nacht bei 4°C, wobei das Target-Protein vom auf der Säule verbleibenden Intein abgespalten wird. Das so ungebundene Target-Protein kann von der Säule eluiert werden, während das Intein mit Chitin-Binde-Domäne am Säulenmaterial verbleibt. Die Regeneration der Säule erfolgt mittels 10 g/l SDS.

### **2.7.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte**

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* ER2566 transformiert. Die Hauptkulturen in LB-Medium zur Überexpression (0.2-1 l) wurden direkt mit frischem Material einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von ca. 100 KE schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Induktion der T7-Polymerase durch Zugabe von 0.1-0.5 mM IPTG [Endkonzentration] und Inkubation über Nacht bei 16-20°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4°C (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

### **2.7.2.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Membranproteinfraktionen**

#### **A.) French-Press**

Das Zellpellet wurde in 30 ml (pro Liter Kultur) Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100] resuspendiert und mit DNase (10 mg/ml) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French-Press* (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm<sup>2</sup>) in maximal 3 Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (1 h, 5000 rpm, 4°C) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

#### **B.) Membranpräparation und Solubilisierung**

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand einer Ultrazentrifugation (100000xg, 1.5 h, 4°C) unterzogen. Das so gewonnene Membranpellet wurde in Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100] aufgenommen und einer Membranproteinbestimmung nach Lowry 2.7.4.1. unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde dann auf 10 mg/ml eingestellt. Die so gewonnene Membranfraktion wurde mit verschiedenen Detergenzien für 30 min auf Eis solubilisiert, wobei ein Verhältnis von 2 mg Detergenz / 1 mg Membranprotein eingestellt wurde. Zusätzlich wurde Phosphatidylcholin von Sojabohnen in einer Endkonzentration von 3.5 mg/ml hinzugefügt. Nach erfolgter Solubilisierung wurden ungelöste Membranreste sowie Zelltrümmer durch eine weitere Ultrazentrifugation (100000 g, 30 min, 4°C) pelletiert. Die so gewonnenen Membranproteine konnten für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

### **2.7.2.3. Native Proteinreinigung über Chitin-Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins**

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit dem Säulenmaterial (*Chitin Beads*) gepackt (Bindekapazität 2 mg/ml) und mit 10 Vol. Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100, 0.02 % (w/v) n-Laurylsarcosin] äquilibriert. Der klare Rohextrakt wurde auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band, während die anderen Proteine durch Waschen mit 17 Vol. Säulenpuffer entfernt wurden. Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgte durch Addition von 3 Vol. *Cleavage Buffer* [20 mM HEPES (pH 8.0), 50 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.1 % (v/v) Triton X-100, 0.02 % n-Laurylsarcosin] mit 40-100 mM DTT [Stammlösung 1 M in 0.01 M NaAc (pH 5.2)] auf die Säule über Nacht.

Das Protein wurde von der Säule eluiert und das Säulenmaterial mit 1 % SDS regeneriert.

### **2.7.3. Protein-Expression und -Reinigung über das *Strep-tag II*<sup>®</sup> Protein Purification System**

(Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Mittels des *Strep-tag II*<sup>®</sup> Überexpressionssystems können heterolog exprimierte Proteine in einer Einschritt-Affinitätschromatographie zur Homogenität gereinigt werden. Aufgrund der hohen Expressionsraten und der Unempfindlichkeit des verwendeten Säulenmaterials ist dieses System im Besonderen geeignet, Membranproteine zu reinigen. Zur Reinigung des *Target*-Proteins wird N- oder C-terminal ein *tag* eingefügt, der aus 8 AS (WSHPQFEK) besteht. Dieser *Strep-tag II*<sup>®</sup> bindet spezifisch an Streptactin, das als Säulenmaterial verwendet wird. Weiterhin beeinflusst dieser kurze *tag* weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Die Induktion der Expression erfolgt mittels AHT (Anhydrotetracyclin), da der zu exprimierende ORF hinter einen *tet<sub>p</sub>* kloniert wurde.

Unspezifisch bindende Proteine können während eines Waschschruttes entfernt werden, während das *Target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule eluiert werden konnte.

#### **2.7.3.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte**

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Die Vorkultur, die über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, wurde 1 %ig in 1 l frisches TB-Medium überführt. Die Hauptkulturen in TB-Medien zur Überexpression wurden schüttelnd bei 30°C inkubiert, bis sie eine Optische Dichte von OD<sub>600</sub> = 1.5 erreicht hatten. Die Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von 200 µg AHT (Anhydrotetracyclin)/l induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 8000 rpm und 4°C (Sorvall, Tuttingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss und die Gewinnung der Membranproteinfraktion erfolgte wie unter 2.7.2.2. beschrieben.

### **2.7.3.2. Native Proteinreinigung mittels Strepactinchromatographie**

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml – 10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1-3 ml Säulenmaterial (*Strepactin*) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), ( $\pm$  1 mM EDTA), 2 M NaCl, 0.35 mg/ml Phosphatidylcholin, 0.05 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid oder 0.2 % (w/v) n-Laurylsarcosin] equilibriert. Die solubilisierte Membranproteinfraktion wurde auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band, unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 Vol. Puffer W entfernt.

Das Target-Protein wurde mittels Puffer E [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), ( $\pm$  1 mM EDTA), 0.35 mg/ml Phosphatidylcholin, 0.05 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid oder 0.2 % (w/v) n-Laurylsarcosin, 2.5 mM Desthiobiotin] eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch das Spülen mit 10 Vol. Puffer R [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM HABA] regeneriert.

### **2.7.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

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

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

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

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

Die Proben wurden mit Puffer auf 600  $\mu$ l verdünnt, mit 10  $\mu$ l 1 % iger (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und nach Durchmischung 15 min bei RT inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 200  $\mu$ l 24 % (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation 7 min, 12000 rpm und bei 4°C in einer Tischzentrifuge (*Sigma 112*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden die Überstände sorgfältig entfernt und das Pellet mit 450  $\mu$ l Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente resuspendiert waren, wurden den Proben 2 x 300  $\mu$ l Reagenz C zugesetzt, wobei jeweils sofort gemischt wurde. Die Proben wurden 30-60 min lichtgeschützt bei

RT inkubiert, bevor die Extinktion bei 750 nm gegen einen Nullwert gemessen wurde. Zu jeder Messreihe wurde eine Eichkurve im Bereich von 5-60 µg Protein pro Ansatz mit BSA aufgenommen.

#### **2.7.4.2. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm**

Um die Konzentration von gereinigten Proteinen zu bestimmen, wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm gemessen und nach folgender Gleichung die Proteinkonzentration bestimmt, wobei  $l$  die Länge der Küvette in cm angibt (Standardküvette  $l=1$  cm):

$$C = \frac{E_{280}}{\varepsilon_{\text{Protein}} \cdot l}$$

Dabei wurde der theoretische Extinktionskoeffizient nach folgender Gleichung für die untersuchten Proteine berechnet, wobei  $n$  die Anzahl vorhandener AS-Reste darstellt:

$$\varepsilon = 5400 \cdot n_{\text{Trp}} + 1790 \cdot n_{\text{Tyr}} + 152 \cdot n_{\text{S-S}}$$

#### **2.7.4.3. Analyse von Sekundärstrukturen mittels Circular Dichroismus**

Um sekundäre Strukturen von CzcD zu untersuchen, wurden CD-Spektren des Proteins aufgenommen. Dabei wurde das Protein in Puffer W [100 mM Tris-HCl, (pH 8.0)] resuspendiert und die Spektren wurden im Bereich von 250-203 nm in einem CD-Spektrometer (CD-Spektrometer Model 62A DS, AVIV, Lakewood N.J., USA) gemessen.

#### **2.7.5. 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.

##### **2.7.5.1. 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)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau] gemischt und 5 min bei 96°C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufs Gel. Bei Membranproteinen wurden die Proben 30 min bei 40°C inkubiert bzw. ohne Erhitzung auf das Gel aufgetragen.

##### **2.7.5.2. 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 acht 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.

### 2.7.5.3. SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

#### A.) Lineare SDS-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 10, 12.5, 15 oder 17.5 %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 <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	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 vorsichtigem 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 Trenngeles 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 6.8)	0.4 ml
5 g/l SDS	0.4 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	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 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 angeschlossenem Gel an. Nach 15 min wurde die Stromstärke auf 20 - 25 mA pro Gel heraufreguliert und die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke weiter durchgeführt.

#### B.) Gradienten-SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Gradienten-Gele zeichneten sich durch eine kontinuierliche Zunahme der PAA-Konzentration vom Sammelgel bis zum Ende des Trenngeles aus. So wurde sichergestellt, dass kleinere Proteine nicht

aus dem Gel und sehr große Proteine zumindest ins Trenngel liefern. Mit Gradienten-Gelen konnte die gesamte Bandbreite eines Proteinspektrums aufgetrennt und dargestellt werden.

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

Die beiden Gellösungen (je 3 ml, ohne APS und TEMED) wurden in die Kammern eines Gradientenmischers gegeben, wobei die vordere Kammer mit 20 %iger Gellösung befüllt wurde. Vorher war der Verbindungskanal mit der 7.5 %igen Gellösung geflutet worden. Nach Zugabe von je 2 µl TEMED und 10 µl 10 % (w/v) APS wurde der Kanal geöffnet und das Gelmaterial unter Rühren mittels einer Miniperistaltikpumpe [2232 *Microperpex S*, LKB Bromma (Pharmacia, Freiburg)] mit Stufe 21 zwischen die präparierten Glasplatten gepumpt. Das Trenngel wurde abschließend mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> überschichtet, das nach Polymerisation des Acrylamids wieder entfernt wurde. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 2.7.5.3.A.).

#### **2.7.5.4. SDS-Tricin-PAGE** (Schägger und Jagow, 1987)

Dieses Tricine-SDS-PAGE-System wurde eingesetzt, um Proteine mit einer besseren Trennleistung aufzutrennen. Es wurden 6 ml Trenngel (18 %ig) zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit H<sub>2</sub>O zur Gewinnung einer scharfen Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel überschichtet.

Gelzusammensetzung:	Sammelgel	Trenngel
40 % Acrylamid	0.2 ml	2.4 ml
Gelpuffer [3 M Tris, 10.4 mM SDS (pH 8.45)]	0.496 ml	1.92 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1.3 ml	1.48 ml
Glyzerin	-	0.88 ml
10 % APS	13.3 µl	40 µl
TEMED	1.7 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 entsprechende Elektrodenkammern gegeben wurden. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

### **2.7.5.5. Native PAGE**

#### A.) Probenvorbereitung

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

#### B.) Molekulargewichtsmarker für Native PAGE

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

#### C.) Native Gradienten-PAGE

Die native Auftrennung von Proteinen, z. B. für Gelshifts, konnte mit dieser PAGE bewerkstelligt werden.

Gelzusammensetzung:

	Trenngele	
40 % (w/v) Acrylamid/	4 %	20 %
Bisacrylamid 29:1	0.3 ml	1.5 ml
2.5 M Tris-HCl (pH 8.5)	0.3 ml	0.3 ml
Glyzerin	----	0.24 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2.4 ml	0.46 ml
TEMED	2 µl	2 µl
10 % (w/v) APS	10 µl	10 µl

Auf ein Sammelgel wurde verzichtet und der Kamm direkt ins Trenngel gegeben. Als Elektrodenpuffer diente 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) mit 0.1 M Glycin. Die Elektrophorese wurde bei 100 V und  $I_{\max}$  im Kühlraum über Nacht durchgeführt.

### **2.7.5.6. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)**

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, H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 10 min in Anodenpuffer II [25 mM Tris (pH 10.4), 10 % (v/v) Methanol] 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 (pH10.4), 10 % (v/v) Methanol] und eines mit Anodenpuffer II getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung beim Transfer störender Salze in Kathoden-Puffer geschwenkt. In der Blot-Apparatur (Biometra Göttingen) wurden 2 Lagen Whatman-Papier in Anodenpuffer I getränkt, eine Lage Whatman-Papier in Anodenpuffer II getränkt, die Membran,

das Proteingel und noch einmal 3 Lagen Whatman-Papier in Kathodenpuffer getränkt, luftblasenfrei übereinandergelegt und Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte im Kühlraum bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) über 30-60 min.

### B.) Tank-Blot

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach dem Gellauf in auf 4°C vorgekühltem Transferpuffer [1 Vol. 0.1 M CAPS (pH 11), 8 Vol. H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st und 1 Vol. Methanol] geschwenkt, um die beim Transfer auf die Membran störenden Salze zu entfernen. Außerdem wurden 12 Lagen Whatman-3MM-Papier auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls mit gekühltem Transferpuffer getränkt. Eine PVDF-Membran, die gleichfalls der Gelgröße entsprach, wurde nacheinander für jeweils 1 min in Methanol, H<sub>2</sub>O 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 etwa 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 Markerspür abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung unterzogen. Ebenso wurde das Gel zur Überprüfung der Blot-Effizienz Coomassie gefärbt.

#### 2.7.5.7. *Strep-tag II*<sup>®</sup> Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Der spezifische Nachweis *Strep-tag II*<sup>®</sup>-haltiger Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mit einem *StrepTactin*<sup>®</sup>-Peroxidase-Konjugat.

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

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

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

Alle Schritte wurden bei RT unter Schütteln durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Die PVDF-Membran mit transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen

für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in Blockierungspuffer [PBS (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl) und 5 % (w/v) *Glücksklee*-Magermilchpulver] inkubiert. Nach dem Waschen der Membran 3 x 5 min in PBS-Tween [0.1 % (v/v) Tween 20 in PBS] folgte eine Inkubation der Membran in PBS-Tween mit dem gegen das nachzuweisende Antigen-Protein gerichteten primären AK für 1 h, wobei sich die Konzentration des AK nach seiner Spezifität richtete. Es wurden je nach AK Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:50000 eingesetzt (Tab. 4). Nach der Inkubation mit dem primären AK wurde die Membran 3 x 10 min in PBS-Tween und 5 min in PBS-Puffer gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Dann wurde die Membran mit einem Anti-IgG-AK (Tab. 4) für 1 h inkubiert, der in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den folgenden Waschschritten (3 x 10 min in PBS-Tween und 5 min in PBS-Puffer) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunokomplexe an.

**Tab. 4: Übersicht über die verwendeten AK und ihre Verdünnungen**

Bezeichnung	AK-Typ	Antigen	Verdünnung
<b>Primäre AK</b>			
Anti-CzcD-AK	Kaninchen-IgG	CzcD	1:10000
Anti-LacZ-AK	Maus-IgG	β-Galaktosidase	1:2000
Anti-PhoA-AK	Maus-IgG	Alkalische Phosphatase	1:5000
<b>Sekundäre AK</b>			
Anti-Kaninchen-IgG-AK (Alkalische Phosphatase-Konjugat)	Maus-IgG	Kaninchen-IgG	1:50000
Anti-Maus-IgG-AK (Peroxidase-Konjugat)	Schaf-IgG	Maus-IgG	1:1000
Anti-Kaninchen-IgG-AK (Peroxidase-Konjugat)	Maus-IgG	Kaninchen-IgG	1:50000

#### A.) Farbreaktion für Alkalische Phosphatase-Konjugate

Bei der Nachweisreaktion wurde die PVDF-Membran bis zu 30 min in 20 ml Reaktionspuffer [0.1 M Tris-HCl (pH 8.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl] mit 60 µl 5 % (w/v) BCIP in DMF und 10 µl 7.5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) DMF bis zur Violettfärbung der Immunokomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

#### B.) Lichtreaktion für Peroxidase-Konjugate

Zum Nachweis wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 10 ml frische Detektionslösung I [0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 5.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] und frische Detektionslösung II [0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 2.5 mM Luminol (Stammlösung in DMSO), 0.4 mM p-Cumarsäure (Stammlösung in DMSO)] gegeben, durch Schwenken gemischt und ca. 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Detektionslösung abgegossen, die feuchte Membran in einen aufgeschnittenen

Hybridisierungsbeutel gepackt und ein Röntgenfilm [*Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>* von Amersham Life Science, Little Chalfont (England)] 30 s bis 2 min exponiert.

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

### C.) Farbreaktion für Peroxidase-Konjugate

Diese Detektionsmethode wurde in Anlehnung an den Nachweis *Strep-tag II<sup>®</sup>*-haltiger Proteine (2.7.5.7.) durchgeführt.

Die Blot-Membran wurde in 20 ml frisch hergestellter Reaktionslösung [0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 8.8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.02 % (w/v) 4-Chlornaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol)] bis zu 30 min zur Färbung der Immunkomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

## 2.7.6. Färbung und Trocknung von PAA-Gelen

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

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

### 2.7.6.2. Silberfärbung (Rabilloud *et al.*, 1988, Nesterenko *et al.*, 1994)

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

### 2.7.6.3. Autoradiographie

#### A.) Direkte Autoradiographie

Zur Sichtbarmachung der mit <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proteine wurden die getrockneten Gele bis zu 72 h auf einem Röntgenfilm inkubiert. Dafür konnte die zur Trocknung verwendete Saran® [Dowchemical] Folie vom Gel entfernt werden, was zu einer Verstärkung des radioaktiven Signals führte.

Zur Entwicklung der Röntgenfilme wurde folgendes Protokoll verwendet: Der Röntgenfilm wurde 4 min in Entwicklerlösung inkubiert. Entwicklerreste wurden durch kurzes Spülen in einem Wasserbad entfernt. Die Fixierung des Filmes erfolgte 10 min in Fixierlösung. Danach wurde der Film 10 min in Wasser gespült.

### B.) Szintillationsautoradiographie (Bonner und Laskey, 1974)

Diese Methode beruht auf der Umwandlung radioaktiver Strahlung schwacher  $\beta$ -Strahler in blaues Licht, welches besser mit einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Dabei wurde der Szintillator PPO (in DMSO, Rotifluoroszint<sup>®</sup> D, Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) ins Gel eingebracht und dadurch zur Emission von Licht angeregt.

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese 2 x 30 min in je 25 ml DMSO inkubiert. Dies diente dem Austausch des Wassers im Gel gegen DMSO, da PPO wasserunlöslich ist. Es folgte eine Inkubation des Geles in 25 ml Rotifluoroszint<sup>®</sup> D über Nacht, der sich eine weitere Inkubation von 1 h in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> anschloss. Das Gel wurde getrocknet und, wie unter 2.7.6.3. A.) beschrieben, weiterbehandelt.

### 2.7.7. in vitro Metallbindestudien

Um Hinweise auf in enzymatische Reaktionen involvierte AA-Reste zu erhalten, wurden verschiedene proteinchemische Modifikationen durchgeführt.

#### 2.7.7.1. Tryptische Verdaue von CzcD (Bhattacharjee *et. al*, 1995).

Bei der Bindung eines Liganden an ein Protein sind bestimmte Bereiche eines Proteins vor dem Abbau durch Trypsin geschützt. Deshalb wurde die Methode des vergleichenden Proteaseverdaus gewählt, um zu zeigen, dass CzcD *in vitro* in der Lage ist, Metalle zu binden. Zur Entfernung vorhandener Schwermetallionen wurde das gereinigte Protein mit 10 mM EDTA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der EDTA-Behandlung musste der Überschuss an EDTA durch Dialyse gegen Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)] ausgetauscht werden. Die verwendeten Proteinproben wurden auf eine Proteinkonzentrationen von 20  $\mu$ g/60  $\mu$ l eingestellt und in zwei Teile separiert. Mit den so gewonnenen Proben erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Metallkonzentrationen im Bereich von 50  $\mu$ M bis 5 mM. Der Proteaseverdau wurde mit 10  $\mu$ g/ml Trypsin bei 37°C durchgeführt. Durch die Zugabe von 5  $\mu$ l SDS-Probenpuffer [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 20 g/l SDS, 50 % (v/v) Glycerin 0.5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau] konnte die Reaktion nach definierten Zeiten (15-60 min) gestoppt werden. Um zu untersuchen, ob sich die verwendeten Metallkonzentrationen negativ auf die Trypsinaktivität auswirken, wurden Probeverdaue mit BSA durchgeführt. Eine Inaktivierung des Trypsins konnte dabei nicht beobachtet werden.

Die entstandenen Verdaumuster wurden auf 17.5 % Polyacrylamidgelen analysiert.

### **2.7.7.2. Modifikation von Cysteinen mittels DTNB (Dithionitrobenzoesaeure)** (Kim *et al.*, 1997)

Die chemische Modifikation mittels DTNB ist eine spezifische Methode, um die Rolle von Cysteinen bei der Bindung von Schwermetallen zu untersuchen. Die Untersuchungen zur Modifikation mit DTNB wurden in einem UV/VIS-Spektrometer (Uvikon, Eching) bei 412 nm durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 5  $\mu\text{M}$ . Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 750  $\mu\text{l}$ . Die Konzentration von DTNB im Reaktionsansatz wurde auf 0.5 mM eingestellt. Der Reaktionsverlauf wurde für 40 min bei RT verfolgt. Um Unterschiede in der Verfügbarkeit der Cysteine zu zeigen, wurden Proteinproben mit und ohne Metallinkubation für diese Modifikation eingesetzt. Die gemessenen Absorptionen wurden mittels des Lambert-Beerschen-Gesetzes ausgewertet ( $\epsilon_{\text{DTNB}} = 14000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ).

### **2.7.7.3. Modifikation von Histidinen mittels DEPC (Diethylpyrocarbonat)** (Schiavo *et al.*, 1992)

Um die Menge von Histidinen zu untersuchen, die in die Metallbindung involviert ist, wurde die Methode der chemischen Modifikation durch DEPC verwendet. Der zytoplasmatische Bereich von CzcD (AA 203-316) in Reaktionspuffer [10 mM Na-phosphat (pH 8.0)] wurde für diese Titrationsexperimente eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 600  $\mu\text{l}$  und einer Proteinkonzentration von 2.4-3.6  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Entstehung von Carbethoxylhistidinen wurde in einem UV/VIS-Spektrometer bei 242 nm verfolgt. Um unspezifische Reaktionen mit anderen Aminosäureresten zu verhindern, wurde das Verhältnis DEPC:Histidine auf 1:1 eingestellt. Die Titration wurde durchgeführt, bis es zu keiner weiteren Zunahme der Absorption kam. Neben einer unbehandelten Probe, wurde eine Proteinprobe vermessen, die mit Zink inkubiert worden war. Der Überschuss an Zink wurde durch Dialyse gegen Reaktionspuffer entfernt. Zur Auswertung der gemessenen Absorptionen wurde das Lambert-Beersche-Gesetz verwendet ( $\epsilon_{\text{Ethoxyl-His}} = 3200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ).

### **2.7.7.4. Regeneration von modifizierten Histidinen mittels HA (Hydroxylamin)** (Shriver *et al.*, 1998)

Die Entfernung von Carbethoxylierungen an Histidinen erfolgt durch die Inkubation mit Hydroxylamin. Dafür wurde der Überschuss an DEPC durch Dialyse entfernt und die Proteinlösung mit 75 mM Hydroxylamin für 12 h auf Eis inkubiert. Die so behandelten Proteine wurden, wie unter 2.7.7.6., beschrieben über *in vitro* Bindestudien analysiert.

### **2.7.7.5. Gelshiftexperimente mittels Nativer PAGE** (verändert nach Rech *et al.*, 1996)

Erste Hinweise zur Bindung von Metallen *in vitro* an CzcD wurden durch die Inkubation von Metallen mit dem c-terminalen Teil des Proteins ermittelt.

Nach einer Inkubation von 3  $\mu\text{g}$  Protein mit verschiedenen Metallkonzentrationen (1-10 mM) für 30 min auf Eis konnte das veränderte Laufverhalten des Proteins im Vergleich zu einer nicht mit Metallen inkubierten Proteinprobe auf einer Nativen PAGE analysiert werden.

#### **2.7.7.6. Bindung von CzcD an *Metal chelating sepharose*** (verändert nach Pharmacia)

Um die Bindung von CzcD an verschiedene Metalle *in vitro* zu untersuchen, wurde die Metall-Affinitäts-Chromatographie benutzt. Als Standardsäulen wurden Polyethyldurchlaufssäulen (Qiagen GmbH, Hilden) benutzt, in die 1 ml (=1 Vol.) *metal chelating sepharose* gefüllt wurden. Nach dem Waschen des Säulenmaterials mit 2 Vol. H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurden 3 Vol. 250 mM Metalllösung (ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) auf die Säule gegeben. Um ungebundene Metallionen zu entfernen, schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 2 Vol. H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> an. Zum Equilibrieren des Säulenmaterials wurde die Sepharose anschließend mit 2 Vol. 10 mM Na-phosphat-Puffer (pH 7.2) gewaschen. 60 µg Protein wurden zur Analyse auf die Säule gegeben. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen des Proteins an das Säulenmaterial wurde die Säule mit 10 Vol. 10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.2) gewaschen. Eluiert wurde das gebundene Protein mit 3 Vol. Elutionspuffer [10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.2), 10 mM EDTA]. Durchlauf-, Wasch- sowie Elutionsfraktionen wurden in Aliquoten von je 300 µl gesammelt und auf 12.5-15 % Polyacrylamidgelen analysiert. Nach einer anschließenden Silberfärbung (2.7.6.2.) wurden die gefärbten Gele densitometrisch mit dem Programm *OneDScan* ausgewertet.

#### **2.7.7.7. Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)**

Die Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) dient zum Nachweis von Metallionen, die an Proteine gebunden sind. Dabei wird das Protein verbrannt. Aus der Extinktion des von einer Lampe emittierten Lichts einer konstanten Wellenlänge kann der Gehalt an Metallionen errechnet werden. Gereinigtes Protein wurde mit 10 mM EDTA behandelt. Der Überschuss an EDTA wurde durch Dialyse gegen Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)] über Nacht entfernt. Anschließend wurden dem Protein verschiedene Mengen an Metallsalzen hinzugegeben. Dann erfolgte eine Inkubation der Proteinlösung für 1 h auf Eis. Der Überschuss an Metall wurde durch eine weitere Dialyse von 12 h gegen Puffer W entfernt. Es wurde eine Cellulose-Dialysemembran mit einem *Cut-off* von 3500 kDa verwendet (Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin). Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das Protein am 929 AA-Spektrometer2 (Unicam Ltd., Cambridge England) unter einem Luft/Aceton-Gemisch verbrannt. Als Nullabgleich wurde Puffer W verwendet. Die Metallkonzentration der Probe wurde aus dem Vergleich mit einer Eichreihe aus Lösungen verschiedener Metallkonzentration bestimmt. Aus der Menge an eingesetztem Protein und dem Messwert konnte dann das Verhältnis Metall:Protein bestimmt werden.

#### **2.7.8. *In vitro*-Vernetzungsexperimente**

##### **2.7.8.1. Tris-2,2'-bipyridylruthenium(II)chlorid** (Fancy & Kodadek, 1999)

Um den oligomeren Zustand eines Proteins zu untersuchen, wurde das *in vitro crosslinking* gewählt. In einer *Crosslink*-Reaktion wurden 10 µg Protein in 9 µl 10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.2) verwendet. Weiterhin wurden 1 µl 50 mM APS und 10 µl *Crosslink*-Puffer [30 mM Na-Phosphat (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 250 µM Tris-2,2'-bispyridyl-rutheniumchlorid], welcher einen photoaktiven *Crosslinker* enthält, zum Reaktionsansatz gegeben. Alle Schritte wurden in

Dunkelheit durchgeführt und die *Crosslink*-Reaktion durch Inkubation unter einer Laborlampe für 1-30 s induziert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl 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] beendet. Die entstandenen Oligomere wurden auf 12.5 % SDS-Polyacrylamidgelen und 10-17 % SDS-Gradientengelen analysiert.

### **2.7.8.2. Glutardialdehyd**

Eine weitere Methode des *in vitro Crosslinking* ist die Reaktion mit Glutardialdehyd. Zum Reaktionsansatz von 200 µl mit 5 µM CzcD wurden 50 mM Glutardialdehyd hinzugegeben. Nach verschiedenen Zeiten im Bereich von 1-40 min wurden Aliquote zu je 20 µl entnommen und die Reaktionen durch Zugabe von 10 µl 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] gestoppt. Die entstandenen Oligomere wurden auf 12.5 % Polyacrylamidgelen und 10-17.5 % SDS-Gradientengelen analysiert.

### **2.7.8.3. Formaldehyd**

#### **A.) in vitro**

Für die Untersuchung des oligomeren Zustandes von CzcD wurde das Protein *in vitro* mit Formaldehyd inkubiert. Im Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl wurden 10 µg Protein eingesetzt. Formaldehyd wurde in verschiedenen Konzentrationen [0.1-1 % (v/v)] zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min auf Eis bzw. bei RT inkubiert.

#### **B.) in vivo**

Nach erfolgter T7-Expression wurden die Zellen durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Nach erfolgtem Aufschluss wurden Zelltrümmer durch eine Zentrifugation (5 min, 12000 rpm, 4°C) entfernt. Die so gewonnenen Rohextrakte der zu untersuchenden Zellsuspensionen wurden 1:1 gemischt und mit verschiedenen Formaldehydmengen [0.1-1 % (v/v)] für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden auf 12.5 %igen Polyacrylamidgelen mit anschließender Autoradiographie analysiert.

## **2.8. Transportstudien mit radioaktiven Metallisotopen**

### **2.8.1. Vesikelpräparation**

Für jede Expression wurde der *E.coli* Stamm GG48 erneut mit pECD723 (*czcD*) transformiert. Die Übernachtskultur wurde bei 30°C schüttelnd inkubiert und anschließend 1:100 in 1 l frischem LB-Medium verdünnt. Die Kultur wurde schüttelnd inkubiert, bis die Zellen eine Optische Dichte bei 600 nm von 0.7 erreicht hatten. Die Induktion der Expression der zu untersuchenden Proteine erfolgte durch die Zugabe von 200 µM AHT (Anhydrotetracyclin)/l LB-Medium induziert. Danach

wurden die Zellen weitere 2 h inkubiert und anschließend durch eine Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4°C) geerntet. Das Zellpellet sollte mittels eines Pinsels vorsichtig in 5 ml Puffer A [25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.5 mM EDTA, 200 mM KCl, 250 mM Saccharose] resuspendiert werden. Nach Auflösung des Pellets wurden weitere 25 ml Puffer A hinzugegeben und restliche Zellhaufen mittels eines Pinsels aufgelöst. Anschließend wurden die Zellen nochmals durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4°C) pelletiert. Nach diesem Waschschrift erfolgte eine weitere Resuspension der Zellen mit einem Pinsel in 1 ml Puffer B [25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 250 mM Saccharose]. Nach Auflösung des Pellets wurden weitere 5 ml Puffer B hinzugegeben und wieder mit dem Pinsel behandelt. Danach wurde die Suspension mit Puffer B auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Behandlung der Zellsuspension mittels der French Press (SLM Aminco, SOPRA GmbH, Deutschland, 1250 psi). Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4°C) entfernt. Aus dem Überstand konnte mittels einer Ultrazentrifugation (1 h, 100000 g, 4°C) die Membranfraktion präpariert werden. Die Membranen wurden mittels eines Pinsels in 1 ml Assay-Puffer [75 mM HEPES-KCl (pH 7.5), 150 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 mM Saccharose, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>] resuspendiert und anschließend mit Assay-Puffer auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation (1 h, 100000 g, 4°C) wurden die Membranen in 250 µl Assay-Puffer mittels eines Pinsels resuspendiert und dann auf 1 ml mit Assay-Puffer aufgefüllt. Die so gewonnenen Vesikel wurden in 200 µl Aliquote geteilt und sofort für Quenching Experimente eingesetzt.

### **2.8.2. Nachweis eines künstlichen pH-Gradienten durch Fluoreszenzlöschung**

Um das Löschen der Fluoreszenz, also das Entstehen und den Zusammenbruch eines pH-Gradienten nachzuweisen, wurden 1999 µl des 2 µM Acridinorange (3,6-Bis-dimethylaminoacridin) enthaltenen Cholinchlorid-Puffers [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M Cholinchlorid, 5 mM MgCl<sub>2</sub>] in Quarzküvetten, die 4 klare Seiten aufwiesen, in einem Spektrofluorometer (Modell SFM 25, Fa. Kontron, Eching) bei einer Wellenlänge von 493 nm vorinkubiert. Die Fluoreszenzemission wurde bei 530 nm detektiert und mittels der Software WIND (32-bit spectroscopy software for windows, Fa. Kontron, Eching) auf den angeschlossenen PC dargestellt. Nachdem sich das Signal stabilisiert hatte, wurden 3 µl der Vesikel zugegeben. Das Beladen der Vesikel geschah durch die Zugabe von 50 µM NADH. Das Entstehen des pH-Gradienten ließ sich durch die Verringerung der relativen Fluoreszenz (bis ca. 20 % des Ausgangswertes) verfolgen. Der Zusammenbruch des pH-Gradienten wurde durch die Zugabe von 0.5-50 µM FCCP induziert. Die Fluoreszenz wurde 7 min spektroskopisch verfolgt, bis wieder mindestens 90% des Ausgangswertes erreicht wurden.

### **2.8.3. Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Metallen** (Rosen, 1986, Nies und Silver, 1989)

Nach einer Vorkultur in LB-Medium, wurden die Zellen 1:100 in Tris-Minimal-Medium, welches 0.2 % (w/v) Glukose und 0.1 % (w/v) Hefeextrakt enthielt, verdünnt. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Expression von CzcD durch die Zugabe von 200 µg AHT

(Anhydrotetracyclin)/l induziert und die Zellen weitere 2 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach dem Erreichen einer frühstationären Wachstumsphase wurden die Zellen bei ca. 150 Klett geerntet und zweimal mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) gewaschen. Danach erfolgte die vollständige Resuspension des Zellpellets in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0). Die Zelldichte wurde nochmals bestimmt.

Die Aufnahmeuntersuchungen wurden nach der Filtrationsmethode in einem Wasserbad bei 30°C durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Zellen wurde pro Ansatz auf 3 ml eingestellt, wobei die Kultur 2 g/l Glukose enthält. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 15 µl einer radioaktiven  $^{65}\text{Zn}^{2+}$ ,  $^{57}\text{Co}^{2+}$  oder  $^{109}\text{Cd}^{2+}$ -Lösung (3 mM, DuPont, Bad Homburg) gestartet. Nach definierten Zeiten wurden 400 µl Proben entnommen und filtriert (NC 45, Schleicher und Schüll, Dassel). Um unspezifisch gebundenes Metall zu entfernen, wurden die Filter zweimal mit 10 Vol. Waschpuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ] gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt.

Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe<sup>TM</sup> wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min. Die gemessene Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Als Absolutwert wurden dem Ansatz 400 µl Probe entnommen, ohne Filtration in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt und gemessen. Anschließend erfolgte die Berechnung, wie viel µmol radioaktives Metall pro g Zelltrockenmasse aufgenommen worden war.

## **2.9. Kristallisation von CzcD**

Um Aussagen über die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu erhalten, ist es notwendig, das Protein in einen Zustand zu überführen, in dem die native Struktur messbar ist. Erster Schritt, diese Struktur zu erhalten, ist die Kristallisation des Proteins. Im Fall von CzcD wurde die Gasphasendiffusion am hängenden Tropfen gewählt, um einen Proteinkristall zu erhalten.

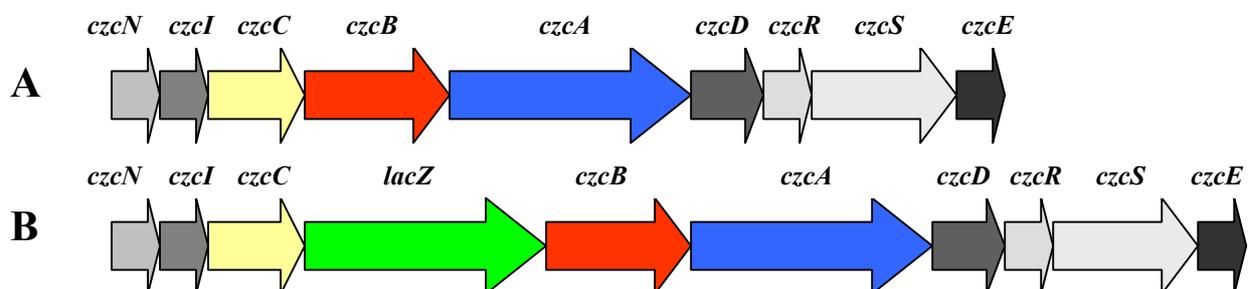
Für die Kristallisationen wurden Proteinlösungen mit einer Proteinkonzentration von 7.5-10 mg/ml verwendet. Dabei war das Protein nur unter dem Einfluss von n-Dodecyl-β-D-Maltosid gereinigt worden. CzcD lag in 10 mM Tris-HCl pH 7.0 gelöst vor. Als Präzipitant wurden ausschließlich verschiedene Polyethylenglykole (PEG) verwendet. Zum Einsatz kamen dabei PEG4000, PEG6000, PEG8000 und PEG10000 in 12-23 % (w/v) Konzentrationen, gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0). Die Präzipitationslösungen (1 ml) wurden in Kristallisationsschalen (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) vorbereitet, indem PEG-Lösungen (25 % [w/v]) mit den entsprechenden Volumina 10 mM Tris-HCl pH 7.0 gemischt wurden. Anschließend wurden die Kristallisationsschalen zur besseren Durchmischung langsam auf einem Schüttler für 15 min inkubiert. 5 µl der Proteinlösung wurden anschließend mit 5 µl Präzipitationslösung auf einem silanisierten Deckgläschen (Durchmesser 18 mm) gemischt. Dieses Deckgläschen wurde dann auf der Kristallisationsschale mit Silikonkleber luftdicht befestigt. Nach 14tägiger Inkubation konnten die Kristallisationsschalen unter einem Mikroskop analysiert werden.

### III. Ergebnisse

#### 3.1. Eine $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ Operon-Fusion zur Untersuchung induktiver Ereignisse

##### 3.1.1. Die Induktion der $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ Operon-Fusion erfolgt durch Zink, Kobalt und Kadmium

Da die Genprodukte der *czc*-Determinante keine direkt messbare enzymatische Aktivität besitzen, und somit die Induktionen nur durch aufwendige Northern- bzw. Western-Blot Analysen nachweisbar waren, wurde nach einer Methode gesucht, schnell und effizient die Expression der *czc*-Gene zu untersuchen. Es sollte deshalb, ein gut messbares, in *R. metallidurans* AE128(pMOL30) nicht vorhandenes, Reporterenzym eingesetzt werden. Als Reportergen wurde *lacZ*, das Gen der  $\beta$ -Galaktosidase, ausgewählt, das als promotorlose *lacZ*-Kassette zwischen *czcC* und *czcB* (Abb. 3) eingefügt worden war. Dadurch entstand DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ], der bereits konstruiert vorlag (Große *et al.*, 1999). Der Einfluss und die Messbarkeit der  $\beta$ -Galaktosidase bei der Induktion mit  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  mussten jedoch noch untersucht werden.

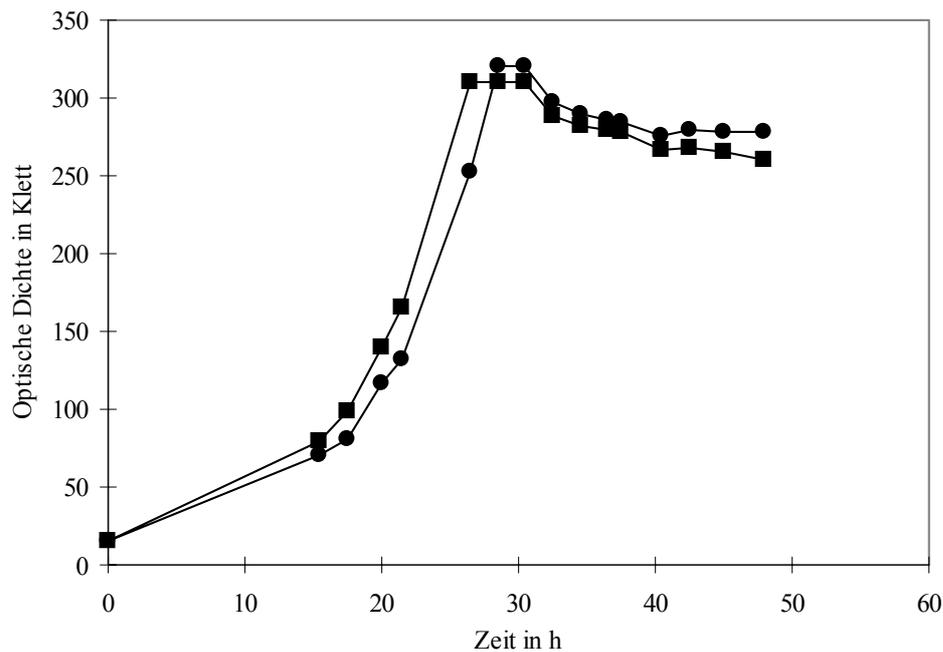


**Abb. 3: Physische Karte der *czc*-Determinante in AE128[pMOL30] und DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ]**

Durch die Insertion einer promotorlosen *lacZ*-Kassette lag eine Transkriptionsfusion vor, deren Expression direkt mit der *czc*-Expression gekoppelt war. **A:** AE128[pMOL30] **B:** DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ]

Die eingefügte *lacZ*-Kassette sollte hierbei allerdings nicht die *czc*-vermittelte Schwermetallresistenz beeinflussen. Deshalb wurden Wachstumsversuche auf festen und flüssigen Medien (Abb. 4) durchgeführt. Es konnten keine Unterschiede zwischen AE128[pMOL30], dem Wildtyp und DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] beim Wachstum in Anwesenheit von 2.5 mM  $Zn^{2+}$  festgestellt werden.

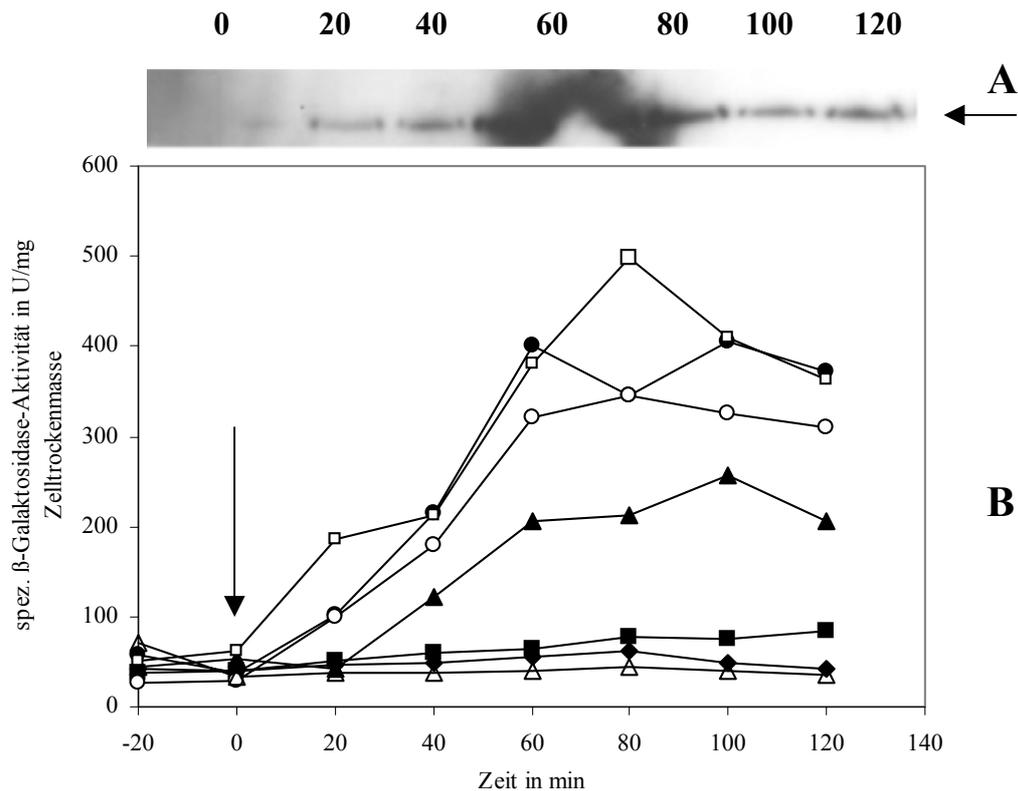
Ein ähnliches Wachstumsverhalten war auch unter dem Einfluss von 2.5 mM Kobalt und 1 mM Kadmium in Tris-Minimal-Medium zu beobachten (Ergebnis nicht gezeigt). Somit beeinflusst die Insertion einer promotorlosen *lacZ*-Kassette nicht die *czc*-vermittelte Schwermetallresistenz.



**Abb. 4: Wachstumskurven von AE128 (●) und DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] (■) in 2.5 mM  $ZnCl_2$**

Wachstumsversuch in Tris-Minimal-Medium, bei dem die 48 h-Vorkulturen 1:100 in frischem Medium, das 2.5 mM  $ZnCl_2$  enthielt, verdünnt wurden. Dabei wurden in Abständen von 2 h die Optische Dichte der Stämme AE128[pMOL30] (●) und DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] (■) bestimmt. Gezeigt ist eine reproduzierbare Wachstumskurve.

Nachdem gezeigt worden war, dass die inserierte promotorlose *lacZ*-Kassette nicht die Schwermetallresistenz beeinflusst, wurde untersucht, inwieweit es mit diesem System möglich ist, induktive Ereignisse direkt durch die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nachzuweisen. Dazu wurde DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] mit verschiedenen Konzentrationen von Zink in der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und die Bildung der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Entnahme von 200  $\mu$ l Zellen über 120 min in 20minütigen Abständen verfolgt (Abb. 5, B). Als wichtig erwies sich dabei die Verwendung von SL-6 freiem Tris-Minimal-Medium, da die Verdünnung der Vorkulturen in frischem Tris-Minimal-Medium ebenfalls die  $\beta$ -Galaktosidase induzierte. Zuerst wurde die Induktion mit  $Zn^{2+}$  untersucht, wobei folgende Konzentrationen verwendet wurden: 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 1 mM, 2 mM und 5 mM. Während die niedrigen Zink-Konzentrationen 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M die  $\beta$ -Galaktosidase nicht induzierten, war ab 100  $\mu$ M ein deutlicher Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu beobachten (Abb. 5, B). Diese Aktivität stieg auch mit zunehmender  $Zn^{2+}$ -Konzentration an. Die Induktion erreichte bei ca. 1 mM ein Maximum, verringerte sich dann allerdings bei höheren Konzentrationen wieder. Während es bei 2 mM noch zu einer leicht verringerten LacZ-Aktivität kam, war bei 5 mM keine LacZ-Aktivität mehr zu beobachten (Abb. 5, B). Um die Koexpression der  $\beta$ -Galaktosidase und von CzcA, der zentralen Komponente des *czc*-Efflux-Komplexes, zu beweisen, wurden parallel Proben der Induktion mit 300  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  auf einem Western-Blot analysiert. Es wurde ein CzcA-spezifischer Antikörper eingesetzt. In Analogie wurde auch die Induktion des LacZ-Proteins durch



**Abb. 5: β-Galaktosidase-Induktion mit verschiedenen Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen in DN175[pMOL30-9, Φ(*czcC-lacZ-czcBA*)]**

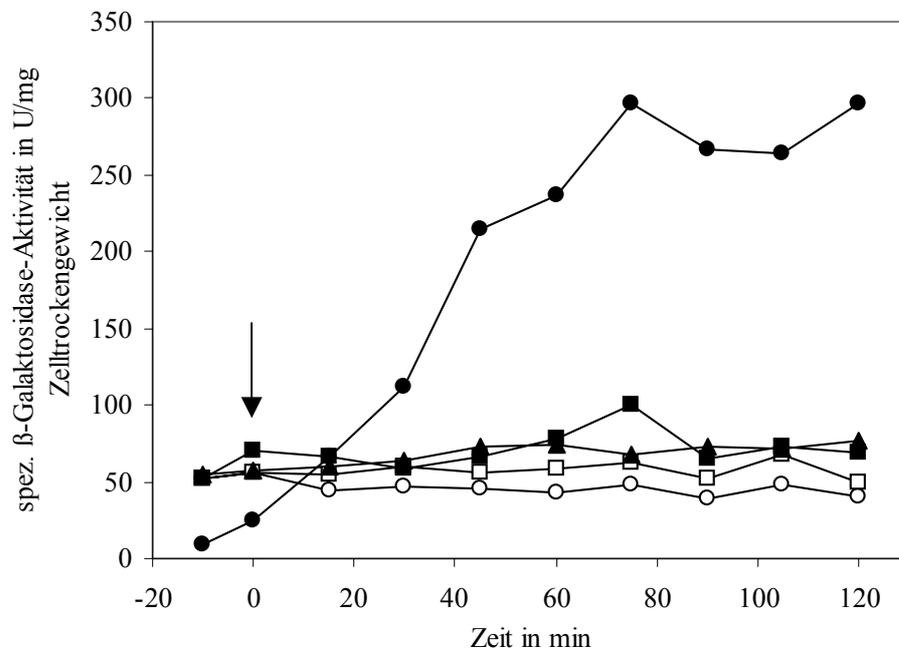
Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (75-120 Klett) wurden verschiedene Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen eingesetzt, um die Φ(*czcC-lacZ-czcBA*)-Expression zu induzieren. **A:** Parallel zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden Proben in einem Western-Blot eingesetzt und mit einem gegen CzcA-spezifischen Antikörper nachgewiesen, 300 μM Zn<sup>2+</sup>. **B:** Proben mit einem Volumen von 200 μl wurden entnommen und die Aktivität der β-Galaktosidase in U/mg Zelltrockenmasse bestimmt. Zum Zeitpunkt 0 wurde der Induktor zugegeben (Markierung durch Pfeil): 1 μM (◆) 10 μM (■), 100 μM (▲), 300 μM (●), 1 mM (□), 2 mM (○), 5 mM (Δ). Ohne Induktion ergab sich keine Erhöhung der β-Galaktosidase im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (Ergebnis nicht gezeigt).

Western-Blot nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt). Dadurch konnte die Koexpression von CzcA zur β-Galaktosidase gezeigt werden (Abb. 5, A).

Die Induktion mit Co<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Während bei Zn<sup>2+</sup> schon mit 100 μM eine Induktion nachgewiesen werden konnte, war eine eindeutige Induktion mit Co<sup>2+</sup> erst ab einer Konzentration von 500 μM zu beobachten. Ähnlich bewirkte die Induktion mit Cd<sup>2+</sup> erst ab 300 μM einen Anstieg der β-Galaktosidase-Aktivität. Während mit Co<sup>2+</sup> bei den verwendeten Konzentrationen keine Hemmung der β-Galaktosidase gezeigt werden konnte, war diese bei Cd<sup>2+</sup> ab einer Konzentration von 1 mM zu beobachten. Beide Metalle erreichten aber trotz Induktion mit gleichen Schwermetallkonzentrationen nie das Expressionsniveau, das durch Zn<sup>2+</sup> vermittelt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.1.2. Die Induktion der $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ Operon-Fusion erfolgt nur durch die Schwermetallionen $Zn^{2+}$ , $Co^{2+}$ und $Cd^{2+}$

Nachdem ein schnelles und effektives System zur Bestimmung von induktiven Ereignissen vorhanden war, konnten auch andere Substanzen bei der Induktion von DN175[pMOL30-9,



**Abb. 6: Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] durch verschiedene Stressoren**

Die Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch verschiedene „Stressoren“ wurde untersucht. Dabei wurden Zellen von DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] in der exponentiellen Wachstumsphase (75-120 Klett) mit  $300 \mu M Pb^{2+}$  (■), 0.05 % (v/v)  $H_2O_2$  (○), 5 % (v/v) Ethanol (▲) und  $42^\circ C$  (□) inkubiert. Als Positivkontrolle diente DN175[pMOL30-9;  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ], induziert mit  $300 \mu M Zn^{2+}$  (●). Ein Pfeil markiert den Zeitpunkt (0 min) der Zugabe der potentiellen Induktoren. Nach definierten Zeiten wurden 200  $\mu l$  Proben der Kultur entnommen und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Im Fall der Hitzeinduktion wurde die Kultur von  $30^\circ C$  auf  $42^\circ C$  im Wasserbad erhitzt.

$\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] untersucht werden. Da für die Induktion der *czc*-Expression ein ECF-Sigmafaktor postuliert wird, wurde untersucht, inwieweit andere „Stressoren“, die zum Teil auch über ECF-Sigmafaktoren reguliert werden, die Expression von *czcCBA* induzieren. Als Vertreter für Schwermetallstress wurden  $300 \mu M Pb^{2+}$  als Induktor gewählt. In DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] wurde oxidativer Stress durch die Zugabe von 0.05 % (v/v)  $H_2O_2$  induziert und Hitzestress durch die Inkubation der Kulturen bei  $42^\circ C$ . Des Weiteren wurden die Zellen auch mit 5 % (v/v) Ethanol als Vertreter für Lösungsmittelstress inkubiert.

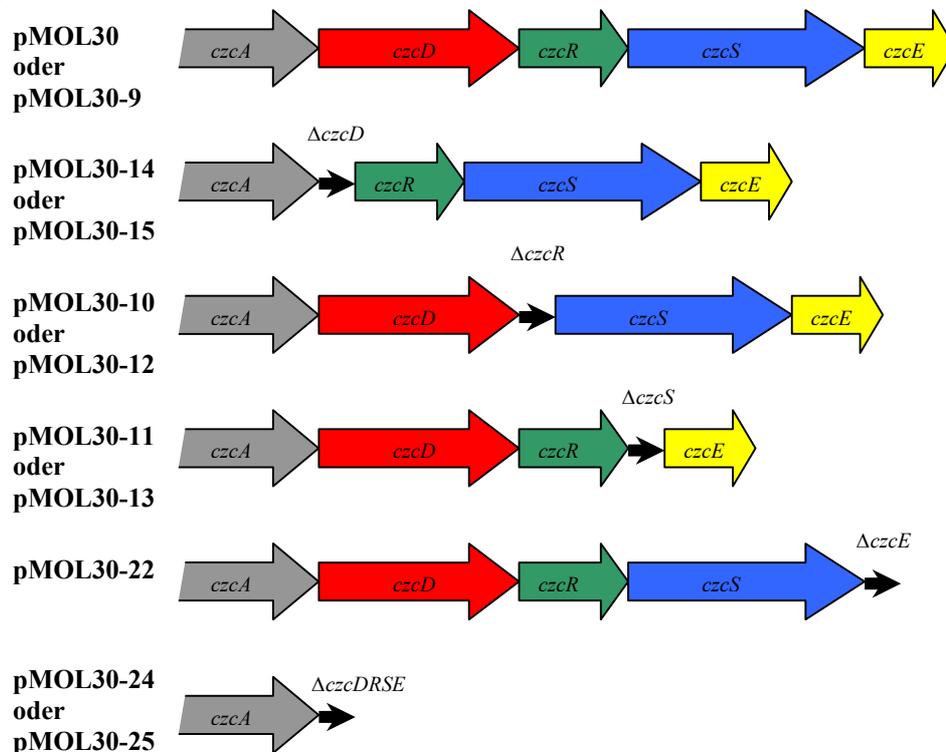
Durch die Zugabe von „Stressoren“, die bisher nicht als Induktoren für die  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ -Expression identifiziert wurden, konnte in keinem der untersuchten Fälle eine Expression der  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$  Operon-Fusion beobachtet werden (Abb. 6). Dabei war das Wachstum bei der verwendeten Bleikonzentration (100 Klett bei 0 min–150 Klett bei 120 min) nicht inhibiert. Auch das Wachstum bei  $42^\circ C$  (100 Klett bei 0 min–142 Klett bei 120 min) wurde nicht durch die erhöhte Temperatur negativ beeinflusst. Die Inkubation mit 5 % (v/v) Ethanol hingegen verzögerte das

Wachstum des DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] (100 Klett bei 0 min-115 Klett bei 120 min) deutlich. Die gewählte  $H_2O_2$ -Konzentration von 0.05 % (v/v) bewirkte eine Einstellung des Wachstums. Letztendlich war jedoch nur 300  $\mu M$  Zink in der Lage, die  $\beta$ -Galaktosidase in DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] zu induzieren (Abb. 6).

### 3.2. Deletionsmutanten der regulatorischen Genbereiche

Da die Rollen der einzelnen akzessorischen Gene der *czc*-Determinante nicht bekannt waren, sollten verschiedene Deletionsmutanten in DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] und AE128(pMOL30) hergestellt werden. Dabei war es wichtig, die Beeinflussung der Expression der anderen Gene minimal zu halten. Um dies sicherzustellen, wurden Deletionen konstruiert, die 24 bp am 5'-Ende des ORFs und 24 bp am 3'-Ende des ORFs sowie 6 bp durch eine zusätzlich eingefügte *MunI*-Schnittstelle aufwiesen. Dadurch sollten Restpeptide mit 18 AS-Resten exprimiert werden, die keine enzymatischen Aktivitäten mehr aufweisen sollten. Da die Deletionen *in frame* eingefügt wurden, sollte das Ausschalten des gewünschten Genes keinen Einfluss auf die Expression stromabwärts liegender Gene haben.

Um die einzelnen Gene zu deletieren, wurden zwei Genbereiche von ca. 300 bp mit den jeweiligen Primern (*czcX* OD und *czcX* OU sowie *czcX* UD und *czcX* UU, *X*=Genname) von pMOL30 amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte enthielten die 24 bp am 5'-Ende des ORFs sowie die 24 bp am 3'-Ende des ORFs. Zusätzlich wurden eine *MunI* und eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

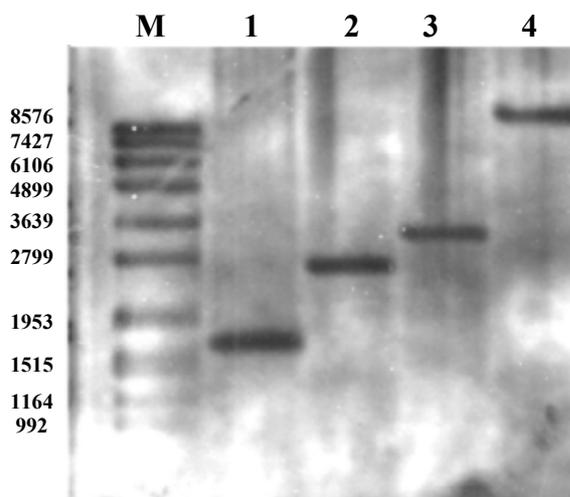


**Abb. 7: Schematische Darstellung der Deletionen in der DRR (downstream regulatory region)**

Durch die Konstruktion von verkürzten Genen, die nur noch aus 24 bp am 3'-Ende des ORFs und 24 bp am 5'-Ende des ORFs sowie eine *MunI*-Schnittstelle bestanden, konnten folgende Deletionen in den *R. metallidurans* Stamm AE128(pMOL30):  $\Delta czcD$  (pMOL30-14),  $\Delta czcR$  (pMOL30-10),  $\Delta czcS$  (pMOL30-11),  $\Delta czcE$  (pMOL30-22), und  $\Delta czcDRSE$  (pMOL30-24), und in den *R. metallidurans* Stamm DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] eingefügt werden:  $\Delta czcD$  (pMOL30-15),  $\Delta czcR$  (pMOL30-12),  $\Delta czcS$  (pMOL30-13) und  $\Delta czcDRSE$  (pMOL30-25).

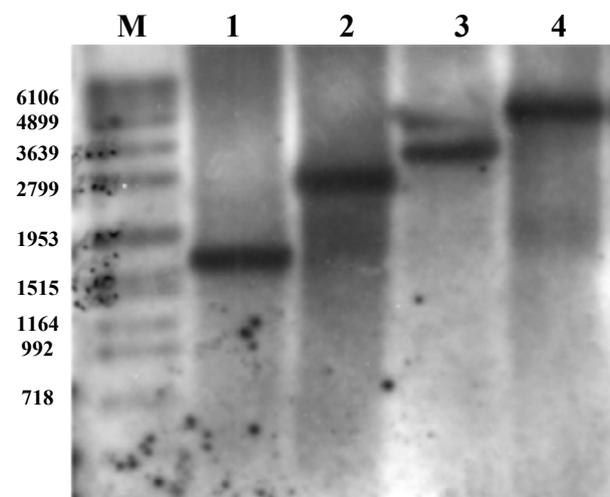
Nach erfolgter Amplifikation wurden die PCR-Fragmente mit *MunI* geschnitten und durch eine „Drei-Arm-Ligation“ in den Vektor pGEM-Teasy ligiert. Die gewonnenen Konstrukte konnten durch Sequenzierung verifiziert werden. Die so erhaltenen verkürzten Genfragmente wurden durch eine *NdeI*-Restriktion aus dem Vektor pGEM-Teasy geschnitten und in pLO2 umkloniert. Dieser Vektor kann nicht in *R. metallidurans* repliziert werden und trägt eine Kanamycin-Resistenz sowie das Gen der Leavansucrase (*sacB*). pLO2 kann also nur aufgrund der Rekombination homologer Bereiche in das Megaplasmid eingebaut werden. Dies wurde durch die Selektion auf Tris-Minimal-Agar mit 1500 mg/l Kanamycin erreicht. Durch die anschließende Doppelaustauschrekombination konnten alle regulatorischen Gene der DRR in AE128(pMOL30) und alle Gene außer *czcE* in DN175[pMOL30-9,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ ] deletiert werden (Abb. 7).

Alle erhaltenen Deletionsmutanten wurde mittels PCR überprüft. Zusätzlich erfolgte die Isolation aller mutierten Megaplasme und die Deletionen konnten mittels Southern Hybridisierung nachgewiesen werden (Abb. 8a-8d). Dabei wurde die native *MunI*-Schnittstelle in *czcA* genutzt, um ein definiertes Fragment bei der Überprüfung der Deletionen zu erhalten. Als zweite Schnittstelle konnte die *MunI*-Schnittstelle im ausgetauschten Fragment (s. Konstruktion) genutzt werden. Im Southern-Blot wurden dann folgende Fragmente im *MunI*-Verdau erwartet:  $\Delta\text{czcD}$  (pMOL30-14/pMOL30-15) **1609 bp**,  $\Delta\text{czcR}$  (pMOL30-10/pMOL30-14) **2489 bp**,  $\Delta\text{czcS}$  (pMOL30-11/pMOL30-13) **3210 bp** und  $\Delta\text{czcDRSE}$  (pMOL30-24/pMOL30-25) **1609 bp** und AE128(pMOL30) bzw. DN175[pMOL30-9,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ ] **> 8500 bp** (in der *MunI/XbaI*-Restriktion **4761 bp**). Als Sonde diente hierbei das PCR-Produkt der Primer *czcD* OD und *czcD* OU, welches ca. 300 bp stromaufwärts des *czcD*-Genes enthielt.



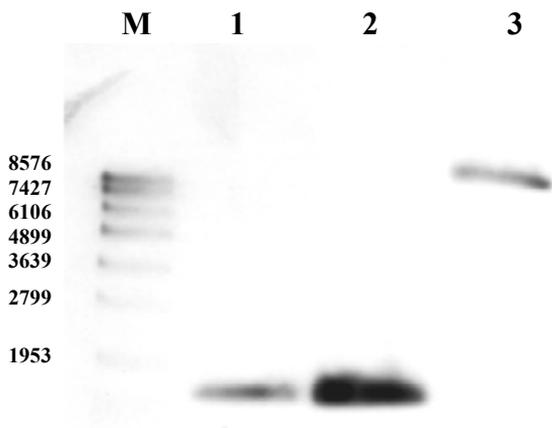
**Abb. 8a: Southern Blot der Deletionen, basierend auf DN175[pMOL30-9  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ ]**

Nachweis der Deletionen der regulatorischen Gene durch einen *MunI*-Verdau; als Sonde diente ein Fragment, das 300 bp stromaufwärts von *czcD* enthielt. **M:** Marker, **1:**  $\Delta\text{czcD}$  (pMOL30-15), **2:**  $\Delta\text{czcR}$  (pMOL30-12), **3:**  $\Delta\text{czcS}$  (pMOL30-13), **4:** (pMOL30-9)



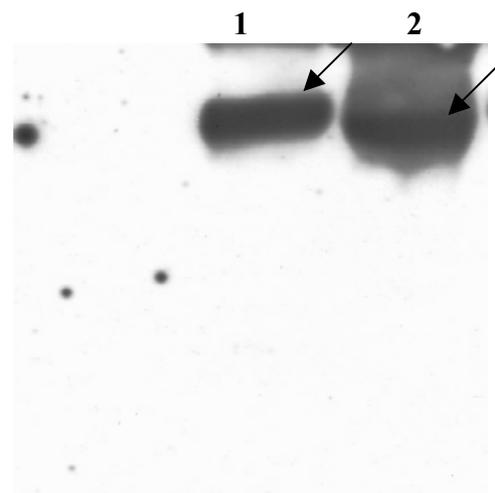
**Abb. 8b: Southern Blot der Deletionen, basierend auf AE128(pMOL30)**

Nachweis der Deletionen der regulatorischen Gene durch einen *MunI/XbaI*-Verdau; als Sonde diente ein Fragment, das 300 bp stromaufwärts von *czcD* enthielt. **M:** Marker, **1:**  $\Delta\text{czcD}$  (pMOL30-14), **2:**  $\Delta\text{czcR}$  (pMOL30-10), **3:**  $\Delta\text{czcS}$  (pMOL30-11), **4:** (pMOL30)



**Abb. 8c: Southern Blot der Deletionen der gesamten DRR (*downstream regulatory region*)**

Nachweis der Deletionen des gesamten Genbereiches stromabwärts der Strukturgenregion durch einen *MunI*-Verdau; als Sonde diente ein Fragment, das 300 bp stromaufwärts von *czcD* enthielt. **M:** Marker, **1:**  $\Delta czcDRSE$  (pMOL30-24), **2:**  $\Delta czcDRSE$  (pMOL30-25), **3:** pMOL30



**Abb. 8d: Southern Blot der *czcE*-Deletion in *R. metallidurans* AE128**

Nachweis der Deletionen des *czcE*-Genbereiches stromabwärts von *czcDRS* durch einen *XbaI*-Verdau; als Sonde diente ein Fragment, das 300 bp stromabwärts von *czcE* enthielt. **1:** pMOL30, **2:**  $\Delta czcE$  (pMOL30-22)

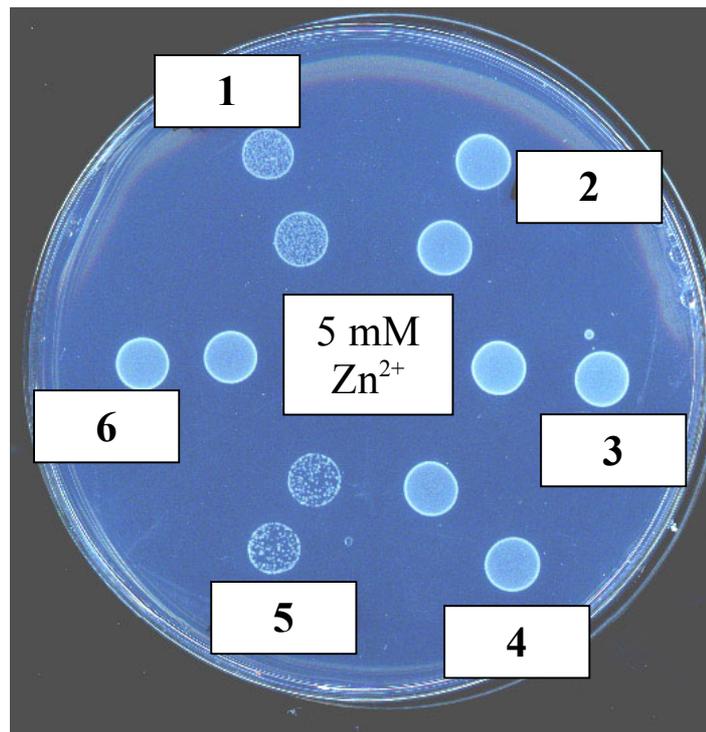
Aufgrund des unbekanntes Abstandes der beiden *XbaI*-Schnittstellen im Nachweis der *czcE*-Deletion war die Größe der zu erwartenden Fragmente nicht ermittelbar. Einzig der Unterschied im Laufverhalten zwischen pMOL30 und pMOL30-22 ( $\Delta czcE$ ) sollte als Charakteristikum zur Analyse herangezogen werden.

### **3.2.1. Die Deletionen der Gene der DRR (*downstream regulatory region*) zeigten nur geringe Effekte auf die *czc*-vermittelte Resistenz**

Da in flüssigem Medium schlecht reproduzierbare Effekte im Wachstumsverhalten bei verschiedenen Zink-, Kobalt- und Kadmium-Konzentrationen zu sehen waren, wurde der Effekt hoher Metallionen-Konzentrationen auf festen Medien näher untersucht.

Bei Wachstumsversuchen waren nur Konzentrationen von 1-2.5 mM Zink verwendet worden, da höhere Konzentrationen zu einer starken Trübung des Mediums führten. In festen Medien konnten hingegen eindeutig Effekte der Deletion einzelner Gene der DRR bei hohen Zink- und Kobalt-Konzentrationen (2.5-10 mM) nachgewiesen werden (Abb. 9).

Dabei war nicht der direkte Verlust der Resistenz sichtbar, sondern eine verringerte Vitalität der Kulturen bei hohen Zink-Konzentrationen. So wuchsen die Deletionen des *czcD*-Genes so wie die Deletion der gesamten stromabwärts der Strukturgene liegenden Region *czcDRSE* deutlich schlechter als der Wildtyp (Abb.9).



**Abb. 9: Wachstumsversuch der Deletionsmutanten, basierend auf AE128(pMOL30) auf 5 mM Zn**

Wachstumsversuch der Deletionsmutanten auf festem Medium. Dabei wurden 48 h-Kulturen 1:200 verdünnt und 15  $\mu$ l auf die Tris-Minimal-Medium-Platten mit 5 mM  $Zn^{2+}$  getropft. Die Platten wurden anschließend für 2-3 d bei 30°C inkubiert. **1: DN182(pMOL30-14,  $\Delta czcD$ ), 2: DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ), 3: DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ), 4: DN191(pMOL30-22,  $\Delta czcE$ ), 5: DN193(pMOL30-24,  $\Delta czcDRSE$ ), 6: AE128(pMOL30)**

### **3.2.2. Einfluss der Deletionen regulatorischer Gene auf die Induktion der *czc*-Strukturgene in DN175[pMOL30-9, $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ]**

Durch den Beweis, dass die Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität direkt mit der Expression der *czcCBA*-Strukturgene korreliert und es Hinweise auf mögliche Einflüsse der akzessorischen Gene auf diese Expression gab, war es nun möglich, den Einfluss der einzelnen Deletionen direkt zu messen.

Die verwendeten Zellkulturen befanden sich hierbei immer im frühexponentiellen Wachstumsstadium (75-100 Klett). Sie wurden zum Zeitpunkt 0 mit den angegebenen Metallkonzentrationen induziert. Es wurden in definierten Zeitabständen von je 20 min über einen Zeitraum von 2 h Proben entnommen. Anschließend wurde die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, bezogen auf die Zelltrockenmasse, bestimmt. Dabei wurden verschiedene Metallionen-Konzentrationen verwendet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Deletionsmutanten und DN175[pMOL30-9,  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$ ] bei stark induzierenden (300  $\mu$ M)  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen beobachtet werden. Auch bei der Induktion mit  $Co^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  konnte bei hohen Metall-Konzentrationen kein Unterschied detektiert werden. Deshalb wurde nach Metallionen-Konzentrationen gesucht, bei denen Unterschiede gemessen werden konnten. Nach mehreren

**Tab. 5:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität<sup>1</sup> der Deletionsmutanten im Vergleich zu DN175[pMOL30-9,  $\Phi$ (*czcC-lacZ-czcBA*)]<sup>2</sup>**

Stamm	10 $\mu$ M Zn <sup>2+</sup>		300 $\mu$ M Co <sup>2+</sup>		100 $\mu$ M Cd <sup>2+</sup>	
	0 min	120 min	120 min	120 min	120 min	120 min
<b><math>\Delta</math>czcD</b>						
DN183	137.5 $\pm$ 18.7	291.7 $\pm$ 127.3	293.6 $\pm$ 12.4	341.5 $\pm$ 43.9		
<b><math>\Delta</math>czcR</b>						
DN180	136.2 $\pm$ 8.5	211.3 $\pm$ 31.3	198.8 $\pm$ 9.7	303.3 $\pm$ 21.6		
<b><math>\Delta</math>czcS</b>						
DN181	103.3 $\pm$ 20.7	172.7 $\pm$ 43.5	208.2 $\pm$ 10.9	237.5 $\pm$ 48.3		
<b>Wildtyp</b>						
DN175	92.3 $\pm$ 5.4	132.3 $\pm$ 29.5	111.4 $\pm$ 16.3	96.2 $\pm$ 14.3		

<sup>1</sup>Alle Enzymaktivitäten sind in U/mg Zelltrockengewicht angegeben.

<sup>2</sup>Bei allen Induktionen wurden Zellen im frühexponentiellen Stadium (75-125 Klett) benutzt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach 2 h bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht aus drei unabhängigen Messungen.

**Tab. 6:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität<sup>1</sup> der Mehrfach-Deletionsmutanten im Vergleich zu zu DN175[pMOL30-9,  $\Phi$ (*czcC-lacZ-czcBA*)]<sup>2</sup> bei der Induktion mit 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>**

Stamm	0 min	90 min
<b><math>\Delta</math>czcDRSE</b>		
DN194	24.1 $\pm$ 4.4	96.8 $\pm$ 48.4
<b><math>\Delta</math>czcDR</b>		
DN401	47.1 $\pm$ 6.5	216.7 $\pm$ 54.5
<b><math>\Delta</math>czcDS</b>		
DN403	26.4 $\pm$ 5.0	144.4 $\pm$ 58.6
<b><math>\Delta</math>czcDE</b>		
DN405	22.4 $\pm$ 3.9	113.9 $\pm$ 70.7
<b><math>\Delta</math>czcRE</b>		
DN407	23.4 $\pm$ 3.8	94.7 $\pm$ 65.0
<b><math>\Delta</math>czcSE</b>		
DN409	21.5 $\pm$ 5.7	118.7 $\pm$ 55.0
<b>Wildtyp</b>		
DN175	22.3 $\pm$ 2.2	33.0 $\pm$ 1.0

<sup>1</sup>Alle Enzymaktivitäten sind in U/mg Zelltrockengewicht angegeben.

<sup>2</sup>Bei allen Induktionen wurden Zellen im frühexponentiellen Stadium (75-125 Klett) benutzt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach 1.5 h bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht aus drei unabhängigen Messungen.

Versuchsreihen wurden folgende Konzentrationen ausgewählt: 10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>, 300  $\mu$ M Co<sup>2+</sup> und 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> (Tab. 5).

Die beiden Deletionen DN180[pMOL30-12,  $\Phi$ (*czcC-lacZ-czcBA*;  $\Delta$ czcR)] und DN181[pMOL30-13,  $\Phi$ (*czcC-lacZ-czcBA*;  $\Delta$ czcS)] im Zwei-Komponentenregulationssystem zeigten ein ähnliches Verhalten in der Expression der *lacZ*-Operon-Fusion. Während DN175[pMOL30-9,  $\Phi$ (*czcC-lacZ-*

*czcBA*)] bei den gewählten Metallionen-Konzentrationen nur sehr schwach induziert wurde, konnte bei den beiden Deletionen im Zwei-Komponentenregulationssystem CzcRS eine deutliche Zunahme der Induzierbarkeit der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beobachtet werden.

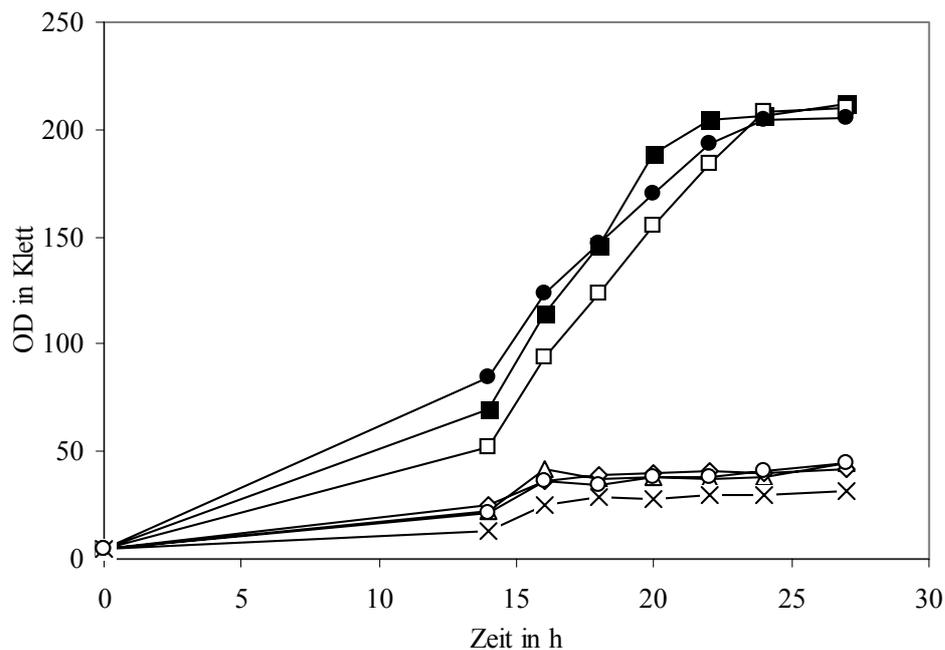
Die Deletion des *czcD*-Genes in DN183[pMOL30-15,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA}; \Delta\text{czcD})$ ], ähnlich wie bei DN180[pMOL30-12,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA}; \Delta\text{czcR})$ ], führte ebenfalls zu einer besseren Induzierbarkeit der Determinante. Auffällig ist die etwas erhöhte Grundexpression der Operon-Fusion um Faktor 1.5 im Vergleich zu DN175[pMOL30-9,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ ].

Alle konstruierten Mehrfachdeletionen setzten den Trend der Einzeldelationen fort. Aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde in diesen Versuchsreihen nur Kadmium als Induktor gewählt. Bei allen Mehrfachdeletionen war eine bessere Induzierbarkeit der *czc*-Determinante bei der Inkubation mit 100  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  zu beobachten. Dabei zeigten die Deletionen von *czcDR* den stärksten und von *czcRE* sowie *czcDRSE* den schwächsten Effekt. Eine leichte Verringerung der MIC war allerdings nur bei den Deletionen von *czcDR* und *czcDRSE* zu beobachten.

### **3.2.3. CzcD reprimiert die Expression der *czc*-Determinante**

Neben dem schnelleren Wachstum des Deletionsstammes DN182(pMOL30-14;  $\Delta\text{czcD}$ ) in flüssigem Medium bei 2.5 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , der verringerten Vitalität des Deletionsstammes auf festen Medien (Abb. 9) sowie der erhöhten Basisexpression im DN183[pMOL30-15,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA}; \Delta\text{czcD})$ ] (siehe 3.2.2.) konnte auch in Wachstumsversuchen mit unterschiedlich vorinkubierten Vorkulturen diese erhöhte Expression des *czcCBA*-Operons bestätigt werden (Abb. 10).

In einem Wachstumsversuch in flüssigem Tris-Minimal-Medium war festgestellt worden, dass DN182(pMOL30-14;  $\Delta\text{czcD}$ ) keinen Unterschied im Wachstumsverhalten bei Vorinkubation mit und ohne 300  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  zeigte. Im Gegensatz dazu war in AE128(pMOL30) ohne Vorinkubation eine deutlich längere *lag*-Phase als nach Vorinkubation mit 300  $\mu\text{M ZnCl}_2$  sichtbar. Deshalb wurde untersucht, inwieweit verschiedene CDF-Proteine diese offensichtliche Derepression des *czc*-Systems rückgängig machen könnten. Dabei wurden die Gene *czcD* (pDNA176), *ZRC1* (pDNA178) und *COT1* (pDNA177), welche auf pVDZ'2 kloniert vorlagen, in DN182(pMOL30-14;  $\Delta\text{czcD}$ ) konjugiert und das Wachstumsverhalten in Tris-Minimal-Medium untersucht. Nach erfolgter Vorinkubation mit 300  $\mu\text{M ZnCl}_2$  zeigte keiner der Stämme einen Unterschied im Vergleich zu DN182(pMOL30-14;  $\Delta\text{czcD}$ ) oder AE128(pMOL30), wobei die exponentielle Wachstumsphase bei allen Kulturen in Abhängigkeit vom Zustand der Vorkultur nach ca. 12 h einsetzte. Wurden die Stämme DN182(pMOL30-14,  $\Delta\text{czcD}$ ; *in trans* pDNA176 *czcD*), DN182(pMOL30-14,  $\Delta\text{czcD}$ , *in trans* pDNA177 *COT1*) und DN182( $\Delta\text{czcD}$ ; *in trans* pDNA178 *ZRC1*) jedoch nicht mit Zink vorinkubiert, zeigten allen CDF-Proteine die Fähigkeit, wieder das Verhalten des AE128(pMOL30) zu restaurieren, und die *lag*-Phase entsprach der des Wildtyps.



**Abb. 10: Wachstumskurve in Tris-Minimal-Medium mit 2.5 mM ZnCl<sub>2</sub> von DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ ), in trans komplementiert mit Genen von verschiedenen CDF-Proteinen im Vergleich zu AE128(pMOL30)**

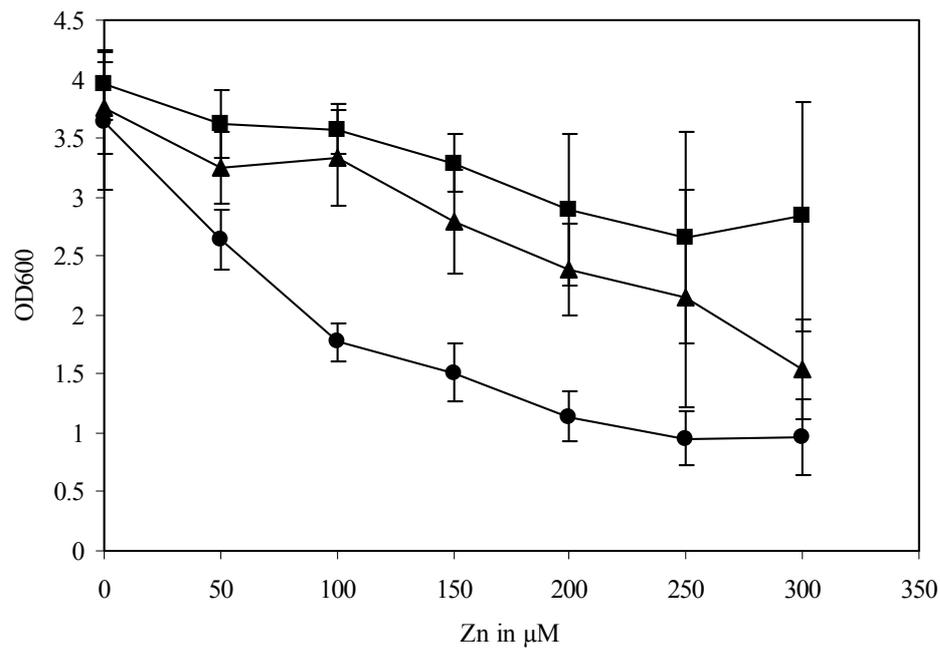
Alle Vorkulturen wurden 1:50 in frischem Tris-Minimal-Medium verdünnt und schüttelnd bei 30°C inkubiert. Dabei wurden für jeden untersuchten Stamm zwei Vorkulturen verwendet, eine Vorkultur wurde mit 300  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 48 h vorinkubiert, während die zweite Vorkultur ohne ZnCl<sub>2</sub> inkubiert wurde. Neben DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ ) und AE128(pMOL30) wurden auch in trans-Komplementationen mit *czcD* (pDNA176) sowie *ZRC1* (pDNA178) und *COT1* (pDNA177), zwei Genen aus *Saccharomyces cerevisiae*, die für CDF-Proteine kodieren, untersucht. Da gezeigt werden sollte, dass die in trans-Komplementationen von DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ ) zu einer Wiederherstellung des Wachstumsverhaltens des Wildtyps führten, wurden hier nur die nicht vorinkubierten Kulturen der verschiedenen Komplementationen dargestellt. DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ ) vorink. (■), DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ ) nicht vorink. (□), AE128(pMOL30) vorink., AE128(pMOL30) nicht vorink., DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ , in trans pDNA176 *czcD*) nicht vorink. (Δ) nicht vorink., DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ , in trans pDNA178 *ZRC1*) nicht vorink. (◇) nicht vorink., DN182(pMOL30-14;  $\Delta czcD$ , in trans pDNA177 *COT1*) nicht vorink. (x) nicht vorink., gezeigt werden repräsentative Wachstumsversuche.

### 3.3. Welche Aktivität zeigt CzcD?

#### 3.3.1. CzcD vermittelt erhöhte Zink-Resistenz im sensitiven *E. coli* GG48

Um die Transportaktivität und somit die Funktion von CzcD zu untersuchen, wurde der *E. coli* Stamm GG48 mit dem Plasmid pECD723(pASK-IBA5::*czcD*) transformiert. Der gewählte Expressionsstamm zeichnete sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zink aus. Diese Sensitivität beruht auf der Deletion der Gene *zntA* und *zitB* (Grass *et al.*, 2001b). Die beiden Genprodukte ZntA und ZitB sind in die Zink-Resistenz in *E. coli* involviert. ZntA ist die Zn<sup>2+</sup>-transportierende P-Typ-ATPase, bei ZitB handelt es sich um eines der beiden nativen CDF-Proteine in *E. coli*.

Sollte CzcD Zink-Resistenz vermitteln, müsste die Expression des *czcD*-Genes diese Sensitivität zumindest teilweise aufheben können. Als Expressionssystem wurde das *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System (IBA, Göttingen) ausgewählt. Das *czcD*-Gen wurde mit den Primern D-pASK5-3' und D-pASK5-5'



**Abb. 11: Wachstumsverhalten von *E. coli* GG48 (●) und GG48(pECD723) (■) unter Zinkstress**

Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium verdünnt und ca. 14 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Dabei wurde der Kultur GG48(pECD723) 200  $\mu\text{g}$  AHT/l zur Induktion von *czcD* hinzugegeben (■). Die Optische Dichte wurde nach 14 h bei 600 nm bestimmt. Als uninduzierte Probe wurde GG48(pECD723) ohne Induktion mit AHT mitgeführt (▲).

von pMOL30 amplifiziert und nach einer Zwischenklonierung und Sequenzierung in pGEM-Teasy in den *high copy* Vektor pASK-IBA5 kloniert. Durch die verwendete Klonierungsstrategie war es nun möglich, die Expression von *czcD*, definiert durch die Zugabe von 200  $\mu\text{g}$  AHT/l, zu induzieren.

In Wachstumsversuchen in LB-Medium unter Anwesenheit von verschiedenen Zink-Konzentrationen (0-300  $\mu\text{M}$ ) konnte ein deutlich besseres Wachstum von GG48(pECD723) gegenüber dem sensitiven Kontrollstamm GG48 beobachtet werden.

Nach 14stündiger Inkubation führte der Einfluss des Induktors Anhydrotetrazyklin allerdings nur zu einer Erhöhung der Optischen Dichte um ca. 7-23 % im Vergleich zur Kultur ohne AHT-Induktion (Abb. 11).

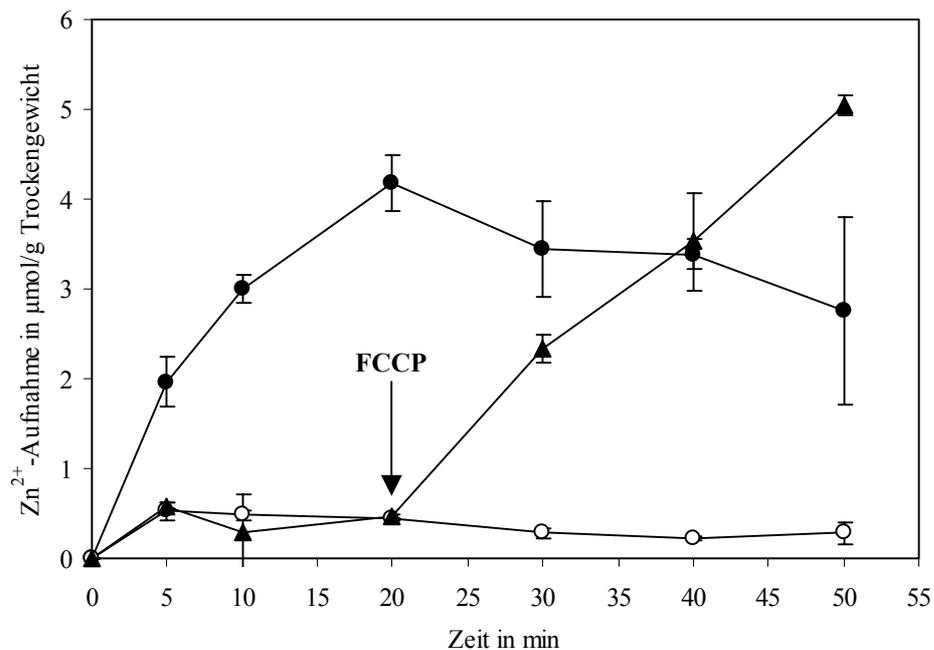
Währenddessen änderte sich die Optische Dichte der beiden Stämme GG48(pECD723) im Vergleich zu GG48 um 8-195%. Die Werte des *in trans* exprimierten nativen CDF-Proteins ZitB konnten hierbei allerdings nicht erreicht werden (Ergebnis nicht gezeigt).

### **3.3.2. Worauf beruht die durch CzcD vermittelte Resistenz?**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CzcD in *E. coli* eine erhöhte Resistenz gegenüber Zink vermittelt, war die Frage nach der Art der Transportaktivität des Proteins entscheidend für die weitere Charakterisierung. So sollte anhand von Transportexperimenten mit radioaktiven

Zinkisotopen ( $^{65}\text{Zn}^{2+}$ ) gezeigt werden, inwieweit sich die intrazelluläre Zinkkonzentration durch die Expression von *CzcD* ändert.

Dieser Versuch wurde an ganzen frühstationären Zellen durchgeführt. Dabei wurde der *E. coli* Stamm GG48(pECD723) in Tris-Minimal-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen und die Expression von *czcD* nach Erreichen einer Optischen Dichte von ca. 75-100 Klett mittels 200  $\mu\text{g}$  AHT /l für 3 h induziert. Die Transportversuche wurden nach der Filtermethode durchgeführt und die intrazelluläre Zinkkonzentration im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen.

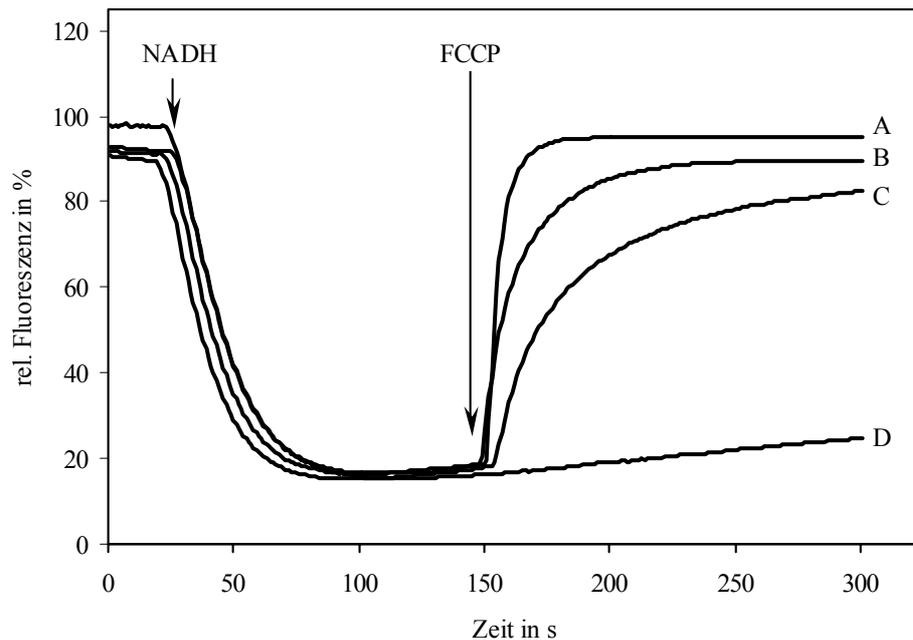


**Abb. 12: Transportmessung mit  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  an ganzen Zellen**

Die Aufnahme von radioaktivem  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  wurde an frühstationären Zellen mit 15  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  durchgeführt. Dabei wurde das intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$  in GG48(pECD723) (○) im Vergleich zum sensitiven GG48 (●) gemessen. Nach 20 min wurde zu GG 48(pECD723) 10  $\mu\text{M}$  FCCP gegeben (▲).

Der Vergleich der intrazellulären Zinkkonzentration zeigte, dass der sensitive *E. coli* Stamm GG48 nach 20 min bei einer Außenkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  eine maximale Zinkkonzentration von  $4.1 \pm 0.3$   $\mu\text{mol/g}$  Zelltrochgewicht akkumulierte, während im Stamm GG48(pECD723) bereits nach 5 min eine maximale Aufnahme von  $0.5 \pm 0.1$   $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht (nach 20 min;  $0.4 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$ ) (Abb. 12) erreicht wurde. Nach diesem Maximum nahm die intrazelluläre Zinkkonzentration kontinuierlich ab. Nach der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  FCCP zu GG48(pECD723) stieg die intrazelluläre Zinkkonzentration innerhalb von 30 min auf  $5.0 \pm 0.1$   $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht an, erreichte also eine noch höhere intrazelluläre Zinkkonzentration als in GG48 (Abb. 12).

Im Vergleichsexperiment mit *inside out* Vesikeln des Stammes GG48(pECD723) konnte der Aufbau eines Protonengradienten in der Fluoreszenzlöschung mit Acridinorange nachgewiesen werden. Als Protonendonor dienten hierbei 50 mM NADH (Abb. 13). Nach Erreichen von ca. 20 % des Ausgangsniveaus der Fluoreszenz wurden verschiedene Mengen (1-50  $\mu\text{M}$ ) an FCCP



**Abb. 13: Fluoreszenzlöschung zum Nachweis eines Protonengradienten**

Durch die Zugabe von 50 mM NADH zu *inside out* Vesikeln von GG48(pECD723) ist die Entstehung eines Protonengradienten im Acridinorange-Puffer detektierbar. Durch die Wirkung des Entkopplers FCCP [A (50  $\mu$ M), B (10  $\mu$ M), C (1  $\mu$ M), D (ohne FCCP)] wird dieser Protonengradient aufgehoben.

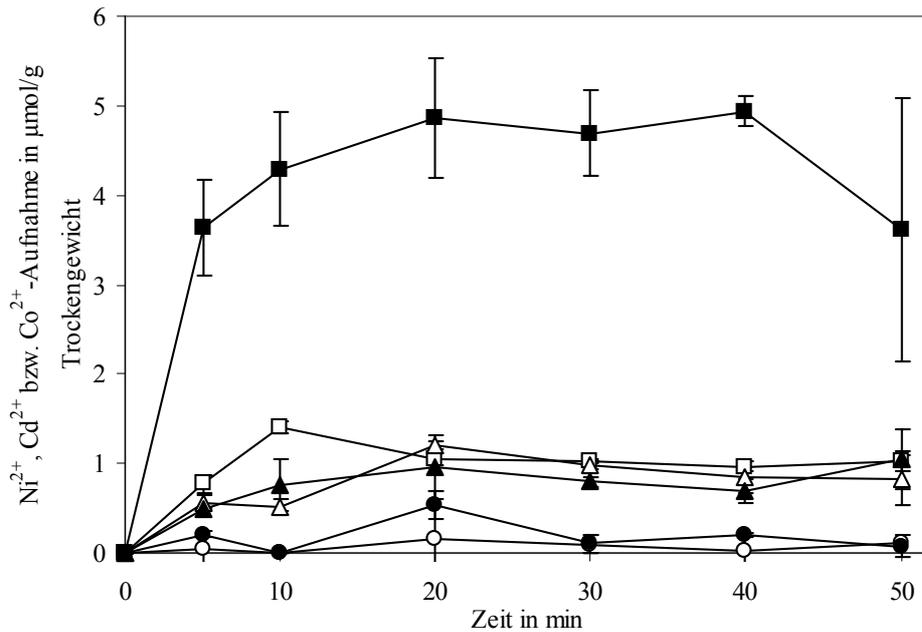
hinzugegeben und der Verlauf der Fluoreszenzlöschung spektroskopisch verfolgt. In Abhängigkeit von den gewählten FCCP-Konzentrationen konnte der Protonengradient aufgehoben werden.

Im Vergleich zu den Aufnahmeexperimenten ist also die Zunahme der intrazellulären Zinkionen-Konzentration auf den Zusammenbruch des Protonengradienten zurückzuführen. Unbehandelte Vesikel zeigten hingegen einen stabilen Protonengradienten (Abb.13).

Durch Transportmessungen mit radioaktivem  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  an *inside out* Vesikeln konnten allerdings keine reproduzierbaren Effekte durch die Expression von CzcD nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Neben der Aufnahme von  $\text{Zn}^{2+}$  sollte auch der Transport von  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  durch CzcD an ganzen Zellen untersucht werden. In Homologie zu den beschriebenen Versuchen mit  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  wurden Transportstudien mit  $^{57}\text{Co}^{2+}$ ,  $^{63}\text{Ni}^{2+}$  und  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  durchgeführt.

Während die Aufnahme von  $^{57}\text{Co}^{2+}$  oder  $^{63}\text{Ni}^{2+}$  in GG48 kaum durch die Anwesenheit von CzcD beeinflusst wurde (Abb. 14), ist ein deutlicher Effekt bei der Untersuchung mit  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  zu beobachten. Die sehr niedrige Basisaufnahme von  $^{57}\text{Co}^{2+}$  in GG48 mag in der Expression eines nativen Kobalttransporters in *E. coli* begründet liegen. Im Fall von Kadmium akkumulierte *E. coli* GG48 innerhalb von 20 min ca.  $4.9 \pm 0.6$   $\mu\text{mol}$  Kadmium /g Zelltrockengewicht und erreichte damit ein Akkumulationsniveau, das innerhalb des gewählten Zeitrahmens stabil blieb. GG48(pECD723) hingegen erreichte bereits nach 10 min die maximal aufgenommene Metallmenge von  $1.4 \pm 0.04$   $\mu\text{mol}$  Kadmium/g Zelltrockengewicht. Danach sank die Kadmiummenge innerhalb der letzten 30 min auf  $1 \pm 0.1$   $\mu\text{mol}$ /g Zelltrockengewicht (Abb. 14).



**Abb. 14: Transportmessung mit  $^{57}\text{Co}^{2+}$ ,  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  und  $^{63}\text{Ni}^{2+}$  an ganzen Zellen**

Die Aufnahme von radioaktivem  $^{57}\text{Co}^{2+}$  und  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  wurde an frühstationären Zellen mit jeweils  $15 \mu\text{M Me}^{2+}$  durchgeführt.

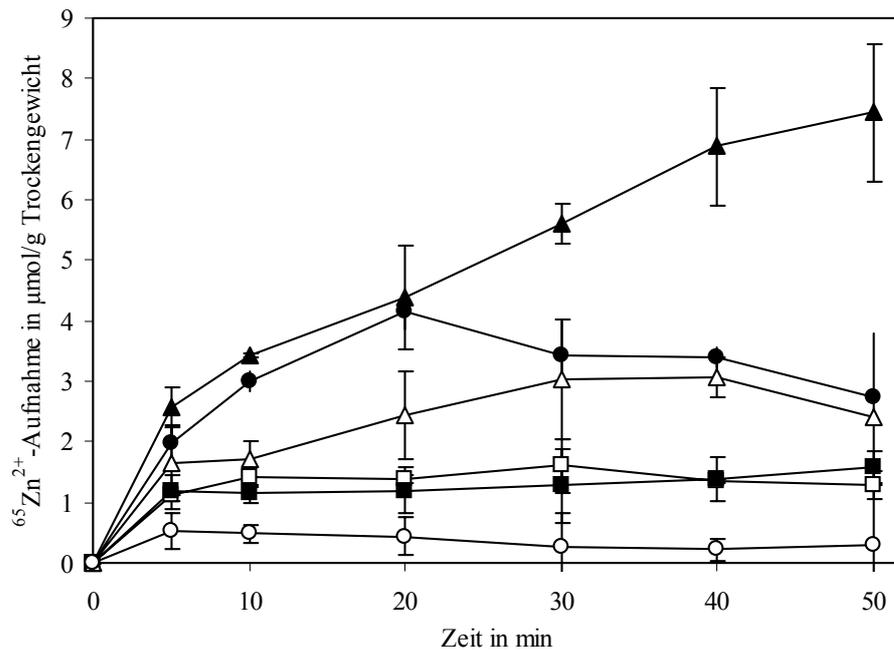
Dabei wurde der intrazelluläre  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Co}^{2+}$ - oder  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in GG48(pECD723, *czcD*) im Vergleich zum sensitiven GG48 gemessen:  $^{57}\text{Co}^{2+}$ : GG48 (●) und GG48(pECD723) (○);  $^{109}\text{Cd}^{2+}$ : GG48 (■) und GG48(pECD723) (□);  $^{63}\text{Ni}^{2+}$ : GG48 (Δ) und GG48(pECD723) (▲).

### **3.3.3. Aspartate innerhalb des transmembranen Kanals sind am Transport beteiligt**

Da nun die Art der Transportaktivität von CzcD aufgeklärt war, sollten am Transport beteiligte Aminosäure-Reste identifiziert werden. Dies geschah durch den gezielten Austausch bestimmter Aspartate, die sich nach Topologievorhersagen und Untersuchungen (Anton *et al.*, 1999) in exponierten transmembranen Bereichen des Proteins befinden sollten. Außerdem wiesen diese AS-Reste eine hohe Konservierung zwischen den einzelnen Vertretern der CDF-Proteinfamilie auf (Paulsen & Saier, 1997; Gaither & Eide, 2001).

Mittels der *Quick-Change* PCR wurden folgende Aminosäureaustausche in CzcD eingeführt: D<sub>53</sub>N; D<sub>158</sub>N und D<sub>181</sub>N. Des Weiteren wurde ein CzcD-Derivat konstruiert, das keinen C-Terminus enthielt. Alle so gewonnenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Restriktionsanalysen verifiziert.

Wie bereits in 3.3.2. beschrieben, wurde die verminderte Akkumulation in *E. coli* GG48 durch die Anwesenheit von CzcD (pECD723) nachgewiesen. Nach der Mutation der einzelnen Aspartate im putativen Effluxkanal von CzcD zeigte nur der Aminosäureaustausch in Aspartat<sub>181</sub> zum Asparagin<sub>181</sub> einen sehr deutlichen Effekt auf die Transportaktivität von CzcD (Abb. 15). In Homologie zum Zink-sensitiven GG48 akkumulierte GG48(pECD727; D<sub>181</sub>N) bis zur 20. Minute genauso viel Zink. Während dann jedoch das erreichte Maximum bei GG48 stabil blieb bzw. leicht fiel, akkumulierte GG48(pECD727; D<sub>181</sub>N) kontinuierlich weiter.



**Abb. 15: Transportmessung mit  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  an ganzen Zellen**

Die Aufnahme von radioaktivem  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  wurde an frühstationären Zellen mit  $15\ \mu\text{M}\ \text{Zn}^{2+}$  durchgeführt. Dabei wurde das zellgebundene  $\text{Zn}^{2+}$  in GG48(pECD723) (○) im Vergleich zum sensitiven GG48 (●) gemessen. Beide Stämme wurden als Basis zum Vergleich der Effekte von Aminosäureaustauschen herangezogen. Der Einfluss des Aminosäureaustausches D<sub>53</sub>N [pECD725 (■)], D<sub>158</sub>N [pECD726 (□)], D<sub>181</sub>N [pECD727 (▲)] sowie die Deletion des C-Terminus von CzcD [pECD728 (Δ)] wurden untersucht.

Die beiden zusätzlichen Aspartatmutationen Aspartat<sub>53</sub> (pECD725) und Aspartat<sub>158</sub> (pECD726) zeigten zwar eine höhere Akkumulation im Vergleich zu GG48(pECD723; CzcD Wildtyp), die Transportaktivität wurde jedoch nicht vollständig ausgeschaltet (Abb.15). Eine Doppelmutante könnte hier Aufschluss über möglicherweise sich überlagernde Funktionen der beiden Aminosäure-Reste geben.

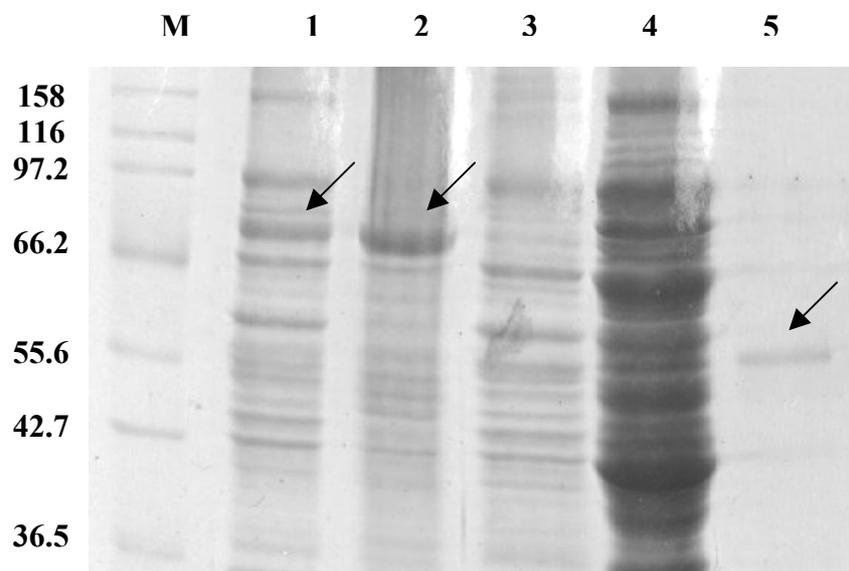
Bei der Analyse der Proteinexpression durch quantitativen Western-Blot war eine vergleichbare Expression aller Proteine zu erkennen, auch wenn das Laufverhalten von CzcD<sub>D181N</sub> durch eine etwas diffusere Bande gekennzeichnet war. Eine Degradation eines der Proteine konnte jedoch nicht beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt). Einzig das Derivat CzcD<sub>(Δ204-316)</sub> war nur als schwache Proteinbande im Western-Blot nachweisbar. Parallel zu dieser schwachen Expression konnte nur noch eine schwache Restaktivität im Transportexperiment nachgewiesen werden (Abb. 15). Auch wenn anfänglich eine schwächere Akkumulation in GG48(pECD728; CzcD<sub>(Δ204-316)</sub>) zu beobachten war, so konnte keine Abnahme der Zinkakkumulation nach mehr als 30 min nachgewiesen werden. GG48(pECD728, CzcD<sub>(Δ204-316)</sub>) erreichte dann das Niveau von GG48.

### 3.4. Reinigung des Membranproteins CzcD

#### 3.4.1. Das Impact<sup>®</sup>-Expressionssystem ist ungeeignet, um CzcD zu reinigen

Nachdem die Aktivität von CzcD untersucht worden war, erschien es nun notwendig, das Protein zu reinigen, um es dann auch biochemisch charakterisieren zu können.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, CzcD mit dem Impact<sup>®</sup> Expressionssystem NEB (New England Biolabs) zu reinigen. Dabei wurde der zu exprimierende ORF mit einem Intein (55 kDa) und vorhandener Chitinbindedomäne (CBD) fusioniert. In einer Affinitätschromatographie bindet diese Chitinbindedomäne an die als Säulenmaterial verwendeten *Chitin-Beads*. Nach der Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wird die Selbstspaltungs-Aktivität des Inteins unter reduzierenden Bedingungen genutzt, um das zu reinigende Protein abzuspalten und von der Säule zu eluieren.



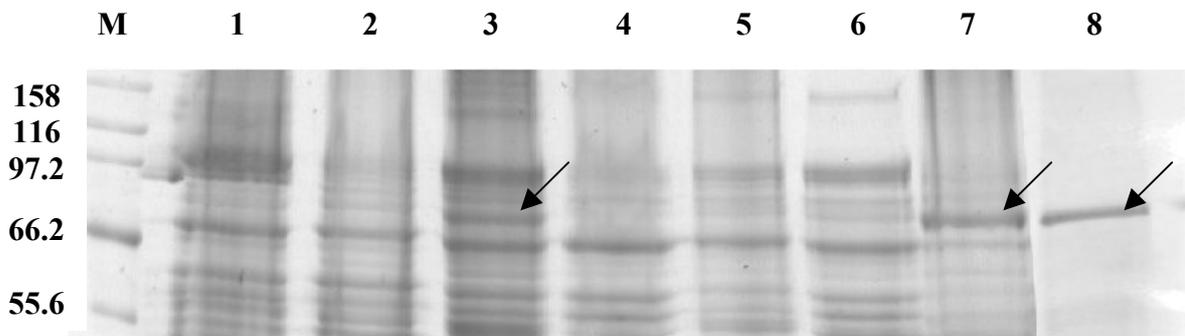
**Abb. 16: SDS-PAA-Gel mit dem exprimierten CzcD-Intein-Fusionsproteins**

12.5 % (w/v) SDS-PAA-Gel mit Coomassie gefärbt. Pfeile in Spur 1 und 2 markieren CzcD-Intein, in Spur 5 das Intein **M**: Marker, **1**: Membranfraktion nach Induktion, **2**: Membranreste nach Solubilisierung mit n-Dodecylmaltosid, **3**: Membranfraktion ohne Induktion, **4**: lösliche Proteinfraction nach Induktion, **5**: Intein

Für die Klonierung in den Vektor pTYB2 wurde das *czcD*-Gen mit den Primern D:pTYB2-5' und D:pTYB2-3' vom Megaplasmid pMOL30 amplifiziert. Durch die Induktion mit 0.25 mM IPTG bei 16°C über Nacht konnte die chromosomal kodierte T7-Polymerase in *E. coli* ER2566 induziert werden, die die hinter dem T7-Promotor liegende *czcD*-Intein-CBD-Fusion transkribierte. Eindeutig konnte in Spur 1 in Abb. 16 die Expression eines stabilen, ca. 85 kDa großen Fusionsproteins in dem *E. coli*-Stamm ER2566 nachgewiesen werden. Dabei war das Fusionsprotein nur in den Fraktionen der Membranproteine zu finden, in der Fraktion der löslichen Proteine konnte es nicht gezeigt werden. Allerdings war die geringe Ausbeute an Membranprotein von 25 mg/l (im Gegensatz zu ca. 250 mg/l aus BL21, angezogen in LB) einer der Faktoren, die dieses System zur Expression von Membranproteinen als wenig geeignet auswies. Das so isolierte

Fusionsprotein konnte nicht durch eine Solubilisierung mit 2 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid aus der Membran gelöst werden (Abb. 16, Spur 2). In Spur 5 (Abb. 16) ist das ca. 55 kDa große Intein, exprimiert ohne *Target*-Protein, zu sehen.

Weiterhin wurde versucht, das CzcD-Intein-CBD Fusionsprotein mit verschiedenen Detergenzien aus der bakteriellen Membran zu solubilisieren. Einzig n-Laurylsarcosin erwies sich als geeignet, dieses Protein in löslicher Form zu erhalten (Abb. 17).



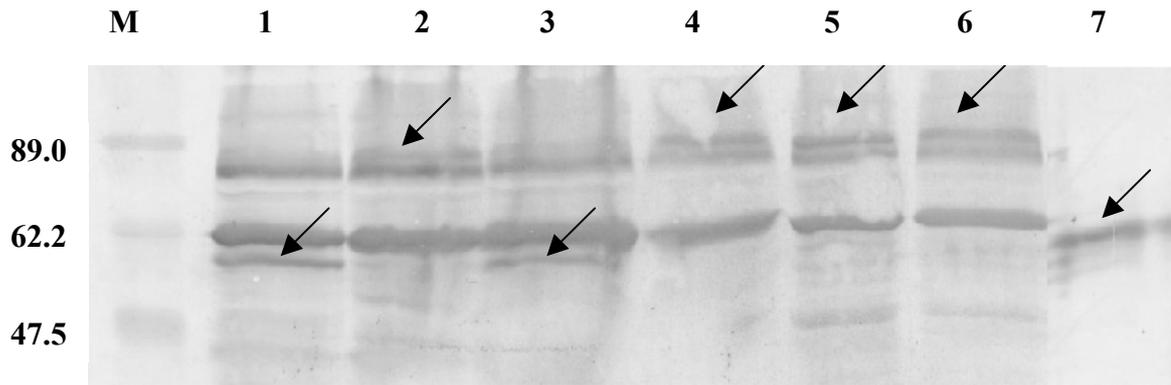
**Abb. 17: Solubilisierung des CzcD-Intein-CBD-Fusionsproteins**

12.5 % (w/v) SDS PAGE. Nach erfolgter Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien und Abtrennung ungelöster Membranbestandteile durch Ultrazentrifugation wurden die gelösten Membranproteine auf einem 12.5 % SDS-PAA-Gel analysiert und anschließend mit Coomassie gefärbt. Dabei wurden die Detergenzien im Verhältnis 2 mg Detergenz pro mg Membranprotein eingesetzt. Pfeile in Spur 3, 7 und 8 markieren das CzcD-Intein-CBD-Fusionsprotein. **M:** Marker, **1:** n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, **2:** Octylglucopyranosid, **3:** 2 % (w/v) n-Laurylsarcosin, **4:** Chaps, **5:** Desoxycholat, **6:** Mannoil- $\beta$ -D-Pyranosid, **7:** Membranreste der Solubilisierung mit n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, **8:** ungespaltenes CzcD-Intein (sol. mit n-Laurylsarcosin)

Bei allen anderen verwendeten Detergenzien konnte das Fusionsprotein nicht oder in nur ungenügendem Maße solubilisiert werden. Beim verwendeten n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid wurde das Fusionsprotein in den ungelösten Bestandteilen der bakteriellen Membran gefunden (Abb. 17, Spur 7). Der Versuch, das Fusionsprotein durch eine Affinitätschromatographie zu reinigen, gelang nur bedingt, da das Protein sehr ineffizient an die Säule gebunden wurde und dann die enzymatische Aktivität des Intein-*tags* nach der Behandlung mit n-Laurylsarcosin nicht mehr nachweisbar war (Abb. 17). Dadurch war es nur möglich, ungespaltenes Fusionsprotein mittels SDS von der *Chitin-Beads*-Säule zu eluieren (Abb. 17, Spur 8).

Um den negativen Einfluss des n-Laurylsarcosins auf die Spaltung des Fusionsproteins zu untersuchen, wurden die exprimierten Fusionsproteine im Rohextrakt mit den reduzierenden Agenzien DTT, Hydroxylamin und Mercaptoethanol versetzt und über Nacht auf Eis inkubiert. Der so behandelte Rohextrakt wurde auf einem 12.5 % (w/v) SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Spaltprodukte wurden in einem Western-Blot durch eine Antikörperreaktion mit dem AK gegen die Chitinbindedomäne analysiert.

Durch die Inkubation mit Mercaptoethanol und DTT war deutlich das Erscheinen einer ca. 55 kDa Bande im Western-Blot nachweisbar, die sich in Höhe des Inteins, also des potentiellen Spaltprodukts, befand. Diese Bande konnte nicht durch die Inkubation mit Hydroxylamin induziert werden. Hier war weiterhin die ca. 85 kDa große Bande des intakten Fusionsproteins zu erkennen.



**Abb. 18: Einfluss von n-Laurylsarcosin auf die *selfsplicing* Aktivität des CzcD-Intein-CBD Fusionsproteins**  
 Western-Blot mit einem AK gegen die Chitin-Bindedomäne des *Tags*, basierend auf einem 12.5 % SDS-PAA-Gel. Die Spaltbarkeitstests wurden in Membranproteinlösungen über Nacht in An- und Abwesenheit von n-Laurylsarcosin mit verschiedenen reduzierenden Agenzien durchgeführt. Pfeile in Spur 1, 3 und 7 markieren das Intein, welches nach erfolgter Spaltung erscheint, Pfeile in Spur 2, 4, 5 und 6 markieren das stabile Fusionsprotein. **M:** Marker, **1:** 50 mM DTT, **2:** 50 mM Hydroxylamin, **3:** 1 % (v/v) Mercaptoethanol, **4:** 50 mM DTT, 2 % (w/v) n-Laurylsarcosin, **5:** 50 mM Hydroxylamin, 2 % (w/v) n-Laurylsarcosin, **6:** 1 % (v/v) Mercaptoethanol, 2 % (w/v) n-Laurylsarcosin, **7:** Intein

Nach der Zugabe von 2 % (w/v) n-Laurylsarcosin war auch in Anwesenheit von DTT und Mercaptoethanol keine Spaltungsreaktion im Rohextrakt mehr nachweisbar (Abb. 18).

Der initialen Schritt der Reinigung (die Spaltung des Fusionsproteins) wurde durch die Anwesenheit des n-Laurylsarcosins verhindert. Da aber nur n-Laurylsarcosin das CzcD-Intein-CBD-Fusionsprotein aus der Membran solubilisierte, konnte kein Protokoll erstellt werden, mit dem die Isolierung des Membranproteins CzcD aus *E. coli* ER2566 über das Impact-System möglich war.

### **3.4.2. Das CzcD Protein konnte mittels des *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Systems mit guter Ausbeute gereinigt werden**

Die Expression und Reinigung mittels des *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Purification Systems beruht auf der Bindung des *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Peptides (WSHPQFEK) an Streptactin-Sepharose.

Um CzcD mittels dieses Systems zu reinigen, wurde das *czcD*-Gen mit den Primern D-pASK5-3' und D-pASK5-5' von pMOL30 amplifiziert und in den Vektor pGEM-Teasy kloniert. Dieses Konstrukt wurde zur Kontrolle sequenziert. Durch die *EcoRI/NcoI*-Klonierung des Fragmentes in pASK-IBA5 wurden N-terminal 20 AS (MASWSHPQFEKGAETAVPNS) an das CzcD-Protein angefügt. Diese 20 AS beinhalten auch den *Strep-tag II*<sup>®</sup>, der für die Reinigung des Proteins essentiell war. Das Gen wurde hinter den *tetA<sub>p</sub>* ligiert, so dass die Expression durch die Zugabe von 200 µg AHT/l Medium induziert werden konnte. C-terminal wurden vier weitere AS an die native Primärsequenz angefügt. Der für die lösliche, zytoplasmatische Domäne kodierende Abschnitt des *czcD*-Gens wurde mit den Primern CTh-CzcD-pASK5-5' und D-pASK5-3' in Analogie zum Gesamtprotein amplifiziert und in pASK-IBA5 kloniert (Abb. 19).

A)

MASWSHPQFEKGAETAVPNS<sub>G2</sub>AGHSHDHPGGNERSLKIALLTGTFLIAEVVGGVMTKSLALISD  
 AAHMLTDTVALAIALAAIAIAKRPADKKRTFGYYRFEILAAAFNALLLFGVAIYI LYEAYLRLKSP  
 PQIESTGMFVVAVLGLI INLISMRMLSSGQSSSLNVKGAYLEVWSDLLGSVGVIAGAI IIRFTGWA  
 WVDSAIAVLI GLWVLPRTWILLKSSLNVLLEGVPDDVDLAEVEKQILATPGVKSFHDHLHIWALTSG  
 KASLTVHVVNDAVNPEMEVLPELKQMLADKFDITHVTIQFELAPCEQADAAQHFNASPALVGSKS  
 LAAGGNHGL

B)

MASWSHPQFEKGAETAVPNS<sub>S203</sub>LNVLLEGVPDDVDLAEVEKQILATPGVKSFHDHLHIWALTSGKA  
 SLTVHVVNDAVNPEMEVLPELKQMLADKFDITHVTIQFELAPCEQADAAQHFNASPALVGSKSLA  
 AGGNHGL

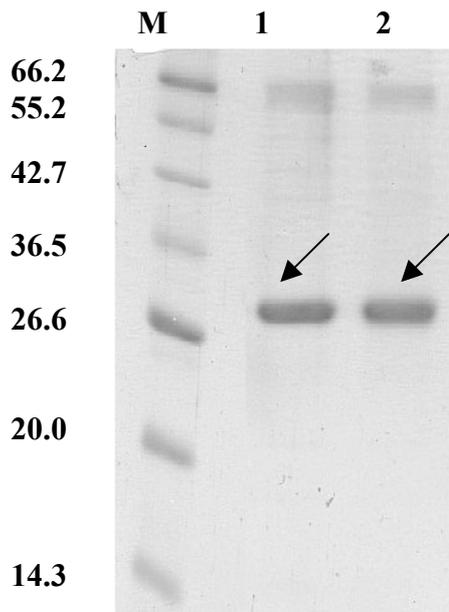
**Abb. 19: CzcD als Strep-Tag-Fusion**

Durch die *EcoRI/NcoI*-Klonierung des *czcD*-Gens wurde N-terminal ein *Strep-tag II*<sup>®</sup> an das Protein angefügt (AS). A) zeigt das gesamte Protein, das mit dem Gly<sub>2</sub> der nativen AS-Sequenz beginnt. B) zeigt die zytoplasmatische, lösliche Domäne des CzcD Proteins, beginnend mit Ser<sub>203</sub> der nativen AS-Sequenz.

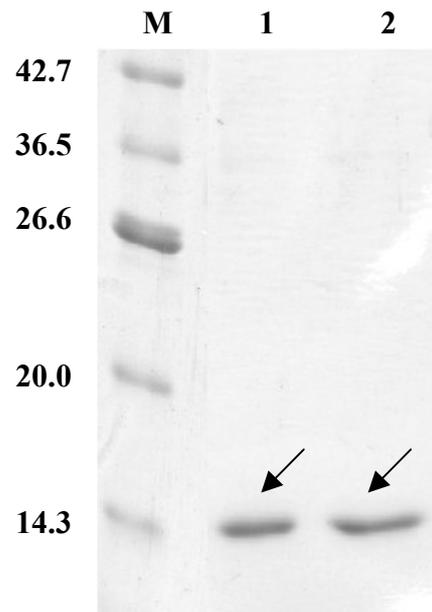
Beide Konstrukte konnten überexprimiert und bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 20a und 20b). Dabei wurde das CzcD-Protein aus den Membranen mit 2 mg n-Dodecyl-β-D-Maltosid/mg Membranprotein und 3.5 mg Phosphatidylcholin/ml oder 2 % (w/v) n-Laurylsarcosin vor der Reinigung solubilisiert (Ergebnis nicht gezeigt). Während der Reinigung war eine hohe Ionenstärke von 2 M NaCl im Waschpuffer erforderlich, da es ohne diese hohe Salzkonzentration nicht möglich war, das Protein ohne Kontaminationen zu reinigen.

Die zytoplasmatische Domäne wurde aus dem Überstand nach einer Ultrazentrifugation des Rohextraktes gewonnen.

Bei verschiedenen Präparationen der Membranproteine wurden unterschiedliche Medien zur Anzucht des *E. coli*-Stammes BL21 untersucht. Dabei wurde die Expression des *czcD*-Gens in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0.7 optimal induziert. Es konnten 250 mg Membranprotein/l Medium präpariert werden, aus denen ca. 2.8 mg CzcD nach der Solubilisierung mit n-Dodecyl-β-D-Maltosid isoliert werden konnten. Die Verwendung des TB-Mediums (*Terrific Broth*) machte es möglich, die heterologe Expression von *czcD* in BL21 erst bei einer Optischen Dichte (600 nm) von 1.5 zu induzieren. Dabei konnten pro Liter Medium ca. 450 mg Membranprotein isoliert werden, aus denen 7 mg/l CzcD mit n-Dodecyl-β-D-Maltosid bzw. ca. 15-20 mg/l CzcD mit n-Laurylsarcosin präpariert wurden.



**Abb. 20a: Reinigung von CzcD als *Strep-Tag*-Protein**  
15 % (w/v) SDS-PAA-Gel des gereinigten CzcD, Expression in BL21, Solubilisierung mit n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid. **M:** Marker, **1:** Elutionsfraktion 2, **2:** Elutionsfraktion 3



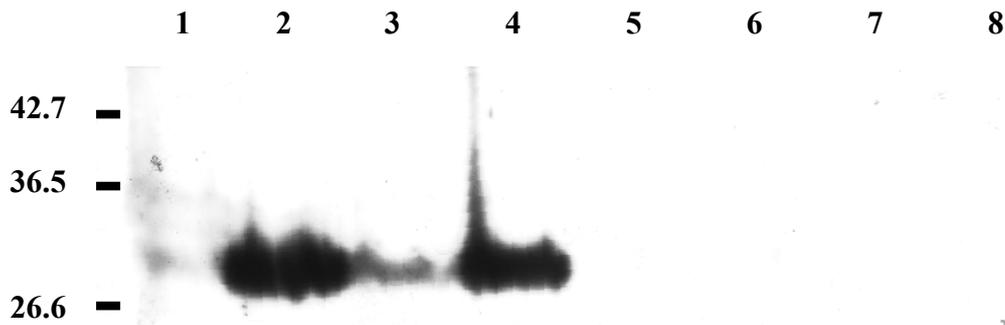
**Abb. 20b: Reinigung des zytoplasmatischen Teils des CzcD-Proteins**  
17.5 % (w/v) SDS-PAA-Gel der gereinigten zytoplasmatischen Domäne, Expression in BL21. **M:** Marker, **1:** Elutionsfraktion 4, **2:** Elutionsfraktion 5

Nach der Reinigung zeigte das CzcD-Protein ein ~~ausreichendes Laufverhalten~~ in einem SDS-PAA-Gel. Die theoretische Masse des Proteins liegt zwar bei 36.0 kDa, aber das CzcD-Protein läuft deutlich unterhalb der 36.5 kDa-Bande des Proteingrößenstandards (Abb. 20a). Die lösliche Domäne wurde ebenfalls mit dem Programm *Peptidmass* analysiert und ist in der Höhe von ca. 14.3 kDa des Proteinmarkers zu finden, wobei der theoretisch berechnete Wert bei 14.6 kDa liegt (Abb. 20b).

### **3.5. Nachweis des nativen CzcD-Proteins durch Western-Blot**

Durch die Reinigung des CzcD-Proteins war es möglich, ausreichende Proteinmengen zu isolieren, um ein Kaninchen zu immunisieren. Dafür wurde 1 mg Protein mit n-Laurylsarcosin gereinigt. Die Firma SEQLAB (Göttingen) führte die Immunisierung innerhalb von 2 Monaten durch mehrmaliges *Boostern* des Antigens durch.

Mit den auf diese Weise gewonnenen Antikörpern konnte die Induktion der Expression von CzcD nachgewiesen werden. Während es jedoch nach 90minütiger Induktion zu keiner sichtbaren Expression von CzcD kam (Ergebnis nicht gezeigt), konnte das Protein nach 30minütiger Induktion detektiert werden. Während es in *R. metallidurans* AE104 und DN182(pMOL30-14,  $\Delta$ *czcD*) zu keiner Proteinexpression kam, konnte CzcD durch die Zugabe von 100  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  oder  $Cd^{2+}$  in *R. metallidurans* AE128 nachgewiesen werden (Abb. 21). Nicht reproduzierte Ergebnisse mit 200  $\mu$ M  $Cu^{2+}$  und  $Ni^{2+}$  deuten auch auf eine mögliche Induktion durch weitere Schwermetallionen hin.



**Abb. 21: Western-Blot mit Anti-CzcD-Antikörpern gegen *Ralstonia metallidurans* Rohextrakte**

Western-Blot, basierend auf einer 15 % (w/v) SDS-PAGE. Alle verwendeten Kulturen wurden bei einer Optischen Dichte von ca. 150-200 Klett für 30 min mit verschiedenen Schwermetallen induziert. Nach erfolgter PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und eine Immunopräzipitation durchgeführt: **1:** AE128 unind., **2:** AE128 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  ind., **3:** AE128 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$  ind., **4:** AE128 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  ind., **5:** AE128 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ind., **6:** AE128 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  ind., **7:** AE104 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  ind., **8:** DN182 mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  ind.

### **3.6. Wie ist CzcD in der Lage, Metalle zu binden?**

Da das Protein gereinigt und *in vivo* gezeigt werden konnte, dass es für die verminderte Akkumulation von Zink innerhalb der Zelle und damit für eine erhöhte Zink-Resistenz verantwortlich ist, sollte auch *in vitro* gezeigt werden, dass CzcD in der Lage ist, Metalle zu binden. Dabei sollte auch die Art der Aminosäuren, die für die Bindung verantwortlich sein könnten, untersucht werden.

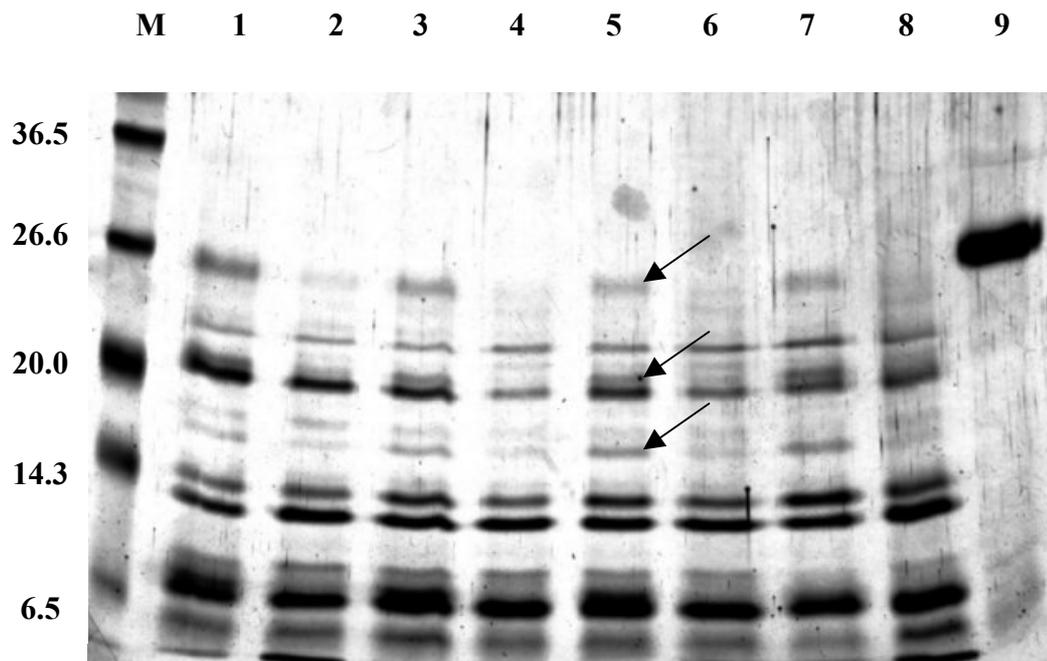
#### **3.6.1. Drei Domänen von CzcD werden durch Zink und Kobalt vor dem Verdau durch Trypsin geschützt**

Da bisher unbekannt war, inwieweit Metalle an CzcD binden und welche strukturellen Effekte diese Bindung auf das Protein haben kann, wurde die protektive Wirkung der Metallbindung auf einzelne Domänen des Proteins gegenüber des Proteaseverdaus mit Trypsin untersucht.

In ersten Versuchen wurden die Proteaseverdaue mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Trypsin durchgeführt. Doch das Protein erwies sich als relativ stabil gegenüber dem Angriff der Protease. Deshalb wurde die Trypsinmenge auf 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erhöht.

Eindeutig konnte das Erscheinen von drei Banden in folgenden Größen bei Anwesenheit von Zink beim Verdau mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Trypsin beobachtet werden: 26 kDa, 20 kDa und 17 kDa (Pfeile in Abb. 22). Dabei war die Bildung dieser Banden in einem Bereich von 500  $\mu\text{M}$  bis 5 mM unabhängig von der Konzentration an eingesetztem  $\text{ZnCl}_2$  (Ergebnis nicht gezeigt).

Auch konnte mit einem Probeverdau an Rinderserumalbumin (BSA) gezeigt werden, dass die verwendeten Zink-Konzentrationen nicht die enzymatische Aktivität des Trypsins beeinflussen (Ergebnis nicht gezeigt). Ähnliche Verdauemuster konnten auch bei der Inkubation mit verschiedenen Kobaltmengen (500  $\mu\text{M}$  bis 5 mM) beobachtet werden. So konnte sichtbar, dass die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$  die Zugänglichkeit bestimmter Domänen im CzcD-Protein für Trypsin änderte.



**Abb. 22: Tryptischer Verdau von CzcD in An- und Abwesenheit von 1 mM Zink**

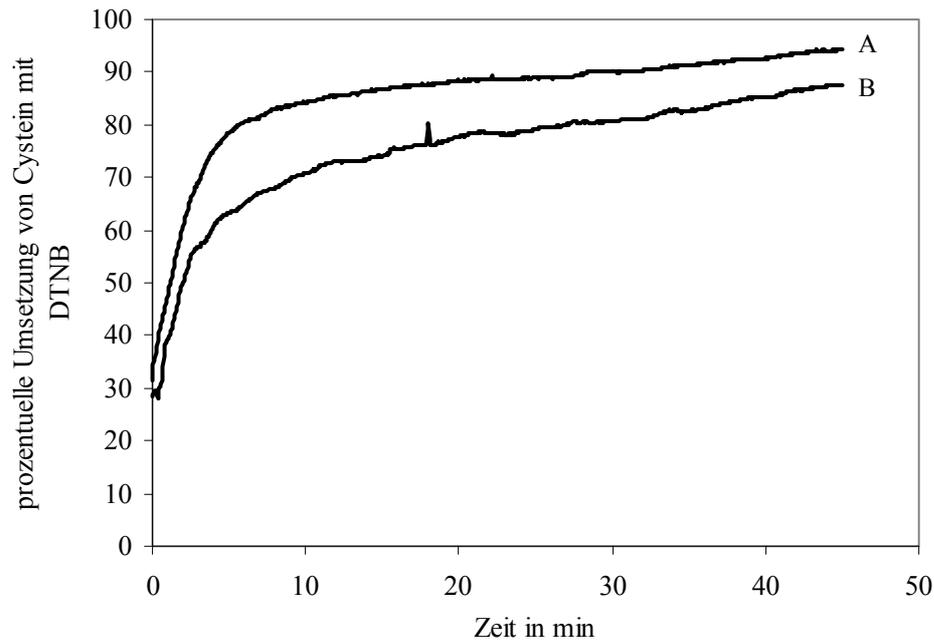
17.5 % SDS-PAGE des tryptischen Verdaus von CzcD. 10 µg Protein wurde mit 1 mM Zink für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 10 µg/ml Trypsin für verschiedene Zeiträume (15-60 min) bei 37°C inkubiert. Der Proteaseverdau wurde durch die Zugabe von Stopplösung beendet. Pfeile markieren zusätzlich auftretende Banden **M**: Marker, **1**: CzcD mit Zn<sup>2+</sup> nach 15 min, **2**: CzcD ohne Zn<sup>2+</sup> nach 15 min, **3**: CzcD mit Zn<sup>2+</sup> nach 30 min, **4**: CzcD ohne Zn<sup>2+</sup> nach 30 min, **5**: CzcD mit Zn<sup>2+</sup> nach 45 min, **6**: CzcD ohne Zn<sup>2+</sup> nach 45 min, **7**: CzcD mit Zn<sup>2+</sup> nach 60 min, **8**: CzcD ohne Zn<sup>2+</sup> nach 60 min, **9**: uninkubiertes Protein

### **3.6.2. Cystein291 ist für die chemische Modifikation durch DTNB zugänglich**

Nachdem gezeigt worden war, dass die Inkubation von CzcD mit Zink und Kobalt die Zugänglichkeit für Proteasen veränderte, sollte untersucht werden, über welche Aminosäure-Reste die Bindung der Metalle an CzcD erfolgt.

Da Metalle oft an Cysteine binden, wurde untersucht, inwieweit das einzige Cystein<sub>291</sub> im CzcD-Protein an dieser Bindung beteiligt ist. Dafür wurde die Methode der chemischen Modifikation mit DTNB gewählt, um die Zugänglichkeit des Cysteins vor und nach Inkubation mit Zink zu untersuchen.

Für dieses Experiment wurden 5 µM CzcD mit DTNB nach der Ellmann-Reaktion modifiziert. Dabei wurde das Protein mit und ohne vorhergehende Zinkinkubation eingesetzt. Ohne Zink erreichte die Reaktion nach ca. 8-9 min ein Plateau, wobei ca. 83 % des maximal modifizierbaren Cysteins (bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge von 5 µM ergibt sich eine maximale Absorption von 0.07) umgesetzt waren. Diese Absorption stieg dann schwach über weitere 36 min auf maximal 94 % an (Abb. 23).



**Abb. 23: DTNB-Titration von 5  $\mu\text{M}$  CzcD mit 500  $\mu\text{M}$  DTNB**

Die Zugänglichkeit des Cystein 291 wurde durch die Inkubation von 5  $\mu\text{M}$  CzcD mit 500  $\mu\text{M}$  DTNB spektroskopisch bei 412 nm für 45 min untersucht, dabei wurde die Bildung von TNB, einem gelben Farbstoff, detektiert. Die maximal erreichbare Absorption von 0.07 wurde als 100 % angenommen (berechnet nach dem Lambert-Beerschen Gesetz,  $\epsilon_{\text{DTNB}} = 14000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) und die gemessenen Werte darauf bezogen. **A:** CzcD ohne  $\text{Zn}^{2+}$ , **B:** CzcD nach Inkubation mit 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$

Nach der Inkubation des Proteins mit 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  von 30 min auf Eis ergab sich eine wenig veränderte Reaktivität des Cysteins im CzcD-Protein. Während das Reaktionsplateau etwas später bei 12-13 min erreicht wurde, konnten maximal in diesem Zeitraum 73-75 % des Cysteins umgesetzt werden. Die Reaktion verlief dann weiter, bis nach 45 min ca. 87 % umgesetzt waren. Eine mögliche Zinkbindung beeinflusst die Zugänglichkeit des Cysteins<sub>291</sub> für DTNB daher nur geringfügig (Abb. 23).

### **3.6.3. Bindung von divalenten Metall-Kationen an CzcD**

Die Bindung an Zink konnte für CzcD durch die Trypsinverdauung gezeigt werden, jedoch war es wichtig zu untersuchen, inwieweit sich diese Metallbindung auch auf andere divalente Kationen erstreckt. Dafür wurde die Fähigkeit von CzcD untersucht, *in vitro* auch an andere Metalle zu binden, die an Metallchelate-Sepharose immobilisiert worden waren.

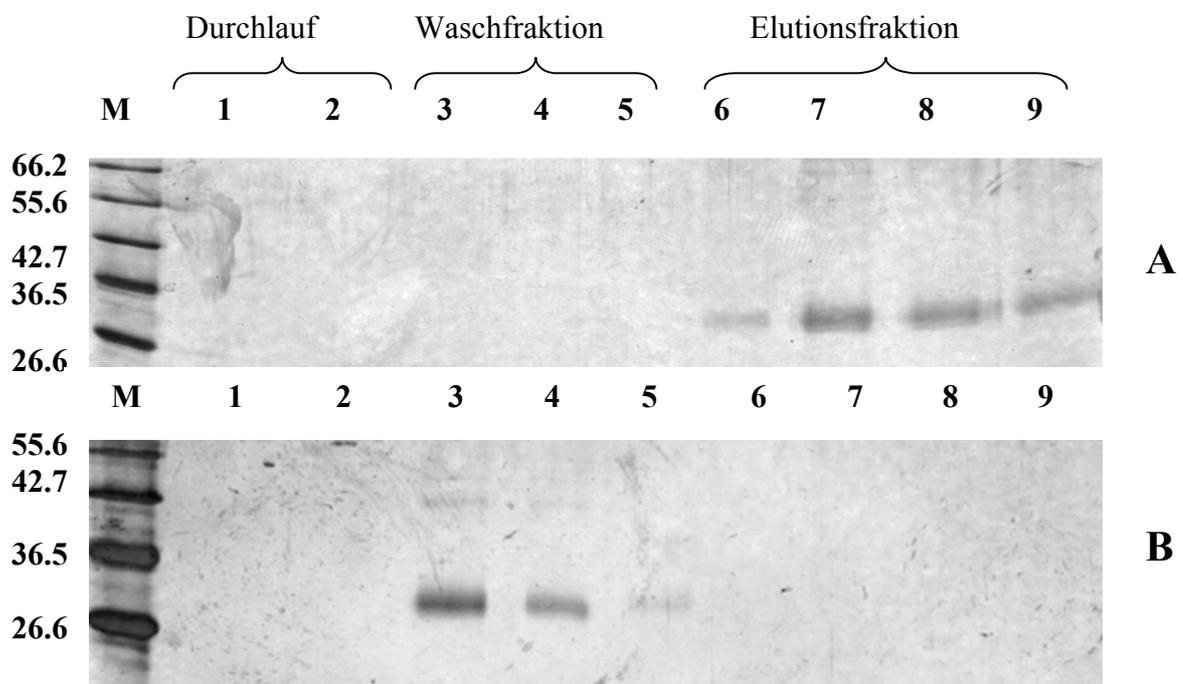
Dafür wurden 3 ml einer 250 mM wässrigen Lösung der folgenden divalenten Kationen auf einer 1 ml Metallchelate-Sepharose-Säule immobilisiert:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . 60  $\mu\text{g}$  (300  $\mu\text{l}$ ) CzcD, die mit 10 mM EDTA vorbehandelt worden waren, wurden auf die Säule gegeben und Fraktionen von je 300  $\mu\text{l}$  gesammelt. Gebundenes Protein wurde mit Elutionspuffer [10 mM Na-Phosphatpuffer (10 mM EDTA)] von der Säule gewaschen. Dabei wurden die Fraktionen in Durchlauf, Wasch- und Elutionsfraktion eingeteilt. 20  $\mu\text{l}$  dieser Fraktionen wurden auf 15 %ige

**Tab. 7. Elutionsprofile nach der Bindung an Metallchelate-Sepharose**

Metall	Proteingehalt in Durchlauf- /Waschfraktion in %	Proteingehalt in Elutionsfraktion in %
Zn <sup>2+</sup>	0	100
Co <sup>2+</sup>	0	100
Cd <sup>2+</sup>	100	0
Ni <sup>2+</sup>	13	87
Cu <sup>2+</sup>	0	100
Mg <sup>2+</sup>	100	0
<sup>1</sup> Zn <sup>2+</sup>	15	75

<sup>1</sup> nach Vorinkubation mit 1 mM Zink für 30 min auf Eis, ohne Dialyse gegen Puffer auf die Säule gegeben

(w/v) SDS-PAA-Gele aufgetragen, einer Silberfärbung unterzogen und densitometrisch analysiert (Abb. 24). Die Bindung des Proteins konnte hierbei direkt anhand des Vorhandenseins des Proteins in Wasch-, Durchlauf- oder Elutionsfraktionen bestimmt werden. Für die densitometrische Auswertung der Gele war entscheidend, in welcher Fraktion sich das Protein

**Abb. 24: Elutionsprofil der Metallchelate-Sepharose Säulen mit CzcD**

15 % SDS-PAGE, Silberfärbung; Auf das Säulenmaterial, das mit 3 Vol. einer 250 mM Lösung von verschiedenen divalenten Kationen vorinkubiert worden war, wurden 60 µg (300 µl) CzcD gegeben. Alle gesammelten Eluate wurden in 300 µl fraktioniert, von denen 20 µl aufgetragen wurden. Gebundenes Protein wurde hierbei mit 10 mM EDTA eluiert. **A:** Säule mit Zink, vorinkubiert, **B:** Säule mit Magnesium, vorinkubiert, **M:** Marker, **1-2:** Durchlaufaktionen, **3-5:** Waschfraktionen, **6-9:** Elutionsfraktionen

befand. Protein in den Durchlauf- und Waschfraktionen galt als ungebunden, Protein, welches mit 10 mM EDTA eluiert werden konnte, als gebunden.

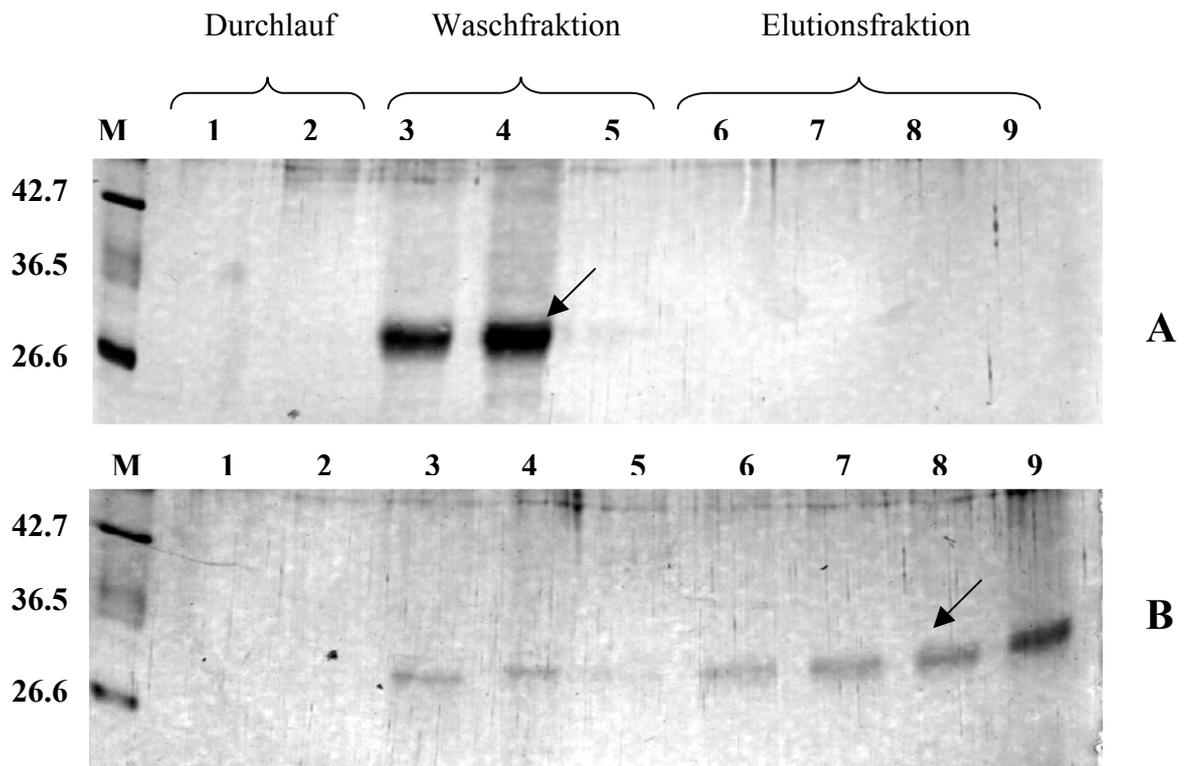
Wie bereits beschrieben, zeigte CzcD eine eindeutige Affinität zu Zink (Tab. 7), so dass 100 % des Proteins in den Elutionsfraktionen zu finden waren. Kobalt, ein anderes Substrat der *czc*-Determinante, wurde ebenfalls von CzcD *in vitro* zu 100 % gebunden. Kadmium jedoch, welches auch vom *czc*-System entgiftet wird, konnte mit diesem Versuch nicht von CzcD *in vitro* gebunden werden (Tab. 7). Auffällig ist hingegen, dass das Protein teilweise (87 %) an die Ni<sup>2+</sup>-Säule und sogar vollständig an die Cu<sup>2+</sup>-Säule band. CzcD wurde nicht an eine Mg<sup>2+</sup>-Säule gebunden, so dass 100 % des Proteins in den Waschfraktionen zu finden waren. Eine unspezifische Bindung des Proteins an die Metallchelate-Sepharose konnte demnach auch ausgeschlossen werden (Abb. 24).

### **3.6.4. Die Metallbindung von CzcD erfolgt über die im Protein vorhandenen Histidine**

Die Bindung von CzcD an verschiedene divalente Kationen konnte *in vitro* gezeigt werden. Jedoch wurde nicht eindeutig geklärt, aufgrund welcher Aminosäure-Reste diese Bindung erfolgte. Da viele in CzcD vorhandenen Histidin-Reste in allen prokaryotischen CDF-Proteinen konserviert sind, wurde die Möglichkeit untersucht, ob die Histidine für die Bindung von Metallen verantwortlich sein könnten. Hier wurde die chemische Modifikation mittels DEPC gewählt, um diese Aminosäure-Reste zu deaktivieren.

Dabei wurden 120 µg CzcD mit einem zweifachen Überschuss an DEPC im Vergleich zu den Histidinen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Entfernung des Überschusses an DEPC wurde die Proteinlösung in zwei Teile separiert. Eine Fraktion wurde direkt auf eine Metallchelate-Sepharose-Säule gegeben, die mit 3 Vol. 250 mM Zn<sup>2+</sup> vorinkubiert worden war. Der zweite Teil wurde parallel dazu mit 75 mM Hydroxylamin für 12 h auf Eis inkubiert und dann ebenfalls auf eine Zn<sup>2+</sup>-Säule gegeben. Hydroxylamin decarboxyliert spezifisch Carboxylhistidine, während modifizierte Tyrosin-Reste nur bedingt durch Hydroxylamin beeinflusst werden.

Durch die DEPC-Modifikation war eindeutig zu erkennen, dass CzcD seine Bindefähigkeit durch die Deaktivierung der Histidine vollständig verloren hat. Als Resultat war das gesamte Protein in den Waschfraktionen zu finden. Durch die zusätzliche Inkubation von CzcD mit 75 mM Hydroxylamin hingegen restaurierte sich die Bindefähigkeit des Proteins auf ca. 75 %, während nur noch 25 % in den Waschfraktionen zu finden waren (Abb. 25).



**Abb. 25: DEPC-Modifikation und Regeneration der Bindefähigkeit von CzcD mit Hydroxylamin**

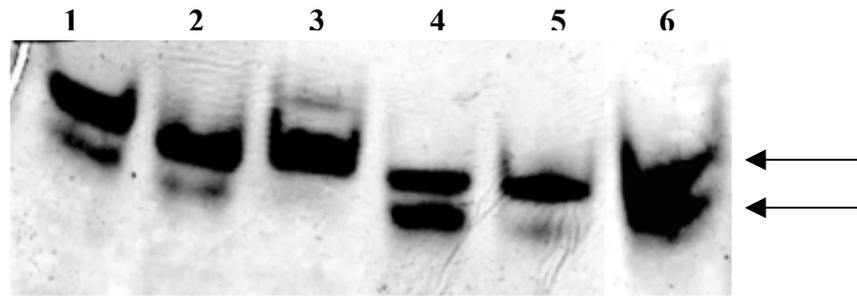
15 % SDS-PAGE, Silberfärbung. Nach Inkubation mit DEPC wurden die Fraktionen in gleiche Teile separiert. Der erste Teil wurde direkt auf die Säule gegeben. Der verbleibende Teil wurde mit 75 mM Hydroxylamin für 12 h auf Eis inkubiert und anschließend auch auf die  $Zn^{2+}$ -Säule gegeben. **A:**  $Zn^{2+}$ -Säule mit DEPC modifiziertem CzcD, **B:**  $Zn^{2+}$ -Säule mit DEPC und Hydroxylamin modifiziertem CzcD, **M:** Marker, **1-2:** Durchlauf, **3-5:** Waschfraktion, **6-9:** Elutionsfraktionen

### 3.6.5. CzcD bindet 2-3 Zink-Atome

Um zu quantifizieren, wie viele Zink-Atome pro Proteinmolekül gebunden werden, wurde die Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) durchgeführt. Dafür wurde CzcD mit verschiedenen Zink-Mengen inkubiert. 7.1-9.8  $\mu\text{M}$  CzcD wurden mit 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1 mM  $Zn^{2+}$  versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Der Überschuss an  $Zn^{2+}$  wurde anschließend durch Dialyse entfernt. Durch die Analyse mittels AAS konnte gezeigt werden, dass CzcD 2.09 Zinkatome bei 100  $\mu\text{M}$   $Zn^{2+}$  und 3.09 Zn-Atome bei 500  $\mu\text{M}$  und 1 mM  $Zn^{2+}$  pro Proteinmonomer gebunden hat.

### 3.6.6. Die lösliche, zytoplasmatische Domäne bindet Metalle *in vitro*

Die Bindung von Metallen durch CzcD konnte *in vitro* gezeigt werden. Da es möglich war, auch die zytoplasmatische Domäne von CzcD zu exprimieren und zu reinigen, konnte untersucht werden, ob es eine Metallbindestelle innerhalb dieses Bereiches des Proteins gab.



**Abb. 26: Gelshift-Experiment durch Inkubation der löslichen Domäne mit verschiedenen Metallen**

15 % Native PAGE. Nach Inkubation von 3  $\mu\text{g}$  Protein mit verschiedenen Metallen (10 mM) für 30 min auf Eis erfolgte eine Analyse auf einer Nativen PAGE. Die Pfeile zeigen zwei Banden an, die sich im Nativen Gel zeigen. **1:** Zink, **2:** Kobalt, **3:** Kadmium (4 mM), **4:** Nickel, **5:** Kupfer, **6:** ohne Metall

Um die Bindung von Metallen in diesem Bereich zu untersuchen, wurden Gelshiftexperimente in Nativen PAA-Gelen durchgeführt. Dafür wurde das Protein in Anwesenheit von EDTA gereinigt und 3  $\mu\text{g}$  Protein für die Inkubation mit Metallen eingesetzt. Es wurden 10 mM folgender Metalle verwendet:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ , bei der Inkubation mit  $\text{Cd}^{2+}$  wurde eine Endkonzentration von 4 mM verwendet. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die gesamten Ansätze auf 15 % (w/v) Nativen PAA-Gelen analysiert.

Auffällig war das Erscheinen einer Doppelbande im nativen Gel ohne Metallinkubation (Abb. 26, Spur 6), während im SDS-Gel nur eine Bande sichtbar war (Abb. 20b, Spuren 1 und 2). Durch die Inkubation mit den nativen Substraten der *czc*-Determinante  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  zeigte sich eindeutig die Veränderung des Laufverhaltens (Abb. 26, Spur 1-3) zu höher laufenden Proteinbanden. Am deutlichsten war dabei der Effekt von  $\text{Cd}^{2+}$  zu beobachten, bei dem die obere der beiden ursprünglichen Banden das gesamte Protein im Ansatz repräsentierte. Die Inkubation mit  $\text{Ni}^{2+}$  führte zu keiner Veränderung des Laufverhaltens, beide Proteinbanden waren zu gleichen Teilen vorhanden. Obwohl  $\text{Cu}^{2+}$  bisher nicht als Substrat für die *czc*-Determinante beschrieben wurde, war bei der Inkubation mit  $\text{Cu}^{2+}$  ein ähnliches Laufverhalten wie bei  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  zu beobachten.

Auf die Auftragung eines Proteingewichtsmarkers wurde bewusst verzichtet, da das Laufverhalten des Proteins nach Metallinkubation im Vergleich zur uninkubierten Probe von entscheidender Bedeutung für dieses Experiment sein sollte.

### **3.6.7. Mindestens zwei der sieben Histidine in der löslichen Domäne sind in die Metallbindung involviert**

MASWS<sup>H\*</sup>PQFEKGAETAVPNSS<sub>203</sub>LNVLLEGVPDDVDLAEVEKQILATPGVKSF<sup>H</sup>DL<sup>H</sup>IWALTS GK  
 ASLTV<sup>H</sup>VVNDTAVNPMEVLP<sup>L</sup>PELKQMLADKFDIT<sup>H</sup>VTTIQFELAPCEQADAAQ<sup>H</sup>FNASPALVGSKS  
 LAAGGN<sup>H\*</sup>GL

#### **Abb. 27: AS-Sequenz der löslichen Domäne CzcD**

Das Protein wurde in verschiedenen Konzentrationen zur Titration der Histidine mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) eingesetzt. Das Protein verfügt über fünf Histidine (**H**), die sich von der nativen AS-Sequenz ableiten. Zwei Histidine (**H\***) wurden durch die *EcoRI/NcoI*-Klonierung in das Protein eingefügt.

Zur Titration von einzelnen Histidin-Resten wurde die Methode der chemischen Modifikation mittels DEPC (Diethylpyrocarbonat) gewählt, um AS-Reste zu quantifizieren, die in die Bindung von Zn<sup>2+</sup> involviert sind. Dabei waren im Protein sieben Histidine vorhanden, von denen 5 auf der nativen Primärsequenz basierten und zwei durch die Klonierung in pASK-IBA5 hinzukamen (Abb. 27). Die DEPC-Modifikation beruht auf der Carbethoxylierung eines Stickstoffatoms am Imidazol-Ring des Histidins, wodurch die Aminosäure nicht mehr in der Lage ist, Metalle zu binden. Die Proteinlösung wurde hierbei mit 10 mM EDTA für 30 min inkubiert, um nach der Reinigung noch im Protein gebundenes Zink zu entfernen. Das Protein lag aufgrund des Reinigungsprotokolls in 100 mM Tris-HCl gelöst vor. Da DEPC in Tris-HCl äußerst instabil ist, wurde der Überschuss an EDTA durch Dialyse gegen 10 mM Phosphat-Puffer pH 7.2 entfernt. In Phosphat-Puffer ist DEPC über einen längeren Zeitraum stabil, und deshalb wurde dieses Puffersystem zur Modifikation gewählt.

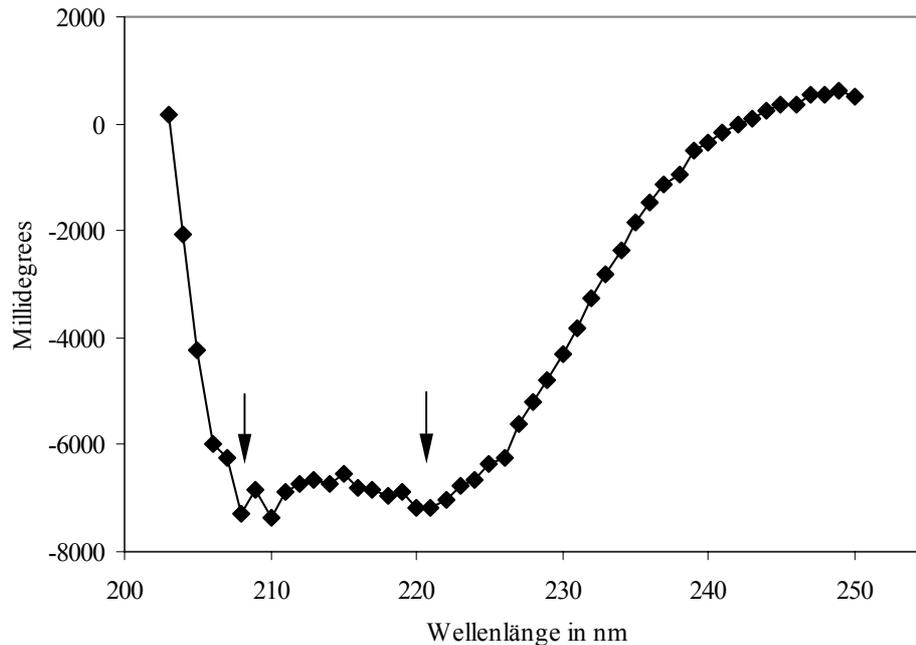
Es wurden Proteilmengen von 2.4-3.6 µM verwendet und DEPC im Verhältnis von 1:1 in Bezug auf die Menge an Histidinen eingesetzt. Der Anstieg der Absorption bei 242 nm wurde in einem UV/VIS-Spektrometer verfolgt. Die DEPC-Zugabe erfolgte, bis es zu keinem weiteren Anstieg der Absorption kam.

Dabei konnte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ( $\epsilon_{\text{Carbethoxyl-His}} = 3200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) der Gehalt an Histidinen berechnet werden. Für uninkubierte Proteinlösungen konnte eine Histidinmenge von  $3.7 \pm 0.3$  (von vorhandenen 7 His) identifiziert werden. Nach der Inkubation des Proteins mit 1 mM Zink für 30 min auf Eis verringerte sich die anschließend modifizierbare Menge an Histidinen auf  $2.15 \pm 0.15$ .

## **3.7. Welche Struktur weist CzcD *in vitro* auf?**

### **3.7.1. CzcD ist ein Protein mit eindeutig $\alpha$ -helikalen Strukturen**

Die Struktur des CzcD-Proteins wurde aufgrund von 6 postulierten transmembranen Segmenten als hauptsächlich  $\alpha$ -helikal beschrieben. Bisher fehlte allerdings die eindeutige Analyse der Sekundärstruktur, die als Referenz dienen muss, wenn Einzelmutationen in Form von



**Abb. 28: CD-Spektrum des CzcD-Proteins in 100 mM Tris-HCl pH 8.0**

CD-Spektren wurden in Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) aufgenommen. Dabei wurde das Puffersignal vom Proteinspektrum subtrahiert. Pfeile zeigen die beiden Minima des Proteins bei 208 und 222 nm an. Dieses Spektrum wurde mit einer Proteinkonzentration von 240  $\mu\text{g/ml}$  aufgenommen.

Aminosäureaustauschen in CzcD charakterisiert werden sollen. Es ist also absolut essentiell, Effekte, die aufgrund von Mutationen im Protein in der enzymatischen Reaktion des Proteins zu beobachten sind, auch als katalytische und nicht strukturelle Effekte zu beschreiben.

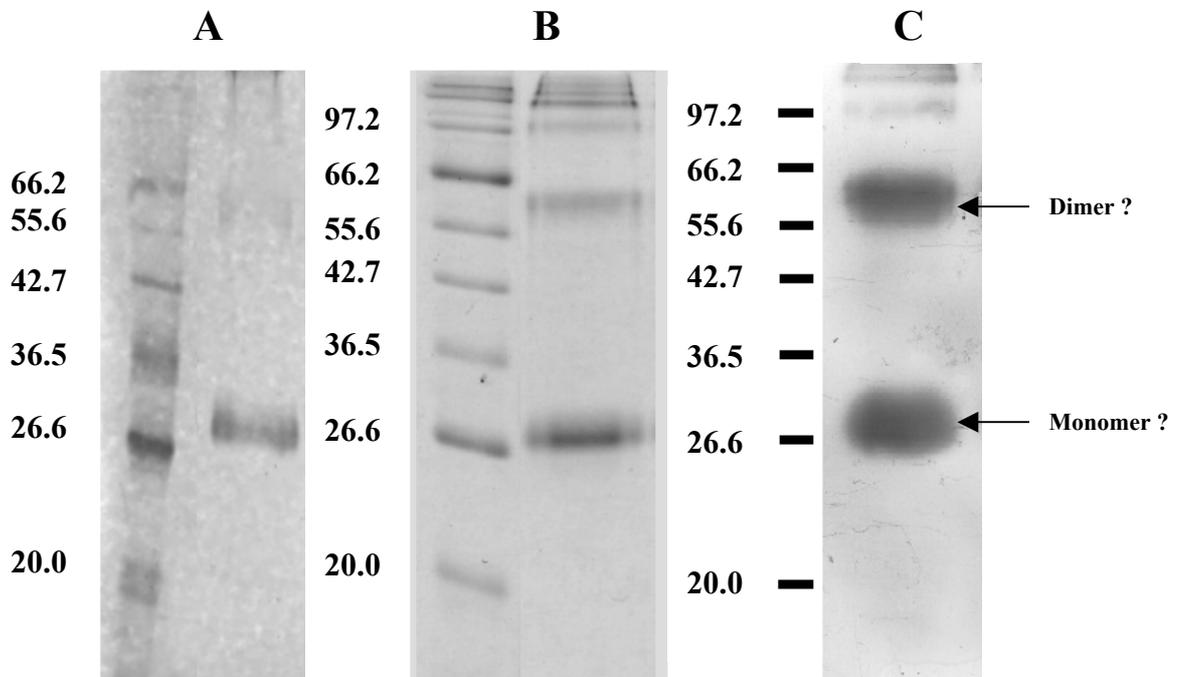
Eindeutig waren die beiden Extrema im Spektrum des CzcD-Proteins bei 208 und 222 nm zu erkennen (Abb. 28). Diese beiden Minima sind ein Charakteristikum  $\alpha$ -helikaler Proteine. Die Inkubation des Proteins mit verschiedenen Zink-Konzentrationen zeigte, dass sich das CD-Spektrum nur unwesentlich innerhalb des Toleranzbereiches aufgrund von Schwankungen in der Proteinkonzentration änderte (Ergebnis nicht gezeigt). Auch das Umpuffern in 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0 hatte keine Veränderung des CD-Spektrums zur Folge. Dabei konnte allerdings auch nicht das für  $\alpha$ -helikale Proteine charakteristische Extremum bei 190 nm gezeigt werden. Offensichtlich war die Lichtstreuung unterhalb von 203 nm zu groß, so dass das CD-Spektrometer im fernen UV-Bereich die Messungen einstellte.

Die Messungen mit der zytoplasmatischen Domäne des CzcD-Proteins ergaben ein Spektrum eines gefalteten Proteins, wobei nur ungenaue Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins gemacht werden konnten (Ergebnis nicht gezeigt).

### **3.7.2. CzcD neigt zur Bildung einer oligomeren Struktur**

Das CzcD-Protein weist eine molekulare Masse von ca. 36 kDa auf. Allerdings war während des Reinigungsvorganges aufgefallen, dass weitere höhermolekulare Proteinbanden spezifisch von der Affinitätschromatographiesäule eluierten. Der Versuch, diese Proteinbanden vom erwarteten 36

kDa-Protein mittels einer Gelchromatographie (Ausschlussgröße 175 kDa) zu trennen, misslang. Außerdem konnte die Zunahme dieser Banden zeitabhängig nach Inkubation auf Eis beobachtet werden (Abb. 29, A und B). Um die Identität dieser Banden zu überprüfen, wurde ein Nachweis des *Strep-tags II*<sup>®</sup> durchgeführt.



**Abb. 29: Oligomerisierung von CzcD nach Inkubation über Nacht auf Eis**

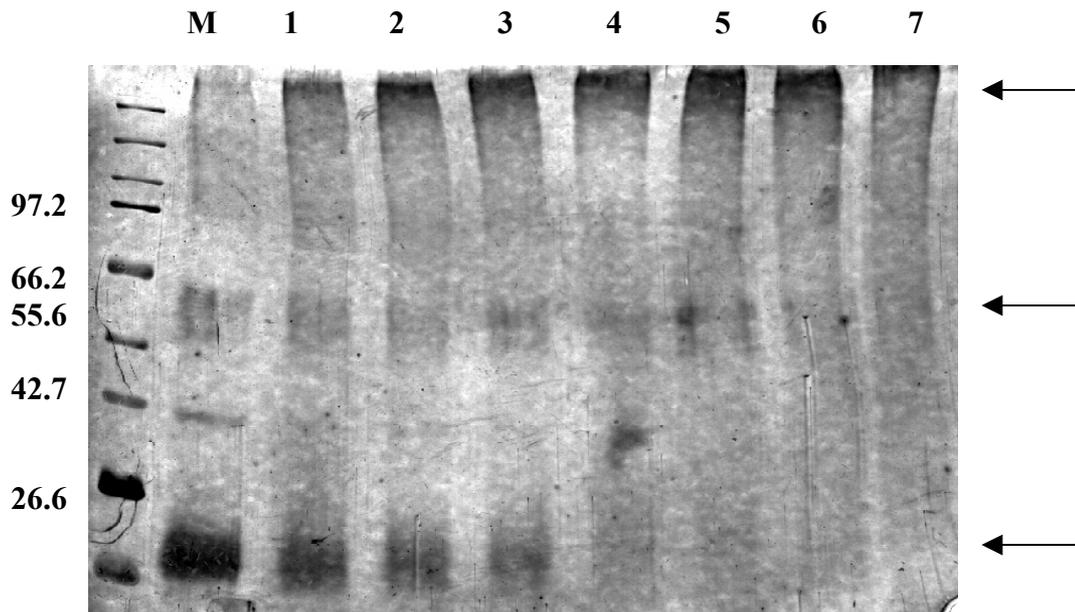
15 % SDS-PAA-Gele. Auffällig war das Erscheinen mehrerer höhermolekularer Proteinbanden nach Inkubation des Proteins über Nacht auf Eis. Pfeile markieren die beiden dominanten Proteinbanden. **A:** CzcD direkt nach der Elution von der *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Säule, **B:** CzcD nach Inkubation über Nacht auf Eis, **C:** Nachweis des *Strep-tags II* nach Inkubation der Proteinprobe

Nachdem die höhermolekularen Proteinbanden nicht von den erwarteten Proteinbanden getrennt werden konnten, wurde versucht, den *Strep-tag II*<sup>®</sup> in allen Proteinbanden nachzuweisen. Dafür wurde das Protein auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Streptactinkonjugat der verwendete *tag* nachgewiesen. Auch die größeren Banden zeigten hierbei ein deutliches Signal im Peroxidasenachweis des *Strep-tags II*<sup>®</sup>, was auf eine Oligomerisierung des Proteins hinwies. Da das Protein vor dem Auftragen auf dem SDS-PAA-Gel nicht auf 96°C erhitzt worden war, wurde versucht, die höhermolekularen Proteinbanden mittels Erhitzen auf 96°C für 15 min vollständig zu denaturieren. Jedoch führte dies zu einer undefinierten Oligomerisierung der Proteinlösung, die nach der SDS-PAGE als Schmier sichtbar war (Ergebnis nicht gezeigt).

### **3.7.3. Unter Einfluss chemischer Vernetzer wird das potentielle Dimer bevorzugt gebildet**

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die auftretenden Banden mögliche Multimere von CzcD sein könnten, wurden Vernetzer eingesetzt, um dieses Ergebnis zu verifizieren.

Es gibt verschiedene Substanzen, die für chemisches Quervernetzen von Proteinen eingesetzt



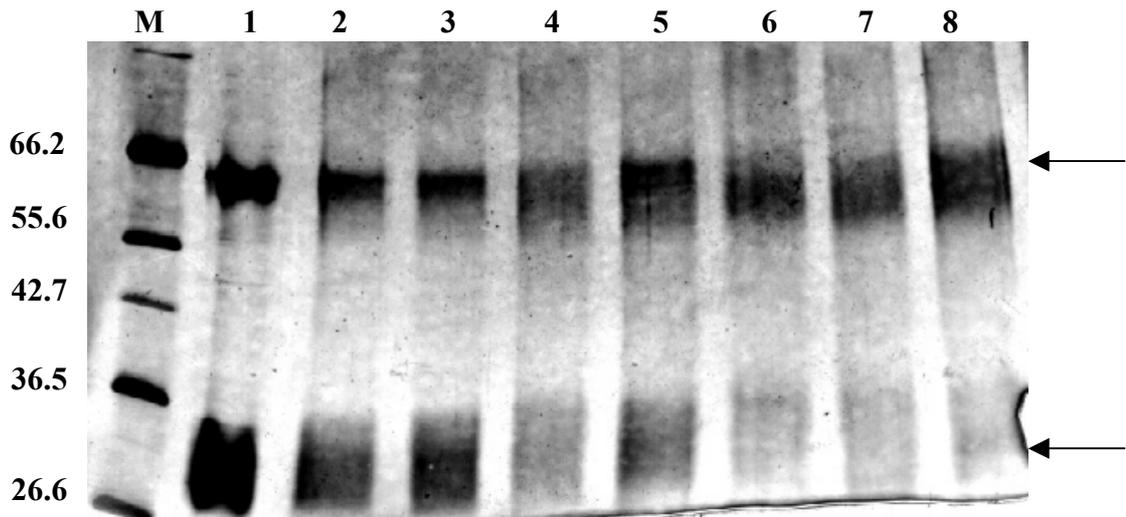
**Abb. 30: Vernetzung von CzcD mittels 5 mM Glutardialdehyd**

5-15 % (w/v) Gradienten-SDS-PAGE; Silberfärbung; Gereinigtes CzcD in 10 mM Na-Phosphat-Puffer wurde mit 5 mM Glutardialdehyd definierte Zeiten inkubiert und anschließend auf einer 5-15 % Gradienten-SDS-PAGE analysiert. Pfeile markieren die dominanten Proteinbanden. **M:** Marker, **1:** uninkubierte Probe, **2:** 1 min, **3:** 2 min, **4:** 5 min, **5:** 10 min, **6:** 15 min, **7:** 20 min

werden können. In unterschiedlichen Versuchen wurden hierbei folgende Substanzen ausgewählt, um den Oligomersierungszustand von CzcD näher zu untersuchen: Formaldehyd, Glutardialdehyd und Tris-2,2-bispyridyl-ruthenium(II)chlorid. Für die *Crosslinking*-Experimente lag das Protein in Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) oder 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 vor.

Während es *in vitro* nicht gelang, CzcD mittels Formaldehyd zu vernetzen, erwies sich Glutardialdehyd als sehr potenter Vernetzer, der zu einer schnellen und völligen Oligomerisierung des Proteins führte (Abb. 30). Aufgrund der hohen Reaktivität des Glutardialdehydes war es auch nicht möglich, eine definierte Bande zu erhalten. Der Großteil des Proteins schmierte über das Gel, sobald der Vernetzer länger als ca. 5 min einwirkte. Bei Vorversuchen waren 500 mM Glutardialdehyd eingesetzt worden, wobei sich allerdings das gesamte Protein an der Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel konzentrierte (Ergebnis nicht gezeigt).

Mit Tris-2,2-bispyridyl-ruthenium(II)chlorid konnte hingegen gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten Bildung des potentiellen Dimers kommt. 9 µg CzcD wurden über definierte Zeiträume unter einer Laborlampe mit dem photoreaktiven Vernetzer inkubiert. Während es in 10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.0), ähnlich wie bei der Vernetzungsreaktion mit Glutardialdehyd (Ergebnis nicht gezeigt), zu einer schnellen und intensiven Verstärkung höhermolekularer Proteinbanden kam, konnte in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) eine abgeschwächte Reaktivität des *Crosslinkers* beobachtet werden. Dadurch war eindeutig das Erscheinen des Dimers zu beobachten. Dieses Dimer konnte allerdings auch in der uninkubierten Probe gefunden werden (Abb. 31). Während der zeitabhängigen Inkubation mit dem Vernetzer verschob sich das Verhältnis jedoch zum potentiellen Dimer (Abb. 31).



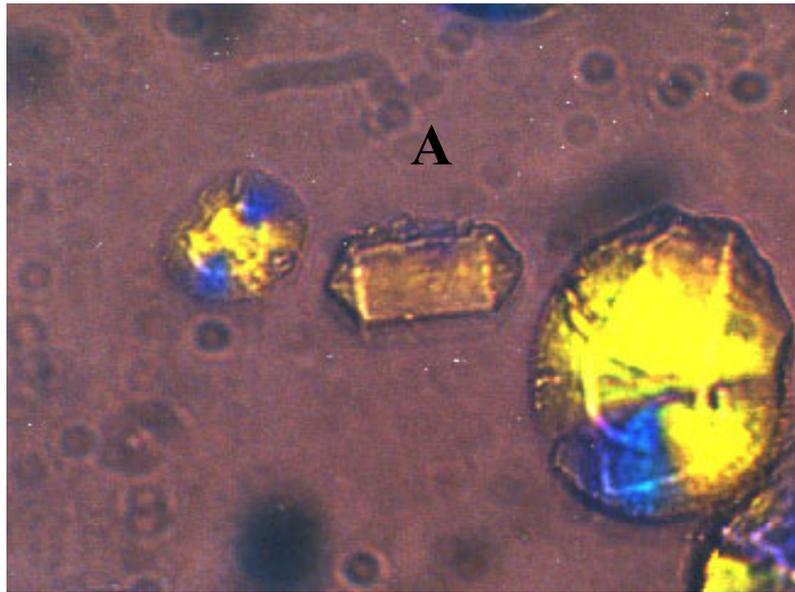
**Abb. 31: Crosslinking-PAGE mit CzcD, behandelt mit Tris-2,2-bispyridyl-ruthenium(II)chlorid**  
 5-15 % (w/v) Gradienten SDS-PAGE, Silberfärbung. 9  $\mu\text{g}$  CzcD wurden verschiedene Zeiten (1-30 s) in Anwesenheit von 125  $\mu\text{M}$  Tris-2,2-bispyridyl-ruthenium(II)chlorid und 2.5 mM APS in Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) unter einer Laborlampe inkubiert. Pfeile markieren die dominanten Banden des Mono- bzw. Dimers. **M:** Marker, **1:** uninkubiert, **2:** 1 s, **3:** 5 s, **4:** 10 s, **5:** 15 s, **6:** 20 s, **7:** 25 s, **8:** 30 s

#### **3.7.4. Erste Schritte, eine dreidimensionale Struktur von CzcD zu erhalten**

Um die Frage der dreidimensionalen Struktur von CzcD und um Aminosäure-Austauschmutationen und deren katalytischen Effekt zu verifizieren, war es notwendig, Bedingungen zu finden, unter denen Kristalle von CzcD erhalten werden konnten. Gleichzeitig wurde versucht, durch Röntgenkleinwinkelstreuung erste Aussagen zur Struktur von CzcD zu machen.

Durch die Aufklärung der Struktur sollten die genauen Positionen der einzelnen Aminosäure-Reste bestimmbar sein und sich die Wahl der Mutationsorte vereinfachen. Die Kristallisation ist dabei die entscheidende Grundvoraussetzung zur Aufklärung der Proteinstruktur. Als Methode zur Kristallisation wurde die Gasphasendiffusion am hängenden Tropfen gewählt. Dafür wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von ca. 7 mg/ml eingesetzt, da das Protein oberhalb dieser Konzentration sehr stark zur Präzipitation neigte.

Als Präzipitant erwies sich PEG (Polyethylenglykol) als am besten geeignet, CzcD zu kristallisieren. Dabei wurden die verschiedenen PEG-Formen 4000, 6000, 8000 und 10000 in den Konzentrationen von 12-23 % (w/v) eingesetzt. Bei den beiden höhermolekularen PEG-Formen 8000 und 10000 präzipitierte der Großteil des Proteins. Im Gegensatz dazu verblieb das Protein in PEG4000 vollständig in Lösung. Nur bei PEG6000 präzipitierte das Protein teilweise, und auch nur bei 19 und 20 % (w/v) konnte das Erscheinen von Kristallen beobachtet werden (Abb. 32). Dabei konnte allerdings bisher nicht schlüssig bewiesen werden, dass es sich wirklich um Proteinkristalle handelte.



**Abb. 32: 1:40 Vergrößerung eines putativen CzcD-Kristalls in 19 % (w/v) PEG6000**

Ca. 7 mg/ml CzcD wurden zur Kristallisation mit 19 % (w/v) PEG6000 eingesetzt. Das Bild wurde nach 14tägiger Inkubation aufgenommen. A: potentieller CzcD-Kristall

Mittels Methylenblau-Färbung konnten jedoch die sphaerolitischen Strukturen (stark lichtbrechende, gelb-blaue Strukturen in Abb. 32), welche mögliche Vorstufen zu Kristallen darstellten, angefärbt werden.

### **3.8. Untersuchung der weiteren Regulatoren der *czc*-Determinante**

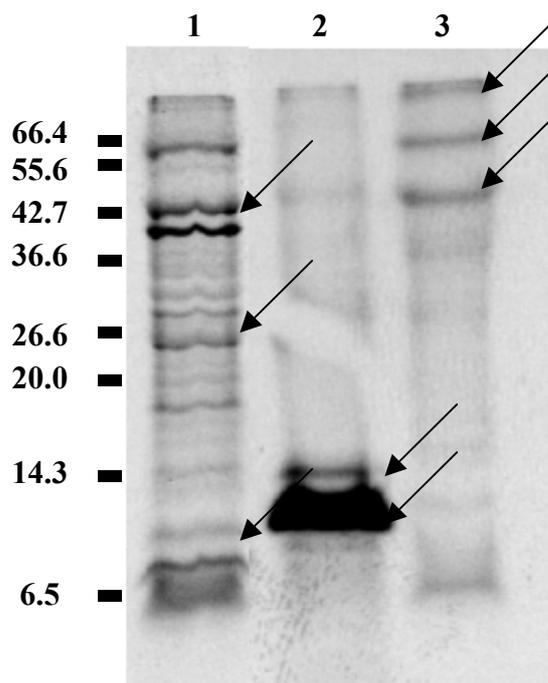
#### **3.8.1. *czcR*, *czcS*, *czcE*, *czcN* und *czcI* ließen sich mittels T7-Expression als Proteine nachweisen**

Neben CzcD sollten aber auch weitere Regulatoren der *czc*-Determinante untersucht werden. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten war nur CzcR als Vertreter der regulatorischen Proteine, die in die *czc*-vermittelte Resistenz involviert sein sollten, gereinigt und charakterisiert worden (Große *et al.*, 1999). Alle anderen akzessorischen ORFs konnten bis zu diesem Zeitpunkt nicht als Protein nachgewiesen werden. Da die T7-Expression eine schnelle und effektive Methode ist, exprimierte Proteine ohne den Einsatz von Antikörpern im Rohextrakt nachzuweisen, wurden alle Gene regulatorischer Proteine der *czc*-Determinante in pT7-5 oder den Vektor pGEM-Teasy kloniert. Beide Plasmide verfügen über den T7-Promotor. Durch das gewählte System war es möglich, heterolog in *E. coli* K38 exprimierte Proteine mit radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin zu markieren und durch Autoradiographie sichtbar zu machen (Abb. 33a und Abb. 33b).

Als Konstrukt für den Nachweis der Expression von *czcN* und *czcI* wurde ein DNA-Fragment durch *SacI/PstI*-Verdau aus pECD162 (*Bam*HI-Fragment der *czc*-Determinante, kloniert in pUC18) isoliert und in pT7-5 kloniert. Die Expressionsexperimente mit diesem Konstrukt ergaben

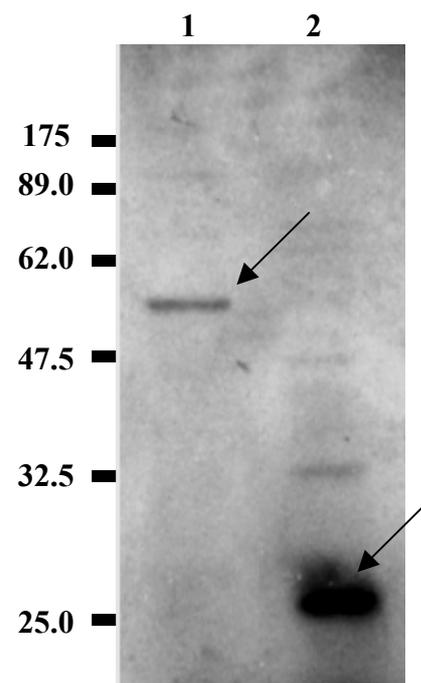
jedoch keine reproduzierbaren Expressionsmuster (Ergebnis nicht gezeigt). Zur internen Kontrolle der Expression wurde das Plasmid pECD730 einem *PstI*-Verdau unterzogen und ein weiteres Fragment, auf dem sich *czcC* befand, aus pECD162 stromabwärts von *czcI* in Plasmid pECD730 kloniert. Bei den anschließenden T7-Expressionen wurde die Bande für CzcC (Abb. 33a, Spur 1) exprimiert, hypothetische Banden für CzcN und CzcI konnten gezeigt werden. Dabei wurde für CzcN eine Bande mit ca. 24 kDa in der Autoradiographie nachgewiesen. Für CzcI wurde eine Proteinbande mit einer theoretischen Größe von 9 kDa gezeigt (Abb. 33a). Die Klonierung von *czcN* und *czcI* in pGEM-Teasy, um beide Proteine einzeln nachzuweisen, führte zu keiner sichtbaren Expression beider Gene (Ergebnis nicht gezeigt), obwohl vor beiden ORFs zur Optimierung der Expression eine künstliche Ribosomenbindestelle (AGGAGANNNNATG) kloniert worden war.

Der ORF131 (später *czcE*) konnte von van der Lelie (Belgien) als *EcoRI/HindIII*-Fragment in pUC18 erhalten werden (pMOL1085). Dieses Fragment wurde mit den genannten Schnittstellen in pT7-5 umkloniert. Auffällig war das Erscheinen einer Doppelbande bei der Expression von *czcE* (Abb. 33a, Spur 2), wobei die prozessierte Bande (kleiner als 14.3 kDa) deutlich den größeren Teil des Proteins repräsentierte.



**Abb. 33a: Autoradiographie der T7-Expression von CzcN, CzcI und CzcE**

17.5 % SDS-PAGE; Das Konstrukt pECD731 enthielt die Gene *czcC*, *czcN* und *czcI* auf einem *SacI/PstI*-Fragment von pMOL30 in pT7-5. *czcE* (pECD717) wurde ebenfalls in pT7-5 kloniert exprimiert. Als Kontrolle diente hierbei die Expression von *czcCBA* mit pECD110. Alle Konstrukte wurden in *E. coli* K38 exprimiert. **1.** Plasmid pECD731 (CzcNIC), **2.** pECD717 (CzcE), **3.** pECD110 (CzcCBA)



**Abb. 33b: Autoradiographie der T7-Expression von CzcR und CzcS**

12.5 % SDS-PAGE; Beide Gene lagen im Vektor pGEM-Teasy kloniert vor (pECD714 und pECD685) und wurden durch Hitzeinduktion der T7-Polymerase in *E. coli* K38 exprimiert. **1:** pECD685 (CzcS), **2:** pECD714 (CzcR)

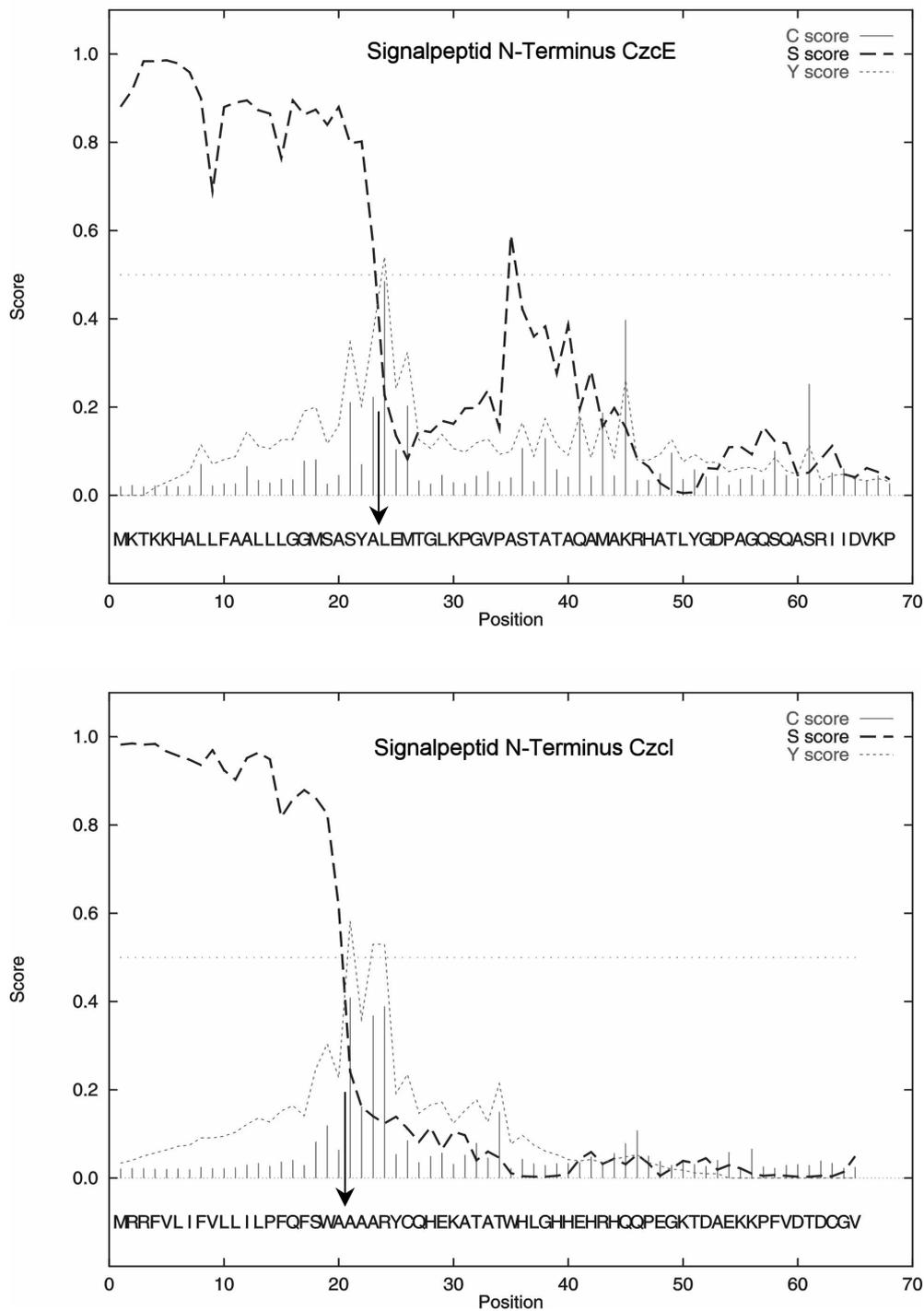
Beide Proteine des Zweikomponentenregulationssystems CzcR und CzcS konnten nachgewiesen werden (Abb. 33b). Beide ORFs lagen in pGEM-Teasy kloniert vor. Die exprimierten Proteine zeigten die erwarteten Proteinmassen im SDS-PAA-Gel von CzcR 25.5 kDa und CzcS 52.0 kDa. Bei Interaktionsexperimenten durch *in vivo crosslinking* mittels 0.1 % (v/v) Formaldehyd konnte keine Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen beiden Komponenten gezeigt werden. Dabei wurden Rohextrakte verwendet, die durch Einfrieren und Auftauen gewonnen worden waren. Nach erfolgter Lyse wurden die Rohextrakte, die CzcR bzw. CzcS enthielten, im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 min in Anwesenheit von 0.1 % (v/v) Formaldehyd auf Eis inkubiert (Ergebnis nicht gezeigt).

### **3.8.2. CzcE und CzcI sind im Periplasma lokalisiert**

Da bei verschiedenen T7-Expressionen die Bildung von Doppelbanden im Fall von CzcE beobachtet werden konnte, war die Frage nach der Lokalisation der beiden löslichen Regulatoren der *czc*-Determinante, denen bisher keine Funktion nachgewiesen werden konnte, gestellt worden. Um den möglichen Export der Proteine in das Periplasma zu untersuchen, wurden Reporterproteininfusionen des *czcE*- bzw. *czcI*-Gens mit Alkalischer Phosphatase und  $\beta$ -Galaktosidase konstruiert.

Das *czcE*-Gen wurde mit den Primern *czcE-KpnI* und *czcE-PhoA-3'* und *czcI* wurde mit den Primern *czcI<sub>RBS</sub>-KpnI* und *czcI-PhoA* von pMOL30 mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte in die Plasmide pECD636 (Fusion mit *lacZ*) bzw. pECD637 (Fusion mit *phoA*) kloniert. Die beiden verwendeten Reportergensysteme bildeten dabei Fusionen mit reziproken Enzymaktivitäten, bezogen auf die Lokalisation des Reporters, aus. So ist die alkalische Phosphatase nur nach Translokation ins Periplasma aktiv. Da im *phoA*-Gen jedoch der Bereich deletiert war, der für das Signalpeptid kodiert, konnte nur ein stabil exprimiertes Fusionsprotein, das aufgrund des untersuchten Proteins ins Periplasma transportiert wird, enzymatische Aktivität zeigen. Andererseits ist die  $\beta$ -Galaktosidase nur im Zytoplasma enzymatisch aktiv. Durch den versuchten Export eines periplasmatisch lokalisierten LacZ-Fusionsproteins über die Zytoplasmamembran wird das Protein durch die Reporterprotein-domäne am Export gehindert und zeigt keine Aktivität. Als Kontrollen wurden die Plasmide pECD618 (*bla-phoA*) und pECD619 (*bla-phoA*) bzw. pECD502 (*bla-lacZ*) verwendet, welche Fusionsproteine mit der  $\beta$ -Laktamase, einem periplasmatischen Protein, ohne bzw. mit Signalpeptid kodierten.

Aufgrund von Computeranalysen wurden die jeweiligen putativen Spaltstellen in CzcE und CzcI ermittelt. Für CzcE wurde eine Spaltung nach AS-Rest 23 mit dem Motiv SYA<sub>23-24</sub>LE und für CzcI die Spaltung nach AS-Rest 20 mit dem Motiv SWA<sub>20-21</sub>AA berechnet (Abb. 34).



**Abb. 34: Signalpeptide der Proteine CzcE und CzcI aufgrund von Computeranalysen**

Aufgrund von Computeranalysen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) wurden die jeweiligen putativen Spaltstellen in CzcE und CzcI ermittelt. Für CzcE wurde eine Spaltung nach AS-Rest 23 mit dem Motiv SYA<sub>23-24</sub>LE und für CzcI die Spaltung nach AS-Rest 20 mit dem Motiv SWA<sub>20-21</sub>AA berechnet. Für die Berechnung wurden nur die N-Termini der Proteine verwendet (CzcI 63 AS-Reste; CzcE 68 AS-Reste). Pfeile markieren die putativen Spaltstellen.

**Tab. 8: Lokalisationsuntersuchung der Regulatoren CzcE und CzcI durch Reporterfusionen<sup>1</sup>**

Plasmid	Relevanter Genotyp	Spezifische Aktivität in U/mg	Spezifische Aktivität % der Positivkontrolle
pECD719	<i>czcE-`phoA</i>	145.9±20.8	240.7 %
pECD720	<i>czcI-`phoA</i>	36.4±2.1	60.1 %
pECD618 (Negativkontrolle)	<i>`bla-`phoA</i>	2.3±0.6	3.8 %
pECD619 (Positivkontrolle)	<i>bla-`phoA</i>	60.6±5.8	100 %
pECD718	<i>czcE-`lacZ</i>	nicht transformierbar	
pECD721	<i>czcI-`lacZ</i>	1.0±0.4	2.6 %
pECD502 (Positivkontrolle)	<i>`bla-`lacZ</i>	37.0±7.2	100 %

<sup>1</sup> Alle verwendeten Konstrukte wurden in *E. coli* CC118(pGP1-2) exprimiert. Die T7-Polymerase wurde durch Inkubation bei 42°C (30 min) induziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Enzymaktivitäten bestimmt. Die angegebenen Aktivitäten sind in U/mg (1 U = 1 nmol/min) Zelltrockengewicht dargestellt. Als Positivkontrollen wurden pECD619 und pECD502 verwendet, die die Fusionen mit der  $\beta$ -Laktamase kodierten (*phoA*-Fusion mit Signalpeptid, *lacZ*-Fusion ohne Signalpeptid). Als Negativkontrolle diente pECD618, welches für die  $\beta$ -Laktamase ohne Signalpeptid kodierte. Das Plasmid pECD718, welches die Fusion *czcE-`lacZ* enthielt, konnte nicht in *E. coli* CC118 transferiert werden.

Alle Versuche wurden zweimal mit drei unabhängigen Kulturen durchgeführt.

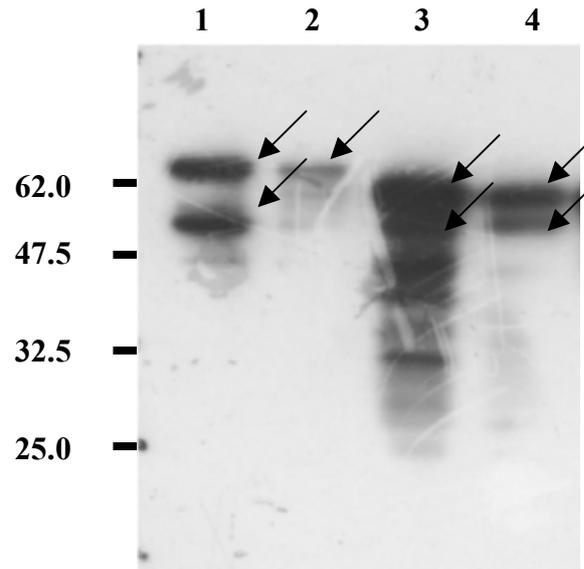
Beide untersuchten Proteinfusionen mit der alkalischen Phosphatase zeigten Enzymaktivitäten im Bereich der Positivkontrolle. So erreichte CzcE-`PhoA ca. 240 % und CzcI-`PhoA ca. 60 % der Enzymaktivität der Positivkontrolle. Währenddessen zeigte die  $\beta$ -Laktamase ohne Signalpeptid im PhoA-Assay nur 3.8 % (Tab. 8).

Reziproke Enzymaktivitäten konnten bei der Expression von *czcI-`lacZ*(pECD721) gezeigt werden. Bei der Expression der zytoplasmatischen Reporterfusion wurden nur 2.6 % der Enzymaktivität der Positivkontrolle `Bla-LacZ(pECD502) erreicht (Tab. 8). Der *E. coli*-Stamm CC118(pGP1-2) konnte mit dem Plasmid pECD718(*czcE-`lacZ*) nicht transformiert werden.

Aufgrund der ermittelten Enzymaktivitäten, hohen Aktivitäten der PhoA-Fusionen und niedrigen Aktivitäten der LacZ-Fusionen sowie der offensichtlichen Toxizität von CzcE-`LacZ kann beiden Proteinen CzcE und CzcI eine periplasmatische Lokalisation zugesprochen werden.

Durch Western-Blot mit Rohextraktmaterial konnte die Expression der PhoA-Fusionsproteine gezeigt werden (Abb. 35). Ergänzend zu den gemessenen Aktivitäten wurde versucht, den Nachweis zu erbringen, dass die PhoA-Fusionsproteine im Periplasma zu finden sind. Die Präparation von Sphaeroplasten erbrachte jedoch keine genauen Aussagen über die Lokalisation (Ergebnis nicht gezeigt).

Bei den aktiven PhoA-Fusionsproteinen konnte eine Doppelbande detektiert werden, die aus einer ca. 50 kDa-Bande und der putativen Fusionsproteinbande bestand Bla-`PhoA (71 kDa), `Bla-`PhoA (68 kDa), CzcE-`PhoA (62 kDa) und CzcI-`PhoA (61 kDa) (Abb. 35). Offensichtlich waren alle Fusionsproteine nur zum Teil stabil, da bei allen die alkalische Phosphatase abgespalten wurde. Nur bei der CzcE-`PhoA-Fusion waren neben der Bande für die Alkalische Phosphatase auch weitere Abbauprodukte des Fusionsproteins erkennbar.



**Abb. 35: Western-Blot der PhoA-Fusionen**

Western-Blot, nach einer 15 % SDS-PAGE. Es wurden 20 µg Rohextrakt von allen Konstrukten, die durch 42°C für 30 min induziert worden waren, aufgetragen. Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese PVDF-Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Alkalische Phosphatase inkubiert. Pfeile bei ca. 50 kDa markieren die abgespaltene PhoA-Domäne der Fusionsproteine (Spuren 1, 2 und 4). Weitere Pfeile markieren die stabilen Fusionsproteine. **1:** pECD619 (*bla-phoA*) 71 kDa, **2:** pECD618 (*bla-phoA*) 68 kDa, **3:** pECD719 (*czcE-phoA*) 62 kDa, **4:** pECD720 (*czcI-phoA*) 61 kDa

Deutlich schwächer als *czcE-phoA* wurde *czcI-phoA* exprimiert, was sich auch in den ermittelten Enzymaktivitäten widerspiegelte. pECD619 (*bla-phoA*), die Fusion mit der  $\beta$ -Laktamase ohne Signalpeptid, zeigte nur eine sehr schwache Expression des Fusionsproteins. Das zytoplasmatisch lokalisierte Fusionsprotein wurde wahrscheinlich größtenteils abgebaut.

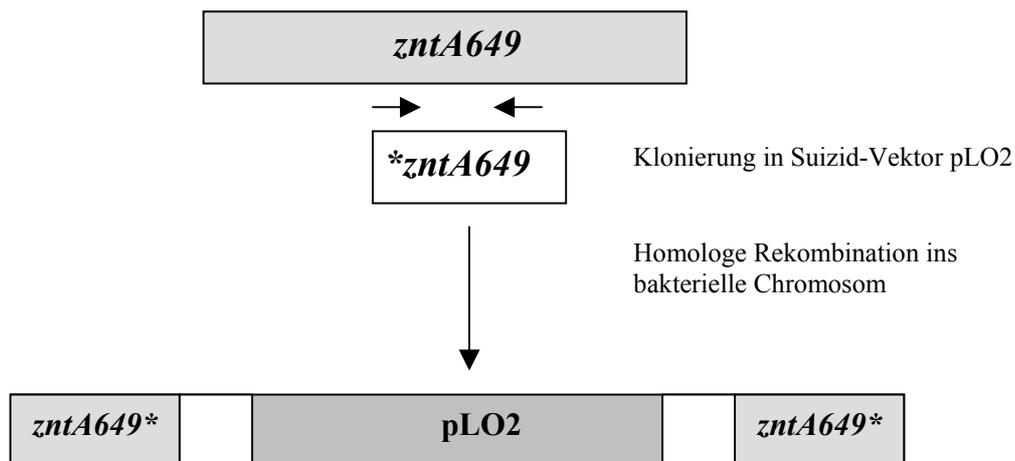
### **3.9. Zwei chromosomal kodierte P-Typ-ATPasen vermitteln in *R. metallidurans* AE104 Schwermetallresistenz**

Nach erfolgter Sequenzierung des *R. metallidurans* wurde die Frage nach weiteren Schwermetalltransportern gestellt, die die hohe Basisresistenz gegenüber Schwermetallen in *R. metallidurans* AE104, dem megaplasmidfreien Derivat von *R. metallidurans*, erklären könnten. Dabei wurde der Schwerpunkt auf ATPasen gelegt. Nach erfolgter BLAST-Analyse der Gesamtsequenz mit ZntA aus *E. coli* als Ausgangspunkt konnten 6 verschiedene P-Typ-ATPasen in *R. metallidurans* identifiziert werden, die in die Schwermetallhomöostase involviert sein könnten. Da die Auswertung der Sequenzdaten noch nicht abgeschlossen war, wurden die Gene mit ihren *Contigs*, in denen sie sich befinden, bezeichnet. Aus den gefundenen 6 Genen ließen sich zwei Gruppen von P-Typ-ATPasen ableiten. Die gefundenen ORFs in den *Contigs* 710 und 646 hatten die höchste Homologie zu  $\text{Cu}^{2+}$ -P-Typ-ATPasen und die P-Typ-ATPase 649, 691, 692a und 692b zu  $\text{Cd}^{2+}$ -P-Typ-ATPasen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Zn}^{2+}$

transportierenden ATPasen lag, wurden die ORFs, die in den  $\text{Cu}^{2+}$ -Transport involviert sein könnten, nicht näher untersucht.

Mittels PCR wurde anschließend überprüft, auf welchem der genetischen Elemente (Chromosom, pMOL30 oder pMOL28) sich die gefundenen ORFs befinden. Nur zwei der vier ATPasen konnten dem bakteriellen Chromosom zugeordnet werden: *contig649* und *contig691*.

Da beide Gene durch einfache Insertion eines Suizidvektors in das intakte Gen in zwei unvollständige ORFs (Abb. 36) aufgespalten werden sollten, wurde der zentrale Bereich (ca. 300 bp) *zntA649* mit den Primern *zntA-649-5'* und *zntA-649-3'* sowie *cadA691* mit den Primern *cadA-691-5'* und *cadA-691-3'* von der chromosomalen DNA mittels PCR amplifiziert. Nach erfolgter Klonierung in den Suizidvektor pLO2, der auch bei der *in frame*-Deletion der regulatorischen Gene eingesetzt worden war, wurden die so konstruierten zentralen Genbereiche in die folgenden *R. metallidurans*-Stämme eingeführt (Abb. 36): AE104, AE128(pMOL30), DN182(pMOL30-14,  $\Delta\text{czcD}$ ) und DN432(pMOL-38,  $\Delta\text{czcA}$ ). Dadurch entstanden die Stämme DN430(pMOL30-38,  $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649), DN431(pMOL30-38,  $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691), DN428(pMOL30-14,  $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649), DN429(pMOL30-14,  $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691), DN426(pMOL30,  $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649), DN427(pMOL30,  $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691), DN424( $\Delta$ -P-Typ-ATPase 649) und DN425( $\Delta$ -P-Typ-ATPase 691).



**Abb. 36: Destruktionsschema der putativen P-Typ-ATPase *zntA649* bzw. *cadA691***

Durch die Amplifikation nur des zentralen Bereiches (ca. 300 bp) des jeweiligen ORFs entstanden nach erfolgter Klonierung in den Suizid-Vektor pLO2 und der homologen Rekombination ins bakterielle Chromosom zwei neue ORFs, von denen keiner mehr ein intaktes Protein exprimieren konnte.

Auf pLO2 befindet sich eine Kanamycin-Resistenz, die als Marker für den Einbau der Konstrukte ins Genom benutzt werden konnte.

Nach erfolgter Identifikation der einzelnen Mutationen wurde das Wachstumsverhalten auf festen Medien und in flüssigem Medium untersucht. Während in AE128(pMOL30) und DN182(pMOL30-14,  $\Delta\text{czcD}$ ) durch die Deletion der beiden P-Typ-ATPasen keine sichtbaren Effekte detektiert werden konnten, zeigten die Stämme DN430(pMOL30-38,  $\Delta\text{czcA}$ ,  $\Delta\text{zntA649}$ )

und DN424( $\Delta zntA649$ ) eindeutige Effekte beim Wachstum auf Tris-Minimal-Agar, der verschiedene Zink-Konzentrationen (50-300  $\mu\text{M}$ ) enthielt. Weiterhin konnten auch durch die Deletion der zweiten P-Typ-ATPase *cadA691* in AE104 Effekte detektiert werden. Allerdings zeigten sich nur in Bezug auf das Wachstum auf kadmiumhaltigen Tris-Minimal-Medien Unterschiede zu AE104, auch wenn der Verlust der Resistenz nur schwach ausgeprägt war (Tab. 9).

**Tab. 9: Minimale Inhibitor-Konzentration von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  in *R. metallidurans*-Derivaten mit Mutationen in *zntA649* bzw. *cadA691***

Stamm	Relevanter Genotyp	Zink	Kadmium
AE104		300 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$
DN424	$\Delta zntA649$	150 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}^1$
DN425	$\Delta cadA691$	300 $\mu\text{M}^1$	250 $\mu\text{M}^1$
DN432	pMOL30-38, $\Delta czcA$ ,	300 $\mu\text{M}$	n.d.
DN430	pMOL30-38, $\Delta czcA$ ,	150 $\mu\text{M}^2$	n.d.
	$\Delta zntA649$		
DN431	pMOL30-38, $\Delta czcA$ ,	200 $\mu\text{M}^2$	n.d.
	$\Delta cadA691$		

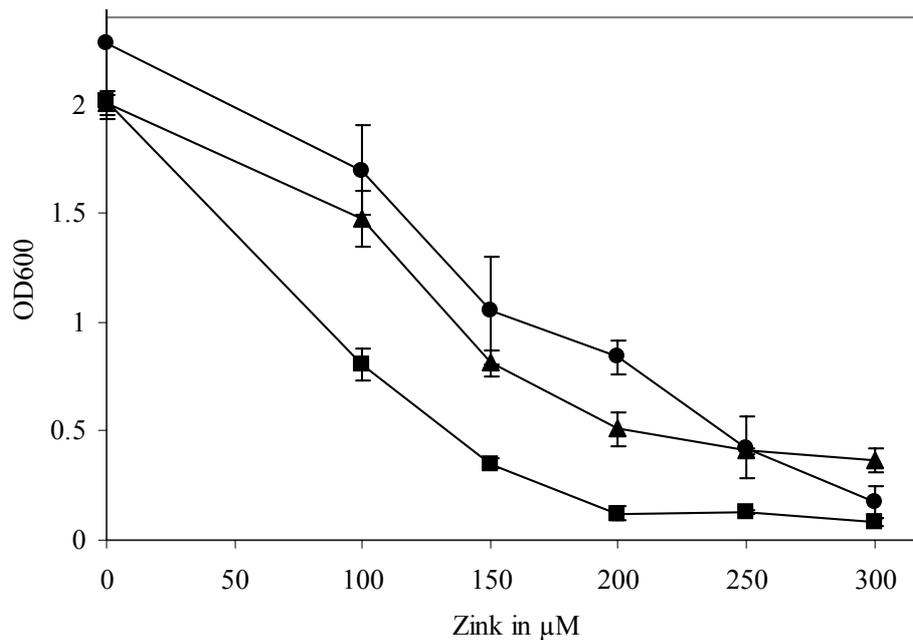
<sup>1</sup> Es war ein deutlich schlechteres Wachstum zu erkennen, aber es kam zu keinem eindeutigen Verlust der Resistenz bei den gewählten Konzentrationen.

<sup>2</sup> Einzelkolonien bei höheren Konzentrationen wurden nicht mehr als Wachstum gewertet. Alle Stämme wurden nach einer 48 h Vorkultur 1:200 in frischem Tris-Minimal-Medium verdünnt und sofort auf die frisch präparierten Tris-Minimal-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 48 h bei 30 inkubiert. Alle Versuche wurden zweimal mit demselben Ergebnis wiederholt.

Im Fall von Kadmium könnte vermutlich eine Doppelmutante die sich überschneidenden Effekte der beiden P-Typ-ATPasen aufheben. Auffällig war auch das Verhalten der Stämme DN430(pMOL30-38,  $\Delta czcA$ ,  $\Delta zntA649$ ) und DN431(pMOL30-38,  $\Delta czcA$ ,  $\Delta cadA691$ ), die noch sensitiver auf die Zugabe von Zink reagierten als DN424( $\Delta zntA649$ ), was für ein unreguliertes Metall-Aufnahmesystem auf pMOL30 spricht.

Neben Versuchen auf festen Nährmedien wurden auch Wachstumsversuche in flüssigem Medium durchgeführt (Abb. 37).

Auch hier konnte der negative Einfluss der Deletion der P-Typ-ATPase *ZntA649* unter Zinkstress beobachtet werden, während der Einfluss von *CadA691* eher als gering einzustufen war. Eine Doppelmutante würde Aufschluss über die Möglichkeit sich überlappender Substratspezifitäten bringen.



**Abb. 37: Wachstumsverhalten der *R. metallidurans*-Stämme DN424, DN425 und AE104 in flüssigem Tris-Minimal-Medium unter dem Einfluss von Zink**

Nach einer 48 h Vorkultur wurden die Stämme DN424( $\Delta zntA649$ ) (■), DN425( $\Delta cadA691$ ) (▲) und AE104 (●) 1:50 in frischem Tris-Minimal-Medium mit den jeweiligen Zink-Konzentrationen (0-300  $\mu\text{M}$ ) verdünnt und weitere 48 h bei ca. 25°C schüttelnd inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

### **3.9.1. *R. metallidurans* verfügt über Glutathion als intrazellulären Chelator**

Als mögliches Substrat von P-Typ-ATPasen wurden thiolhaltige Zink-Komplexe, möglicherweise in Verbindung mit Glutathion, postuliert (Sharma *et al.*, 2000). Deshalb wurde auch der Gehalt an Glutathion als intrazellulärer Chelator in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen untersucht.

In einem gekoppelten Enzymtest wurde der Glutathiongehalt der Stämme AE128, AE126 und AE104 bestimmt.

**Tab. 10: Glutathiongehalt verschiedener *R. metallidurans*-Stämme**

Stamm	Induktion <sup>1</sup>	$\mu\text{g}$ Glutathion/ $\mu\text{g}$ Gesamtprotein unind.	$\mu\text{g}$ Glutathion/ $\mu\text{g}$ Gesamtprotein ind.
AE128	1 mM $\text{Zn}^{2+}$	9.6 $\pm$ 0.2	18.4 $\pm$ 0.3
AE126	1 mM $\text{Ni}^{2+}$	5.1 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.4
AE104	150 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	6.8 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.7

<sup>1</sup>Die Induktion erfolgte direkt nach der 1:100 Verdünnung der Vorkultur in frischem Tris-Minimal-Medium und wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 200 Klett fortgesetzt.

## **IV. Diskussion**

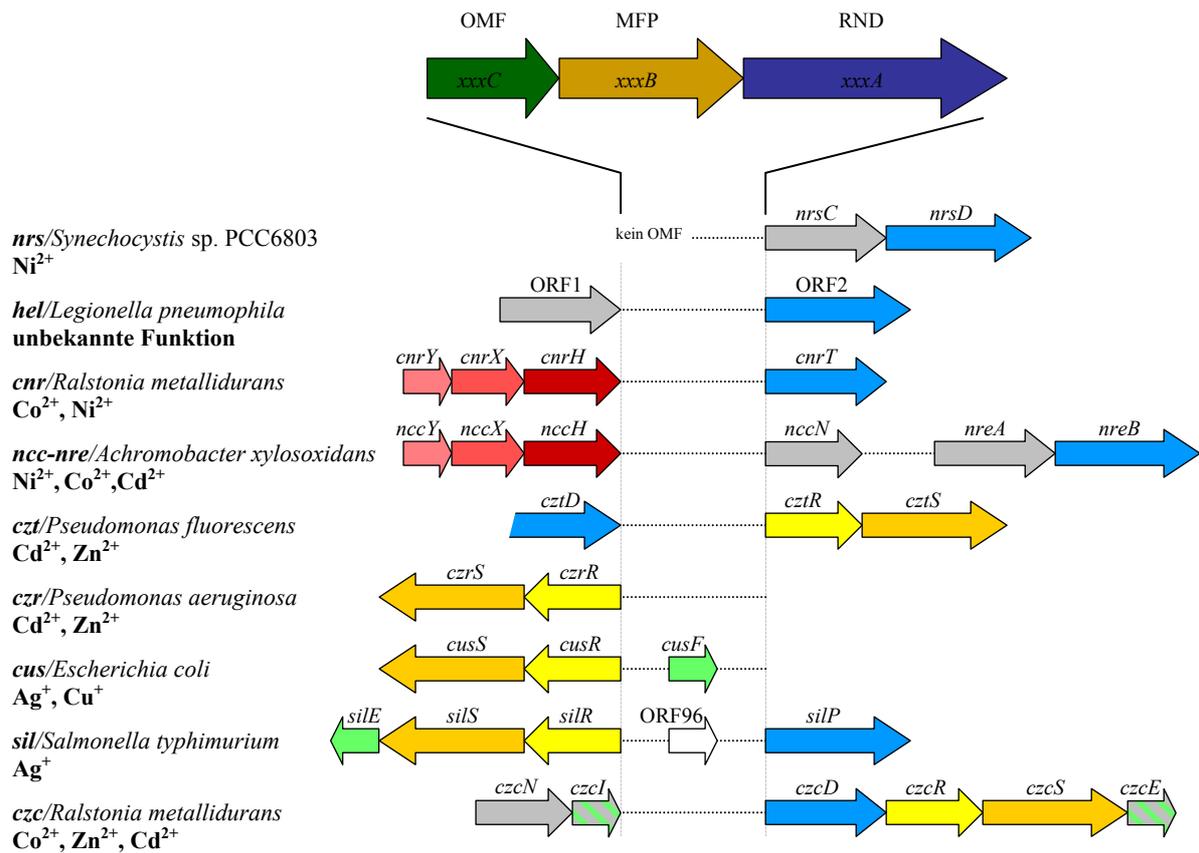
Für die Aufnahme von Substraten und den Efflux toxischer Substanzen verfügen Bakterien über eine Vielzahl von Transportsystemen (Saier *et al.*, 1994). Die Regulation zur Aufrechterhaltung der Homöostase dieser Substrate ist eine der primären Aufgaben einer Zelle. Für den Stoffwechsel essentielle Substanzen wie  $Mg^{2+}$  und Phosphat werden über konstitutiv exprimierte Transportsysteme aufgenommen, um eine ständige Versorgung der Zelle zu garantieren (Moncrief & Maguire, 1999; Beard *et al.*, 2000). Da die bakterielle Zelle nicht in der Lage ist, z. B. den Zufluss von Schwermetallionen über diese konstitutiven Systeme zu kontrollieren, kann das Auftauchen großer Mengen dieser Metallionen in der Umwelt schnell zu toxischen Zuständen innerhalb der Zelle führen (Nies, 1999). Zur Aufrechterhaltung der Schwermetallhomöostase haben Zellen verschiedene Mechanismen der Komplexierung oder des Effluxes entwickelt (Nies, 1999).

Die *czc*-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* kodiert für den membrangebundenen Effluxkomplex CzcCBA, der Resistenz gegenüber  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  vermittelt. Im *czc*-Operon sind sechs Gene zu finden, die an der Regulation dieser Schwermetallresistenz beteiligt sind. Da die Schwermetallionen  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  nicht direkt die Transkription initiieren, wie es z. B. für  $Hg^+$  und die Quecksilberresistenz *mer* beschrieben wurde (O'Halloren & Walsh, 1987), erfolgt die Signaltransduktion über ein regulatorisches Netzwerk. Dieses Netzwerk muss die Information eines erhöhten Schwermetallvorkommens über die Zytoplasmamembran ins Innere der Zelle leiten und so die Transkription des Effluxkomplexes induzieren.

### **4.1. Membrangebundene Efflux-Komplexe und ihre regulatorischen Netzwerke**

Die drei größten Klassen von Transportproteinen, die in der Natur gefunden werden, sind primäre und sekundäre Transporter sowie Proteinkanäle (Saier, 1998; Saier, 2000). Primäre Transportsysteme sind an den Verbrauch einer Energiequelle gebunden und bauen dadurch Gradienten auf. Sie nutzen z. B. die hydrolytische Spaltung von ATP oder den Fluss von Elektronen, um den Transport durchzuführen (West, 1997; Saier, 2000). Während Kanalproteine die passive Diffusion ihrer Substrate durch wassergefüllte Poren ermöglichen, nutzen sekundäre Transporter elektrochemische Gradienten wie Protonen- oder Natrium-Gradienten, um ihre Substrate zu transportieren. Dabei sind sie für Akkumulation oder Efflux ihrer Substrate verantwortlich (Chung *et al.*, 2001).

Eine gut charakterisierte Proteinfamilie, die zu der Gruppe der sekundären Transporter gehört, ist die *Resistance/Nodulation and Cell Division* (RND)-Proteinsuperfamilie (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle spielen RND-Proteine in Multikomponenten-Efflux-Systemen (Paulsen *et al.*, 1996), die verschiedenste Substrate wie Lösungsmittel (Ramos *et al.*, 1998), Farbstoffe, Detergenzien, hydrophile Antibiotika (Ma *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995; Zgurskaya & Nikaido, 2000) und Kationen (Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989b; Hassan *et al.*, 1999; Franke *et*



**Abb. 38: Physische Karte von Schwermetallresistenzen, die auf RND-MFP-OMF-Proteinkomplexen basieren**  
 Der membrangebundene Effluxkomplex wird durch die Gene der Strukturgenregionen, die bei allen Resistenzen hohe Homologien aufweisen, kodiert. Einzige Ausnahme bildet hierbei das *nrs*-System aus *Synechocystis* sp. PCC6803, in dem kein Gen für einen OMF zu finden ist. Zusätzlich zu den drei Strukturgenen findet man im *sil*-Operon aus *Salmonella typhimurium* und der *cus*-Determinante aus *E. coli* zwischen den Genen für den OMF und das MFP ein zusätzliches Gen für ein periplasmatisches Bindepotein. Die dargestellten Gene werden in Richtung der jeweiligen Pfeile transkribiert. Gene in roter Farbe stellen Sigma- und Antisigmafaktoren bzw. deren Regulatoren dar. Zweikomponentensysteme werden durch gelbe Pfeile, Gene für putative Transportsysteme in blauer Farbe dargestellt. Hellgrün gezeichnete ORFs stellen Gene für periplasmatische, putative Metallbindeproteine dar. Gene, die mit grauer Farbe markiert wurden, sind bisher ohne funktionelle Einordnung ihrer Aufgabe bei der Ausbildung einer Resistenz beschrieben.

*al.*, 2001) aus dem Zytoplasma über den periplasmatischen Raum in das umgebende Medium abgeben (Saier *et al.*, 1994; Nikaido, 1996).

Während diese Efflux-Komplexe in allen Systemen grundsätzlich sehr ähnlich sind, unterscheiden sich die regulatorischen Netzwerke dieser Determinanten in wesentlichen Aspekten. Die Regulation von Antibiotikaresistenzen ist aufgrund der Toxizität ihrer Substrate relativ einfach strukturiert. Die Kontrollsysteme zur Expression von RND-basierenden Schwermetallresistenzen sind hingegen sehr viel komplexer (Abb. 38).

Das AcrAB-TolC-System aus *E. coli*, das Resistenz gegen multiple Antibiotika vermittelt (Ma *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995; Zgurskaya & Nikaido, 1999), wird nicht reguliert und konstitutiv exprimiert. Andere Antibiotika-Resistenzsysteme wie das MexAB-OprM (Poole *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 2000), MexCD-OprM-System (Li *et al.*, 1998) aus *Pseudomonas aeruginosa* und

das MtrCDE-System aus *Neisseria gonorrhoeae* (Hagman *et al.*, 1995; Hagman *et al.*, 1997) werden durch einen Repressor MexR (Saito *et al.*, 1999; Srikumar *et al.*, 2000) bzw. MtrR (Hagman *et al.*, 1995) reguliert.

Abgesehen von Schwermetallresistenzen, für die bisher keine Regulatoren ermittelt werden konnten, sind verschiedene Systeme beschrieben, die über mehr oder weniger komplexe Regulationsnetzwerke verfügen. Keine Regulatoren konnten bisher für das *hel*-System aus *Legionella pneumophila* (McClain *et al.*, 1996) und das *nrs*-System aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Garcia-Dominguez *et al.*, 2000) beschrieben werden. Andererseits werden aber auch Beispiele von Zweikomponenten-Systemen, wie das IrlRS-System aus *Burkholderia pseudomallei*, diskutiert, für die bisher zwar die Involvierung in die Schwermetallresistenz klar gezeigt werden konnte, aber keine Gene von eventuellen Effluxkomplexen identifiziert wurden (Jones *et al.*, 1997).

Es sind keine prinzipiellen Strukturen für regulatorische Netzwerke in diesen Determinanten zu erkennen. Tendenziell lässt sich jedoch eine wichtige Rolle von Sigmafaktor-Antisigmafaktor-Komplexen (Schmidt & Schlegel, 1994; Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000) und Zweikomponentensystemen (van der Lelie *et al.*, 1997; Große *et al.*, 1999; Munson *et al.*, 2000) erkennen. (Abb. 38). Das *cnr*-Resistenzsystem aus *R. metallidurans* (Collard *et al.*, 1993; Liesegang *et al.*, 1993; Grass *et al.*, 2000) und das *ncc*-Resistenzsystem aus *Achromobacter xylosoxidans* (Schmidt & Schlegel, 1994; Grass *et al.*, 2000), die Resistenzen gegen Kobalt und Nickel bzw. Nickel, Kobalt und Cadmium vermitteln, verfügen über den beschriebenen Sigmafaktor-Antisigmafaktorkomplex. Dabei wird die Expression der jeweiligen Strukturgene durch Freisetzung eines gebundenen ECF-Sigmafaktors (CnrH bzw. NccH) (Liesegang *et al.*, 1993; Lonetto *et al.*, 1994) initiiert. Die meisten dieser bekannten ECF-Sigmafaktoren werden durch einen membrangebundenen Antisigmafaktor inaktiviert (Hughes & Mathee, 1998). In Stresssituationen kommt es zur Freisetzung des Sigmafaktors. Dies führt letztendlich zum Start der Transkription (De Las Penas *et al.*, 1997; Paget *et al.*, 1999; Enz *et al.*, 2000).

Während diese Form der Regulation bei Schwermetallresistenzen selten zu finden ist, werden andere Stresssituationen in Bakterien häufig durch diese Sigmafaktor-Antisigmafaktor-Komplexe reguliert. So führt die Anwesenheit von Antibiotika in Patienten, die mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert sind und an cystischer Fibrose leiden, zu einer erhöhten Alginateproduktion des Bakteriums (Deretic *et al.*, 1994). Die Herstellung dieses Polymers wird durch die Regulation des Sigmafaktors AlgT(AlgU) durch den Antisigmafaktor MucA kontrolliert (Goldberg *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993; Schurr *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). In *Myxococcus xanthus* wird Lichtstress, der zu reaktiven Sauerstoffspezies führt, durch die Synthese von Carotinoiden entgegengewirkt. Diese Synthese beruht ebenfalls auf der Expression eines Systems, das durch den ECF-Sigmafaktor CarQ und den Antisigmafaktor CarR reguliert wird (McGowan *et al.*, 1993; Gorham *et al.*, 1996; Martinez-Argudo *et al.*, 1998). Auch Hitzestress wird in *E. coli* durch den ECF-Sigmafaktor RpoE in einem Proteinkomplex mit den Antisigmafaktor RpoA, kontrolliert (Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995; Missiakas *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zum *cnr*- bzw. *ncc*-System werden das *sil*-System aus *Salmonella typhimurium* (Gupta *et al.*, 1999), das *czr*-System aus *Pseudomonas aeruginosa* (Hassan *et al.*, 1999), das *czt*-System aus *Pseudomonas fluorescens* (Rossbach *et al.*, 2000) und das *cus*-System aus *E. coli* (Munson *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2001) „nur“ durch Zweikomponentenregulationssysteme reguliert. Die Signaltransduktion erfolgt hierbei durch die Phosphorylierung des *Response-Regulators* durch die Histidinkinase (Stock *et al.*, 1990). Alle Zweikomponentenregulationssysteme (Hoch & Silhavy, 1995) in Schwermetallresistenzen weisen hohe Homologien zu den Proteinen der Zweikomponentenregulationssysteme der plasmidkodierten Kupferresistenzen *pcoABCDRS* aus *E. coli* (Mills *et al.*, 1994) und *copABCDRS* aus *Pseudomonas syringae* (Brown *et al.*, 1992) auf (Nies & Brown, 1998; Hassan *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 1999).

Das *czc*-System aus *R. metallidurans* ist hingegen sehr viel komplexer aufgebaut. Während vor ein paar Jahren nur zwei putative ORFs *czcR<sub>alt</sub>* und *czcD* als Regulatoren beschrieben wurden (Nies, 1992a; Nies, 1992b), ist die Zahl der Regulatoren inzwischen drastisch angestiegen. Das postulierte Regulatorprotein *CzcR<sub>alt</sub>* konnte inzwischen als falsch identifiziert werden (Große *et al.*, 1999). Neben einem klassischen Zweikomponentenregulationssystem *CzcRS* (Diels *et al.*, 1995; van der Lelie *et al.*, 1997; Große *et al.*, 1999) befinden sich mindestens vier weitere Gene in diesem Operon, die die Expression der *czcCBA*-Strukturgene beeinflussen (Abb. 1). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, findet man ein Gen (*czcD*) für einen weiteren Transporter stromabwärts der Strukturgene. Noch komplexer wird das Bild durch die Anwesenheit von Genen weiterer Regulatoren wie *czcN*, *czcI* (Diels *et al.*, 1995) und *czcE*. Den putativen Proteinen konnten bisher keine essentiellen Funktionen in der Regulation nachgewiesen werden. Aufgrund von Homologien zu anderen beschriebenen Proteinen (*CzcN*→*NccN*; Diels *et al.*, 1995; *CzcE*→*CopH*, Mergeay, 2000), die für die vollständige Ausprägung von Resistenzen notwendig sind, ist eine Beteiligung an der Regulation wahrscheinlich.

## **4.2. Die Regulation der *czc*-Determinante**

### **4.2.1. *czcN*, *czcI* und *czcE* – Gene mit unbekanntem Funktionen!**

Zu Beginn dieser Arbeit sollte durch T7-Expression gezeigt werden, dass die ORFs der regulatorischen Gene für exprimierbare Proteine kodieren und welche Größe diese Proteine haben. In früheren Arbeiten waren bereits die Komponenten des *CzcCBA*-Effluxkomplexes durch die T7-Expression nachgewiesen worden (Nies *et al.*, 1989b, Rensing *et al.*, 1997a). Auch in anderen Resistenzsystemen wurde diese Methode zum Nachweis putativer Genprodukte eingesetzt. So wiesen Nies *et al.* (1989a) die drei Proteine der Chromatresistenz und Liesegang *et al.* (1993) *CnrXYHBA* aus *A. xylosoxidans* nach. Die Proteine des *ncc*-Systems wurden ebenfalls durch die T7-Expression erstmalig gezeigt. Allerdings gelang es Schmidt und Schlegel (1994) nicht, die zwei Regulatoren *NccYH* nachzuweisen. Die Proteine des *znu*-Systems aus *E. coli* wurden ebenfalls durch diese Methode gezeigt (Patzner & Hantke, 1998). Patzner und Hantke (2000) gelang es auch, den Hauptregulator dieser Determinante, das *Zur*-Protein, mittels T7-Expression sichtbar zu machen.

Durch T7-Expression konnte gezeigt werden, dass ORF131 für ein ca. 14 kDa und *czcI* für ein ca. 9 kDa großes Protein kodieren. Das bisher als ORF131 bezeichnete Gen wurde in *czcE* umbenannt. Auch wenn Große *et al.* (1999) die Transkription der *czc*-Determinante nur bis zu *czcS* beschrieben, so zeigen doch neue Experimente, dass möglicherweise doch ein Transkript über *czcS* hinaus in *czcE* existiert (Große, pers. Mitteilung). Die Möglichkeit der Kotranskription von *czcDRS* und *czcE* würde für eine Involvierung des CzcE-Proteins in die *czc*-vermittelte Resistenz sprechen, zumal inzwischen auch die zinkabhängige Induktion auf mRNA-Niveau gezeigt werden konnte (Große, pers. Mitteilung). Mit einer Molekularen Masse von ca. 14 kDa entspricht die markierte Bande im Rohextrakt der erwarteten Proteingröße von ca. 13.8 kDa. Während CzcE gut durch die T7-Expression gezeigt werden konnte, ist der Nachweis von CzcI kritisch zu betrachten. Eine Überexpression von *czcI* in *E. coli* mit verschiedenen Expressionssystemen (*Strep-TagII*<sup>®</sup>, *Impact-T7*<sup>®</sup>) und auch der Versuch der homologen Reinigung aus *R. metallidurans* AE104 sind bisher fehlgeschlagen (Lucke, 2000), daher kann nicht gesagt werden, ob *czcI* wirklich für ein Protein in *R. metallidurans* kodiert.

Für beide putativen Regulatoren wird jedoch eine periplasmatische Lokalisation postuliert. Auffällig war auch die Prozessierung des Proteins CzcE (Abb. 33a). Computergestützte Analysen postulieren für CzcE ein Signalpeptid bis zum Ala<sub>23</sub> und für CzcI bis zum Ala<sub>20</sub>. Dabei handelt es sich um LspA-abhängige Spaltstellen, die die Konsensussequenz SXA aufweisen (CzcE→SYA<sub>23</sub>; CzcI→SWA<sub>20</sub>), (Pugsley, 1993).

Um subzelluläre Lokalisationen von Proteinen zu untersuchen, hat sich die Verwendung von Reporterfusionen bewährt (Rensing *et al.*, 1997a; Anton *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 1999). Bei der Wahl der verwendeten Fusionsproteine sollte man jedoch Folgendes beachten: das verwendete Reporterprotein sollte nur in einem Kompartiment der Zelle enzymatisch aktiv sein, das Exportsignal ins Periplasma sollte nur vom zu untersuchenden Protein abhängen und die Funktion des untersuchten Protein sollte nicht durch das Reporterprotein beeinflusst werden (Ehrmann *et al.*, 1990). Am besten geeignet hierfür sind die Alkalische Phosphatase (PhoA) und  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ). Beide zeigen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle (Zyto- und Periplasma) wechselseitige Enzymaktivitäten. Die Alkalische Phosphatase wird ins Periplasma exportiert und bildet dort ein natives Homodimer. In jeder Untereinheit entstehen je zwei Disulfidbrücken, die sich nur im Periplasma ausbilden können (Derman *et al.*, 1993). Befindet sich die Alkalische Phosphatase im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas, kann das Protein diese, für die Aktivität essentiellen, Struktur motive nicht ausbilden und ist daher enzymatisch inaktiv (Pugsley, 1993; Derman & Beckwith, 1995). Im Gegensatz dazu zeichnet sich die  $\beta$ -Galaktosidase durch hohe enzymatische Aktivität im Zytoplasma aus (van Geest & Lolkema, 2000). Sie bildet dort ein Homotetramer und kann aufgrund von „Blocksequenzen“ nicht ins Periplasma exportiert werden (Lee *et al.*, 1989; Manoil, 1991; Ellis *et al.*, 1995).

Zum Einsatz kamen die Alkalische Phosphatase und die  $\beta$ -Galaktosidase, die mittels eines bereits vorhandenen Reporterplasmids (Pribyl, 2001) mit CzcE und CzcI fusioniert wurden. Als Positivkontrolle für die Messungen mit PhoA diente eine Fusion der  $\beta$ -Laktamase, einem periplasmatischen Protein. Die Positivkontrolle zeigte aufgrund des Exports des Fusionsproteins

ins Periplasma hohe enzymatische Aktivität. Wurde CzcI mit der alkalischen Phosphatase fusioniert, führte dies zu einer Aktivität von ca. 60 % des Wertes der Positivkontrolle. Im Fall von CzcE wurde sogar eine Steigerung auf 240 % ermittelt. Die  $\beta$ -Laktamase, die ohne Signalpeptid als Kontrolle für eine zytoplasmatische Lokalisation verwendet wurde, war hingegen praktisch inaktiv.

Der Versuch, eine reziproke Enzymaktivität mit CzcE- $\beta$ -LacZ zu erhalten, schlug an der Transformation von *E. coli* CC118(pGP1-2) mit pECD718(*czcE*- $\beta$ -lacZ) fehl. Die hohe Aktivität des CzcE- $\beta$ -PhoA-Fusionsproteins legt eine periplasmatische Lokalisation nahe. Die gleichzeitige Toxizität des CzcE- $\beta$ -LacZ-Proteins könnte auf der bereits beschriebenen „Verstopfung“ der Translokationsmaschinerie durch zu exportierende  $\beta$ -LacZ-Fusionen beruhen (Manoil, 1991; Ellis *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu CzcE konnte jedoch eine *czcI*- $\beta$ -lacZ-Fusion exprimiert werden. Diese zeigte nur 2,3 % der Aktivität der Positivkontrolle, einer Fusion des LacZ-Reporters mit der  $\beta$ -Laktamase ohne Signalpeptid. Die geringe Enzymaktivität von CzcI- $\beta$ -LacZ und die hohe CzcI- $\beta$ -PhoA-Aktivität bestätigten ebenfalls die Sekretion von CzcI ins Periplasma in *E. coli*.

Beide Proteine ließen sich als stabile Fusionen im Western-Blot nachweisen, auch wenn ein Teil der PhoA-Proteine nach dem Export prozessiert wurde (Abb. 32). Es wurde ebenfalls versucht, die PhoA-Fusionsproteine direkt im periplasmatischen Extrakt zu zeigen. Dies gelang jedoch nur in begrenztem Maße, da sich auch noch große Teile der Proteine in der Membranfraktion befanden.

Die Spaltung aktiver Fusionen ist auch für andere Proteine beschrieben worden. Bei der Topologieuntersuchung von NixA aus *Helicobacter pylori* wurden Western-Blots mit LacZ-Fusionen gezeigt. Dabei war deutlich das Erscheinen einer permanenten Bande von ca. 100 kDa zu beobachten, welche für die abgespaltene  $\beta$ -Galaktosidase kennzeichnend sein könnte (Fulkerson & Mobley, 2000). Eine gewisse Instabilität von LacZ-Fusionen wurde auch von Froshauer *et al.* (1988) bei der Untersuchung der Struktur von MalF beschrieben. Andererseits zeigten Guan *et al.* (1999) bei der Untersuchung der Struktur von MexB aus *P. aeruginosa* nur stabile PhoA-Fusionen. Aufgrund des gezeigten Western-Blots kann jedoch eine Korrelation zwischen der Expressionsrate und der Spaltung der Fusionsproteine postuliert werden (Guan *et al.*, 1999). Die periplasmatische Lokalisation von Regulatorproteinen konnte auch für CnrX sowie den C-Terminalen Teil von CnrY durch Reporterfusionen mit Alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Grass *et al.* (2000) werten eine enzymatische Aktivität im Bereich der Positivkontrolle als Beweis einer periplasmatischen Lokalisation der Proteine bzw. Proteinteile. Für die beiden Regulatoren, CzcE und CzcI, konnte also aufgrund der gemessenen PhoA-Enzymaktivitäten eindeutig eine Lokalisation im Periplasma nachgewiesen werden. Die gemessenen LacZ-Daten und der Nachweis teilweise prozessierter, aber stabiler PhoA-Fusionen bestätigen die postulierte periplasmatische Lokalisation der beiden Regulatoren.

Zur weiteren Charakterisierung waren von beiden Genen, *czcI* und *czcE*, Mutanten konstruiert worden. Mit Deletionsmutante von *czcE* konnte kein reproduzierbarer Phänotyp generiert werden. Nachdem die vollständige Sequenzierung von *Ralstonia metallidurans* abgeschlossen war, zeigte sich, dass es noch zwei weitere homologe *czcE*-Gene gab (*contig709*→50 % Identität auf AS-Basis bei 42 von 84 überlappenden Aminosäure-Resten; *contig711*→41 % Identität auf AS-Basis

bei 41 von 100 überlappenden Aminosäure-Resten; CzcE 131 AS). Inwieweit sich daraus komplementierende Aktivitäten ableiten lassen, kann ohne weiterführende Experimente, in denen diese homologen Gene ausgeschaltet werden, nicht geklärt werden. Inzwischen konnte CzcE durch heterologe Expression bis zur Homogenität gereinigt werden (Hoffmann, 2001). Obwohl die Bindung des Proteins an Schwermetalle *in vitro* nachgewiesen werden konnte, ist die Rolle von CzcE in der Regulation auch weiterhin unklar (Hoffmann, 2001).

Demgegenüber zeigte Nies (1992b), dass die Region, die für *czcI* kodiert, essentiell für die Expression der gesamten Strukturgenregion ist. Über die Rolle von CzcI war bisher allerdings nur spekuliert worden. So schlugen van der Lelie *et al.* (1997) die Interaktion von CzcI mit CzcD als neues Regulationssystem vor. Die verschiedenen putativen Metallbindestellen in CzcI, wie H<sub>36</sub>LGHHERH oder C<sub>63</sub>GVCH, wiesen möglicherweise auf eine Bindung von Schwermetallen im Periplasma hin (van der Lelie *et al.*, 1997). Experimentelle Beweise für eine Metallbindung oder die Interaktion mit CzcD fehlen jedoch noch.

Eine *czcI*-Knock-out-Mutante wurde von Lucke (2000) konstruiert. Dabei wurde im Gegensatz zur Deletion von *czcE* nicht das gesamte Gen ausgeschaltet. Im Fall von *czcI* wurden Mutationen eingeführt, die das Startkodon ATG in ein TAG umwandelten. Dieser Austausch führte zu einem deutlichen Verlust der Schwermetallresistenz gegenüber Zn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup>. Der Effekt gegenüber Cd<sup>2+</sup> war eindeutig schwächer ausgeprägt. Drei unabhängige Mutationsstämme wurden konstruiert und mittels PCR und Southern-Hybridisierung verifiziert. Alle zeigten denselben Phänotyp. Der beobachtete Effekt ließ sich zumindest teilweise durch die Expression von *czcI in trans* auf pVDZ'2 aufheben (Lucke, 2000). Dies würde für CzcI als den Hauptregulator der *czc*-Determinante sprechen.

In dem Bereich, in dem *czcI* kodiert wird, wurden jedoch drei der vier beschriebenen Promotoren der *czc*-Determinante nachgewiesen (Große *et al.*, 1999). Eine sekundäre Mutation in einem der Promotoren *czcNp*, *czcIp* oder *czcCp*, hervorgerufen durch die PCR bei der Konstruktion oder bei der homologen Rekombination in pMOL30, könnte ebenfalls zum beobachteten Phänotyp führen. Nies (2000) postuliert andererseits die mögliche Involvierung von CzcI in einen membrangebundenen Antisigmafaktorkomplex mit CzcN als Antisigmafaktor und einem putativen ECF-Sigmafaktor RpoX, wie es z. B. für *cnr* aus *R. metallidurans* bereits beschrieben wurde (Grass *et al.*, 2000). Dort führte die Deletion des periplasmatischen Regulators CnrX zu einer hochkonstitutiven Expression der *cnr*-Strukturgene, da vermutlich Sigmafaktor CnrH und Antisigmafaktor CnrY nicht aneinander binden konnten. Ähnliche Effekte wurden auch bei der Deletion des Negativregulators RseB für die Hitzeschockantwort in *E. coli* beschrieben. RpoE, der ECF-Sigmafaktor, wird von RseA, dem Antisigmafaktor, gebunden. Dies unterliegt unter anderem der Regulation durch das periplasmatische RseB. Wird nun RseB deletiert, erhöht sich die Aktivität von RpoE (Missiakis *et al.*, 1997; De Las Penas *et al.*, 1997).

Im postulierten CzcN-CzcI-Komplex wäre die Rolle von CzcI aufgrund des beobachteten Phänotyps und im Gegensatz zu den beschriebenen Systemen sicherlich die eines Aktivators, der zur Auflösung des CzcN-RpoX-Komplexes notwendig wäre. Das Fehlen von CzcI würde zu einer Ausdünnung des putativen Sigmafaktors führen und die Expression der *czcCBA*-Strukturgene

verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit ist auch eine  $czcN_{ATG \rightarrow TAG}$ -Mutante konstruiert worden (Ergebnis nicht gezeigt). Erste Versuche zeigen keinen Einfluss der Mutation auf die  $czc$ -vermittelte Resistenz. Allerdings zeigte sich nach dem Ausschalten von  $czcN$  eine bessere Induzierbarkeit der Determinante. Da jedoch alle gewonnenen Daten in weiterführenden Experimenten verifiziert werden müssen, kann z. Z. nichts über eine signifikante Beteiligung von CzcN und CzcI an der Regulation ausgesagt werden. Anschließende Untersuchungen, die die Rolle der einzelnen postulierten Promotoren in den einzelnen Deletionsmutanten näher erläutern würden, wären hier sicherlich sehr sinnvoll (Große *et al.*, 2001).

#### **4.2.2. Was wird vom Zweikomponentensystem CzcR und CzcS reguliert?**

Wie viele andere Schwermetallresistenzen verfügt auch das  $czc$ -System aus *R. metallidurans* über ein klassisches Zweikomponentenregulationssystem CzcRS (van der Lelie *et al.*, 1997; Große *et al.*, 1999; West & Stock, 2001). Zweikomponentensysteme werden oft als die Hauptregulatoren von Schwermetallresistenzen beschrieben (Rossbach *et al.*, 2000; Munson *et al.*, 2000). Deshalb war bereits in früheren Arbeiten die funktionelle Analyse der beiden Regulatoren vorgenommen worden (Große *et al.*, 1999).

Die  $czc$ -vermittelte Antwort auf Schwermetallstress erfolgt durch sechs verschiedene Transkripte:  $czcNI$ ,  $czcI$ ,  $czcNICBA$ ,  $czcICBA$ ,  $czcCBA$  und  $czcDRS$  (Große *et al.*, 1999). Sollte CzcR einer der Hauptaktivatoren dieser metallinduzierten Transkription sein, müsste eine direkte Bindung an die Promotorstrukturen zu zeigen sein. Dies gelang aufgrund von Gelshiftexperimenten, in denen eine spezifische Bindung von CzcR an den Promotor von  $czcN$  gezeigt werden konnte (Große *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde eine zweite Bindestelle innerhalb von  $czcA$  identifiziert, der allerdings keine Funktion zugeordnet werden konnte. Der Startpunkt von  $czcD$  als nächstliegende Operatorstruktur für die Bindung von CzcR liegt mindestens 1000 bp stromabwärts der beobachteten Bindestelle und kommt daher als CzcR-abhängiger Operator nicht in Frage. Eine Bindung innerhalb der  $czcRS$ -Region oder am erwarteten  $czcCp$  konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (Große *et al.*, 1999). Letztendlich fehlte jedoch der direkte Beweis, dass CzcR und CzcS die Induktion der Expression von  $czcCBA$  beeinflussen.

Wie alle anderen Regulatoren sollten CzcR und CzcS ebenfalls mittels T7-Expression nachgewiesen werden. Dies gelang bei beiden ORFs. Im Fall von  $czcS$  musste jedoch erst eine künstliche Ribosomenbindestelle (AGG AGG<sub>RBS</sub>T GAC GGA ATG<sub>czcS</sub>) eingefügt werden, bevor ein markiertes Protein von 52 kDa zu erhalten war.

Um direkte Protein-Protein-Interaktionen zu zeigen, wurde die Methode der chemischen Quervernetzung mit Formaldehyd eingesetzt. Formaldehyd ist ein unspezifischer Vernetzer, der in ganzen Zellen angewandt werden kann und dessen Länge nicht vorher definiert werden muss (Skare *et al.*, 1993). Einige Untersuchungen dazu wurden auch an TonB aus *E. coli* mittels Formaldehyd durchgeführt. So zeigten Skare *et al.* (1993), dass TonB den periplasmatischen Raum überspannt. Durch Formaldehydbehandlung konnte die physische Interaktion mit dem Siderophorrezeptor für Enterochelin, FepA, nachgewiesen werden. In Homologie wurde auch die

Interaktion von TonB und FhuA über diese Methode gezeigt (Moeck *et al.*, 1997). Eine direkte Interaktion zwischen CzcR und CzcS konnte jedoch durch die Inkubation mit Formaldehyd nicht bewiesen werden. Allerdings wurde inzwischen von Egler (2000) eine CzcS-abhängige Phosphorylierung von CzcR im Rohextrakt von *R. metallidurans* im Vergleich zum  $\Delta czcS$ -Stamm gezeigt. Mit den gereinigten Komponenten des Regulationssystems CzcRS konnte die Phosphorylierung bisher aber noch nicht experimentell bestätigt werden (Egler, 2000). Möglicherweise ist eine weitere Komponente des Regulationsnetzwerkes für die Signaltransduktion notwendig.

Neben den Versuchen zum Nachweis des Zweikomponentensystems wurde auch der Effekt von *in frame* Gen-Deletionen von *czcR* und *czcS* auf die Expression der Strukturgene *czcCBA* untersucht. Erstmals wiesen Diels *et al.* (1995) durch die Insertion einer *lux*-Fusion in die DRR das Vorhandensein weiterer zinkinduzierter Gene nach. Die Autoren zeigten die Induktion des *lux*-Genes durch  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Pb^{2+}$  (van der Lelie *et al.*, 1997). Dass  $Pb^{2+}$  die *czcCBA*-Expression genauso wenig induziert wie oxidativer Stress, Hitze oder Lösungsmittelstress, konnte mittels der Transkriptionsfusion  $\Phi(czcC-lacZ-czcBA)$  gezeigt werden (Abb. 6). Ob es sich bei der Induktion der Gene der DRR mit  $Pb^{2+}$  um eine spezifische Reaktion handelte, muss jedoch durch weitere Experimente gezeigt werden.

Doch wie beeinflussen Deletionen der Gene *czcR* oder *czcS* die Expression von *czcCBA*? *In frame*-Deletionen beider Komponenten wurden in *R. metallidurans* eingefügt. Ähnlich wie es schon für das *cnr*-System gezeigt werden konnte (Grass *et al.*, 2000), sollte die Induktion anhand einer Transkriptionsfusion mit einem Reportergen untersucht werden. Da es bei den ansonsten in den RNA-Experimenten verwendeten Metallkonzentrationen von z. B. 300  $\mu M$   $Zn^{2+}$  (Große *et al.*, 1999) zu keinem sichtbaren Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp kam, musste zuerst nach den geeigneten Induktorkonzentrationen gesucht werden. Es wurden die Konzentrationen 10  $\mu M$   $Zn^{2+}$ , 300  $\mu M$   $Co^{2+}$  und 100  $\mu M$   $Cd^{2+}$  verwendet, da es bei höheren Metallkonzentrationen auch im Wildtypstamm zu einer sofortigen Expression der *czcC-lacZ-czcBA*-Transkriptionsfusion kam. Mit beiden Deletionstämmen in *R. metallidurans* AE128 wurden RNA-Messungen durch semiquantitative RT-PCR in Bezug auf die *czcCBA*-RNA-Menge vor und nach Induktion mit 300  $\mu M$   $Zn^{2+}$  durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Stämme eine ähnliche Menge an *czcCBA*-mRNA im uninduzierten Stadium aufwiesen. Nach der Induktion mit 300  $\mu M$   $Zn^{2+}$  stieg die cDNA-Menge in den beiden Deletionstämmen auf ca. 1200-1400 ng/g RNA im Vergleich zum Wildtyp mit ca. 800 ng/g deutlich höher an (Große *et al.*, 1999). In Versuchen zur *lacZ*-Reportergenexpression konnten diese Unterschiede jedoch nicht bestätigt werden. Dies mag aber in der Tatsache begründet liegen, dass RNA-Menge und letztlich translatiertes bzw. funktionell gefaltetes Protein nicht immer zwingend miteinander korrelieren (Anderson & Anderson, 1995). Eine weitere Möglichkeit, diese Divergenz zu erklären, ist die ungenügende Sensitivität des verwendeten Reportersystems. Die unterschiedliche Expression in den RNA-Mengen ließen sich jedoch bei den erwähnten Induktorkonzentrationen auch im *LacZ*-Versuch tendenziell zeigen. Als am besten geeignet, Unterschiede in der Induktion zu untersuchen, erwies sich 100  $\mu M$   $Cd^{2+}$ . Während der Wildtyp bei der verwendeten Metallkonzentration keine

Expression der *czcC-lacZ-czcBA*-Fusion zeigte, war ein deutlicher Anstieg in beiden Deletionsmutanten nach 120 min auf ca. 220-230 % der Grundaktivität zu beobachten. Der Wildtyp zeigte hingegen keinen Anstieg der LacZ-Aktivität. Eine Deletion des Zweikomponentensystems führt demnach zur Dereprimierung bzw. zur besseren Induzierbarkeit der *czc*-Strukturgene.

Beide Deletionen von *czcR* und *czcS* in *R. metallidurans* zeigten in der Bestimmung ihrer MIC im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied. Das Zweikomponentensystem ist also nicht essentiell für die Expression von *czcCBA*. Alle konstruierten Mehrfachdeletionen mit den Komponenten des *czcRS*-Systems spiegelten nur den Effekt der Einzelmutationen wider. Ausnahmen waren hier nur  $\Delta czcDR$  und  $\Delta czcDRSE$ , die geringe Verminderung der MIC zeigten. Andererseits war  $\Delta czcDS$  nicht sensitiver als der Wildtyp, obwohl die Mutante auf dem leicht sensitiveren Stamm  $\Delta czcD$  basierte.

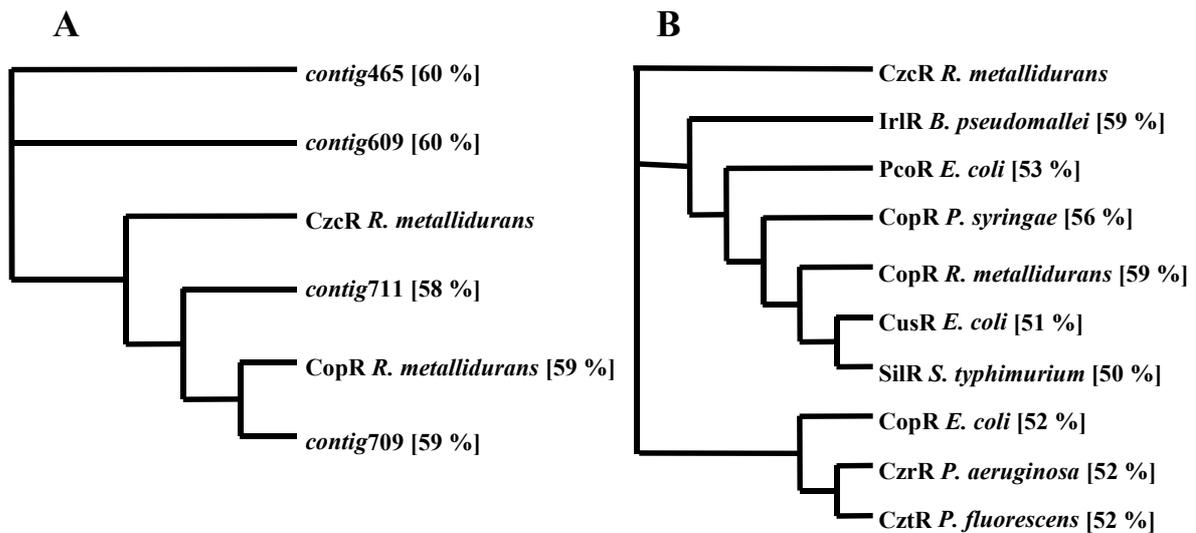
Doch warum ist der Einfluss von CzcRS so gering? In anderen Systemen bewirkte die Deletion der Zweikomponentensysteme sehr viel stärkere Effekte. Die Insertion eines Transposons Tn5-B20 in *cztR* aus *Pseudomonas fluoreszenz* führte zu einem 50 %igen Verlust der Kadmium- (von 1 mM auf 0.5 mM) bzw. Zinkresistenz (von 4 mM auf 2 mM) des Bakteriums (Rossbach *et al.*, 2000). Deutlichere Effekte ließen sich im *irl*-System aus *Burkholderi pseudomallei* (Jones *et al.*, 1997) durch das Ausschalten des Responseregulators beobachten. Auch hier wurde die Insertion eines Transposons (Tn5-OT182) als Methode gewählt, ein Gen auszuschalten. Die Kadmiumresistenz verminderte sich um Faktor 16 von 9.6 mM auf 0.6 mM, die Zinkresistenz verringerte sich hingegen nur um 50 % von 4.8 mM auf 2.4 mM. Eine Komplementation konnte in diesem Fall den Wildtyp nicht vollständig wiederherstellen (Jones *et al.*, 1997). Kupfersensitive *E. coli*-Stämme werden ebenfalls auf Mutationen bzw. Deletionen im Zweikomponentensystem CusRS zurückgeführt. Diese Sensitivität konnte durch die *in trans*-Komplementation mit den *cusRS*-Genen wieder aufgehoben werden (Munson *et al.*, 2000).

In anderen Kupferresistenzen hingegen werden Zweikomponentensysteme als nicht essentielle Faktoren der Resistenzantwort beschrieben. Die beiden Promotoren der plasmidkodierte *pco*-Kupferresistenz aus *E. coli* *pcoA<sub>p</sub>* und *pcoE<sub>p</sub>* agieren auch in Abwesenheit des nativen Zweikomponentensystems PcoRS (Brown *et al.*, 1995; Rouch & Brown, 1997). Die Autoren spekulieren über die Möglichkeit, dass ein chromosomales Pendant die Funktion der beiden Proteine PcoR und PcoS übernehmen könnte. Sie schlagen hierbei ein CutRS-homologes System vor, wie es von Tseng und Chen (1991) für *Streptomyces lividans* postuliert wurde. Ähnliche Effekte konnten auch beim *pco*-homologen System *copABCDRS* aus *Pseudomonas syringae* beobachtet werden. Auch hier wurde ein chromosomal lokalisiertes System mit ähnlichen Funktionen vorgeschlagen (Mills *et al.*, 1993). Das putativ, chromosomale Zweikomponentensystem in *E. coli* konnten inzwischen Munson *et al.* (2000) als *cusRS* identifizieren, ein System, das neben Kupfer auch für die Resistenz gegenüber Silber verantwortlich ist (Franke *et al.*, 2001).

Lässt sich durch ein weiteres homologes System im Genom von *R. metallidurans* der geringe Effekt der Deletionen des Zweikomponentensystems erklären? Rodrigue *et al.* (2000) beschrieben,

dass in *Pseudomonas aeruginosa* 63 Gene für Histidinkinasen und 64 Gene für *Response*-Regulatoren identifiziert werden konnten. In *E. coli* wurden z. B. „nur“ 28 Histidinkinasen und 32 *Response*-Regulatoren beschrieben (Mizuno, 1997), in *Bacillus subtilis* 36 Histidinkinasen und 34 *Response*-Regulatoren (Fabret *et al.*, 1999) und im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 42 Histidinkinasen und 38 *Response*-Regulatoren (Mizuno *et al.*, 1996). Die Autoren werten diese Vielfalt als eine evolutionäre Adaptation an verschiedenste Umweltbedingungen, die die große Verbreitung des Bakteriums erklären könnte. Allein 24 der 64 *Response*-Regulatoren wurden der OmpR-Gruppe zugeordnet, zu der auch CzcR gehört (Parkinson & Kofoid, 1992).

Da seit kurzem das gesamte Genom von *R. metallidurans* aufgeklärt wurde und mit 6800 kb eine ähnliche Größe wie das *P. aeruginosa* Genom (6264 kb) aufwies, konnten BLAST-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) mit der Proteinsequenz von CzcR und CzcS durchgeführt werden. Überraschend war die große Zahl an homologen Proteinsequenzen ([http://spider.jgi-psf.org/JGI\\_microbial/html/ralstonia/ralston\\_home\\_page.html](http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/ralstonia/ralston_home_page.html)). Für CzcR ergaben sich 73 und für CzcS 53 homologe Sequenzen. Da die Annotation der Gesamtsequenz noch nicht abgeschlossen war, wurden auch hier wieder nur die Nummern der gefundenen *contigs* beschrieben. Nach genauer Prüfung konnten homologe Gene für Zweikomponentensysteme in 22 *contigs* (302, 464, 465, 516, 572, 588, 595, 609, 613, 647, 656, 665, 677, 681, 696, 697, 699, 702, 707, 709, 710, 711) identifiziert werden, die große Übereinstimmungen mit den Proteinen CzcR (225 AS) und CzcS (475 AS) zeigten. Die Homologie bestand dabei im Bereich von 32-60 % für die *Response*-Regulatoren (Überlappung der AS-Sequenz von 209-225 AS) und 24-37 % für die entsprechenden Histidinkinasen (Überlappung der AS-Sequenz von 223-463 AS). Sequenzen, die in weniger als 200 Aminosäure-Resten Homologien zeigten, wurden genauso wenig in dieser Betrachtung berücksichtigt wie *contigs*, in denen eine der beiden Komponenten eine auffällig geringe Homologie zum *czcRS*-System aufwies bzw. völlig fehlte. Die höchsten Homologien zeigten die Gene der putativen Zweikomponentensystemen zum *Response*-Regulator CzcR in den *contigs* 465, 609, 709 und 711 (Abb. 39). Die Identitäten lagen zwischen 58-60 % (Überlappung der AS-Sequenz von 220-222 AS), und die entsprechenden Histidinkinasen waren die einzigen vier Sequenzen, deren Ähnlichkeit mit einer Überlappung von mehr als 271 AS berechnet wurde. Hier bewegen sich die Identitäten im Bereich von 29-37 % (Überlappung der AS-Sequenz von 458-463 AS). Die Regulatoren der vier genannten *contigs* wurden mit dem Programm ClustalX (Vers. 1.81) im Vergleich mit zehn anderen *Response*-Regulatoren analysiert. Dabei fiel auf, dass der Regulator aus *contig709* identisch mit dem bereits beschriebenen CopR aus *R. metallidurans* war (Abb. 39). Das Protein aus *contig711* zeigte ebenfalls eine hohe Homologie zu Regulatoren der Kupferhomöostase. Die Proteine aus *contig465* und *contig609* hingegen zeigten die höchste Identität zu CzcR. Legt man bei einem *Alignment* CusR aus *E. coli* zugrunde, so ist die Identität von PcoR, dessen Aktivität von CusR übernommen werden kann (Brown *et al.*, 1995; Rouch & Brown, 1997; Munson *et al.*, 2000), ebenfalls nur 60 %. Es ist also durchaus möglich, dass die beiden homologen Zweikomponentensysteme aus *contig465* und *contig609* die Funktionen von CzcR bzw. CzcS in einer Deletionsmutante komplementieren. Inwieweit die Rolle von CzcR bzw. CzcS in der Aktivierung der *czcCBA*-Expression in Anbetracht dieses komplexen genetischen



### Abb. 39: ClustalX-Analyse CzcR-homologer Regulatoren

Zum Vergleich und zur Einordnung der gefundenen CzcR-homologen Sequenzen wurden neun homologe Regulatoren, die bereits funktionell beschrieben wurden, herangezogen. Mit dem Programm ClustalX (Vers. 1.81) wurden die homologen *Alignments* durchgeführt und mit dem Programm TreeView 1.6.1.

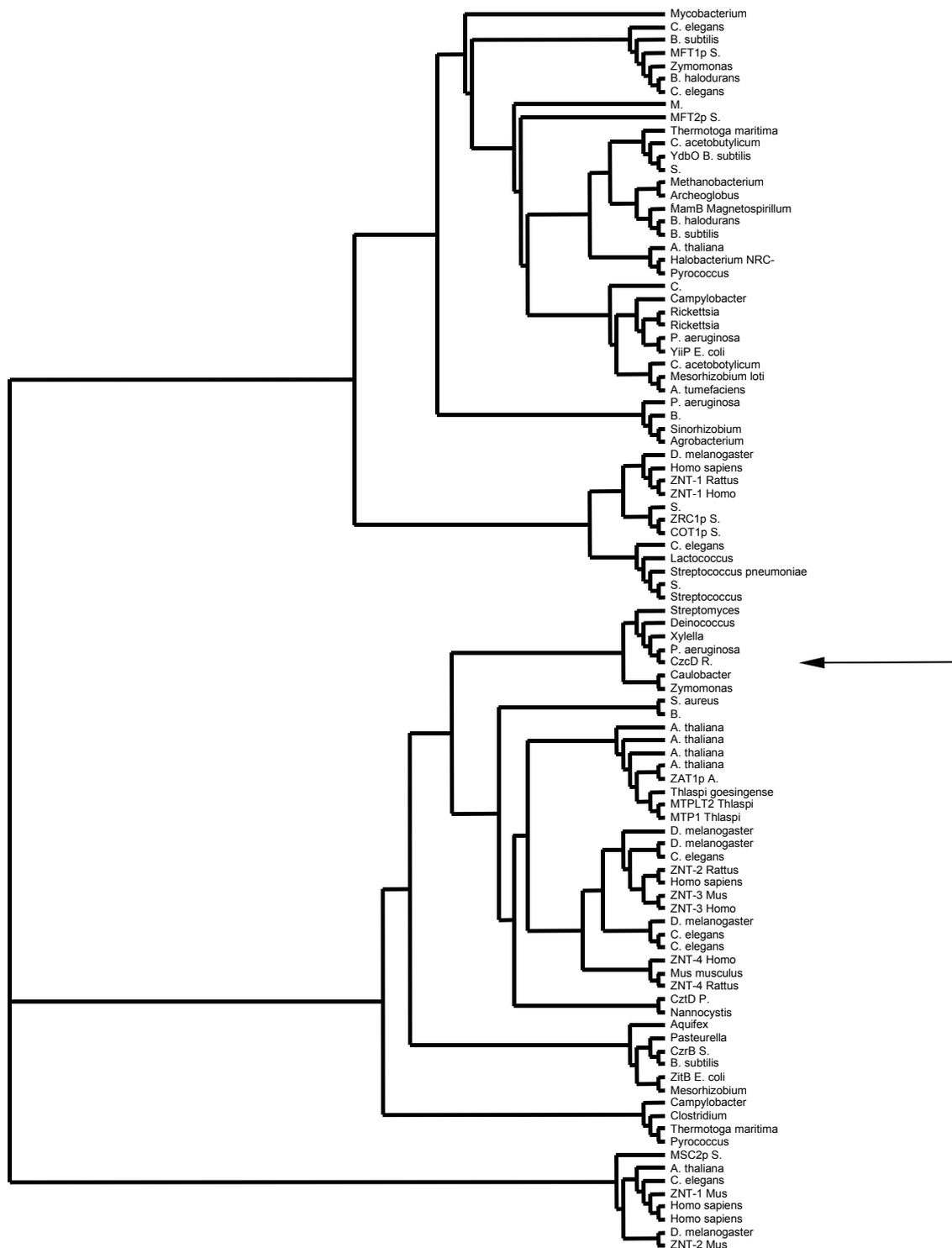
(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) wurden die berechneten Homologien grafisch dargestellt. **A:** Vergleich der *Response*-Regulatoren aus *R. metallidurans*. Was durch die grafische Darstellung nicht gezeigt werden kann, ist die vollständige Identität von contig709 und CopR aus *R. metallidurans*. In Klammern angegebene Werte zeigen die Identitäten der Regulatoren in Bezug auf CzcR. **B:** Vergleich von CzcR mit den *Response*-Regulatoren anderer Schwermetallresistenzen.

Hintergrunds aufgeklärt werden kann, ist weiterhin fraglich, zumal eine direkte Rolle als Hauptregulatoren nicht gezeigt werden konnte. Als Schlüsselprotein für die Rolle des Zweikomponentensystems könnte CzcN dienen, da eine direkte Bindung von CzcR an den *czcNp*-Promotor gezeigt wurde (Große *et al.*, 1999). Allerdings war es bisher nicht möglich, CzcN mit einem System zur heterologen Expression von Genen zu reinigen bzw. eine Expression zu initiieren (Grass, pers. Mitteilung).

## 4.3. CzcD - die zentrale Homöostasepumpe in der Regulation der *czcCBA*-Expression?

### 4.3.1. Die CDF-Proteinfamilie

Neben den Proteinfamilien der P-Typ-ATPasen (Axelsen & Palmgren, 1998; Gatti *et al.*, 2000) und den RND-Proteinen (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999) sind die *Cation Diffusion Facilitator* (CDF) eine der Hauptgruppen von Schwermetalltransportern, die für den Export von Schwermetallen aus dem Zytoplasma in andere Zellkompartimente oder aus dem Zelllumen in das umgebende Medium verantwortlich sind. Im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinfamilien, denen neben dem Efflux von Schwermetallen auch andere Funktionen zukommen, wurden für die Vertreter der CDF-Proteinfamilie bisher nur Aufgaben in der Schwermetallhomöostase bzw. in der



**Abb. 40: Die CDF-Proteinfamilie**

Das dargestellte Dendrogramm beschreibt die Sequenzhomologien zwischen den 96 gefundenen Vertretern der CDF-Proteinfamilie. Verwandte Sequenzen wurden durch eine PSI-BLAST-Analyse identifiziert, wobei die Sequenz von CzcD aus *R. metallidurans* als Ausgangspunkt diente bzw. Sequenzen wurden aus dem Review von Gaither und Eide (2001) übernommen. Verfügen Organismen über mehrere Vertreter dieser Proteinfamilie, so wurden die entsprechenden Accessionnummern angegeben. Die so gewonnenen Daten wurden mit dem Programm CLUSTALX analysiert und dem Programm TreeView grafisch dargestellt. Ein Pfeil markiert das bearbeitete CzcD aus *R. metallidurans*.

Schwermetallresistenz beschrieben (Nies & Silver, 1995; Paulsen & Saier, 1997; Gaither & Eide, 2001b).

Die Familie der CDF-Proteine ist dabei über alle phylogenetischen Bereiche der eukaryotischen (Kamizono *et al.*, 1989; Conklin *et al.*, 1994; Palmiter & Findley, 1995; Palmiter *et al.*, 1996a; van der Zaal *et al.*, 1999; Bloß *et al.*, 2001; Persans *et al.*, 2001) und prokaryotischen Welt (Nies, 1992b; Sturr *et al.*, 1997; Xiong & Jayaswal, 1998; Anton *et al.*, 1999; Kuroda *et al.*, 1999; Grass *et al.*, 2001b) verbreitet (Abb. 40). Während Paulsen und Saier (1997) noch über 13 Vertreter dieser neuen Proteinfamilie berichteten, ist inzwischen die Zahl der zu indentifizierenden Proteinsequenzen auf ca. 100 angestiegen (Gaither & Eide, 2001b). Diese rapide Steigerung an putativen Vertretern der CDF-Proteinfamilie war sicherlich auf ihre ubiquitäre Verbreitung und die steigende Organismenzahl wie z. B. dem Menschen (Venter *et al.*, 2001) zurückzuführen, deren Gesamtgenom in den letzten Jahren aufgeklärt werden konnte.

Die Rolle von CDF-Proteinen ist dabei sehr unterschiedlich. In manchen Organismen stellen sie die Hauptfaktoren der Schwermetallresistenz dar, wie es z. B. für CzcB aus *Staphylococcus aureus* (Xiong & Jayaswal, 1998; Kuroda *et al.*, 1999), ZRC1p aus *S. cerevisiae* (Kamizono *et al.*, 1989) und ZAT1p aus *A. thaliana* (van der Zaal *et al.*, 1999) beschrieben wurde. In anderen Organismen fungieren sie als Homöostasefaktoren wie z. B. ZNT-3 (Palmiter *et al.*, 1996b), das im Gegensatz zu ZNT-1 selbst keine Schwermetallresistenz vermittelt, aber für den Transport von  $Zn^{2+}$  in synaptische Vesikel verantwortlich sein soll (Palmiter *et al.*, 1996b; Cole *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* wurden MFT1 und MFT2 [Lange *et al.* (1999) benannten die Proteine inzwischen in MMT1p und MMT2p um] beschrieben, die für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Eisenhaushalts verantwortlich, aber dafür nicht essentiell sind (Li & Kaplan, 1997; Lange *et al.*, 1999). Andere Eisentransporter sind ebenfalls CDF-Proteine und sind wie z. B. MamB aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* für den Aufbau von Magnetosomen verantwortlich (Schüler, 2000). Diese Magnetosomen wurden inzwischen sogar als erster Beweis extraterrestrischen Lebens in einem Marsmeteoriten beschrieben (Friedmann *et al.*, 2001).

Trotz ihrer großen Vielfalt und ihrer weiten Verbreitung in den verschiedensten Organismen besitzen alle CDF-Proteine einige grundlegende strukturelle Charakteristika. Die meisten Vertreter verfügen über sechs putative transmembrane Segmente (TMS) (Paulsen & Saier, 1997). Die TMS konnten teilweise für einen prokaryotischen Vertreter CzcD aus *R. metallidurans* bestätigt werden. Allerdings waren nur vier der sechs TMS nachzuweisen. Ein kleiner periplasmatischer Loop von vier Aminosäure-Resten zwischen den TMS V und VI konnte mittels der translationalen Kopplung von Proteinteilen mit Reporterproteinen nicht nachgewiesen werden (Anton *et al.*, 1999).

Die einzigen bekannten Ausnahmen mit mehr als sechs TMS sind zwei Proteine aus Pilzen, MSC2p aus *S. cerevisiae* (Acc. Nr. 6320411) und ein putativer Metalltransporter aus *Schizosaccharomyces pombe* (Acc. Nr. 9967708). Für diese Proteine werden zwölf TMS anhand von Computeranalysen vorhergesagt (Li & Kaplan, 2001). Möglicherweise handelt es sich dabei um evolutionäre Weiterentwicklungen der CDF-Proteine, die durch interne Genduplikation, wie bereits für die Proteine der RND-Familie beschrieben, entstanden (Saier *et al.*, 1994).



zytoplasmatischen Loop zwischen TMS IV und V war diese C-terminale Bindestelle in fast allen Vertretern vorhanden (Gaither & Eide, 2001b). Zusätzlich verfügten die meisten prokaryotischen CDF-Proteine über eine konservierte histidinreiche Region im N-Terminus mit der Konsensussequenz (HX)<sub>n</sub>, wobei n in starkem Maße variieren konnte ( $n \geq 2$ ), da auch die Länge der N-Termini in den einzelnen Proteinen verschieden war. Einzig eine Gruppe von Proteinen, die bisher nicht als Zink-Transporter beschrieben wurde, zeigte dieses Strukturmotiv nicht. Zu ihnen gehört z. B. MamB aus *Magnetospirillum gryphiswaldense*, das als Eisentransporter beschrieben wurde (Schüler, 2000). Auch *yiiP* aus *E. coli* wurde zwar durch  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  induziert, zeigte aber nach der Deletion keinen Phänotyp in Bezug auf die  $Zn^{2+}$ - oder  $Cd^{2+}$ -Resistenz. Die Rolle von *yiiP* als potentieller Eisentransporter wurde allerdings noch nicht näher untersucht (Grass *et al.*, 2001b).

Der Transportkanal durch die Zytoplasmamembran wird von den TMS I, II, V und VI gebildet (Paulsen & Saier, 1997). Nur diese TMS sind strikt amphipatisch, mit allen hydrophilen Aminosäure-Resten zum Kanal und allen hydrophoben Aminosäure-Resten nach außen gerichtet. Dabei sind in den TMS II, V und VI Aspartat-Reste konserviert, die ein mögliches Transportrelaissystem bilden können. Für CzcD aus *R. metallidurans* konnte bereits die Rolle dieser Aspartat-Reste (Asp<sub>53</sub>, Asp<sub>158</sub>, Asp<sub>181</sub>) untersucht werden (Anton *et al.*, 2001). Ein weiterer konservierter Aminosäure-Rest ist ein Glutamat-Rest im ersten TMS (Glu<sub>31</sub> in CzcD aus *R. metallidurans*). Auch hier gibt es wieder einige Ausnahmen, die in der Gruppe der putativen Eisentransporter zu finden waren. Fehlte die N-terminale Bindestelle wie in *YiiP* aus *E. coli*, MamB aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* oder YdbO aus *Bacillus subtilis*, so war auch der Glutamat-Rest nicht vorhanden, sondern es war in allen Proteinen in einen Lysin-Rest umgewandelt. Den gleichen Aminosäure-Austausch erkennt man auch bei der Betrachtung der Aminosäure-Sequenz von MMT1p und MMT2p, zwei CDF-Proteinen aus *S. cerevisiae*, die für den Eisentransport in die Mitochondrien verantwortlich sein sollen (Li & Kaplan, 1997).

Inwieweit jedoch diese Aminosäure-Reste über die Substratspezifität entscheiden, wäre ohne definierte Mutanten in einem CDF-Protein reine Spekulation. Andere Transportproteine wie z. B. HoxN aus *R. eutropha* und IRT2 aus *A. thaliana* waren bereits durch Austauschmutationen untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Aminosäure-Reste für das Substratspektrum eines Proteins verantwortlich sein können (Eitinger & Mandrat-Berthelot, 2000, Rogers *et al.*, 2001).

#### **4.3.2. CzcD: ein Transportprotein mit regulatorischen Funktionen**

Die Rolle bzw. die Funktion von CzcD in der *czc*-vermittelten Schwermetallresistenz war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unklar. Vorhergehende Arbeiten zeigten, dass das 1992 beschriebene CzcD-Protein nicht wie angenommen 199 Aminosäure-Reste (Nies, 1992), sondern 316 Aminosäure-Reste lang ist (van der Lelie *et al.*, 1997), so wie es schon für das CzcD-Protein aus *Alcaligenes* sp. CT14 beschrieben wurde (Kunito *et al.*, 1996).

Wie für andere Vertreter der CDF-Proteinfamilie wurde auch für CzcD die Involvierung in den Schwermetalltransport postuliert und erstmals für ein CDF-Protein an ganzen Zellen von *R. metallidurans* gezeigt (Anton *et al.*, 1999). Doch die Rolle im komplexen Regulationsnetzwerk der *czc*-Determinante war weiterhin unklar. Deshalb waren Deletionsmutanten des *czcD*-Gens in *R. metallidurans* DN175[pMOL30-9,  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$ ] und AE128(pMOL30) konstruiert worden. Als einzige Einzelgenmutation zeigte die Deletion von *czcD* einen reproduzierbaren Phänotyp in Bezug auf die Schwermetallresistenz gegenüber  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ . Dabei war der Verlust der Resistenz nur in einer schwachen, aber reproduzierbaren Verminderung der MIC zu beobachten. Da der Deletionsstamm  $\Delta\text{czcD}$  wie der Wildtyp auch noch bei 10 mM  $\text{Zn}^{2+}$  wuchs, aber eine deutliche verringerte Plattierungseffizienz zeigte, wurden spezifischere Methoden ausgewählt, um den Effekt der *czcD*-Deletion zu charakterisieren. Anton *et al.* (1999) zeigten durch semiquantitative RT-PC, dass Zellen des  $\Delta\text{czcD}$ -Stammes ohne Zugabe eines Induktors eine um ca. Faktor 17 höhere Grundexpression der Strukturgenregion im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Nach der Induktion mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  stieg die Menge der mRNA im Wildtyp von 6-16 ng/g auf ca. 800 ng cDNA/g RNA an. Die Expression im  $\Delta\text{czcD}$ -Stamm war allerdings nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  um den Faktor 6.5-12 höher als im Wildtyp. Parallel durchgeführte Experimente mit einer *czcD*-Deletion im *czcC-lacZ-czcBA*-Stamm konnten wieder nur teilweise die Ergebnisse der RNA-Experimente bestätigen. Die Induktion mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  zeigte nicht die auf RNA-Ebene ermittelten Unterschiede in der Expressionsrate. Wie bei der Deletion von *czcR* und *czcS* wurden folgende Metallionenkonzentrationen verwendet: 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ , 300  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$  und 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ .

Wie in den Versuchen mit der mRNA-Menge konnte hierbei eine geringe Erhöhung der Grundexpression ohne Induktion im  $\Delta\text{czcD}$ -Stamm beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich allerdings anstelle einer Erhöhung um Faktor 17 nur eine Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität um ca. Faktor 1.5. Dadurch war auch im Western-Blot kein Nachweis möglich, dass die Grundexpression von *czcCBA* durch die Deletion von *czcD* auch ohne Zugabe von Schwermetallen erhöht wurde. Die bessere Induzierbarkeit des *czcCBA*-Systems konnte jedoch bestätigt werden. Zwar zeigten die Werte nicht exakt die Steigerung um Faktor 42, wie es für das RNA-Niveau beschrieben wurde (Anton *et al.*, 1999), jedoch konnte tendenziell eine Dereprimierung von *czcC-lacZ-czcBA* durch die Deletion von *czcD* auch in der *lacZ*-Expression bestätigt werden.

In Wachstumsversuchen konnte die erhöhte Grundexpression jedoch deutlich gezeigt werden. Für die Ermittlung einer konstitutiven Expression von *czcCBA* wurden Inkubationsexperimente mit und ohne 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  in den Vorkulturen durchgeführt. Nach Vorinkubation mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  sollte die Kultur eine deutlich kürzere *lag*-Phase zeigen als die Kultur ohne Vorinkubation mit  $\text{Zn}^{2+}$ . Im Fall des Wildtyps konnte genau dieses Verhalten beobachtet werden. Wurde jedoch *czcD* deletiert, so konnte keine Abhängigkeit von der  $\text{Zn}^{2+}$ -Inkubation mehr gezeigt werden. Auch in diesem Versuch konnte die Dereprimierung des *czc*-Systems durch die Deletion von *czcD*

bewiesen werden. Diese erhöhte Grundexpression konnte durch die *in trans*-Komplementation mit *czcD*, *ZRC1* und *COT1* aufgehoben werden (Abb. 10).

Die Rolle des CDF-Proteins im *czc*-System ist direkt mit der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase gekoppelt, denn genau diese Funktion übernehmen ZRC1p und COT1p in *S. cerevisiae* (Kamizono *et al.*, 1989; MacDiarmid *et al.*, 2000; Miyabe *et al.*, 2001). Die Anwesenheit von CzcD verhindert also die Expression des energetisch aufwendigeren *czcCBA*-Systems, solange die intrazelluläre Schwermetallionenkonzentration durch CzcD niedrig gehalten werden kann. Überschreitet die Menge an z. B.  $Zn^{2+}$  die Entgiftungskapazität von CzcD, wird die Expression von *czcCBA* induziert (van der Lelie *et al.*, 1997; Weltrowski & Legatzki, pers. Mitteilung).

In anderen Systemen ist die Rolle der CDF-Proteine in der Aufrechterhaltung der Schwermetallhomöostase sehr viel klarer umrissen. Das am besten charakterisierte System ist sicherlich *S. cerevisiae*. Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen verfügt die Hefezelle über Organellen, in denen Schwermetallen gelagert und bei Bedarf auch wieder dem Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden können (MacDiarmid *et al.*, 2000). Nach der Identifikation der ersten beiden CDF-Proteine COT1p (Conklin *et al.*, 1994) und ZRC1p (Kamizono *et al.*, 1989) ging man von einer Lokalisation innerhalb der Mitochondrienmembran aus. Li und Kaplan zeigten jedoch (1998), dass ZRC1p und COT1p in der Membran der Vakuole zu finden waren, was von anderen Gruppen ebenfalls experimentell bestätigt werden konnte (Miyabe *et al.*, 2000; MacDiarmid *et al.*, 2000; Miyabe *et al.*, 2001). Die Vakuole fungiert demnach als Lager für überschüssige Metallionen, z.B. für  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  (Dunn *et al.*, 1994; Bode *et al.*, 1995; Ramsay & Gadd, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Paidhungat & Garrett, 1998; Miyabe *et al.*, 2001). Eine Deletion von *ZRC1* führte zu einer Verminderung der MIC für  $Zn^{2+}$  um 95 %. Während der Wildtyp noch bei 20 mM  $Zn^{2+}$  Wachstum zeigte, war die Deletionsmutante nur noch in der Lage, bei max. 1 mM  $Zn^{2+}$  zu wachsen (Kamizono *et al.*, 1989). Im Vergleich zu CzcD zeigte dies zwar einen stärkeren Effekt von ZRC1p auf die Resistenz, aber die Komplementationsversuche mit *ZRC1* im *czcD*-Deletionsstamm wiesen auf ähnliche Aktivitäten der beiden Proteine hin.

Die Rolle von ZRC1p konnte auch mittels indirekter Beweise untermauert werden. So konnte gezeigt werden, dass die zinkabhängige Enzymaktivität der Glyoxalase I (Inoue & Kimura, 1996) im Zytoplasma von dem Vorhandensein von ZRC1p abhing. Während der Gleichgewichtsphase der  $Zn^{2+}$ -Homöostase in einem *ZRC1*-Deletionsstamm führte eine niedrige Zinkionenkonzentration innerhalb der Vakuole zu einer verminderten Enzymaktivität der Glyoxalase I (Miyabe *et al.*, 2001). Andererseits beschrieben dieselben Autoren die Induktion von *ZRC1* unter  $Zn^{2+}$ -Mangelbedingungen. Durch eine *lacZ*-Fusion wiesen sie die Expression von *ZRC1* unter EDTA-Einfluss nach, während die intrazelluläre Zinkionenkonzentration stetig sank (Miyabe *et al.*, 2000). Dieser offensichtliche Widerspruch wird jedoch aufgeklärt, wenn man betrachtet, wie die Expression von *ZRC1* reguliert wird. Wie die  $Zn^{2+}$ -Aufnahmesysteme *ZRT1-3* und 42 weitere Gene aus *S. cerevisiae* wurde auch *ZRC1* durch Zap1p auf Transkriptionsebene reguliert (Lyons *et al.*, 2000; Miyabe *et al.*, 2000). Zap1p induzierte die Expression von Genen unter  $Zn^{2+}$ -Mangelbedingungen. Dabei war die Bindung an eine konservierte Region im Promotor des

jeweiligen Gens, dem sogenannten *ZRE*-Element (*zinc responsive element*), notwendig. Durch die Klonierung dieser *ZRE*-Elemente in die Aktivatorregion des *CYC1*-Promotors, der vor eine *lacZ*-Kassette kloniert worden war, konnte die Repression der *ZRC1*-Expression durch die Zugabe von  $Zn^{2+}$  direkt nachgewiesen werden (Lyons *et al.*, 2000).

Welche biologische Funktion steckt hinter der Expression eines Resistenzgens unter Mangelbedingungen (MacDiarmid *et al.*, 2000)? Die Frage ist nicht einfach zu beantworten, da der Zyklus von  $Zn^{2+}$  innerhalb der eukaryotischen Zelle nicht vollständig aufgeklärt ist. Möglicherweise war die hohe Anzahl von Aufnahmesystemen wie ZRT1p und ZRT2p (Zhao & Eide, 1996a, Zhao & Eide, 1996b), die zum Teil unter Mangelbedingungen synthetisiert werden, eine Ursache für die gleichzeitige Expression eines Systems, das, um den labilen Pool zytoplasmatischen Zinks stabil zu halten, im Fall hoher  $Zn^{2+}$ -Aufnahme überschüssige Metallionen sofort in die Vakuole entgiftet (MacDiarmid, pers. Mitteilung). Ebenfalls ist die Involvierung eines dritten Aufnahmesystems ZRT3p, das gelagertes  $Zn^{2+}$  wieder aus der Vakuole pumpt, nicht vollständig auszuschließen (MacDiarmid *et al.*, 2000). Die komplexe Regulation eines Homöostasezustandes wird noch durch zusätzliche Resistenzmechanismen kompliziert. Die mögliche Bindung von Metallen an z. B. Phytochelatine, wie es für *S. pombe* beschrieben wurde (Clemens *et al.*, 1999), oder der zusätzliche Transport von Schwermetallkomplexen in die Vakuole durch ABC-Transporter wie z. B. HMT1p aus *S. pombe* (Ortiz *et al.*, 1992) beeinflussen ebenfalls die Schwermetallhomöostase.

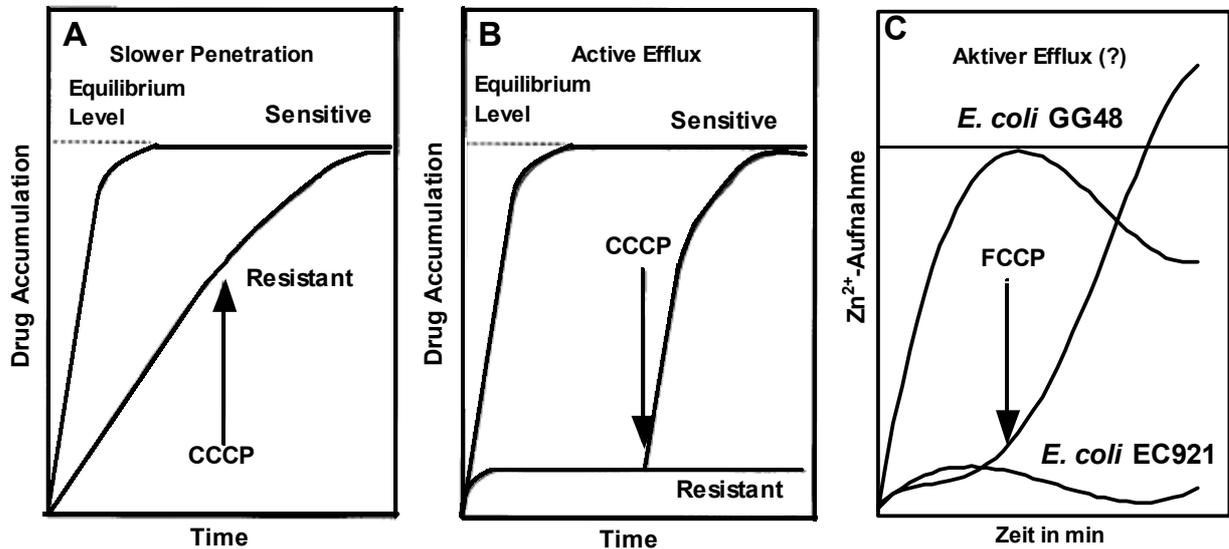
#### **4.3.3. CzcD – Transport durch die PMF (Proton-Motiv-Force)**

Wird *czcD* im zinksensitiven *E. coli*-Stamm GG48( $\Delta zitB$ ,  $\Delta zntA$ ) exprimiert, so erhöhte sich die Zinkresistenz deutlich. Eine Überexpression von *zitB*, dem Gen eines der nativen CDF-Proteine aus *E. coli*, stellte die Resistenz des Wildtyps *E. coli* W3110 wieder her (Rensing *et al.*, 1997b; Grass *et al.*, 2001b). Zwar konnte nicht das gleiche Resistenzniveau durch die Expression von *czcD* erreicht werden, doch zeigte sich im Bereich von 50-300  $\mu M Zn^{2+}$  ein deutlich verbessertes Wachstum (Abb. 11). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits bei der Expression von *czcD* in *R. metallidurans* gezeigt werden (Anton *et al.*, 1999).

Worauf beruht diese erhöhte Resistenz, auf aktivem Efflux oder auf verlangsamter Aufnahme? Aufschluss sollten Transportexperimente mit radioaktiven Schwermetallisotopen geben. Deutlich war die verminderte Akkumulation von  $Zn^{2+}$  innerhalb der Zellen durch die Expression von *czcD* zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse waren bereits bei Transportstudien an *R. metallidurans* ermittelt worden (Anton *et al.*, 1999). Die intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Konzentration verminderte sich in *R. metallidurans* nur um den Faktor 2-3, was bei der bereits beschriebenen Vielzahl an putativen Schwermetalltransportern nicht ungewöhnlich ist.

Die Transportstudien in *E. coli* GG48 zeigten jedoch einen wesentlich deutlicheren Effekt. Durch die Expression von *czcD* in *E. coli* GG48 verminderte sich die intrazelluläre Schwermetallionenkonzentration um Faktor 9-10 ( $Zn^{2+}$ ) bzw. 5-6 ( $Cd^{2+}$ ) (Anton *et al.*, 2001). Ein Transport von  $Co^{2+}$  und  $Ni^{2+}$  konnte nicht nachgewiesen werden. In ähnlichen Experimenten

zeigten Grass *et al.* (2001b) den Transport mit ZitB, einem der nativen CDF-Proteine aus *E. coli*. Allerdings verminderte sich die  $Zn^{2+}$ -Konzentration nur um den Faktor 3-7 von max. 11.4 nmol/mg Protein auf 3.6 nmol/mg Protein (Grass *et al.*, 2001b).



**Abb. 42: Worauf basieren Resistenzen, die verminderte Akkumulation zur Folge haben?**

Resistenzen, die auf verminderter Akkumulation beruhen, können nur auf zwei Prinzipien basieren: verminderte Aufnahme oder aktiver Efflux. Handelt es sich um einen aktiven Transport aus der Zelle aufgrund eines Protonengradienten, lässt sich diese verminderte Akkumulation durch die Zugabe von Entkopplern wie CCCP oder FCCCP aufheben. **A** und **B** sind aus Nikaido (1996) „*Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria*“ entnommen. **C**: Trendlinien der gemessenen Transportaktivität von CzcD im resistenten *E. coli*-Stamm EC921(pECD723; *czcD*) im Vergleich zum sensitiven *E. coli* GG48. Durch die Zugabe von 10  $\mu$ M FCCCP konnte die verringerte Akkumulation und damit die Transportaktivität von CzcD vollständig aufgehoben werden.

Verminderte Akkumulationen innerhalb der bakteriellen Zelle konnten als Ursache der Schwermetallresistenz auch für die beiden CDF-Proteine ZntA und CzrB aus *Staphylococcus aureus* RN450 bzw. 912 gezeigt werden (Xiong & Jayaswal, 1998; Kuroda *et al.*, 1999). Obwohl beide Proteine eine Identität von ca. 97 % aufwiesen, sollten sie sich doch auf zwei unterschiedlich großen *EcoRI*-Fragmenten und damit in unterschiedlichen Regionen des Genoms befinden (Kuroda *et al.*, 1999). Die Deletion der beiden Einzelgene führte zu einer Verminderung der MIC von 5 mM  $Zn^{2+}$  auf 0.5 mM  $Zn^{2+}$  ( $\Delta zntA$ ) bzw. von 5 mM  $Zn^{2+}$  auf 2 mM  $Zn^{2+}$  ( $\Delta czrB$ ). Auch wenn beide Effekte nicht miteinander in Übereinstimmung zu bringen waren, zeigten doch beide Deletionsstämme eine deutlich erhöhte intrazelluläre Akkumulation von  $Zn^{2+}$  im Vergleich zum Wildtyp, in beiden Fällen durch AAS bestimmt (Xiong & Jayaswal, 1998; Kuroda *et al.*, 1999). Bei der zeitabhängigen Akkumulation von  $Zn^{2+}$  in ganzen Zellen zeigte sich nur ein Unterschied von 30 % durch die Expression von *czrB* (Kuroda *et al.*, 1999).

Nikaido (1996) beschrieb anhand von Antibiotika-Transportern, dass die Ursache von verminderter Akkumulation nur eine verlangsamte Aufnahme oder der aktive Efflux sein kann. Bewiesen wurde diese Aussage durch die Zugabe des Entkopplers CCCP. Im Falle von verminderter Aufnahme hat CCCP keinen Einfluss auf den intrazellulären Gehalt an Antibiotika. Ist der Effluxprozess von einem Protonengradienten abhängig, kann dieser durch die Zugabe von FCCCP oder CCCP

aufgehoben werden. Genau dies passierte im Fall von CzcD. Ursache für die verminderte Akkumulation von Schwermetallen durch die Expression von *czcD* konnte deshalb nur Efflux sein (Abb. 42). Diese Schlussfolgerung wurde durch die Experimente mit FCCP untermauert. Durch Versuche mit Vesikeln konnte deutlich gezeigt werden, dass durch die Zugabe von FCCP der Protonengradient zusammenbrach. Die verstärkte Akkumulation nach der Zugabe von FCCP zu ganzen Zellen war also demnach auf den Zusammenbruch des Protonengradienten zurückzuführen. Dabei akkumulierte die Kultur, deren Protonengradient zusammengebrochen war, mehr als der eigentlich sensitive Stamm. Dies könnte auf das Vorhandensein eines weiteren Transportproteins, das im sensitiven Stamm GG48 für die Einstellung des Gleichgewichtes verantwortlich ist, hinweisen. Es lag also durch die Akkumulation nach der FCCP-Zugabe die Vermutung nahe, dass ein protonenabhängiger Transportmechanismus vorlag, wie er bereits für den sekundären RND-Transporter CzcA beschrieben wurde (Goldberg *et al.*, 1999). Der direkte Beweis durch Transportmessungen an *Everted Membrane Vesicles* oder nach Rekonstitution in Liposomen fehlt allerdings noch. Transportmessungen an Proteoliposomen wurden durchgeführt. Es konnte auch eine auf CzcD basierende Aufnahme in die Proteoliposomen nachgewiesen werden, doch war keine Abhängigkeit von einem Protonengradienten gegeben.

Bisher wurde der Transport von CDF-Proteinen nur in wenigen Fällen direkt gemessen. Bloß *et al.* (2001) zeigten durch Rekonstitution von ZAT1p in detergentdestabilisierte Liposomen den spezifischen Transport von  $Zn^{2+}$ . Jedoch konnte im Fall von ZAT1p keine Abhängigkeit von einem Protonengradienten gezeigt werden (Bloß *et al.*, 2001). Eine umfassende Charakterisierung der Transportaktivität eines CDF-Proteins wurde bisher nur für einen ZnT-Vertreter aus *Rattus norvegicus* beschrieben (Kumar & Prasad, 2000). Das isolierte ZnT-Protein wurde als der Haupttransporter postuliert, der für die Aufnahme von  $Zn^{2+}$  in Epithelzellen der Niere verantwortlich sein soll (Kumar & Prasad, 1999). Allerdings wurden nur mit  $NH_4Cl$  geladene Proteoliposomen gezeigt. Eine Negativkontrolle ohne  $NH_4Cl$ -Vorinkubation, in der also kein Protonengradient anlag, fehlte. Es wurden auch keine Entkoppler verwendet, um den Beweis zu erbringen, dass die gemessene Aufnahme durch den Protonengradienten katalysiert wurde. Allerdings konnte eine Hemmung durch  $Cd^{2+}$  gezeigt werden, während  $Ca^{2+}$  keine Einfluss auf den Transport hatte.

Kumar und Prasad (2000) zeigten, dass die Aufnahme von  $Zn^{2+}$  in Proteoliposomen einer hyperbolen Michaelis-Menten-Kinetik folgte. Es wurde ein  $K_m$  von 1.03 mM und eine  $V_{max}$  von 1.333  $\mu\text{mol/mg}$  Protein pro min ermittelt. Ebenfalls zeigten die Autoren, dass der Transport pH- und temperaturabhängig verlief. Der  $K_m$  erscheint hier allerdings mit ca. 1 mM relativ hoch, wenn man bedenkt, dass z. B. für P-Typ-ATPasen  $K_m$ -Werte im  $\mu\text{M}$ -Bereich postuliert werden (Rensing *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 1999). Allerdings bezogen sich die ermittelten Daten auf Metall-Thiolat-Komplexe, die von diesen ATPasen transportiert wurden. Bei Transportstudien mit Proteoliposomen und CzcA wurden  $K_{50}$ -Werte von 6.6 mM ( $Zn^{2+}$ ) und 18.5 mM ( $Co^{2+}$ ) ermittelt (Goldberg *et al.*, 1999). Eine Erklärung wäre in den unterschiedlichen Transportaktivitäten der beiden Proteinfamilien bzw. in den verwendeten experimentellen Systemen *Inverted Membrane Vesicles* und Proteoliposomen zu suchen.

Die Hemmung des Transportes durch FCCP erbrachte erstmalig den Beweis, dass der Protonengradient essentiell für die Aktivität von CDF-Proteinen war. Gleichzeitig konnten Spekulationen über die Funktion von anderen Gradienten widerlegt werden. So wurde für CzcD-TrkA aus *B. subtilis* über einen  $K^+$ -Gradienten spekuliert, da nur durch die Anwesenheit von  $Co^{2+}$  die  $K^+$ -Aufnahme beschleunigt wurde (Wang *et al.*, 2000). Der  $Na^+$ -Gradient als treibende Kraft wurde z. B. vor kurzem für NorM, einen Antibiotika-Transporter aus *Vibrio parahaemolyticus*, beschrieben (Morita *et al.*, 2000).

Hinweise für einen Einfluss des Protonengradienten im Metalltransport durch CDF-Proteine waren schon häufiger erbracht worden. Auch hier waren die Untersuchungen an *S. cerevisiae* am weitesten fortgeschritten. Eine besondere Rolle für den Transport von Metallen spielt der niedrige pH-Wert innerhalb der Vakuole. Interessanterweise befinden sich die Transporter ZRC1p und COT1p, die in *S. cerevisiae* Schwermetallresistenz vermitteln, in der Vakuolenmembran (Li & Kaplan, 1998). Dieser niedrige pH-Wert wird durch eine V-ATPase erzeugt (Forgac, 1998). Die Ansäuerung der Vakuole wurde als eine der entscheidenden Voraussetzungen beschrieben, Schwermetalle bzw. Schwermetallkomplexe zu lagern. Wurde diese V-ATPase in *S. cerevisiae* deletiert, verminderte sich z. B. die  $Ni^{2+}$ -Resistenz. Auch die intrazellulär akkumulierte Menge an  $Ni^{2+}$  verringerte sich deutlich (Nishimura *et al.*, 1998). Die Resistenzen gegenüber  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$  verminderten sich ebenfalls durch den Verlust des Protonengradienten in der Vakuole. Die Schwermetalle  $Cu^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  wurden aber nicht durch die gleichen Mechanismen entgiftet. Die Resistenzen gegenüber diesen beiden Metallen blieben durch die Deletion der V-ATPase unbeeinflusst (Ramsay & Gadd, 1997; Clemens *et al.*, 1999). Auch der Eisentransport in Mitochondrien war von einem Membranpotential abhängig, das durch CCCP aufgehoben werden konnte (Lange *et al.*, 1999). Deletionsmutanten in den beiden putativen Eisentransportern MMT1p und MMT2p zeigten jedoch, dass die Eisenaufnahme auch unabhängig von diesen beiden Proteinen erfolgte. Allerdings fehlte eine direkte Messung der Transportaktivität der CDF-Proteine MMT1p und MMT2p. Es wurden ausschließlich Aktivitäten eisenabhängiger Enzyme wie der Ferrochelatase als Merkmal einer effizienten Aufnahme von  $Fe^{2+}$  analysiert (Lange *et al.*, 1999).

Neben der treibenden Kraft konnten auch Aminosäure-Reste innerhalb des Kanals ermittelt werden, die für den Transport essentiell sind. Wie bereits erwähnt, sollten Aspartat- oder Glutamat-Reste für den Transport von Metallen durch CDF-Proteine wichtig sein (Abb. 43). Dies konnte bereits von Kumar und Prasad (2000) durch den Einsatz von DCCD, einem Modifikator für Carboxyl-Gruppen, untermauert werden. Durch DCCD wurde der Transport von ZnT um 40 % gehemmt (Kumar & Prasad, 2000). Ein direkter Nachweis durch mutierte Proteine fehlte jedoch bisher. Aus diesem Grund waren im Rahmen dieser Arbeit drei Aspartat-Reste innerhalb der TMS II, V und VI durch *Quick-Change*-Mutagenese in Asparagin-Reste umgewandelt worden. Allerdings zeigte nur der Austausch  $D_{181}N$  einen deutlichen Effekt. Während beide Stämme, sensitiver *E. coli* GG48 und  $CzcD_{D181N}$ , bis zur 20. Minute konstant gleich viel  $Zn^{2+}$  akkumulierten, erhöhte sich die intrazelluläre Zinkionenkonzentration im Stamm mit  $CzcD_{D181N}$  nach der 20. Minute deutlich gegenüber dem sensitiven Stamm (Abb. 12). Wie die FCCP-

Inhibierung klar zeigte, gibt es einen weiteren Transporter im zinksensitiven *E. coli*, der eine Gleichgewichtskonzentration von ca. 4  $\mu\text{mol Zn}^{2+}/\text{mg}$  Trockengewicht bei einer außerhalb der Zelle vorliegenden  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  einstellte (Abb. 12). Dieser Transporter konnte möglicherweise nicht in dem Maß synthetisiert werden wie in GG48, da er mit CzcD<sub>D181N</sub> um den Platz in der Zytoplasmamembran konkurriert. Dies würde zumindest die erhöhte Akkumulation über das Gleichgewicht von GG48 hinweg erklären.

CzcD <i>P. aeruginosa</i>	--MLTDAVA--X <sub>n</sub> --VWSDMLG--X <sub>n</sub> --AWVDSLIV--
CzcD <i>R. metallidurans</i>	--MLTDTVA--X <sub>n</sub> --VWSDLLG--X <sub>n</sub> --AWVDSAI--
ZRC1 <i>S. cerevisiae</i>	--MLNDIIS--X <sub>n</sub> --VLGDALG--X <sub>n</sub> --YYSDPIV--
COT1 <i>S. cerevisiae</i>	--MLNDIIS--X <sub>n</sub> --VLGDALG--X <sub>n</sub> --YYTDPLV--
ZNT-1 <i>Mus musculus</i>	--MLSDVLA--X <sub>n</sub> --VLGDALG--X <sub>n</sub> --LYLDPTL--
CzrB <i>S. aureus</i>	--MFSDTFS--X <sub>n</sub> --VIGDLLG--X <sub>n</sub> --TIADPIA--
CzcD <i>B. subtilis</i>	--MLSDSIS--X <sub>n</sub> --VISDMLG--X <sub>n</sub> --GWADPLA--
<i>Aquifex aeolicus</i>	--MLTDAVS--X <sub>n</sub> --VATDTLG--X <sub>n</sub> --YLADPIL--
ZitB <i>E. coli</i>	--MLTDTAA--X <sub>n</sub> --VLGDLLG--X <sub>n</sub> --TPADPIL--
ZAT <i>A. thaliana</i>	--LLSDVAA--X <sub>n</sub> --VLGDSIQ--X <sub>n</sub> --KIVDLIC--
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	--MSTHAAA--X <sub>n</sub> --VLADALT--X <sub>n</sub> --IWLDPMM--
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	--MSTHAGA--X <sub>n</sub> --VLADALT--X <sub>n</sub> --NFLDPLM--
<i>P. aeruginosa</i> (11351436)	-- <u>MSSHALA</u> --X <sub>n</sub> -- <u>VLADAAT</u> --X <sub>n</sub> -- <u>AWLDPLM</u> --
	TMS II                      TMS V                      TMS VI

**Abb. 43: Konservierte Asparat-Reste in den TMS II, V und VI**

Durch eine ClustalX-Analyse wurden einige repräsentative Vertreter der CDF-Proteinfamilie analysiert und die konservierten Bereiche der TMS II, V und VI dargestellt. Während Asp158 und Asp181 (bezogen auf CzcD aus *R. metallidurans*) in allen bekannten CDF-Proteinen stark konserviert sind, wird Asp53 in einigen Proteinen gegen einen Histidin-Rest ausgetauscht.

Der Austausch von Aspartat<sub>53</sub> und Aspartat<sub>158</sub> führte zu einer leicht erhöhten Akkumulation gegenüber dem unmutierten CzcD-Protein, die Einschränkung des Transportes war jedoch nur gering.

Inwieweit dieses DDD-Motiv für ein Ladungsrelais-System oder aber für den Transport von Kationen verantwortlich ist, kann erst nach der Rekonstitution in Liposomen bzw. durch Messungen an invertierten Membranvesikeln wirklich beantwortet werden. In anderen Proteinen waren ähnliche Motive wie z. B. das DDE-Motiv in CzcA (Goldberg *et al.*, 1999) bereits beschrieben worden. Allerdings verfügt CzcA über zwei Kanäle, von denen ein Kanal für den Transport von Kationen, der andere für die Weiterleitung der Protonen verantwortlich ist (Goldberg *et al.*, 1999). Da CzcD nur über einen Kanal verfügt, muss sich der Transportmechanismus von CzcD sicherlich vom Mechanismus für CzcA unterscheiden. Andererseits bildet CzcD eine dimere Struktur und damit möglicherweise zwei Kanäle aus, wobei die Rolle der einzelnen Monomere bisher nicht untersucht wurde.

#### **4.3.4. Die Bindung von Schwermetallionen an CzcD**

Neben der Transportaktivität war die Frage der Metallbindung zu klären. Da es bisher keine weitergehenden Untersuchungen zu Metallbindestellen in CDF-Proteinen gab, wurde zum Großteil auf biochemische Grundtechniken zurückgegriffen. Dabei sollten Bindesepezifität und Aminosäurereste, die in die Bindung involviert sind, analysiert werden.

Die prinzipielle Koordination von Liganden in der Bindung von  $Zn^{2+}$  besteht aus Histidinen, Säuren, also Glutamat oder Aspartat, Cysteinen, Wasser als Ligand und manchmal Tyrosinen, Asparaginen, Serinen und Threoninen (Karlin & Zhu, 1997). Die Bindestellen lassen sich in sechs Klassen unterteilen. Klasse I besteht hauptsächlich aus drei benachbarten Histidin-Resten, z. B. ein weit verbreitetes Zinkbindemotiv ist HEXXHXXGXXH (E und G sind nicht an der Bindung beteiligt). Klasse II zeichnet sich durch ein HXH-Motiv sowie ein drittes Histidin, das sich mehr als 20 Aminosäurereste vom HXH-Motiv entfernt befindet, aus. Eine Kombination von Cystein- und Histidin-Resten ist das Hauptmerkmal der Klasse III. In Klasse IV zeichnen sich Bindemotive durch zwei separate Histidin-Reste, einen sauren Liganden und ein Wassermolekül aus. Aspartate und Glutamate bilden die hauptsächlichsten Bestandteile der Bindemotive der Klasse V. Alle nicht in den Klassen I-V zu findenden Bindestellen werden in Klasse VI zusammengefasst (Karlin & Zhu, 1997).

Um die Metallbindung *in vitro* zu zeigen, war es jedoch notwendig, das Protein zu reinigen. Das *Impact-T7*-System erwies sich als ungeeignet, CzcD zu reinigen, was auf den negativen Einfluss des n-Laurylsarcosins auf die Enzymaktivität des Inteins zurückzuführen war (Abb. 18). Deshalb wurde auf das *Strep-tagII*<sup>®</sup>-System zurückgegriffen und CzcD mit einem bereits für CzcA beschriebenen Protokoll isoliert (Goldberg *et al.*, 1999). Dabei konnte ein Protein zur Homogenität gereinigt werden, das eine Molekulare Masse von ca. 30 kDa aufwies (Abb. 20a, 20b). Die Abweichung zur theoretischen Proteinmasse von 36 kDa war nicht untypisch für Membranproteine. So ist es durchaus möglich, dass ein Protein mit einer vorhergesagten Masse von 43-47 kDa in einem SDS-PAA-Gel eine apparente Masse von 28-33 kDa aufweist (Henderson *et al.*, 2000).

Durch die Anwendung der Metall-Chelat-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass CzcD an ein weites Spektrum an divalenten Kationen binden kann. Obwohl CzcD  $Cd^{2+}$  transportierte, konnte durch die Metall-Chelat-Chromatographie keine Bindung gezeigt werden. Ein Artefakt aufgrund verminderter Bindung des  $Cd^{2+}$  an die Metall-Chelat-Sepharose kann daher nicht ausgeschlossen werden. Murgia *et al.* (1999) bewiesen durch diese Metallaffinitätschromatographie die Bindung der putativen Metallbindestelle zwischen TMS IV und V im CDF-Protein ZnT-4 aus *Rattus norvegicus* an Schwermetallionen. Dabei erhielten sie ein ähnliches Substratspektrum, wie es auch für CzcD beschrieben werden konnte (Anton *et al.*, 2001). Wie die Transportstudien zeigten, hat aber Bindung nicht zwingend etwas mit Transport zu tun. Es konnte zwar eine Bindung an  $Ni^{2+}$ , aber kein Transport gezeigt werden (Anton *et al.*, 2001).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch für andere Transportproteine beschrieben werden. Es wurde an NrsD aus *Synechocystis* sp. PCC6803, einem NreB-homologen Protein, die Bindung von  $Ni^{2+}$ ,

$\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und teilweise von  $\text{Zn}^{2+}$  gezeigt (Garcia-Dominguez *et al.*, 2000). Für NreB wurde hingegen bisher aber nur der Transport von  $\text{Ni}^{2+}$  beschrieben (Grass *et al.*, 2001c). Spezifischere Bindungen konnten für die putativen Bindemotive der N-terminalen Domänen der WND- und MNK-P-Typ-ATPasen aus dem Menschen gezeigt werden. Durch Inkubation mit IAA-Resin war eine eindeutige Bindung an  $\text{Cu}^{2+}$  nachzuweisen. Eine geringe Affinität zu  $\text{Zn}^{2+}$  war ebenfalls erkennbar,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  wurden hingegen nicht gebunden (Lutsenko *et al.*, 1997). Durch die Expression von verschiedenen Proteindomänen konnte sogar der N-Terminus als der metallbindende Teil vom Calreticulin durch Metall-Chelat-Chromatographie identifiziert werden (Baksh *et al.*, 1995).

Andere Gruppen versuchten, die Metallbindung spektroskopisch zu zeigen. Die Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an das Prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  wurde durch Circular dichroismus (CD) (Woody, 1995) und Fluoreszenzspektroskopie gezeigt (Stöckel *et al.*, 1998). Durch CD-Spektren konnte CzcD eindeutig als ein  $\alpha$ -helikales Protein beschrieben werden. Ähnliche Experimente mit CzcD führten allerdings nicht zum Nachweis, dass es zu einer strukturellen Änderung durch die Bindung von Metallionen kam (Anton *et al.*, 2001). Allerdings arbeiteten Stöckel *et al.* (1998) auch in einem UV-Bereich von 250 nm bis 310 nm, um Aussagen über die tertiäre Struktur des Prions machen zu können. Der Effekt im Bereich von 200-250 nm, der auch für die Messungen von CzcD verwendet wurde, war sehr gering und wohl nicht wirklich aussagekräftig. Vielleicht wäre mit Experimenten in anderen Wellenlängenbereichen bzw. mit Techniken wie der Fluoreszenzspektroskopie doch die räumliche Verlagerung von Proteinteilen in CzcD durch die Bindung von Liganden nachzuweisen.

Andere Versuche, die Bindung der Metallionen direkt zu zeigen, wie es z. B. für ZAT1p aus *A. thaliana* (Bloß *et al.*, 2001) und dem Milzbrand-Toxin (Klimpel *et al.*, 1994) durch Inkubation des Proteins mit radioaktiven Schwermetallisotopen gezeigt werden konnte, führten nicht zum Erfolg.

Doch wie könnte die Bindung von Metallionen und ein möglicher Effekt auf die Struktur nachgewiesen werden? Umfangreiche Arbeiten wurden dazu an dem  $\text{Na}^+/\text{Li}^+-\text{H}^+$ -Antiporter NhaA (Gerchman *et al.*, 1993; Taglicht *et al.*, 1993; Rimon *et al.*, 1995) und an der Arsenit und Antimonit aktivierbaren ATPase ArsA aus *E. coli* (Bhattacharjee *et al.*, 1995) durchgeführt. Die Gruppe um Etana Padan konnte so z. B. durch tryptische Verdaue die Modifikation der Konformation in NhaA durch die Veränderung des pH-Wertes nachweisen. Auch wenn die Anzahl von zwei erwarteten Fragmenten nach dem Verdau mit Trypsin sehr gering erscheint, konnte doch deutlich der Effekt des pH-Wertes auf die Konformation durch tryptische Verdaue gezeigt werden (Gerchman *et al.*, 1999). In ArsA aus *E. coli* wurden tryptische Verdaue eingesetzt, um die unterschiedliche Bindung von Substraten in Mutantenproteinen nachzuweisen. Strukturell schienen alle konstruierten Proteinderivate gleich. Doch die ArsA-Proteine mit den Mutationen C113S, C172S und C422S zeigten deutliche Unterschiede nach der Bindung von Antimonit und ATP. In Verbindung mit gemessenen Enzymaktivitäten postulierten die Autoren eine Änderung der Aktivator-domäne durch die Mutationen und konnten dies durch verschiedene Verdaumuster mit Trypsin auch zeigen (Bhattacharjee *et al.*, 1995). Deshalb wurde versucht, die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$

und  $\text{Co}^{2+}$  an CzcD durch die Behandlung mit Trypsin nachzuweisen. Ein Schutz von CzcD-Domänen durch die eingesetzten Ionenkonzentrationen konnte gezeigt werden (Anton *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass die Verdauemuster in einem weiten Konzentrationsbereich identisch waren, spricht für die Spezifität der Metallbindung (Abb. 22).

Danach stellte sich die Frage nach der Beteiligung verschiedener Aminosäure-Reste an der Bindung. Aufgrund der schon beschriebenen Vielfalt an putativen Metallbindestellen wurde nicht die Methode der Mutagenese, sondern die chemische Modifikation von Aminosäure-Resten gewählt, um dies zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, stellen hauptsächlich Cysteine und Histidine die Hauptliganden für die Bindung von Metallionen dar (Karlin & Zhu, 1997).

CzcD verfügt über neun Histidin-Reste und einen Cystein-Rest. Das einzige Cystein in CzcD wurde als erster Kandidat für eine Bindung von Metallen untersucht. Dazu wurde die chemische Modifikation mit DTNB (Di-5,5'-thio-2,2'-Nitrobenzoesäure) gewählt, da man die Entstehung von TNB spektroskopisch verfolgen kann (Kim *et al.*, 1997; Reddy & Rao, 1998; Czerski & Sanders, 2000). Föhr *et al.* (1995) zeigten für das humane S100A3-Protein bei der Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  eine veränderte Modifizierbarkeit der Cysteine durch DTNB (Föhr *et al.*, 1995). In Anlehnung an diese Experimente wurde versucht, eine Antwort auf die Beteiligung von Cystein<sub>291</sub> an der Metallbindung zu finden (Anton *et al.*, 2001). Die spektroskopischen Verläufe zeigten jedoch eine geringe bis gar keine Involvierung von Cystein<sub>291</sub> in die Bindung der Metalle (Anton *et al.*, 2001).

Es gibt einige Argumente, die eine Involvierung von Cysteinen in die Metallbindung von CzcD ausschließen. Bei Cystein<sub>291</sub> handelt es sich nicht um einen konservierten Aminosäure-Rest, der in allen Vertretern der CDF-Proteinfamilie zu finden ist. Nur acht der ca. 100 beschriebenen Mitglieder weisen an der Position 291 (bezogen auf CzcD) ein Cystein auf, dazu gehören z. B. ZitB und YiiP aus *E. coli*. In einigen anderen wie z. B. in CzrB aus *S. aureus* (ClustalX-Analyse) sind an dieser Position Histidin-Reste zu finden. In den meisten CDF-Proteinen war jedoch an dieser Position kein für die Metallbindung interessanter Aminosäure-Rest lokalisiert. Indirekt bewiesen auch die Arbeiten von Kumar und Prasad (2000), dass es keine Involvierung von Cysteinen in die Bindung bzw. in den Transport der Metalle im untersuchten CDF-Protein gab. Die gemessene Aktivität des untersuchten CDF-Proteins verminderte sich nur um ca. 8 % gegenüber der Kontrolle durch die Zugabe von Iodacetat, einem SH-Gruppenmodifikator.

In anderen Untersuchungen konnte allerdings sehr gut der Nachweis für die Bindung von Metallen durch Cysteine erbracht werden. Die N-Termini der WND und MNK, die beiden P-Typ-ATPasen der Wilson's und Menkes Disease, banden spezifisch  $\text{Cu}^+$ . Sie verfügen über sechs N-terminale Bindedomänen mit der Konsensussequenz GMTCCXXCXXXIE. Durch die Modifikation mit 7-Diethylamino-3-(4'-aleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM), einer unter UV-Licht fluoreszierenden Verbindung, konnte die Bindung von  $\text{Cu}^+$  im Vergleich zu  $\text{Cd}^{2+}$  gezeigt werden (Lutsenko *et al.*, 1997). Allerdings zeigten neuere Untersuchungen an CopA aus *E. coli*, einem zu WND und MNK orthologen Protein, dass die Bindung des  $\text{Cu}^+$  an diese Bereiche des Proteins nicht essentiell für die Funktion war. Ganz im Gegenteil, Cystein-Mutanten in den putativen Bindedomänen zeigten sogar eine höhere Resistenz gegenüber Kupfer als das Wildtypprotein.

Durch die Deletion des gesamten N-Terminus ging jedoch die Transportaktivität von CopA völlig verloren (Fan *et al.*, 2001). Chemische Modifikationen können also nur einen Hinweis geben. Ein direkter Beweis für die Involvierung in den Bindeprozess kann nur durch die gerichtete Mutagenese von Aminosäure-Resten erbracht werden. Daher muss auch noch das Cystein<sub>291</sub> durch *Quick-Change*-Mutagenese umgewandelt werden, um die Rolle dieses Aminosäure-Restes in der Metallbindung genauer zu untersuchen.

Auffällig in vielen CDF-Proteinen war eine Anhäufung von Histidinen im N- und C-Terminus, deshalb wurde auch die Rolle von Histidinen in der Metallbindung untersucht. Die Modifikation der Histidine erfolgte durch den Einsatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC). DEPC carbethoxyliert spezifisch Histidine. Aufgrund der Instabilität von DEPC in wässrigen Lösungen, besonders in Tris-HCl-Puffern, wurden alle Versuche im chemisch sehr inerten Phosphat-Puffer durchgeführt (Miles, 1977). Die chemische Modifikation mit DEPC ist eine weit verbreitete Methode, um Proteinen zu inaktivieren. Ähnlich wie für die UDP-*N*-Acetylglucosamin-Acyltransferase LpxA aus *E. coli* (Wyckoff & Raetz, 1999) beschrieben, wurde die chemische Modifikation auch für CzcD durchgeführt. Allerdings wurde die dargestellte sehr geringe DEPC-Menge von vierfachem molarem Überschuss halbiert, um unspezifische Reaktionen des DEPCs mit anderen Aminosäure-Resten zu minimieren (Miles, 1977). Die Bindung von CzcD an Metall-Chelat-Sepharose wurde nach der Inkubation mit DEPC völlig aufgehoben. In manchen Fällen reagiert DEPC jedoch trotzdem mit nukleophilen Seitenketten anderer Aminosäure-Reste wie z. B. Tyrosinen, Lysin und Cysteinen (Shriver *et al.*, 1998). Da sich die Absorption bei 280 nm nicht signifikant änderte, was auf eine Modifikation von Tyrosinen hingewiesen hätte, wurde von einer exklusiven Modifikation von Histidin-Resten ausgegangen. Um sicherzugehen, dass die DEPC-Modifikation histidinspezifisch erfolgte, wurde eine Behandlung mit Hydroxylamin durchgeführt. Durch die Inkubation mit 75 mM Hydroxylamin konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Bindefähigkeit an Schwermetallionen durch Hydroxylamin wiederhergestellt werden konnte. Die gewählten Hydroxylaminmengen bewegten sich im Bereich der in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von 10-500 mM (Shriver *et al.*, 1998; Wyckoff & Raetz, 1999). Histidine sind also erstmalig als Liganden in der Bindung von Schwermetallionen an prokaryotische CDF-Proteine direkt nachgewiesen worden.

Doch diese Experimente sagen nichts über die Lage der Metallbindestellen innerhalb des Proteins bzw. über die Zahl der beteiligten Aminosäure-Reste aus. Deshalb wurde versucht, die Metallbindungsdomänen näher einzugrenzen. Ein Proteinkonstrukt, das ohne den löslichen C-Terminus gereinigt werden sollte, konnte zwar exprimiert werden, aber die Ausbeute lag um Faktor 10-20 unter der des unmodifizierten CzcD-Proteins. Sobald auch die putative, N-terminale Metallbindedomäne deletiert wurde, kam es zu keiner nachweisbaren Expression mehr. Es war nur möglich, den löslichen C-Terminus CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) zu exprimieren und zu reinigen. Deshalb konnte nur der Vergleich zwischen CzcD und CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) durchgeführt werden (Anton *et al.*, 2001).

CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) wurde in *Gelshift*-Experimenten eingesetzt, die bereits für molybdat- (Rech *et al.*, 1996) bzw. wolframatbindende (Makdessi *et al.*, 2001) Proteine beschrieben wurden. Das Gesamtprotein war nicht in der Lage, in ein Natives PAA-Gel hineinzulaufen. Deshalb konnte

auch kein direkter Vergleich CzcD und CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) erhalten werden. Erstaunlicherweise ergab sich für CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) ein ganz ähnliches Substratspektrum, wie es auch für das Gesamtprotein gezeigt werden konnte. Auf die Retention von CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) in das Native PAA-Gel hatten  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  einen deutlichen Einfluss. Auffällig war allerdings das Erscheinungsbild des gereinigten Proteins nach Nativer PAGE (Abb. 26). Die erkennbaren zwei Proteinbanden in Nativen PAA-Gel standen nur einer Bande im SDS-PAA-Gel gegenüber (Abb. 20b).

Über die Ursache dieser beiden Banden kann nur spekuliert werden. Einerseits könnte es sich um Abbau handeln, andererseits verschiebt sich die untere der beiden Banden nach Inkubation mit Metallen zu höher laufenden Proteinbanden. Zwei unterschiedliche Konformationen desselben Proteins, eine ohne und eine mit gebundenen Schwermetallionen, scheint deshalb wahrscheinlich. Mit dem Beweis, dass sich im C-Terminus eine Metallbindestelle befindet, konnte nun eine Quantifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäurereste durchgeführt werden. Da an CzcD bereits die Involvierung von Histidinen in die Metallbindung nachgewiesen werden konnte, wurden Titrationsexperimente mit DEPC auch an CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) durchgeführt. Im C-Terminus sind sieben Histidine zu finden. Zwei Histidin-Reste wurden durch die Klonierung des DNA-Fragmentes in den Vektor pASK-IBA5 eingeführt, fünf sind in der nativen Aminosäuresequenz von CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) kodiert. Experimentell wurde eine Anzahl von vier modifizierbaren Histidin-Resten bestimmt. Nach der Inkubation mit  $Zn^{2+}$  waren allerdings nur noch zwei Histidin-Reste für die Modifikation mit DEPC zugänglich. Ob es sich bei den beiden restlichen zwei Histidinen um die handelt, die durch die Klonierung eingeführt worden waren, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Allerdings muss gesagt werden, dass alle im C-Terminus zu findenden Histidin-Reste in den meisten prokaryotischen CDF-Proteinen konserviert sind. Eine Involvierung in die Metallbindung liegt daher nahe.

Die putative Metallbindestelle H-D/E-X-H-X-W-X-L-T-X<sub>8</sub>-H kann nicht in eine der bereits beschriebenen Klassen von Bindestellen eingeordnet werden, daher kann auch keine Aussage über die mögliche Struktur eines Bindemotivs gemacht werden (Karlin & Zhu, 1997). Untersuchungen an artifiziellen Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Bindemotiven ergaben aber, dass die notwendige tetraedrische Anordnung von Liganden auch nach Einzelmutationen bzw. Doppelmutationen aufrecht erhalten werden konnte. Fehlende Liganden wurden durch das Lösungsmittel ersetzt (Klempa & Regan, 1995). Wenn man bedenkt, dass durch AAS im Gesamtprotein 3 Moleküle  $Zn^{2+}$  pro CzcD-Monomer bestimmt wurden, und das putative HXHXH-Bindemotiv im N-Terminus ein  $Zn^{2+}$  binden könnte, wären also durchaus zwei Bindestellen im C-Terminus des Proteins denkbar (Abb. 43), eine Bindestelle mit drei Histidin- und eine zweite mit zwei Histidin-Resten. Ähnliches konnte durch DEPC-Titration für Calreticulin gezeigt werden. Auch hier waren fünf der sieben Histidin-Reste an der Metallbindung beteiligt (Baksh *et al.*, 1995). Es wäre also durchaus eine Kombination aus einem Motiv der Klasse IV, mit zwei separaten Histidin-Resten, einem weiter entfernten geladenen Aminosäure-Rest (Asp oder Glu) sowie einem Wassermolekül und der H-D/E-X-H-X-W-X-L-T-X<sub>8</sub>-H-Bindestelle vorstellbar. Im Botulinum-Neurotoxin wurde die Bindung von nur zwei Histidin-Resten an  $Zn^{2+}$  durch DEPC-Titration gezeigt (Schiavo *et al.*, 1992). Allerdings



Diese beruht auf einem Leucin-Zipper-Motiv im N-Terminus des Proteins. Dieses Motiv fehlt in CzcD und anderen CDF-Proteinen. Eine Dimerisierung könnte allerdings der native Status eines CDF-Proteins sein. Die Möglichkeit, dass CDF-Proteine zur Oligomerisierung neigen, ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass alle bisher untersuchten Membranproteine in nicht kovalent zusammengesetzten homo- bzw. heterooligomeren Komplexen existieren. Die überwiegende Mehrheit der sekretorischen oder zytoplasmatischen Proteine ist hingegen in monomerer Form vorhanden (Langosch, 1999). Ob diese Oligomerisierung wirklich essentiell für die Funktion ist, muss erst in weiterführenden Experimenten gezeigt werden (Abb. 44).

Das CzcD-Protein ist aufgrund der gemessenen Transportaktivität eine zweite Effluxpumpe im *czc*-Operon. Diese Homöostasepumpe beeinflusst die *czcCBA*-Expression und vermittelt selbstständig Schwermetallresistenz. Dabei verfügt das Protein über die Möglichkeit, verschiedene Schwermetalle zu binden, es kann aber nur die Substrate des CzcCBA-Effluxkomplexes transportieren. Doch warum verfügt die *czc*-Determinante über mehrere Pumpen? Eine Erklärung dafür sind sicherlich die unterschiedlichen Substratkonzentrationen, die von den beiden Pumpen entgiftet werden. Warum verfügen aber fast alle bisher beschriebenen *czc*-homologen Systeme, die sich auf Plasmiden befinden, über eine zweite Pumpe? Die *sil*-Determinante enthält eine zusätzliche P-Typ-ATPase SilP (Gupta *et al.*, 1999), genau wie das *hel*-Operon aus *Legionella pneumophila* (McClain *et al.*, 1996). In anderen Systemen wie den *cnr*- , *nrs*- und *ncc-nre*-Determinanten werden in mehr oder weniger großer Nähe zu den Genen der RND basierenden Effluxkomplexe Vertreter der *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (Saier *et al.*, 1999a) beschrieben, die selbst geringe Schwermetallresistenzen vermitteln (Grass, 2000; Grass *et al.*, 2001c). Ist ein zweiter Transporter für die vollständige Ausprägung einer Resistenz notwendig, oder ist es von Vorteil, mehrere Transporter für verschiedene Homöostasezustände gekoppelt in plasmidkodierten Operonen zu organisieren?

Ein sehr interessanter Aspekt hierbei ist die Theorie des *selfish operon* (Lawrence, 1999). Gene organisieren sich *selfish* – selbst, um im Fall von horizontalem Gentransfer eine erhöhte Überlebenschancen zu haben. Dieser horizontale Gentransfer stellt nach neueren Erkenntnissen kein seltenes Ereignis, sondern einen der entscheidendsten Faktoren in der Evolution dar (Kurland, 2000). Wären diese zusätzlichen Effluxpumpen essentiell für das Operon, dann erscheint es nur als logisch, dass sie gerade in plasmidkodierten Determinanten verstärkt auftreten. Doch ohne experimentelle Beweise ist die Rolle dieser zusätzlichen Transporter in den Schwermetallresistenzoperonen nur spekulativ. Ein guter Ansatz ist möglicherweise die Kupferresistenz in *E. coli*. Die Kupferresistenz setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen: einer P-Typ-ATPase CopA (Rensing *et al.*, 2000), die Ionen bzw. komplexierte Ionen aus dem Zytoplasma transportiert, einer Multicopperoxidase CueO (Grass & Rensing, 2001a; Grass & Rensing, 2001b), die das Periplasma schützt und einem RND-basierten Resistenzsystem *cusCBA* (Munson *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2001), das ebenfalls Kupferresistenz vermittelt.

#### **4.4. Ausblick und weiterführende Experimente**

Aufgrund des bereits beschriebenen genetischen Hintergrundes in *R. metallidurans* ist die Etablierung eines ähnlichen Deletionssystems, wie es Datsenko und Wanner (2000) für *E. coli* beschrieben, dringend notwendig. Nur dadurch können die vielen redundanten Systeme gezielt ausgeschaltet werden. Die Tatsache, dass mehrere P-Typ-ATPasen, wie sie durch Insertion von pLO2 in das Chromosom von *R. metallidurans* AE104 identifiziert wurden, vorhanden sind, zeigt, warum durch homologe Expression von Genen wie z. B. *czcD* auf pVDZ 2 nur schwache Phänotypen dargestellt werden konnten (Anton *et al.*, 1999). Außerdem könnte durch ein schnelles *Knockout*-System, gekoppelt mit einem P1-Transduktionssystem, der Kreislauf von Schwermetallionen in *R. metallidurans* schneller aufgeklärt werden. Gerade für die Konstruktion von Mehrfachmutationen ist das pLO2-System zu langwierig. Gleichzeitig sollten Plasmidsets konstruiert werden, die definierte Induktionen von Genen z. B. für die *in trans*-Komplementation auch in *R. metallidurans* zulassen. Die *in frame*-Deletionen von chromosomalen Genen können mit dem ansonsten für plasmidkodierte Gene verwendeten pLO2-System (Lenz *et al.*, 1994) nicht durchgeführt werden (Egler & Legatzki, pers. Mitteilung).

Die identifizierten P-Typ-ATPasen sollten weiter untersucht und Mehrfachmutanten konstruiert werden, um einen wirklich sensitiven *R. metallidurans*-Stamm zu konstruieren. Gleichzeitig wäre die Rolle von weiteren CDF-Proteinen, die sich auf dem Chromosom befinden (*contig705*; *contig708*), interessant. Diese dürften allerdings in der  $Zn^{2+}$ -Resistenz bis 150  $\mu M$  keine wesentliche Rolle spielen. Möglicherweise lässt sich die Schwermetallresistenz jedoch durch die gleichzeitige Deletion der P-Typ-ATPasen und der CDF-Proteine weiter minimieren.

Begonnene Experimente zur Rolle von CzcD in der Expression von *czcCBA* in Bezug auf Halbwertzeiten der beiden Effluxpumpen und deren induktiven Minimalkonzentrationen sollten weitergeführt werden. Denkbar wäre dabei auch eine metallabhängige Degeneration von CzcD bei einem zu starken Anstieg der intrazellulären Schwermetallionenkonzentration. Dabei könnte der C-Terminus durch die Metallbindung die intrazelluläre Metallionenkonzentration „fühlen“. Ein zinkabhängiger Abbau wurde vor kurzem für ZRT1p gezeigt. Möglicherweise ist die Halbwertzeit von CzcD ebenfalls durch die intrazelluläre Schwermetallionenkonzentration bestimmt (Gitan & Eide, 2000).

In zusätzlichen Transportstudien sollte nach Mutagenese des CzcD-Proteins die Rolle der einzelnen putativen Metallbindestellen sowie weiterer wichtiger Aminosäure-Reste innerhalb des transmembranen Kanals aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch versucht werden, andere *Transportassays*, wie die Aufnahme in *Inverted Membrane Vesicles* oder Proteoliposomen, zu etablieren. Dann könnte man kinetische Daten des Transportes wie  $K_m$  und  $V_{max}$  für die einzelnen Substrate ermitteln. Außerdem könnte dadurch eine direkte Abhängigkeit des Transportes vom Protonengradienten zweifelsfrei bestätigt werden.

Ein großer Schwerpunkt stellt sicherlich die Aufklärung der Struktur von CzcD dar. Dem Hinweis auf eine Oligomerisierung von CzcD wird bereits in Experimenten mit Röntgenkleinwinkelstreuung nachgegangen. Eine substratabhängige Selbstorganisation des

Oligomere könnten Aussagen über die Funktionsweise von CDF-Proteinen zulassen. Parallel sollten Experimente mit Vernetzern definierter Gruppenspezifität und Länge durchgeführt werden. Verdünnungsreihen des Proteins in Vernetzungsexperimenten ließen Aussagen über die Spezifität der Oligomerisierung zu. Außerdem könnten nach Etablierung eines neuen Messsystems für die Transportaktivität in Liposomen und Konstruktion von inaktiven CzcD-Derivaten Negativ-Dominanzstudien durch Korekonstitution mit aktivem CzcD durchgeführt werden, so wie dies Yerushalmi *et al.*, (1996) für EmrE aus *E. coli* beschrieben.

Gleichzeitig wäre eine funktionelle Untersuchung der Dimerisierung sinnvoll. Für das Phosphataufnahmesystem PIC aus *S. cerevisiae* konnte durch die Expression von Monomeren mit verschiedenen *Tags* und anschließender Rekonstitution die enzymatische Notwendigkeit der Dimerisierung gezeigt werden. Nach der Inaktivierung eines der beiden Monomere war das gesamte Dimer nicht mehr in der Lage, Substrate zu transportieren (Schroers *et al.*, 1997).

Begonnene Kristallisationsexperimente sollten weitergeführt werden, wobei allerdings nach neueren Erkenntnissen in Abweichung von den durchgeführten Ansätzen zusätzliche Phospholipide und Schwermetallionen zu den Kristallisationsansätzen gegeben werden sollten. Die Wichtigkeit der zu erhaltenden Informationen sieht man, wenn man die geringe Zahl von kristallisierten Membranproteinen betrachtet und gleichzeitig die wichtige Rolle von Transportproteinen erfasst. So wurden erst vor kurzem zwei Membranproteinkristallisationen in *Science* und *Nature* (Rhodopsin. Palczewski *et al.*, 2000; Ca<sup>2+</sup>-P-Typ-ATPase. Toyoshima *et al.*, 2000) veröffentlicht.

Wie CzcA gehört auch CzcD zu den ersten beschriebenen Vertretern einer neuen Proteinfamilie (Saier *et al.*, 1994; Nies & Silver, 1995; Paulsen & Saier, 1997; Tseng *et al.*, 1999; Gaither & Eide, 2001b). Wichtig ist dies, wenn man die Beteiligung von verschiedenen Metalltransportern als Ursachen einiger Krankheiten betrachtet. So basiert das „Lethal Milk“-Syndrom, das zum Tod von neugeborenen Mäusen durch Zinkunterversorgung in der Milch des Muttertieres führt, auf einem Defekt in ZnT-4, einem CDF-Protein (Huang & Gitschier, 1997).

In Menschen wurden ebenfalls einige schwere neurodegenerative Erkrankungen durch die Mutationen in Metalltransportern, im Besonderen in Cu<sup>2+</sup>-ATPasen (*Wilson/Menkes-Diseases*), beschrieben. Während das Menkes-Syndrom schwere mentale Degeneration zeigt und zum Tod innerhalb der ersten drei Lebensjahre führt, kann das Wilson-Syndrom durch die Gabe von Penicillamin und einer Kupferdiät behandelt werden (Pena *et al.*, 1999; Rolfs & Hediger, 1999; Suzuki & Gitlin, 1999).

Auch mit Blick auf die ganze CDF-Proteinfamilie, die mögliche Rolle von CDF-Proteinen in der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen (Huang *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2000) und ihre Rolle in hyperakkumulierenden Pflanzen (van der Zaal *et al.*, 1999; Persans *et al.*, 2001) kann mit der Aufklärung der Struktur von CzcD als prominenter Vertreter der CDF-Proteine ein großer Beitrag für das Verständnis von Bau und Funktion dieser wichtigen Proteine geleistet werden.

## V. Zusammenfassung

Die *czc*-Determinante von *Ralstonia metallidurans* CH34, die auf dem Megaplasmid pMOL30 lokalisiert ist, vermittelt Resistenz gegenüber den Schwermetallen Kobalt, Zink und Kadmium durch aktiven Efflux dieser Kationen. Die *czc*-Determinante setzt sich aus der *czcCBA*-Strukturgenregion, der *czcNI-Upstream Regulatory Region* und der *czcDRSE-Downstream Regulatory Region* zusammen. Der membrangebundene Effluxkomplex wird von den Strukturproteinen CzcC, CzcB und CzcA gebildet. Die Regulation der *czc*-Determinante erfolgt durch ein Netzwerk aus mindestens sechs Regulatoren, aus dem Zweikomponentenregulationssystem CzcR/CzcS, dem Transportprotein CzcD und den Proteinen mit unbekannter Funktion CzcN, CzcI und CzcE.

1. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität einer  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$  Operon-Fusion wurde spezifisch nur durch  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ , nicht aber durch oxidativen-, Lösungsmittel-, Hitzestress oder  $\text{Pb}^{2+}$  induziert.
2. Die Deletion von *czcD* führte zum teilweisen Verlust der Schwermetallresistenz. Gleichzeitig erhöhte sich die Expression des *czcCBA*-Operons, was durch Messungen der *lacZ*-Induktion und durch Wachstumsversuche bestätigt werden konnte. Dieser Effekt konnte durch *in trans*-Komplementationen mit den Genen der CDF-Proteine CzcD, ZRC1p und COT1p wieder aufgehoben werden.
3. Die Deletionen von *czcR* oder *czcS* hatte keinen Einfluss auf die Schwermetallresistenz, jedoch auf die Induzierbarkeit der  $\Phi(\text{czcC-lacZ-czcBA})$  Operon-Fusion.
4. CzcD vermittelte erhöhte  $\text{Zn}^{2+}$ -Resistenz im sensitiven *E. coli*-Stamm GG48 durch verminderte intrazelluläre Akkumulation der Schwermetallionen. CzcD transportierte spezifisch  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ , jedoch nicht  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ . Durch die Hemmung des Transportes mit FCCP wurde der Nachweis erbracht, dass der Transport von einem Protonengradienten abhängig ist. Drei konservierte Aspartat-Reste im transmembranen Kanal von CzcD wurden in Asparagin-Reste umgewandelt. Die Mutation D<sub>53</sub>N und D<sub>158</sub>N hatten nur einen schwachen Einfluss auf den CzcD-vermittelten Transport, die Mutation D<sub>181</sub>N hob jedoch die Transportaktivität vollständig auf.
5. CzcD und CzcD( $\Delta_{1-202}$ ) wurden bis zur Homogenität gereinigt. Der Versuch, die Proteine durch das *Impact-T7*<sup>®</sup>-System zu reinigen, schlug fehl. Polyklonale Anti-CzcD-Antikörper wurden im Kaninchen erzeugt. Die Induktion des nativen Proteins durch  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  konnte mittels dieser Antikörper nachgewiesen werden.

6. Durch Proteaseverdauung mit Trypsin und Metall-Chelat-Chromatographie konnte nachgewiesen, dass CzcD  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  und  $Ni^{2+}$ , jedoch nicht  $Cd^{2+}$  *in vitro* bindet.
7. An der Bindung von  $Zn^{2+}$  war das Cystein<sub>291</sub> nicht oder nur bedingt beteiligt. Die Bindung erfolgte durch die Histidine im Protein, was durch chemische Modifikation von CzcD mit DEPC und durch die Wiederherstellung der Bindung mit Hydroxylamin nachgewiesen werden konnte. Mindestens eine Metallbindestelle befand sich dabei im C-Terminus des Proteins. Dies konnte durch *Gelshift*-Experimente und die Titration freier Histidine im C-Terminus nachgewiesen werden. Dabei waren mindestens zwei der fünf nativen Histidine an der Bindung beteiligt. Insgesamt wurden pro Monomer 3  $Zn^{2+}$ -Ionen gebunden.
8. CD-Spektren zeigten CzcD als ein hauptsächlich  $\alpha$ -helikales Protein. Chemische Quervernetzung mit Glutardialdehyd zeigte die Oligomerisierung von CzcD. Durch die Inkubation mit Tris-2,2'-bipyridylruthenium(II)chlorid die Bildung von CzcD Dimeren nachgewiesen werden.
9. Die Produkte der Gene *czcR*, *czcS*, *czcE*, *czcN* und *czcI* konnten durch T7-Expression nachgewiesen werden. Eine *in vivo* Interaktion von CzcR und CzcS durch Quervernetzung mit Formaldehyd konnte nicht nachgewiesen werden. Durch Reporterfusionen wurde der Nachweis erbracht, dass sich CzcE und CzcI im Periplasma befinden.
10. Die Gene für zwei CPx-Typ-ATPasen wurden im Chromosom des plasmidfreien Stammes *R. metallidurans* AE104 inaktiviert. Die ATPase aus *contig649* wurde als  $Zn^{2+}$ , die aus *contig691* als  $Cd^{2+}$ -transportierendes Protein identifiziert.
11. *R. metallidurans* enthält Glutathion.

## VI. Literaturverzeichnis

- Akada, R.** 1994. Quick-check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques* **17(1)**: 58.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andersen, N. L. und N. G. Andersen.** 1995. Proteom and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**: 1853-61
- Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl, und D. H. Nies.** 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* **181(22)**: 6876-81.
- Anton, A., G. Grass, C. Rensing und D. H. Nies.** 2001. Binding and Proton-Motive-Force-driven Transport of Zinc by CDF-Protein CzcD from *Ralstonia metallidurans*. Eingereicht.
- Appleyard, R. K.** 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**: 440-452.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith und K. Struhl.** 1993. Current protocols in molecular biology. Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Axelsen, K. B. und M G. Palmgren.** 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46(1)**: 84-101
- Baksh, S., C. Spamer, C. Heilmann und M. Michalak.** 1995. Identification of the Zn<sup>2+</sup> binding region in calreticulin. *FEBS Letters* **376**: 53-57
- Beard, S. J., R. Hashim, G.Wu, M. R. Binet, M. N. Hughes und R. K. Poole.** 2000. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **184(2)**: 231-235
- Bensadown, A. und D. Weinstein.** 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.
- Bhattacharjee, H., J. Li, M. Y. Ksenzenko und B. P. Rosen.** 1995. Role of cysteinyl residues in metalloactivation of the oxyanion-translocating ArsA ATPase. *J. Biol. Chem.* **270(19)**: 11245-11250
- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russel-Jones, und E. C. Gottschlich.** 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179.
- Bloß, T., S. Clemens und D. H. Nies.** 2001. Characterization of the ZAT1p from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Plant Physiol.* Akzeptiert.
- Bode, H. P., M. Dumschat, S. Garotti und G. F. Fuhrmann.** 1995. Iron sequestration by the yeast vacuole. A study with vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **228(2)**: 337-342

- Bonner, W. M. und R. A. Laskey.** 1974. A film detection method for Tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83-88
- Borremans, B., J. L. Hobman, A. Provoost, N. L. Brown und D. van der Lelie.** 2001. Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J. Bacteriol.* **183(19)**: 5651-5658
- Boswell, C. D., R. E. Dick und L. E. Macaskie.** 1999. The effect of heavy metals and other environmental conditions on the anaerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. *Microbiology* **145(Pt 7)**: 1711-1720
- Brim, H., M. Heyndrickx, P. de Vos, A. Wilmotte, D. Springael, H. G. Schlegel, und M. Mergeay.** 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterization of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst. Appl. Microbiol.* **22(2)**: 258-68.
- Brown, N. L., S. R. Barrett, J. Camakaris, B. T. Lee und D. A. Rouch.** 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* **17(6)**: 1153-1166
- Brown, N. L., D. A. Rouch and B. T. O. Lee.** 1992. Copper resistance systems in bacteria. *Plasmid.* **27**: 41-51
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez und J. M. Short.** 1987. XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -Galaktosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378.
- Chung, Y. J., C. Krueger, D. Metzgar und M. H. Saier Jr.** 2001. Size comparisons among integral membrane transport protein homologues in bacteria, Archaea, and Eucarya. *J. Bacteriol.* **183(3)**: 1012-1021
- Clemens, S., E. J. Kim, D. Neumann, J. I. Schroeder.** 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin 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
- Collard, J. M., A. Provoost, S. Taghavi, und M. Mergeay.** 1993. A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutations affecting regulation of the *cnr* cobalt-nickel resistance system. *J Bacteriol* **175(3)**: 779-84.
- 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
- Corbisier, P., D. van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. de Lorenzo, N. L. Brown, J. R. Lloyd, J. L. Hobman, E. Csöregi, G. Johansson und B. Mattiasson.** 1999. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bio available heavy metals in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **387**: 235-244.
- Czerski, L. und C. R. Sanders.** 2000. Thiol modification of diacylglycerol kinase: dependence upon site membrane disposition and reagent hydrophobicity. *FEBS Lett.* **472(2-3)**: 225-229
- Dameron, C. T. und M. D. Harrison.** 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **67(5Suppl)**: 1091S-1097S

- Datsenko, K. A. und B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(12)**: 6640-6645
- Degen, O., M. Kobayashi, S. Shimizu und T. Eitinger.** 1999. Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. *Arch. Microbiol.* **171(3)**: 139-145
- De Las Penas, A., L. Connolly, und C. A. Gross.** 1997. The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol. Microbiol.* **24(2)**: 373-85.
- Deretic, V., S. Chandrasekharappa, J. F. Gill, D. K. Chatterjee, und A. M. Chakrabarty.** 1987. A set of cassettes and improved vectors for genetic and biochemical characterization of *Pseudomonas* genes. *Gene* **57(1)**: 61-72.
- Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, und D. W. Martin.** 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* **176(10)**: 2773-80.
- Derman, A. I. und J. Beckwith.** 1995. *Escherichia coli* alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. *J. Bacteriol.* **177**: 3764-3770.
- Derman, A. I., W. A. Prinz, D. Belin und J. Beckwith.** 1993. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262(5140)**: 1744-1747.
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay, und D. H. Nies.** 1985. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **93**: B27-B28.
- Diels, L., Q. Dong, D. van der Lelie, W. Baeyens, und M. Mergeay.** 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.* **14(2)**: 142-53.
- Dinh, T., I. T. Paulsen, und M. H. Saier, Jr.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176(13)**: 3825-31.
- Dower, W. J., J. F. Miller, und C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16(13)**: 6127-45.
- Dressler, C., U. Kües, D. H. Nies, und B. Friedrich.** 1991. Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. *Applied Environ. Microbiol.* **57**: 3079-3085
- Dunn, T., K. Gable und T. Beeler.** 1994. Regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> by yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.* **269(10)**: 7273-7278
- Egler, M.** 2000. Das regulatorische Zweikomponentensystem CzcRS aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Ehrmann, M., D. Boyd und J. Beckwith.** 1990. Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(19)**: 7574-7578.
- Eitinger, T. und M. A. Mandrand-Berthelot.** 2000. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.* **173(1)**: 1-9.

- Eitinger, T., L. Wolfram, O. Degen, C. Anthon.** 1997. A Ni<sup>2+</sup> binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. *J. Biol. Chem.* **272(27)**: 17139-17144
- Ellis, J., A. Carlin, C. Steffes, J. Wu, J. Liu und B. P. Rosen.** 1995. Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiology* **141(Pt 8)**: 1927-1935
- Enz, S., S. Mahren, U. H. Stroehrer, und V. Braun.** 2000. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J. Bacteriol.* **182(3)**: 637-46.
- Fabret, C., V. A. Feher und J. A. Hoch.** 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181(7)**: 1975-1983
- Fan, B., G. Grass, C. Rensing und B. P. Rosen.** 2001. *Escherichia coli* CopA N-Terminal Cys(X)<sub>2</sub>Cys Motifs Are Not Required for Copper Resistance or Transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286(2)**: 414-418
- Fancy, D. A. und T. Kodadek.** 1999. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6020-6024
- Föhr, U. G., C. W. Heizmann, D. Engelkamp, B. W. Schäfer und J. A. Cox.** 1995. Purification and cation binding properties of the recombinant human S100 calcium-binding protein a3, an EF-hand motif protein with high affinity for zinc. *J. Biol. Chem.* **270(36)**: 21056-21061
- Forgac, M.** 1998. Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *FEBS Lett.* **440(3)**: 258-263
- Franke, S., G. Grass und D. H. Nies.** 2001. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* **147( Pt 4)**: 965-972
- Friedmann, E. I., J. Wierzchos, C. Ascaso und M. Winklhofer.** 2001. Chains of magnetite crystals in the meteorite ALH84001: evidence of biological origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98(5)**: 2176-2181
- Froshauer, S., G. N. Green, D. Boyd, K. McGovern und J. Beckwith.** 1988. Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **200(3)**: 501-511
- Fulkerson, J. F., Jr, H. L. Mobley.** 2000. Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. *J. Bacteriol.* **182(6)**: 1722-1730
- Gaither, L. A. und D. J. Eide.** 2001a. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **276(25)**: 22258-22264
- Gaither, L. A. und D. J. Eide.** 2001b. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* in press
- Garcia-Dominguez, M., L. Lopez-Maury, F. J. Florencio und J. C. Reyes.** 2000. A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **182(6)**: 1507-1514
- Gatti D, B. Mitra und B. P. Rosen.** 2000. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J. Biol. Chem.* **275(44)**:34009-34012

- Gerchman, Y., Y. Olami, A. Rimon, D. Taglicht, S. Schuldiner und E. Padan.** 1993. Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(4)**: 1212-1216
- Gerchman, Y., A. Rimon und E. Padan.** 1999. A pH-dependent conformational change of NhaA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli* involves loop VIII-IX, plays a role in the pH response of the protein, and is maintained by the pure protein in dodecyl maltoside. *J. Biol. Chem.* **274(35)**: 24617-4624
- Germann, U. A. und K. Lerch.** 1987. Copper accumulation in the cell-wall-deficient slime variant of *Neurospora crassa*. Comparison with a wild-type strain. *Biochem. J.* **245(2)**: 479-484
- Gitan, R. S. und D. J. Eide.** 2000. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem. J.* **60264-6021**: 329-336
- Goldberg, J. B., W. L. Gorman, J. L. Flynn und D. E. Ohman.** 1993. A mutation in *algN* permits trans activation of alginate production by *algT* in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **175(5)**: 1303-1308
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke, und D. H. Nies.** 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J. Biol. Chem.* **274(37)**: 26065-70.
- Gong, S., S. W. Bearden, V. A. Geoffroy, J. D. Fetherston, R. D. Perry.** 2001. Characterization of the *Yersinia pestis* YfuABC inorganic iron transport system. *Infect. Immun.* **69(5)**: 2829-2837
- Gorham, H. C., S. J. McGowan, P. R. Robson, und D. A. Hodgson.** 1996. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol. Microbiol.* **19(1)**: 171-86.
- Goris, J., P. De Vos, D Janssens, M. Mergeay und P. Vandamme.** 2001. Polyphasic taxonomic study of *Ralstonia eutropha*-like strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (eingereicht).
- Grass, G.** 2000. Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Grass, G. und C. Rensing.** 2001a. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183(6)**: 2145-2147
- Grass, G. und C. Rensing.** 2001b CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286(5)**: 902-908
- Grass, G., C. Grosse und D. H. Nies.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* **182(5)**: 1390-8.
- Grass, G., S. Kühnemund, K. Sutter, S. Menge, G.-J. Krauß, B. Fricke, und D. H. Nies.** 2001a. Signal transduction pathway involved in regulation of the *cnr* cobalt/nickel resistance determinant from *Ralstonia metallidurans* CH34. In Vorbereitung
- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies und C. Rensing.** 2001b. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183(15)**: 4664-4667

- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, K. Lemke, H. G. Schlegel und C. Rensing.** 2001c. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J. Bacteriol.* **183(9)**: 2803-2807
- Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith und C. Rensing.** 2001d. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* Eingereicht
- Große, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Lucke und D. H. Nies.** 2001. How does *Ralstonia metallidurans* regulate metal homeostasis at high concentrations? In Vorbereitung.
- Große, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. Navarrette-Santos, B. Lawley, N. L. Brown, und D. H. Nies.** 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **181(8)**: 2385-93.
- 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
- Guan, L., M. Ehrmann, H. Yoneyama und T. Nakae.** 1999. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **274(15)**: 10517-10522.
- Guerinot, M. L.** 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 190-198
- Gupta, A., K. Matsui, J.-F. Lo, und S. Silver.** 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* **5(2)**: 183-188.
- Hagman, K. E., C. E. Lucas, J. T. Balthazar, L. Snyder, M. Nilles, R. C. Judd und W. M. Shafer.** 1997. The MtrD protein of *Neisseria gonorrhoeae* is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system. *Microbiology* **143(Pt 7)**: 2117-2125
- Hagman, K.E., W.Pan, B. G. Spratt, J. T. Balthazar, R. C. Judd und W. M. Shafer.** 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the MtrRCDE efflux system. *Microbiology* **141(Pt 3)**: 611-622
- Hassan, M. T., D. van der Lelie, D. Springael, U. Romling, N. Ahmed und M. Mergeay.** 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238(2)**: 417-25.
- Henderson, P. J., C. K. Hoyle und A. Ward.** 2000. Expression, purification and properties of multidrug efflux proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **28(4)**: 513-517
- Hess, H. H. und J. E. Lees.** 1978. Water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal. Biochem.* **85**: 295-300.
- Hobman, J. L. und N. L. Brown.** 1996. Overexpression of MerT, the mercuric ion transport protein of transposon Tn501, and genetic selection of mercury hypersensitivity mutations. *Mol. Gen. Genet.* **250(1)**: 129-134
- Hoch, A. und T. J. Silhavy.** 1995. Two component signal transduction. Washington, DC, American Society for Microbiology Press

- Hofmann, T.** 2001. Untersuchung der Regulation der Schwermetallresistenz in *Ralstonia metallidurans* CH34 durch Zweidimensionale Gelelektrophorese und Reporterfusionen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Huang, L. und J. Gitschier.** 1997. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat. Genet.* **17(3)**: 292-297
- Huang, X., M. P. Cuajungco, C. S. Atwood, R. D. Moir, R. E. Tanzi und A. I. Bush.** 2000. Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc. *J. Nutr.* **130(5S Suppl)**: 1488S-92S
- Hughes, K. T. und K. Mathee.** 1998. The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 231-286
- Hultberg, M.** 1998. Rhizobacterial glutathione levels as affected by starvation and cadmium exposure. *Curr. Microbiol.* **37(5)**: 301-305.
- Inoue, Y. und A. Kimura.** 1996. Identification of the structural gene for glyoxalase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271(42)**: 25958-25965
- Jerpseth, B., A. Greener, J. M. Short, J. Viola und P. L. Kretz.** 1993. Strategies **6**: 24.
- Jones, A. L., D. DeShazer und D. E. Woods.** 1997. Identification and characterization of a two-component regulatory system involved in invasion of eukaryotic cells and heavy-metal resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* **65(12)**: 4972-4977
- Kachur, A. V., C. J. Koch und J. E. Biaglow.** 1998. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radic. Res.* **28(3)**: 259-269
- 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
- Kammler, M., C. Schon und K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175(19)**: 6212-6219
- Karlin, S. and Z. Y. Zhu.** 1997. Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14231-14236
- Keasling, J. D. und G. A. Hupf.** 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(2)**: 743-746
- Kim, S. W., S. Joo, G. Choi, H. S. Cho, B. H. Oh und K. Y. Choi.** 1997. Mutational analysis of the three cysteines and active-site aspartic acid 103 of ketosteroid isomerase from *Pseudomonas putida* biotype B. *J. Bacteriol.* **179(24)**: 7742-7747
- Klempa, M. und L. Regan.** 1995. Characterization of metal binding by a designed protein: single ligand substitution at a tetrahedral Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> site. *Biochemistry* **34**: 10094-10100
- 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
- Kumar, R. und R. Prasad.** 1999. Purification and characterization of a major zinc binding protein from renal brush border membrane of rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1419(1)**: 23-32
- Kumar, R. und R. Prasad.** 2000. Functional characterization of purified zinc transporter from renal brush border membrane of rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1509(1-2)**: 429-439

- Kunito, T., T. Kusano, H. Oyaizu, K. Senoo, S. Kanazawa und S. Matsumoto.** 1996. Cloning and sequence analysis of *czc* genes in *Alcaligenes* sp. strain CT14. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60(4)**: 699-704
- Kurland, C. G.** 2000. Something for everyone. Horizontal gene transfer in evolution. *EMBO Rep.* **1(2)**: 92-95
- Kuroda, M., H. Hayashi und T. Ohta.** 1999. Chromosome-Determined Zinc-Responsible Operon *czr* in *Staphylococcus aureus* Strain 912. *Microbiol. Immunol.* **43(2)**: 115-125
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langosch, D.** 1999. Molekular Erkennung zwischen membranständigen Proteindomänen – strukturen und zellbiologischen Aspekten. *Biospektrum* **4(2)**:
- Lange, H., G. Kispal, R. Lill.** 1999. Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274(27)**: 18989-18996
- Lawrence, J.** 1999. Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9(6)**: 642-648
- Lee Y.H., R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, C. A. Hasemann.** 1999. *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat. Struct. Biol.* **6(7)**: 628-633
- Lee, C., P. Li, H. Inouye, E. R. Brickman und J. Beckwith.** 1989. Genetic studies on the inability of beta-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **171(9)**: 4609-4616.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Dervedde, M. Eitinger, und B. Friedrich.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J. Bacteriol.* **176(14)**: 4385-93.
- Li, L. und J. Kaplan.** 1997. Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *J. Biol. Chem.* **272(45)**: 28485-28493
- 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, L. und J. Kaplan.** 2001. The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J. Biol. Chem.* **276(7)**: 5036-5043
- Li, X. Z., L. Zhang, R. Srikumar und K. Poole.** 1998. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(2)**: 399-403
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, und H. G. Schlegel.** 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **175(3)**: 767-78.
- Lonetto, M. A., K. L. Brown, K. E. Rudd, und M. J. Buttner.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91(16)**: 7573-7.

- Lowry, O. H., A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lucke, S.** 2000. Modellierung der Schwermetall-Homöostase in *Ralstonia metallidurans* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Lutsenko, S., K. Petrukhin, M. J. Cooper, C. T. Gilliam und J. H. Kaplan.** 1997. N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatase (the Wilson and Menkes disease protein) bind copper selectively *in vivo* and *in vitro* with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat. *J. Biol. Chem.* **272(30)**: 18939-18944
- 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
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido und J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175(19)**: 6299-6313.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido und J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16(1)**: 45-55
- MacDiarmid, C. W., L. A. Gaither, D. Eide.** 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**: 2845-2855
- Makdessi, K., J. R. Andreesen und A. Pich.** 2001. Tungstate Uptake by a highly specific ABC transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Biol. Chem.* **276(27)**: 24557-24564
- Mandel, M., und A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- Manoil, C.** 1991. Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and  $\beta$ -galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol.* **34**: 61-75.
- Manoil, C. und J. Beckwith.** 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8129-8133.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. Govan, B. W. Holloway, und V. Deretic.** 1993. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(18)**: 8377-81.
- Martinez-Argudo, I., R. M. Ruiz-Vazquez und F. J. Murillo.** 1998. The structure of an ECF-sigma-dependent, light-inducible promoter from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **30(4)**: 883-893
- Mansilla, M. C. und D. de Mendoza.** 2000. The *Bacillus subtilis cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology* **146(Pt 4)**: 815-821
- McClain, M. S., M. C. Hurley, J. K. Brieland und N. C. Engleberg.** 1996. The *Legionella pneumophila hel* locus encodes intracellularly induced homologs of heavy-metal ion transporters of *Alcaligenes* spp. *Infect. Immun.* **64(5)**: 1532-1540
- McGowan, S. J., H. C. Gorham und D. A. Hodgson.** 1993. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region. *Mol. Microbiol.* **10(4)**: 713-735

- Mergeay, M.** 2000. Bacteria adapted to industrial biotopes: Metal-resistant *Ralstonia*. In Bacterial Stress Responses, Kapitel 26, Seiten 403-414. Ed. G. Storz und R. Hengge-Aronis ASM Press Washington DC.
- Mergeay, M., C. Houba und J. Gerits.** 1978. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **86(2)**: 440-442.
- Mergeay, M., D. H. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles und F. van Gijsegen.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a fakultativ chemolithotroph with plasmid bound resistance to heave metals. *J. Bacteriol.* **162**: 328-334.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Miles, E. W.** 1977. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**: 431-442
- Mills, S. D., C. A. Jasalavich, und D. A. Cooksey.** 1993. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **175(6)**: 1656-64.
- Mills, S. D., C. K. Lim, und D. A. Cooksey.** 1994. Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (*cop* box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Gen. Genet.* **244(4)**: 341-51.
- Misra, T. K., N. L. Brown, D. C. Fritzing, R. D. Pridmore, W. M. Barnes, L. Haberstroh und S. Silver.** 1984. Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(19)**: 5975-5979
- Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos, und S. Raina.** 1997. Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol. Microbiol.* **24(2)**: 355-71.
- Miyabe, S., S. Izawa und Y. Inoue.** 2000. Expression of ZRC1 coding for suppressor of zinc toxicity is induced by zinc-starvation stress in Zap1-dependent fashion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276(3)**: 879-884
- Miyabe, S., S. Izawa und Y. Inoue.** 2001. The Zrc1 is Involved in Zinc Transport System between Vacuole and Cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **282**: 79-83
- Mizuno, T.** 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4(2)**: 161-168
- Mizuno, T., T. Kaneko und S. Tabata.** 1996. Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res.* **3(6)**: 407-414
- Moeck, G. S., J. W. Coulton und K. Postle.** 1997. Cell envelope signaling in *Escherichia coli*. Ligand binding to the ferrichrome-iron receptor *fhua* promotes interaction with the energy-transducing protein TonB. *J. Biol. Chem.* **272(45)**: 28391-28397

- Moncrief, M. B. C. und M. E. Maguire.** 1999. Magnesium transport in prokaryotes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4(5)**: 523-527
- Morby, A. P., J. L. Hobman und N. L. Brown.** 1995. The role of cysteine residues in the transport of mercuric ions by the Tn501 MerT and MerP mercury-resistance proteins. *Mol. Microbiol.* **17(1)**: 25-35
- Morita, Y., A. Kataoka, S. Shiota, T. Mizushima und T. Tsuchiya.** 2000. NorM of *vibrio parahaemolyticus* is an Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **182(23)**: 6694-6697
- Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten, T. V. O'Halloran.** 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182(20)**: 5864-5871
- 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
- Nakajima, A., Y. Sugimoto, H. Yoneyama und T. Nakae.** 2000. Localization of the outer membrane subunit OprM of RND-family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **275(39)**: 30064-30068.
- Navarro, C., L. F. Wu und M. A. Mandrand-Berthelot.** 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol. Microbiol.* **9(6)**: 1181-1191.
- Nelson, D. L., und E. P. Kennedy.** 1971. Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J. Biol. Chem.* **246(9)**: 3042-9.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley, und S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28(3)**: 239-42.
- Nies, D. H.** 1992a. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid* **27**: 17-28
- Nies, D. H.** 1992b. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **174(24)**: 8102-8110.
- Nies, D. H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51(6)**: 730-750.
- Nies, D. H.** 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* **4(2)**: 77-82.
- Nies, D. H. und N. L. Brown.** 1998. Two-component systems in regulation of heavy metal resistance. *Metal ions in gene regulation*. S. Silver und W. Walden. Chapman & Hall, London, England: p. 77-103
- Nies, D., M. Mergeay, B. Friedrich, und H. G. Schlegel.** 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **169(10)**: 4865-8.
- Nies, A., D. H. Nies, und S. Silver.** 1989a. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171(9)**: 5065-70.
- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu, und S. Silver.** 1989b. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(19)**: 7351-5.

- Nies, D. H. und S. Silver.** 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171(2)**: 896-900.
- Nies, A., D. H. Nies, und S. Silver.** 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **265(10)**: 5648-53.
- Nies, D. H.** 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177(10)**: 2707-2712.
- Nies, D. H. und S. Silver.** 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14(2)**: 186-199.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178(20)**: 5853-5859.
- Nikaido, H. und M. H. Saier, Jr.** 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258(5084)**: 936-942.
- Nishimura, K., K. Igarashi und Y. Kakinuma.** 1998. Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180(7)**: 1962-1964
- Odermatt, A., H. Suter, R. Krapf, M. Solioz.** 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **268(17)**: 12775-12779
- Ogawa, N., C. M. Tzeng, C. D. Fraley und A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* **182(23)**: 6687-6693
- O'Halloran, T. und C. Walsh.** 1987. Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the *merR* gene: isolation and characterization. *Science* **235(4785)**: 211-214
- Ortiz, D. F., L. Kreppel, D. M. Speiser, G. Scheel, G. McDonald und 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
- Outten, C. E. und T. V. O'Halloran.** 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292(5526)**: 2488-2492
- Paget, M. S., E. Leibovitz, und M. J. Buttner.** 1999. A putative two-component signal transduction system regulates sigmaE, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **33(1)**: 97-107.
- Paidhungat, M. und S. Garrett.** 1998. Cdc1 and the vacuole coordinately regulate Mn<sup>2+</sup> homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148(4)**: 1787-1798
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto und M. Miyano.** 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289(5480)**: 739-745
- Palmiter, R. D. und 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 und 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. Quaife und S. D. Findley.** 1996b. ZnT3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14934-14939
- Park, M. H., B. B. Wong und J. E. Lusk.** 1976. Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: genetics and physiology. *J. Bacteriol.* **126(3)**: 1096-1103
- Parkinson, J. S. und E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112
- Patzer, S. I. und K. Hantke.** 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28(6)**: 1199-1210
- Patzer, S. I. und K. Hantke.** 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275(32)**: 24321-24332
- Paulsen, I. T. und M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156(2)**: 99-103.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown und R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60(4)**: 575-608.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi und M. H. Saier Jr.** 1998. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **156(1)**: 1-8
- Peitzsch, N.** 1999. Der Chromatstoffwechsel des schwermetallresistenten Bakteriums *Alcaligenes eutrophus* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Pena, M. M., J. Lee und D. J. Thiele.** 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* **129(7)**: 1251-1260
- Persans, M. W., K. Nieman und D. E. Salt.** 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98(17)**: 9995-10000
- Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* **100**: 197-206.
- Poole, K., K. Krebes, C. McNally, und S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175(22)**: 7363-72.
- Pribyl, T.** 2001. Topologie des CzcCBA-Effluxkomplexes aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Prossnitz, E., K. Nikaido, S. J. Ulbrich und G. F. Ames.** 1988. Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **263(34)**: 17917-17920.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57(1)**: 50-108.
- Que Q, und J. D. Helmann.** 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* **35(6)**: 1454-1468

- Rabilloud, T., G. Carpentier, und P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9(6)**: 288-91.
- Raina, S., D. Missiakas, und C. Georgopoulos.** 1995. The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14(5)**: 1043-55.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy und A. Segura.** 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **180(13)**: 3323-3329
- Ramsay, L. M. und G. M. Gadd.** 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol. Lett.* **152(2)**: 293-298
- Rasmussen, B.** 2000. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature* **405(6787)**:676-679
- Rech, S., C. Wolin und R. P. Gunsalus.** 1996. Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271(5)**: 2557-2562
- Reddy, Y. V. und D. N. Rao.** 1998. Probing the role of cysteine residues in the EcoP15I DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273(37)**: 23866-23876
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, und B. P. Rosen.** 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(2)**: 652-6.
- Rensing, C., M. Ghosh und B. P. Rosen.** 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J. Bacteriol.* **181(19)**: 5891-5897.
- Rensing, C., B. Mitra und B. P. Rosen.** 1997b. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(26)**: 14326-14331.
- Rensing, C., B. Mitra und B. P. Rosen.** 1998. A Zn(II)-translocating P-type ATPase from *Proteus mirabilis*. *Biochem. Cell Biol.* **76(5)**: 787-790
- Rensing, C., T. Pribyl und D. H. Nies.** 1997a. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* **179(22)**: 6871-6879.
- Rimon, A., Y. Gerchman, Y. Olami, S. Schuldiner und E. Padan.** 1995. Replacements of histidine 226 of NhaA-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*. Cysteine (H226C) or serine (H226S) retain both normal activity and pH sensitivity, aspartate (H226D) shifts the pH profile toward basic pH, and alanine (H226A) inactivates the carrier at all pH values. *J. Biol. Chem.* **270(45)**: 26813-26817
- Rodrigue, A., Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean und M. Foglino.** 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* **8(11)**: 498-504
- Rogers, E. E., D. J. Eide und M. L. Guerinot.** 2001. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97(22)**: 12356-12360
- Rolfs, A. und M. A. Hediger.** 1999. Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications. *J. Physiol.* **518(Pt 1)**: 1-12
- Rosen, B. P.** 1986. Recent advances in bacterial ion transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 263-286
- Roszbach, S., M. L. Kukuk, T. L. Wilson, S. F. Feng, M. M. Pearson und M. A. Fisher.** 2000. Cadmium-regulated gene fusions in *Pseudomonas fluorescens*. *Environ. Microbiol.* **2(4)**: 373-382

- Rouch, D. A. und N. L. Brown.** 1997. Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiology* **143**(Pt 4): 1191-1202
- Rouviere, P. E., A. De Las Penas, J. Mecsas, C. Z. Lu, K. E. Rudd und C. A. Gross.** 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**(5): 1032-1042
- Saier, M. H., Jr.** 1998. Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv. Microb. Physiol.* **40**: 81-136
- Saier, M. H., Jr.** 2000. Vectorial Metabolism and the Evolution of Transport Systems. *J. Bacteriol.* **182**(18): 5029-5035.
- Saier, M. H., Jr, J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng und P. S. Virk.** 1999b. The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**(2): 257-279
- Saier, M. H., Jr., B. H. Eng, S. Fard, J. Garg, D. A. Haggerty, W. J. Hutchinson, D. L. Jack, E. C. Lai, H. J. Liu, D. P. Nusinew, A. M. Omar, S. S. Pao, I. T. Paulsen, J. A. Quan, M. Sliwinski, T. T. Tseng, S. Wachi und G. B. Young.** 1999a. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta.* **1422**(1): 1-56
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer und J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11**(5): 841-847.
- Saito, K., H. Yoneyama und T. Nakae.** 1999. *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**(1): 67-72
- Saito, T., K. Takahashi, N. Nakagawa, T. Hosokawa, M. Kurasaki, O. Yamanoshita, Y. Yamamoto, H. Sasaki, K. Nagashima und H. Fujita.** 2000. Deficiencies of hippocampal Zn and ZnT3 accelerate brain aging of Rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**(2): 505-11
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, und A. R. Coulson.** 1977. DNA-Sequencing with chain terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5463-5467.
- Schägger, H., G. von Jagow.** 1987. Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379
- Schiavo, G., O. Rossetto, A. Santucci, B. R. DasGupta und C. Montecucco.** 1992. Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J. Biol. Chem.* **267**(33): 23479-23483
- Schmidt, T., und H. G. Schlegel.** 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* **176**(22): 7045-54.
- Schroers, A., A. Burkovski, H. Wohlrab und R. Kramer.** 1998. The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J. Biol. Chem.* **273**(23): 14269-14276

- Schüler, D.**, 2000. Die Biomineralisation von magnetischen Nanokristallen in magnetotaktischen Bakterien. *Biospektrum* **6(6)**: 445-449
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork und C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5857.
- Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting und P. Bork.** 2000. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucl. Acids Res.* **28**: 231-234.
- Schwuchow, T.** 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martinez-Salazar, J. C. Boucher und V. Deretic.** 1996. Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **178(16)**: 4997-5004
- 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
- Shriver, Z., Y. Hu und R. Sasisekharan.** 1998. Heparinase II from *Flavobacterium heparinum*. Role of histidine residues in enzymatic activity as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **273(17)**: 10160-10167
- Siddiqui, R. A., H. G. Schlegel, und M. Mayer.** 1988. Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J. Bacteriol.* **170**: 4188-4193.
- Siddiqui, R. A., K. Benthin, und H. G. Schlegel.** 1989. Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* **171**: 5071-5078.
- Silver, S. und L. T. Phung.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- Simon, R., U. Prierer, und A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Skare, J. T., B. M. Ahmer, C. L. Seachord, R. P. Darveau und K. Postle.** 1993. Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J. Biol. Chem.* **268(22)**: 16302-16308.
- Smith, R. L., und M. E. Maguire.** 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol. Microbiol.* **28(2)**: 217-26.
- Smith, R. L., L. J. Thompson und M. E. Maguire.** 1995. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg<sup>2+</sup> transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol.* **177**:1233-1238
- Snavely, M. D., J. B. Florer, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Mg<sup>2+</sup> transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *J. Bacteriol.* **171(9)**: 4761-4766

- Snavely, M. D., S. A. Gravina, T. T. Cheung, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1991a. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression. *J. Biol. Chem.* **266(2)**: 824-829
- Snavely, M. D., C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1991b. The *mgtB* Mg<sup>2+</sup> transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **266(2)**: 815-823
- Solioz, M. und A. Odermatt.** Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **270(16)**: 9217-9221
- Solioz, M. und C. Vulpe.** 1996. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* **21(7)**: 237-241.
- Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Srikumar, R., C. J. Paul und K. Poole.** 2000. Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-*oprM* multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182(5)**: 1410-1414
- Stock, J. B., A. M. Stock und J. M. Mottonen.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* **344(6265)**: 395-400
- Stöckel, J., J. Safar, A. C. Wallace, F. E. Cohen und S. B. Prusiner.** 1998. Prio protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry* **37**:7185-7193)
- Sturr, M. G., A. J. Ablooglu und T. A. Krulwich.** 1997. A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cations. *Gene* **188(1)**: 91-94
- Suzuki, M. und J. D. Gitlin.** 1999. Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatr. Int.* **41(4)**: 436-442
- Szomolanyi, E., A. Kiss und P. Venetianer.** 1980. Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli*. *Gene* **10(3)**: 219-225.
- Tabor, S.** 1990. Expression using the T7 RNA polymerase/promotor system. In Current protocols in molecular biology, Chap. 16.2. Ed. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith and K. Struhl. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Tabor, S. und C. C. Richardson.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.
- Taghavi, S., M. Mergeay, und D. van der Lelie.** 1997. Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid* **37(1)**: 22-34.
- Taglicht, D., E. Padan und S. Schuldiner.** 1993. Proton-sodium stoichiometry of NhaA, an electrogenic antiporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268(8)**: 5382-5387
- Tao, T., P. F. Grulich, L. M. Kucharski, R. L. Smith and M. E. Maguire.** 1998. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: biphasic magnesium and time dependence of transcription of the *mgtA* and *mgtCB* loci. *Microbiology.* **144**: 655-664
- Tartof, K. D. und C. A. Hobbs.** 1987. Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**: 2.

- Tibazarwa, C., S. Wuertz, M. Mergeay, L. Wyns und D. van der Lelie.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J. Bacteriol.* **182(5)**: 1399-409.
- Townsend, D. E., A. J. Esenwine, J. George 3rd, D. Bross, M. E. Maguire und R. L. Smith.** 1995. Cloning of the *mgtE* Mg<sup>2+</sup> transporter from *Providencia stuartii* and the distribution of *mgtE* in gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **177(18)**: 5350-5354
- Toyoshima, C., M. Nakasako, H. Nomura und H. Ogawa.** 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405(6787)**: 647-655
- Tsai, K. J., K. P. Yoon und A. R. Lynn.** 1992. ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174(1)**: 116-121
- Tseng, H. C. und C. W. Cheng.** 1991. A cloned *ompR*-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melC1*, a putative copper-transfer gene. *Mol. Microbiol.* **5**: 1187-1196
- Tseng, T.-T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, und M. H. Saier, Jr.** 1999. The RND Permease Superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1(1)**: 107-125.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron und I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect. Immun.* **64(11)**: 4549-4556
- Turner, J. S., A. P. Morby, B. A. Whitton, A. Gupta, und N. J. Robinson.** 1993. Construction of Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J. Biol. Chem.* **268(6)**: 4494-8.
- Turner, J. S. und N. J. Robinson.** 1995. Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. *J. Ind. Microbiol.* **14(2)**: 119-125.
- Ullmann, A.** 1984. One-step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene* **29(1-2)**: 27-31.
- Vallee, B. L. und D. S. Auld.** 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29(24)**: 5647-5659
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay, und D. H. Nies.** 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **23(3)**: 493
- 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 Geest, M. und J. S. Lolkema.** 2000. Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(1)**: 13-33.
- van Veen, H. W., T. Abee, G. J. Kortstee, W. N. Konings und A. J. Zehnder.** 1994. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33(7)**: 1766-1770

- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, A. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, X. Zhu. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-1351
- Vert, G., J. F. Briat und C. Curie. 2001. *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J.* 26(2): 181-189

- Vogelstein, B. und D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 615-619.
- Walsh, C. T., M. D. Distefano, M. J. Moore, L. M. Shewchuk und G. L. Verdine.** 1988. Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *FASEB J.* **2(2)**: 124-130
- Wang, W., A. A. Guffanti, Y. Wei, M. Ito und T. A. Krulwich.** 2000. Two types of *Bacillus subtilis tetA(L)* deletion strains reveal the physiological importance of TetA(L) in K<sup>(+)</sup> acquisition as well as in Na<sup>(+)</sup>, alkali, and tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* **182(8)**: 2088-2095
- Weast, R. C., M. J. Astle and W. H. Beyer.** 1984. CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- Weber, K., und M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244(16)**: 4406-12.
- West, I. C.** 1997. Ligand conduction and the gated-pore mechanism of transmembrane transport. 1997. *Biochim. Biophys. Acta* **1331(3)**: 213-234
- West, A. H. und A. M. Stock.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26(6)**: 369-376
- Westenberg, D. J. und M. L. Guerinot.** 1997. Regulation of bacterial gene expression by metals. *Adv. Genet.* **36**: 187-238.
- Wilson, J. R., C. Leang, A. P. Morby, J. L. Hobman und N. L. Brown.** 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett.* **472(1)**: 78-82.
- Woody, R. W.** 1995. Circular dichroism. *Methods Enzymol.* **246**: 34-71
- Wu L.F., C. Navarro, M. A. Mandrand-Berthelot.** 1991. The hydC region contains a multicistronic operon (*nik*) involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene* **107(1)**: 37-42
- Wunderli-Ye, H. und M. Solioz.** 2001. Purification and functional analysis of the copper ATPase CopA of *Enterococcus hirae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280(3)**: 713-719
- Wyckoff, T. J. und C. R. Raetz.** 1999. The active site of *Escherichia coli* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. Chemical modification and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **274(38)**: 27047-27055
- Xiong, A. und 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
- Xie, Z. D., C. D. Hershberger, S. Shankar, R. W. Ye, und A. M. Chakrabarty.** 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* **178(16)**: 4990-6.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yerushalmi, H., M. Lebendiker und S. Schuldiner.** 1996. Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271(49)**: 31044-31048

- 
- 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
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285(1)**: 409-420.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37(2)**: 219-225.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. D. H. Nies. Ich danke Ihnen für das in mich gesetzte Vertrauen, für die Möglichkeit, in einem guten Team arbeiten zu dürfen und die Chance, meine wissenschaftlichen Ideen selbstständig in die Tat umzusetzen, egal wie absurd sie auch im ersten Augenblick manchmal wirkten. Ich danke für die vielen Diskussionen und die konstruktive Kritik, die gemischt mit viel Hirnschmalz doch oft zum Erfolg führten.

Ich danke dem Institut für Mikrobiologie, besonders Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen und Dr. B. Söhling, für das Vertrauen in Bezug auf unsere Rechner und unsere Internetseiten, auch wenn ich mich im letzten Jahr nur noch sehr sporadisch um sie kümmern konnte.

Auch das Graduiertenkolleg „Stress“ hat seinen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit erbracht. Neben der jahrelangen finanziellen Unterstützung danke ich Prof. Dr. G.-J. Krauß hauptsächlich für die Möglichkeit, an vielen Tagungen teilnehmen zu können und dafür, dass ich eine interessante Truppe von Doktoranden kennen lernen durfte.

Neben den stressigen Tagen im Labor 314 gab es auch heitere. Viele entscheidende Ergebnisse basieren auf Arbeiten ehemaliger Mitarbeiter. Deshalb gilt mein besonderer Dank auch Astrid, Gregi, Grit, Nicki, Martina, Thomas, Tanja und Conny, die viel Geduld und Herzblut in die Etablierung von Methoden und wissenschaftlichen Erkenntnissen investiert haben, auf die ich zurückgreifen konnte.

Meinem alten Banknachbarn Thomas danke ich für die viele Hilfe, gerade als ich noch völlig ohne Orientierung durch die Labore streifte. Deine gesunde Skepsis hat mich oft dazu gebracht, ein Ergebnis doch noch einmal zu hinterfragen.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Nies (Antje, Sylvia, Monique, Annett, Susi und Conny) für ein angenehmes und kreatives Arbeitsklima.

Für den Flug über den großen Teich und die Möglichkeit, sechs Wochen das gelobte Land aller Wissenschaftler mal live erleben zu dürfen, danke ich Dr. Gregor Grass und Prof. Dr. Christopher Rensing vom *Department for Soil, Water and Environmental Science* der *University of Arizona/Tucson*. Diese Reise hat viele Eindrücke in mir hinterlassen, meinem Blick für das wissenschaftliche Arbeiten geschärft und sicherlich einige der entscheidendsten Fortschritte für diese Promotionsarbeit erbracht.

Mein Dank gilt natürlich auch Erik und Dr. Stefan König, die mir viele Tipps und Ratschläge gaben, wenn es um die Proteinbiochemie von CzcD ging. Vielen Dank für viele fruchtbare Diskussionen und für die Hilfe bei der Kristallisation, beim Crosslinking, bei der Röntgenkleinwinkelstreuung ...

Auch wenn ich versprochen hatte, mehrere Seiten mit meiner Dankbarkeit gegenüber Antje zu füllen, verzichte ich mit Rücksicht auf die bedrohten Regenwälder lieber darauf. Trotzdem kann ich wohl kaum die vielen kleinen und größeren Unterstützungen wieder gutmachen.

Ich danke meinen beiden ehemaligen Diplomanden Susi und Toni, die den Mut hatten, unter meiner Anleitung ihre Diplomarbeit anzufertigen, auch wenn ich eigentlich immer viel zu wenig Zeit für sie hatte.

Nicht vergessen möchte ich Fam. S+S+D Schnock. Danke dafür, dass ich immer bei euch willkommen war und für die vielen kleinen und auch großen Hilfen, egal in welcher Lebenslage.

Mein ganz besonderer Danke gilt Sina, da sie sicherlich einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte. Danke dafür, dass du die notwendige Spannung in mein Leben bringst, mir zeigst, dass es neben CzcD und *Ralstonia metallidurans* auch andere wichtige Dinge gibt und viel Verständnis für meine Arbeit aufbringst. Danke für die Liebe und die Geborgenheit, sie waren ein Ausgleich für die vielen stressigen Situationen und haben mich immer wieder aufgebaut.

Letztendlich möchte ich auch meinen Eltern und meiner „kleinen“ Schwester danken für das Vertrauen, dass ich den richtigen Weg gehe und dass ihr mich zu einem selbstständigen und wissensdurstigen Menschen erzogen habt. Das Wissen, dass ich mich auf meine Familie stützen kann, machte einiges in den letzten Jahren einfacher. Danke.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), September 2001

-----  
Andreas Anton

## Lebenslauf

Name: Andreas Anton

Geburtsdatum: 02.02.1973

Geburtsort: Erfurt

Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1979-08/1989 Polytechnische Oberschule „Anton Saefkow“ in Sondershausen  
Abschluss mit dem Prädikat „sehr gut“

09/1989-06/1991 Erweiterte Oberschule „Geschwister Scholl“ in Sondershausen  
Abitur mit dem Prädikat „sehr gut“

Wehrdienst:

07/1991-06/1992 Grundwehrdienst als Funker und Feuerleitsoldat im III.  
Feldbeobachtungsartilleriebataillon 701 in Mühlhausen

Studium:

10/1992-10/1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg

08/1996-09/1996 Diplomprüfung in Fächern: Molekularbiologie, Allgemeine  
Mikrobiologie, Biochemie, Enzymologie und Organische  
Chemie

10/1996-06/1997 Diplomarbeit mit dem Titel: „Untersuchung der Struktur des  
CzcD-Proteins aus *Alcaligenes eutrophus* CH34 durch den  
Einsatz von Reporter-gen-Fusionen“  
Abschluss: Diplom-Biochemiker (Prädikat: sehr gut)

Beruf:

seit 10/1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Prof. Dr.  
D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie im Fachbereich  
Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg