

# Die Struktur und Funktion des CDF-Proteins CzcD aus *Cupriavidus metallidurans*

## Dissertation

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

vorgelegt der

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

von Annett Weltrowski  
geb. am 23.03.1977 in Burg

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. H. Nies, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. PD Dr. rer. nat. habil. S. Clemens, Institut für Pflanzenbiochemie Halle
3. Prof. Dr. E. P. Bakker, Universität Osnabrück

Verteidigung am 26.09.06 Halle/Saale

**urn:nbn:de:gbv:3-000010716**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010716>]

**Gehe ganz  
In deinen Handlungen auf  
Und denke,  
es wäre deine letzte Tat.**

Gautama Buddha



2.4.5.1. Sequenzierung unter Verwendung des <i>DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kits</i> (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg i. Br.)	31
2.4.5.2. Das Sequenziergel	32
2.4.5.3. Auswertung der Sequenzdaten	32
<b>2.5. Versuche zum Zellwachstum</b>	32
2.5.1. Wachstumsversuche von <i>E. coli</i> -Stämmen in Flüssigmedien	32
2.5.1.1. Messung der Zelltrübung	32
2.5.1.2. Zellanzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen	33
<b>2.6. Enzymologische Methoden</b>	33
2.6.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Ullmann, 1984)	33
2.6.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte	33
2.6.1.2. Ermittlung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	34
<b>2.7. Proteinbiochemische Methoden</b>	35
2.7.1. Expression und Proteinreinigung über das <i>Strep-tag II® Protein Purification System</i> (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)	35
2.7.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	35
2.7.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Membranproteinfraktionen	35
2.7.1.3. Native Proteinreinigung mittels <i>StrepTactin</i> -Chromatographie	36
2.7.1.4. Gelfiltrationsexperimente	36
2.7.1.5. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	37
2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	38
2.7.2.1. BCA-Test ( <i>Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit</i> ; Sigma GmbH, Osterode)	38
2.7.2.2. Bradford-Proteinbestimmung (Bradford, 1976)	38
2.7.2.3. Proteinbestimmung von Membranproteinen (verändert nach Lowry <i>et al.</i> , 1951)	39
2.7.2.4. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm	40
2.7.3. Konzentrieren von Proteinlösungen	40
2.7.4. Elektrophoretische Methoden	40
2.7.4.1. Probenvorbereitung	40
2.7.4.2. Proteinmarker	41
2.7.4.3. Lineare SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)	41
2.7.4.4. Native PAGE	42
2.7.4.5. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)	42
2.7.4.6. <i>Strep-tag II®</i> -Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)	43
2.7.4.7. Proteinnachweis durch Immunopräzipitation auf PVDF-Membranen (Blake <i>et al.</i> , 1984)	43
2.7.5. Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	45
2.7.5.1. Coomassie-Färbung von Proteinen (verändert nach Weber und Osborn, 1969)	45
2.7.5.2. Silberfärbung (Rabilloud <i>et al.</i> , 1988; Nesterenko <i>et al.</i> , 1994)	45
2.7.5.3. Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	46
2.7.6. Massenspektrometrie	46
<b>2.8. Transportstudien</b>	46
2.8.1. Aufnahmeexperimente mit dem radioaktiven Isotop $^{65}\text{Zn}$ in ganzen Zellen (Rosen, 1986; Nies und Silver, 1989)	46
2.8.2. Aufnahmeexperimente mit radioaktivem $^{55}\text{Fe}$ in ganzen Zellen (nach Kammler, 1993)	47
2.8.3. Transportstudien mit radioaktiven Isotopen in <i>inside out vesicles</i>	48
2.8.3.1. Präparation von <i>inside out vesicles</i>	48
2.8.3.2. Transportexperimente mit <i>inside out vesicles</i>	49
2.8.4. Rekonstitution von CzcD in Proteoliposomen und Transportstudien	50

2.8.4.1. Reinigung von CzcD	50
2.8.4.2. Rekonstitution von CzcD in Proteoliposomen	50
2.8.4.3. Fluoreszenzmessung des Zink- und Eisentransportes von CzcD in Proteoliposomen	50
<b>2.9. Röntgenkleinwinkelstreuung</b>	51
<b>2.10. Kristallisation von CzcD und dessen zytoplasmatischer Domäne</b>	52
<b>3. Ergebnisse</b>	54
<b>3.1. Die Regulation von <i>czcD</i> in <i>Cupriavidus metallidurans</i></b>	54
<b>3.2. Quantifizierung der Transkription von <i>czcD</i> durch <i>real-time</i>-RT-PCR</b>	58
3.2.1. Die Transkription von <i>czcD</i> wird durch Zn(II) induziert	58
<b>3.3. Die Transportaktivität von CzcD</b>	60
3.3.1. CzcD zeigt Cobalt-Resistenz im cobaltsensitiven <i>Escherichia coli</i> -Stamm ECA349	60
3.3.2. CzcD zeigt in <i>inside out vesicles</i> eine Transportaktivität für Zink, Cobalt und Cadmium	61
3.3.3. CzcD kann in Proteoliposomen rekonstituiert werden und zeigt Transportaktivität für Zink und Eisen	63
<b>3.4. Zink- und Cobalt-Wachstumsversuche mit Aminosäureaustausch-Mutanten   von CzcD</b>	65
3.4.1. Der einzige Cystein-Rest ist notwendig für die Funktion von CzcD	67
3.4.2. Der Einfluss der Glutamat-Reste der TMH I und TMH V	68
3.4.3. Aspartat-Reste innerhalb der TMHs II, V und VI sind in der Schwermetall- Homöostase beteiligt	70
3.4.4. Die Histidin-Reste in CzcD sind wahrscheinlich am Metalltransport beteiligt	74
3.4.5. Das CzcD-Derivat CzcD <sub>M50L</sub> hat Einfluss auf die Schwermetallresistenz von CzcD	77
<b>3.5. Biochemische Charakterisierung von CzcD</b>	78
3.5.1. Mittels des <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> -Systems kann CzcD nur als heterogenes Protein gereinigt werden	78
3.5.2. Nach Behandlung mit NaCl und EDTA liegt CzcD in dissoziierter Form vor	80
3.5.3. CzcD aggregiert während der Solubilisierung	82
3.5.4. Fos-Choline 14 ist ein geeignetes Detergenz um CzcD zu solubilisieren	83
<b>3.6. Kristallisationsexperimente</b>	85
3.6.1. Kristallisation von CzcD	85
3.6.2. Kristallisation der zytoplasmatischen Domäne	85
<b>3.7. Röntgenkleinwinkelstreuung mit CzcD und der zytoplasmatischen Domäne   von CzcD</b>	87
<b>4. Diskussion</b>	92
<b>4.1. Die Regulation des CDF-Proteins CzcD</b>	92
<b>4.2. Die Rolle des CDF-Proteins CzcD in der Schwermetall-Homöostase</b>	95
<b>4.3. Die Struktur von CzcD</b>	112
<b>4.4. Ausblick</b>	116
<b>5. Zusammenfassung</b>	118
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	119

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette</i> -Transporter
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bidest	doppelt destilliert (Reinstwasser)
bp	Basenpaar (e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
<i>cat</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase
CCCCP	Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i> (Proteinfamilie)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	<i>counts per million</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxyterminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DRR	<i>downstream regulatory region</i>
DTNB	Di-5,5'-thio-2,2'-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ECF	<i>extracytoplasmic function</i>
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carboimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCCP	Carbonylcyanid (p-trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
G	Guanin
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylat
HME	<i>heavy metal efflux</i> (Proteinfamilie)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid
IRT	<i>iron regulated transporter</i>
JGI	Joint Genome Institute
KE	Kletteinheiten
Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani Medium
LDS	<i>light diffusion scattering</i>

---

M	Molarität
MFP	<i>membrane fusion protein</i> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
MIT	<i>metal inorganic transporter</i> (Proteinfamilie)
MM	Minimalmedium
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Normalität
NA	Nähragar
NAD(P)H	red. Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat)
NB	Nährbouillon
NTP	Nukleosidtriphosphat
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
OMF	<i>outer membrane factor</i> (Proteinfamilie)
ONPG	o-Nitrophenyl-D-galactopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pmf	<i>proton motive force</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RND	<i>resistance, nodulation, cell division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rpr	<i>M13 Reverse Primer</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> -Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGR	Strukturgenregion
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	Terrific Broth
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TMH	Transmembrane Helix
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
upr	<i>M13 universal primer</i>
URR	<i>upstream regulatory region</i>
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

---

X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZIP	ZRT, IRT-ähnliche Proteine
ZnT	<i>zinc transporter</i>
ZRT	<i>zinc regulated transporter</i>

## Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren

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



## **1. Einleitung**

Im Laufe der Evolution sind Lebewesen sich ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Eine Herausforderung für alle Lebewesen ist die Anpassung an hohe Konzentrationen von Schwermetallen. Organismen entwickelten unterschiedliche Mechanismen, um sich vor toxischen Schwermetallionen zu schützen. In geringen Mengen jedoch werden einige Metallkationen vom Organismus als Spurenelemente benötigt. Zink z.B. ist ein wichtiger Cofaktor in Metalloproteinen, ist notwendig für die Synthese von DNA, RNA und Proteinen und beeinflusst den Stoffwechsel von Neurotransmittern (Schorge *et al.*, 2005). Außerdem ist Zink an der Bildung von Wachstums-, Schilddrüsen- und Sexualhormonen beteiligt. In der Bauchspeicheldrüse ist Zink eine essenzielle Komponente für die Insulinspeicherung und -abgabe in sekretorische Vesikel (Chausmer, 1998; Chimienti *et al.*, 2005). Zinkmangel führt bei Kindern zu Wachstums- und Entwicklungsstörungen und zur Schwächung des Immunsystems (Hambidge, 2000). Außerdem kann beim Menschen ein Zinkdefizit zur autosomalen Krankheit *Acrodermatitis enteropathica* führen, wobei Hautschädigungen die Folge sind. Die Ursache ist ein genetischer Defekt des menschlichen Zinktransporters hZIP4 (Wang *et al.*, 2002; Küry *et al.*, 2002).

In Eukaryoten wird Zn(II) über zelluläre Zink-Aufnahmesysteme, die in der Plasmamembran verankert sind, in die Zelle aufgenommen. Diese Zink-Aufnahmesysteme sind Mitglieder der ZIP-Familie (*zinc-regulated transporter and iron-regulated transporter protein*) (Zhao und Eide, 1996a; Zhao und Eide, 1996b; Grotz *et al.*, 1998; Gaither und Eide, 2000; Rogers *et al.*, 2000). Wurden die ZIP-Proteine deletiert und wuchsen die Zellen in Anwesenheit von Zn(II), so wurde in der Hefe und im Menschen die Zink-Aufnahme inaktiviert (Wang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Gitan *et al.*, 1998). Als erster bakterieller Vertreter der ZIP-Familie wurde ZupT aus *Escherichia coli* charakterisiert (Grass *et al.*, 2002). ZupT ist ein konstitutiv exprimiertes Metalltransportsystem mit einer breiten Substratspezifität. Neben Zinkionen können auch Eisen-, Mangan- und Cobaltionen transportiert werden (Grass *et al.*, 2005). Gelangen jedoch zu hohe Konzentrationen an Schwermetallionen ins Zytoplasma, können diese dort toxisch sein. Konzentrationen von 1 mM Zn(II), Co(II), Ni(II) oder Cu(II) wirken im Wildtypstamm *E. coli* W3110 toxisch (Nies, 1999). In der Zelle bilden diese Metalle unspezifische Komplexverbindungen. So können Quecksilber, Cadmium und Silber in der Zelle an Sulfhydryl-Gruppen von Proteinen binden und dadurch ihre enzymatische Aktivität inhibieren. In Gram-negativen Bakterien führen hohe Übergangsmetall-Konzentrationen im Zytoplasma zu oxidativem Stress und durch Bildung freier Radikale sind physiologische

Funktionsstörungen im Organismus die Folge (Nies, 1999). In Pflanzen führte ein Überschuss an Zn(II) zum inhibierten Wurzelwachstum und zur verminderten Photosynthese (Woolhouse *et al.*, 1983). Zwischen Aufnahme und Abgabe der Metallionen muss also ein stetiges Gleichgewicht herrschen. Um eine Vergiftung der Zelle durch toxische Konzentrationen an Metallkationen zu verhindern, können überschüssige Metallionen aus der Zelle bzw. in angrenzende zelluläre Kompartimente durch Efflux abgegeben werden (Kim *et al.*, 2004). Eine essenzielle Rolle spielen dabei die *cation diffusion facilitator* (CDF) Proteine. Die Proteine der CDF-Familie kommen in allen drei Domänen der Lebewesen vor und werden in drei Unterfamilien (Tab.1) eingeteilt (Nies, 2003).

**Tab. 1: Die Subfamilien der CDF-Proteine<sup>1</sup>**

Gruppe	Organismen	Substrate	Beispiele
CDF1	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	<b>Co(II)</b> , Ni(II)	DmeF (Munkelt <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>Zn(II)</b>	MSC2 (Li und Kaplan, 2001; Ellis <i>et al.</i> , 2004)
	Säuger	<b>Zn(II)</b>	ZnT-5, ZnT-7 (Kambe <i>et al.</i> , 2002; Kirschke und Huang, 2003)
CDF2	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	<b>Zn(II)</b> , Co(II), Cd(II)	CzcD (Anton <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Escherichia coli</i>	<b>Zn(II)</b> , Co(II), Cd(II)	ZitB (Grass <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Bacillus subtilis</i>	<b>Zn(II)</b>	CzcD (Guffanti <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>Zn(II)</b> , Ni(II)	AtMTP1 (van der Zaal <i>et al.</i> , 1999; Mäser <i>et al.</i> , 2001; Bloss <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<b>Zn(II)</b>	CDF-1 (Bruinsma <i>et al.</i> , 2002)
CDF3	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	<b>Fe(II)</b> , Zn(II)	FieF (Munkelt <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Escherichia coli</i>	<b>Fe(II)</b> , Zn(II)	FieF (Grass <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	<b>Fe(II)</b>	MamB, MamM (Grünberg <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>Zn(II)</b> , Cd(II)	ZRC1 (Kamizono <i>et al.</i> , 1989; Conklin <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>Co(II)</b>	COT1 (Kamizono <i>et al.</i> , 1989; Conklin <i>et al.</i> , 1994)

<sup>1</sup>Die bevorzugten Substrate, die transportiert werden, sind **dick** hervorgehoben.

Als erster bakterieller Vertreter, der zur Gruppe 1 gehörenden CDF-Proteine, wurde DmeF (*divalent metal efflux*) aus *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Vandamme und Coenye, 2004) [früher *Alcaligenes* (Mergeay *et al.*, 1985), *Ralstonia* (Brim *et al.*, 1999), *Wautersia* (Vanechoutte *et al.*, 2004)] beschrieben. DmeF vermittelt hauptsächlich Co(II)-Resistenz, ist aber auch in der Lage, Ni(II) zu transportieren (Munkelt *et al.*, 2004). Zur Gruppe 1 der CDF-Proteine gehören auch die Zn(II)-transportierenden eukaryotischen Vertreter wie MSC2 (Li und Kaplan, 2001; Ellis *et al.*, 2004) und die Proteine der ZnT-Reihe (*zinc transporter*)

(McMahon und Cousins, 1998; Kambe *et al.*, 2002; Kirschke und Huang, 2003). Ein charakteristisches Merkmal dieser Gruppe ist eine Histidin-reiche Region mit einer möglichen Zink-bindenden Domäne (Paulsen und Saier, 1997), die sich zwischen den transmembranen Helices (TMH) IV und V befindet und die den anderen Unterfamilien fehlt. Das CDF-Protein MSC2 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und vermittelt wahrscheinlich die Aufnahme von Zinkionen in das ER-Lumen (Ellis *et al.*, 2004), ähnlich wie es für ZHF aus *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben wurde (Clemens *et al.*, 2002). In Säugerzellen wurden 10 homologe ZnT-Proteine (ZnT-1 bis ZnT-10) beschrieben (Seve *et al.*, 2004). Kürzlich wurde durch Chimienti *et al.* (2005) ZnT-8 als neuer Zn(II)-Transporter charakterisiert, der in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse exprimiert wird. Dieser Transporter nimmt Zn(II) aus dem Zytoplasma und transportiert es zu den intrazellulären Insulin-Vesikeln. Sequenzvergleiche zwischen dem menschlichen ZnT-8 und dem ZnT-8-Protein anderer Säuger ergab eine 98 %ige Aminosäureidentität (Chimienti *et al.*, 2005). Dieses Beispiel weist darauf hin, dass CDF-Proteine im Laufe der Evolution konserviert geblieben sind. Während die ZnT-Proteine hauptsächlich in den Membranen von unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind, befindet sich das ZnT-3-Protein in der Membran synaptischer Vesikel. Möglicherweise spielt dieses CDF-Protein eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit (Bush, 2003). Dabei aggregiert das Protein  $\beta$ -Amyloid zu sogenannten *Plaques* im Neocortex der Patienten. Der Grund ist eine abnormal hohe Konzentration von Zn(II)-Ionen. Diese erhöhten Zn(II)-Konzentrationen beruhen auf verstärkter Expression des Proteins ZnT-3, wodurch es zu einem stärkeren Einstrom von Zn(II) kommt (Bush, 2003).

Die CDF-Proteine der Gruppe 2 repräsentieren ebenfalls hauptsächlich Zink-Transporter. Sie besitzen eine Histidin-reiche Region am N- bzw. C-Terminus, die möglicherweise an der Metallbindung beteiligt bzw. für die Funktion wichtig ist, und in Größe und Länge variieren kann (Bloss *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). Ein weiteres Merkmal dieser Gruppe ist, dass ihnen die Histidin-reiche Region zwischen TMH IV und V fehlt (Nies, 1992; Grass *et al.*, 2001). Erste Vertreter der Gruppe 2 wurden in Crenarchaeota entdeckt. Dieses Beispiel zeigt, dass sich die CDF-Proteine in der Evolution früh entwickelt haben (Nies, 2003). Zur Unterfamilie 2 gehören ZitB aus *E. coli* und Czcd aus *C. metallidurans*. In *E. coli* konnte der Zn(II)-Transporter ZitB funktionell analysiert werden (Lee *et al.*, 2002). Durch gerichtete Mutagenese konnten in ZitB Aminosäurereste identifiziert werden, die möglicherweise am Zn(II)- bzw. Protonentransport beteiligt sind (Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für CDF-Proteine ist Czcd aus

*C. metallidurans* (Nies, 1992; Anton *et al.*, 1999). CzcD ist ebenfalls wie ZitB aus *E. coli* in der Lage Zn(II), Co(II) und Cd(II) zu transportieren (Anton *et al.*, 1999). CzcD weist die für CDF-Proteine typischen sechs transmembranen  $\alpha$ -Helices auf (Paulsen und Saier, 1997; Anton *et al.*, 1999). Das Protein besitzt eine hydrophobe membrangebundene Domäne mit 200 Aminosäuren und eine hydrophile Region, die mit 115 Aminosäuren im Zytoplasma lokalisiert ist. Sowohl der N-, als auch der C-Terminus des Proteins befinden sich im Zytoplasma der Zelle (Anton *et al.*, 1999). Mit der Zeit konnte die Funktionsweise und Struktur von CDF-Proteinen aufgeklärt werden. Als erster Vertreter in Pflanzen, der zur Gruppe 2 gehörenden CDF-Proteine zählt AtMTP1 (*metal tolerance protein*) (früher ZAT) aus *Arabidopsis thaliana* (Van der Zaal *et al.*, 1999; Mäser *et al.*, 2001; Bloss *et al.*, 2002). Kobae *et al.* (2004) zeigten in *A. thaliana* den Transport von überschüssigen Zn(II)-Ionen durch AtMTP1 in die Vakuole. Dadurch kann die Pflanze die Zink-Homöostase innerhalb der Zelle aufrechterhalten.

Zur Unterfamilie 3 gehören unter anderem die Fe(II)-transportierenden Proteine FieF (*ferrous iron efflux*) aus *E. coli* und das vom Chromosomen kodierte CDF-Protein FieF aus *C. metallidurans* (Munkelt *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2005). In *Magnetospirillum gryphiswaldense*, einem magnetotaktischen Bakterium, wurde der Fe(II)-Transport durch die CDF-Proteine MamB, das an der Biosynthese der Magnetosomen beteiligt ist, und MamM gezeigt (Grünberg *et al.*, 2001; Schüler, 2004). In diesen Transportern fehlen die Histidinreichen Regionen. Jedoch sind die konservierten Histidine, die sich in den TMHs befinden, auch in dieser Gruppe vorhanden.

Nicht nur in Bakterien konnte der Transport von Fe(II) gezeigt werden, sondern auch in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* durch MMT1 und MMT2 (Li und Kaplan, 1997). Zur Unterfamilie 3 gehören nicht nur Fe(II)-transportierende CDF-Proteine, sondern auch Zn(II)- und Co(II)-Transporter. Die ersten eukaryotischen Metalltransporter wurden mit ZRC1 (*zinc resistance conferring*) und COT1 (Zink/Cobalt-Transporter) in *S. cerevisiae* beschrieben (Kamizono *et al.*, 1989; Conklin *et al.*, 1994). Wenn Zink über die ZIP-Transporter ZRT1 und ZRT2 in das Zytoplasma der Hefezelle gelangt, wird es dort an Metalloproteine gebunden oder in die Zellorganellen, wie z.B. den Mitochondrien, transportiert (MacDiarmid *et al.*, 2000). Mit ZRC1 und COT1 kann *S. cerevisiae* den Transport von überschüssigem Zink in die Vakuole steuern, es dort speichern und somit den Zinkhaushalt in der Zelle aufrechterhalten (MacDiarmid *et al.*, 2000; MacDiarmid *et al.*, 2002). Die CDF-Proteine ZRC1 und COT1 sind demnach für die intrazelluläre Kompartimentierung von Zinkionen innerhalb der Zelle notwendig. Anhand der genannten Beispiele wird die Bedeutung von

CDF-Proteinen deutlich. CDF-Proteine können in einem Organismus mit verschiedenen Funktionen in unterschiedlichen Organellen vorkommen. In den Kompartimenten sind sie verantwortlich für den Metall-Transport, die Speicherung und die Entgiftung.

Nicht nur die divalenten Kationen Cd(II), Co(II), Zn(II) oder Fe(II) sind bekannte Substrate der CDF-Proteine. Das Substratspektrum konnte um Mangan erweitert (Pittmann, 2005) und der Transport erstmalig in dem vakuolären Transporter ShMTP1 aus *Stylosanthes hamata* gezeigt werden (Delhaize *et al.*, 2003). Die Energetisierung der Metallkationen erfolgt für die meisten CDF-Proteine durch einen Protonengradienten im Antiport zum Kation. Durch *everted membrane vesicles* konnte der aktive Transport von radioaktiven Zn(II)-Ionen durch FieF und ZitB aus *E. coli* nachgewiesen werden (Grass *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2004). In *Bacillus subtilis* hingegen wird der aktive Efflux von Zn(II) im Zusammenhang mit einem  $K^+/H^+$ -Gradienten diskutiert (Guffanti *et al.*, 2002). Die Proteine der CDF-Familie sind somit in der Lage, Kationen aus dem Zytoplasma ins Periplasma zu exportieren (Grass *et al.*, 2005; Guffanti *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

Neben dem "Fühlen" der Metallkonzentration im Inneren der Zelle sind CDF-Proteine in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu regulieren. Das CDF-Protein CDF-1 des Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurde als positiver Regulator des Ras/Raf-Signalweges beschrieben (Bruinsma *et al.* 2002). CDF-1 spielt dabei eine Rolle in der biologischen und enzymatischen Aktivierung von Raf-1 (Jirakulaporn und Muslin, 2004) und ist somit indirekt durch die Bindung an Raf-1 bei der Zellteilung und -differenzierung in eukaryotischen Zellen involviert (Yoder *et al.*, 2004). Außerdem wurde CDF-1 als Zn(II)-Exporter beschrieben und ist in der Lage, die intrazelluläre Zink-Konzentration zu senken (Jirakulaporn und Muslin, 2004).

In Eukaryoten regulieren CDF-Proteine hauptsächlich die intrazelluläre Metall-Homöostase. In Prokaryoten hingegen sind sie nur als Metall-Efflux-Systeme bekannt (Nies, 1992; Nies und Silver, 1995; Paulsen und Saier, 1997). Die Zink-Resistenz erhöhte sich, wenn *czcD* in einem zinksensitiven *E. coli*-Stamm exprimiert wurde (Anton, 2001; Anton *et al.*, 2004). Damit ist CzcD aus *C. metallidurans* in der Lage, die intrazelluläre Zn(II)-Konzentration in *E. coli* zu verringern.

*C. metallidurans* gehört zu den Gram-negativen  $\beta$ -Proteobakterien. Es besitzt eine Vielzahl von Resistenz-Systemen gegenüber Schwermetallen (Nies, 2003; Mergeay *et al.*, 2003). Neben der Entgiftung durch CDF-Proteine besitzt *C. metallidurans* noch andere Efflux-Systeme. So konnten durch Legatzki *et al.* (2003) die Schwermetall-transportierenden Zn-CPx-Typ-ATPasen ZntA und CadA beschrieben werden. Diese umfassen ein Substratspektrum von ein- bzw. zweiwertigen Metallkationen. Durch ATP-Hydrolyse werden

die Metallionen aus dem Zytoplasma ins Periplasma transportiert (Rensing *et al.*, 1999; Gatti *et al.*, 2000). Eine weitere Familie sind die *resistance-nodulation-cell division*-Proteine (RND). Der RND-Efflux-Komplex CzcCBA gehört zur Strukturgenregion (SGR) der *czc*-Determinante, die Resistenz gegenüber Cobalt, Zink und Cadmium in *C. metallidurans* vermittelt (Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989, Nies, 2003). Die *czc*-Determinante ist auf dem Megaplasmid pMOL30 (238 kb) (Mergeay *et al.*, 1985) lokalisiert. Zur *upstream regulatory region* (URR) der *czc*-Determinante gehören das membrangebundene Protein CzcN und der periplasmatisch lokalisierte Regulator CzcI. Die Sensorkinase CzcS und der *response*-Regulator CzcR, der an den *czcNp*-Promotor bindet (Grosse *et al.*, 1999) werden von der *downstream regulatory region* (DRR) kodiert und bilden ein Zweikomponentenregulationssystem (Nies und Brown, 1998). Des Weiteren gehören die Gene *czcD*, *czcE*, *czcJ* und *czcP* zur DRR. Weitere Systeme, wie die *chr*-Determinante, die gegenüber Chromat (Juhnke *et al.*, 2002) Resistenz und das *cnr*-Operon, das Resistenz gegenüber Co(II) und Ni(II) (Liesegang *et al.*, 1993; Grass *et al.*, 2000) vermittelt, befinden sich auf dem kleineren Megaplasmid pMOL28 (180kb) (Diels *et al.*, 1985; Taghavi *et al.*, 1997).

Die Grundlagen der Funktion von CzcD aus *C. metallidurans* waren bereits durch Vorarbeiten bekannt (Anton *et al.*, 1999, Anton, 2001; Anton *et al.*, 2004). Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Mechanismus von CzcD biochemisch zu charakterisieren. Mittels Aminosäureaustausch-Mutanten sollten konservierte Aminosäuren identifiziert werden, die an einer möglichen Bindung und dem Transport von Metallkationen beteiligt sind. Der direkte Transport von Übergangsmetallen und kinetische Daten des CzcD-Proteins sollten bestimmt werden. Analysen durch Röntgenkleinwinkelstreuung sollten erste Hinweise auf die Struktur des Proteins geben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bakterienstämme und Plasmide

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

**Tab. 2: Bakterienstämme und Plasmide**

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Cupriavidus metallidurans</i>			
AE104	plasmidfrei		Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE128	pMOL30	<i>czc</i> , <i>mer</i> , <i>cop</i> , <i>pbr</i>	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN182	pMOL30-14	$\Delta czcD$	Anton <i>et al.</i> , 1999
DN178	pMOL30-10	$\Delta czcR$	Große <i>et al.</i> , 1999
DN179	pMOL30-11	$\Delta czcS$	Große <i>et al.</i> , 1999
DN193	pMOL30-24	$\Delta czcDRSE$	Große <i>et al.</i> , 2004
DN191	pMOL30-22	$\Delta czcE$	Große <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i>			
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15</i> , Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Bullock <i>et al.</i> , 1987, Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue MRF <sup>r</sup> Kan	plasmidfrei	$\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15</i> , Tn5 (Kan <sup>r</sup> )]	Jerpseth <i>et al.</i> , 1992, Stratagene GmbH, Heidelberg
XL2-Blue	plasmidfrei	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15</i> , Tn10 (Tet <sup>r</sup> ), Amy, Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene GmbH, Heidelberg
JM83	plasmidfrei	<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , <i>rpsL</i> ( <i>Str<sup>r</sup></i> ), $\phi 80$ , <i>lacZ<math>\Delta</math>M15</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BL21	pLysS	F' <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> , ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>lon<sup>-</sup></i> , <i>gal<math>\lambda</math></i> , DE3, [pLysS, Cam <sup>r</sup> ], Überexpressionsstamm für <i>Strep-tag II<sup>®</sup></i> -System	Stratagene Europe, Amsterdam
S17-1		pro, Tra <sup>+</sup> <i>recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
GG48		$\Delta zitB::cat$ , $\Delta zntA::kan$	Grass <i>et al.</i> , 2001b
GR362		$\Delta zntA::kan$ , $\Delta zntB::cat$ , $\Delta zitB$ , $\Delta zupT$ , $\Delta znuABC$	Grass <i>et al.</i> , 2002
ECA334	plasmidfrei	$\Delta yohM::cat$	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

## Fortsetzung Tab. 2

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
ECA349		$\Delta corA$ , $\Delta zupT::cat$ , $\Delta yohM$	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	<i>lacPOZ'</i> , Klonierungsvektor für PCR- Produkte (Amp <sup>r</sup> )	Promega, Madison (USA)
	pASK-IBA5	Expressionsvektor mit <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> (N-terminal), (Amp <sup>r</sup> )	IBA-GmbH, Göttingen
	pASK-IBA7	Expressionsvektor mit <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> (N- terminal), (Amp <sup>r</sup> )	IBA-GmbH, Göttingen
GG196	plasmidfrei	$\Delta fieF::cat$	Grass <i>et al.</i> , 2005
EC921	pECD723	<i>czcD</i> kloniert hinter Tet-Promotor, Derivat von pASK-IBA5	Anton <i>et al.</i> , 2004
ECA297	pECD922	<i>czcD</i> , C-terminaler Teil (203-316) kloniert hinter Tet-Promotor, Derivat von pASK-IBA7	Diese Arbeit
ECA235	pECD897	<i>czcD</i> Austauschmutante His7Arg, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA236	pECD898	<i>czcD</i> Austauschmutante His49Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA237	pECD899	<i>czcD</i> Austauschmutante His237Arg, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA238	pECD900	<i>czcD</i> Austauschmutante His251Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA239	pECD901	<i>czcD</i> Austauschmutante His280Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA240	pECD902	<i>czcD</i> Austauschmutante His298Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA241	pECD903	<i>czcD</i> Austauschmutante Met50Lys, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA242	pECD904	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp53Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA243	pECD905	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp53Glu, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA244	pECD906	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp158Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA245	pECD907	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp158Glu, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA246	pECD908	<i>czcD</i> Austauschmutante Glu31Lys, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA247	pECD909	<i>czcD</i> Austauschmutante Glu31Asp, Derivat von pECD723	Diese Arbeit



**Fortsetzung Tab. 2**

<b>Stamm</b>	<b>Plasmid</b>	<b>wichtige Charakteristika</b>	<b>Referenz/Herkunft</b>
ECA248	pECD910	<i>czcD</i> Austauschmutante Glu154Asp, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA249	pECD911	<i>czcD</i> Austauschmutante Glu154Asn, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA250	pECD912	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp181Ala, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA251	pECD913	<i>czcD</i> Austauschmutante His5Arg, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA252	pECD914	<i>czcD</i> Austauschmutante His9Arg, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA253	pECD915	<i>czcD</i> Austauschmutante Cys290Ser, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
ECA254	pECD916	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp181Glu, Derivat von pECD723	Diese Arbeit
EC922	pECD725	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp53Asn, Derivat von pECD723	Anton, 2001
EC923	pECD726	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp158Asn, Derivat von pECD723	Anton, 2001
EC924	pECD727	<i>czcD</i> Austauschmutante Asp181Asn, Derivat von pECD723	Anton, 2001
ECA364	pDNA392	300 bp upstream von <i>czcD</i> (Promotorbereich <i>czcD</i> <sub>p</sub> mit Terminatorstruktur) als Transkriptionsfusion mit <i>lacZ</i> , Derivat von pVDZ'2- <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
ECA365	pDNA393	300 bp upstream von <i>czcD</i> (Promotorbereich <i>czcD</i> <sub>p</sub> ohne Terminatorstruktur) als Transkriptionsfusion mit <i>lacZ</i> , Derivat von pVDZ'2- <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
VS276	pVDZ'2- <i>lacZ</i>	Tet <sup>r</sup> IncP1 <i>lacZ'</i> Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup> Insertion eines promotorlosen <i>lacZ</i> als <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I-Fragmentes	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

**2.2. Kultivierungsbedingungen****2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien****A.) Nährbouillon (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)**

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 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

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 und *C. metallidurans*-Stämmen speziell für Konjugations-Experimente.

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

20 g Lennox-Medium

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 35 g/l Agar zugesetzt.

D.) SB-Medium (Sambrook, *et al.*, 1989)

12 g Pepton

24 g Hefeextrakt

5 ml Glyzerin

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Phosphatpuffer für SB-Medium:

11.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

62.7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Beides wurde getrennt autoklaviert und zur Verwendung 10:1 gemischt.

E) SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

20 g Pepton

5 g Hefeextrakt

0.5 g NaCl

10 ml 0.25 M KCl

NaOH ad pH 7.0

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

SOB-Medium wurde für die Anzucht von *E. coli* zur Gewinnung elektrokompetenter Zellen eingesetzt. Nach Elektroporation wurden die Zellen in SOC-Medium aufgenommen. Um

dieses zu erhalten, wurden  $\text{MgSO}_4$  (5  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgSO}_4/\text{ml}$ ) und Glukose (20  $\mu\text{l}$  1 M Glukose/ml) zu SOB-Medium zugeben.

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

900 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

0.10 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0.03 g  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

0.30 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0.20 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 Minimalmedium (Mergeay *et al.*, 1985)

**Komponente A (20 fach):**

800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

121.1 g Tris-HCl

HCl ad pH 7.0

danach Zugabe von:

93.6 g NaCl

29.8 g KCl

21.4 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

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

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

0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat

2 ml Spurenelementlösung SL6 (10fach) nach Pfennig (1974)

ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

**Komponente B (20 fach):**

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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Für die Anzucht von *C. 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* wurden 3 g/l Caseinhydrolysat und 0.2 % (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Für Tris-Minimal-Festmedien wurden zusätzlich vor dem Autoklavieren 1.5 % (w/v) und bei Zugabe von Metallsalzen 2 % (w/v) *Bacto*<sup>TM</sup>-Agar (Becton Dickinson and Company, USA) zugesetzt.

H.) Medienzusätze**Schwermetallsalze**

Es wurden 1 M bzw. 0.1 M wässrige Stammlösungen der Schwermetallsalze ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<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 3 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

**Tab. 3: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Medium**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration im Medium</b>
Ampicillin	125 g/l H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	25 mg/l ( <i>E. coli</i> ) 1500 mg/l ( <i>C. metallidurans</i> )
Tetracyclin	12.5 g/l Ethanol (50 % v/v)	12.5 mg/l

**Weitere Medienzusätze**

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

Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei -20°C gelagert. IPTG lag als wässrige Stammlösung von 200g/l vor und wurde in einer Endkonzentration von 40 mg/l den sterilen Medien zugesetzt. Von X-Gal wurde eine Stammlösung von 100g/l in DMF hergestellt. Die Endkonzentration im Medium betrug 48 mg/l.

**2.2.2. Anzucht und Zellernte**A.) *C. metallidurans*

Die Anzucht von *C. metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Minimalmedium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 2 g/l Natriumgluconat zugesetzt wurde.

Als Kulturgefäße für die Anzuchten aller Stämme dienten sterile Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß maximal 1:5 betrug. Die Zugabe der Medienzusätze erfolgte in den beschriebenen Konzentrationen. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C (Brutraum) auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG,

Bottmingen, Schweiz oder IKA-Schüttler KS500, IKA-Labortechnik, Staufen) oder in einem Wasserbadschüttler (HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei je 250 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung mit einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., USA) in Klett-Einheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Es wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, da er im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) das meiste Licht transmittiert. Zur Kalibrierung der Skala wurde unbeimpftes Medium (Nullwert) verwendet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probenahme zur Messung notwendig ist und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wird.

Die Zellernte erfolgte entweder durch Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) für 15 min, 5000 rpm bei 4 °C; in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R bei 4 °C, 10 min und 14000 rpm oder durch 10 min Zentrifugation bei 12000 rpm in der Sigma Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 30 °C für 2-5 Tage inkubiert.

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

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB oder NB angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Medienzusätze in den beschriebenen Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C 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 Spektrophotometer SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Amsterdam) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Die Zellernte erfolgte entweder in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R, in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R oder in der Sigma-Tischzentrifuge wie für *C. metallidurans* beschrieben. Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### 2.2.3. Stammhaltung

Die Kultivierung von *C. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-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.

## 2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

Alle verwendeten Puffer, Lösungen und auch H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wurden mit 0.1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC), welches ein starker Inhibitor von RNasen ist, versetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert.

Als zusätzlichen Schutz vor endogenen RNasen wurden bei der Arbeit stets Handschuhe getragen, Plastikutensilien wurden doppelt autoklaviert und hitzelabile Geräte gründlich mit 70 % (v/v) Ethanol behandelt. Außerdem wurden spezielle *MuITiGuard Filter Tips* (Sorenson, Bioscience, Inc., USA) mit Filter für die Arbeit verwendet.

### 2.3.1. Gesamt-RNA-Isolation

Die Inkubation der Vorkulturen von *C. metallidurans* AE128, DN178(pMOL30-10;  $\Delta czcR$ ) und DN179(pMOL30-11;  $\Delta czcS$ ) für diese Experimente erfolgte in 10 ml Tris-Minimalmedium schüttelnd bei 30 °C. Am nächsten Tag wurden Klettkolben, die jeweils 20 ml Tris-Minimalmedium enthielten, 1.5 %ig mit der Vorkultur angeimpft und schüttelnd bei 30 °C über Nacht angezogen. Hatten die Kulturen einen Klettwert von ca. 150 erreicht, wurden sie, bis auf die Kontrolle ohne Metall, mit 300  $\mu$ M Zn(II) und 300  $\mu$ M EDTA für weitere 10 min schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Zur Zellernte wurden die Kulturen in Aliquots von 2 ml in Eppendorfgefäße zentrifugiert, das Medium wurde vollständig abgenommen und die Zellpellets sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bis zur Isolation der RNA bei -80 °C gelagert.

Um die Gesamt-RNA zu gewinnen, wurde zunächst das Lysegemisch [6 ml Phenol/Chloroformgemisch, 72  $\mu$ l 20 % (w/v) SDS, 2.5 ml AE-Puffer] in einem 15 ml Greinerröhrchen pipettiert und auf 60 °C vorgewärmt. Pro Isolation wurden die Zellpellets von jeweils 10 ml Kultur mit 500  $\mu$ l AE-Puffer [20 mM Natriumacetat (pH 5.5), 1 mM EDTA

in DEPC-H<sub>2</sub>O] durch mehrmaliges Aufziehen in einer sterilen Spritze mit Kanüle resuspendiert und zu dem vorgewärmten Lysegemisch gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 60 °C inkubiert und während dessen aller 30 sec geschüttelt. Danach wurde der Ansatz in einem Kochsalz-Eisgemisch für mindestens 10 min stehen gelassen. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 10 °C und 5000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) eine Phasen-Trennung. Die Oberphase (mind. 3 ml) wurde daraufhin mit 3 ml Phenolgemisch und 300 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.5) gemischt. Nach starkem Schütteln erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm. Diese Schritte wurden mehrmals wiederholt, um die Proteine aus der Interphase zu entfernen. Die Oberphase wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 2.5 Vol eiskaltem Ethanol [96 % (v/v)] über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm. Das Pellet wurde nochmals mit 1 ml Ethanol [70 % (v/v)] für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Ethanol wurde so vollständig wie möglich abgenommen und das Greinerröhrchen kopfüber gestellt, um das Pellet zu trocknen. Anschließend wurde dieses zweimal mit 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20 °C.

### **2.3.2. Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA**

Um die Konzentration der präparierten RNA zu bestimmen wurde die optische Dichte bei 260 nm am *Gene Quant* (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg i.Br.) gemessen, wobei eine OD von 1.0 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen zu. Ist dieser Wert kleiner als 1.7, ist die RNA-Präparation mit Proteinen verunreinigt. Beträgt der Wert 1.7 oder mehr, spricht das für eine geringe Verunreinigung mit Phenol und die RNA-Präparation wird als rein angesehen.

### **2.3.3. DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA**

Um die nach der Isolation noch vorhandene DNA aus der Gesamt-RNA-Präparation zu entfernen, wurde ein Verdau mit RNase-freier DNaseI durchgeführt.

Dafür wurden 20 µg RNA eingesetzt. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 60 µl durchgeführt. Nach Auffüllen der entsprechenden Menge an RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O wurde diese für 3 min bei 95 °C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 6 µl 10x DNase Puffer und 6 µl RNase-freie DNaseI (Promega, Madison) hinzugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Daran schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion an. Dazu wurden 100 µl des Phenol-Chloroform-Gemisches und 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5.2

hinzugegeben, gut geschüttelt und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit 2.5 Vol. eiskaltem Ethanol [96 % (v/v)] für 1 h bei -80 °C gefällt. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm wurde die RNA im Pellet gewonnen und nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol luftgetrocknet und in 22 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die RNA wurde auf Eis oder bei -20 °C gelagert. Die präparierte RNA wurde im Formaldehydgel auf Intaktheit und mittels PCR auf Verunreinigung mit DNA überprüft.

#### **2.3.4. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese**

Für analytische Zwecke wurden 1.5 %ige denaturierende Formaldehydgele verwendet. Für 50 ml Gel wurden 0.75 g Agarose in 43.5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O mit 5 ml 10 x MOPS [0.2 M MOPS, 0.05 M Natriumacetat, 0.01 M EDTA in DEPC-H<sub>2</sub>O (pH 7.0)] in der Mikrowelle gelöst und auf ca. 50 °C abgekühlt. Danach wurden 1.5 ml Formaldehyd hinzugegeben, gut gemischt und in eine Minigelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Es wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA mit 12.5 µl Formamid, 2.5 µl 10 x MOPS und 4 µl Formaldehyd gemischt und bei 65 °C für 15 min denaturiert. Zum schnellen Abkühlen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und anschließend mit 3 µl Probenpuffer [100 mM EDTA, 50 % Glycerin, 0.1 % SDS, 0.1 % Bromphenolblau] und 0.5 µl Ethidiumbromid versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-90 Volt.

#### **2.3.5. Reverse transcription-Reaktion RT**

Um die Stärke der Expression der Gene während der Inkubation mit verschiedenen Schwermetallen zu bestimmen, wurde die Methode der *reverse transcription*-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) angewandt. Dabei wurde im ersten Schritt die RNA mittels der Reversen Transkriptase SUPERSRIPT™II (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben, die im zweiten Schritt durch *real-time*-PCR amplifiziert wurde.

Im ersten Schritt erfolgte die Synthese der cDNA:

Gesamt-RNA	1 µg
<i>random</i> Primer (100 ng/µl)	1 µl
steriles DEPC-H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 6 µl

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt.

Danach erfolgte die Zugabe von:

5 x <i>first strand</i> -Puffer	2 µl
0.1 M DTT	1 µl
10 mM dNTP-Lösung	0.5 µl
SUPERSRIPT™II (200 U/µl)	0.5 µl



Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Daran schloss sich eine Reaktion für 1 h bei 50 °C an. Das Enzym wurde danach für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

Im nächsten Schritt schloss sich die Amplifizierung der synthetisierten cDNA an.

### **2.3.6 real-time-PCR**

Die Methode der *real-time*-PCR erlaubt eine Quantifizierung der Genexpression. Es wurde eine relative Quantifizierung der Proben, die mit Schwermetall oder EDTA inkubiert wurden, im Vergleich zur Probe mit EDTA durchgeführt. Es wurden spezifische Primer herausgesucht, die zwischen 18 und 22 bp lang sind, am 3'-Ende nicht mehr als drei Basen G oder C besaßen und nicht mit der Base T am 3'-Ende endeten. Die Amplikons hatten eine Länge von 100 bis 150 bp.

Die *real-time*-PCR wurde mit dem *QuantiTect*<sup>TM</sup>*SYBR*<sup>®</sup>*Green* PCR-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) am Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake NSW, Australia) durchgeführt.

Dafür wurden 25 µl Gesamtansätze pipettiert:

RNase-freies H <sub>2</sub> O <i>bidest.</i>	10.5 µl
2x <i>QuantiTect SYBR Green</i>	
PCR Master Mix*	12.5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0.5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0.5 µl
cDNA- <i>Template</i>	1 µl

\* Der 2x *QuantiTect SYBR Green* PCR Master Mix enthält:

- *HotStarTaq*<sup>TM</sup> DNA Polymerase
- *QuantiTect SYBR Green* PCR Puffer
- dNTP Mix, welcher dUTP enthält
- *SYBR Green* I
- ROX (passiver interner Referenz-Puffer)
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Die cDNA wurde im Rotor Gene 3000 nach folgendem Programm amplifiziert:

1)	95 °C	15 min	Initialer Aktivierungsschritt für die <i>HotStarTaq</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase
2)	95 °C	10 sec	Denaturierung
3)	57-59 °C	10 sec	<i>Annealing</i>
4)	72 °C	10 sec	<i>Extension</i>

Schritt 2-4 wurde in 35-40 Zyklen wiederholt.

Die *Annaeling*-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer und sollte 5-8 °C unter dieser liegen. Während der *primer extension* wurde die Fluoreszenz gemessen. Diese wurde nach Anregung von *SYBR Green I* emittiert, wenn es an doppelsträngige DNA gebunden hatte. Der Farbstoff *SYBR Green I* ist Bestandteil des *QuantiTec<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup>Green* PCR-Kits. Die Anregung von *SYBR Green I* erfolgte bei einer Wellenlänge von 470 nm, die Detektion der Fluoreszenz bei 585 nm. Für jedes Primer-Paar wurden pro cDNA Doppelansätze pipettiert, deren Ergebnisse automatisch durch die Rotor Gene 3000 Software gemittelt wurden. Für jeden PCR-Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte erstellt, da *SYBR<sup>®</sup>Green* unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet. Außerdem wurde mittels der Schmelzkurvenanalyse überprüft, ob spezifische Produkte gebildet wurden oder ob auch unspezifische Produkte oder Primer-Dimere auftraten. Ein spezifisches Produkt wurde nur dann amplifiziert, wenn bei der spezifischen Schmelztemperatur nur ein Peak zu sehen war. Dafür wurde am Ende der bis zu 40 Zyklen die Fluoreszenz gemessen, während die Temperatur langsam von 60 °C auf 100 °C erhöht wurde. Bei niedrigen Temperaturen waren die PCR-Produkte aufgrund ihrer höheren spezifischen Schmelztemperaturen doppelsträngig, so dass *SYBR Green I* gebunden und die Fluoreszenz sehr hoch war. Dagegen waren die PCR-Produkte bei hohen Temperaturen denaturiert, wodurch die Fluoreszenz schnell abnahm. Das Programm (Rotor Gene 3000 Software), mit dem die Auswertung vorgenommen wurde, stellte die erste Ableitung der aus den Messungen der Fluoreszenz erhaltenen Kurven dar. Diese erste Ableitung enthielt Peaks bei der spezifischen Schmelztemperatur der PCR-Produkte. Peaks, die bei einer niedrigeren Temperatur auftraten, sind ein Zeichen für die Bildung von Primer-Dimeren. Während Peaks, die bei verschiedenen Temperaturen auftraten oder Plateaus besaßen, auf die Bildung unspezifischer Produkte hinweisen. Zusätzlich wurden die *real-time*-PCR-Reaktionen auf 2.5 %ige Agarosegele aufgetragen, um eventuelle Nebenprodukte sichtbar zu machen.

Für die Analyse der Daten mittels der *comparative quantitation software* (Rotor Gene Version 6.0) wurde die Fluoreszenz für jeden Zyklus gemessen und die zweite Ableitung der Rohdaten wurde gegen die Zykluszahl aufgetragen, die einen charakteristischen Kurvenverlauf mit einem Maximum an Fluoreszenz ergab. Mit der Amplifikation des PCR-Produkts erhöhte sich auch die Fluoreszenz durch gebundenes *SYBR Green I*. Der durch die zweite Ableitung der Rohdaten erhaltene Peak entsprach der maximalen Rate an Fluoreszenzzunahme in der Reaktion und wurde für die Berechnung des *Takeoff points* jeder Probe verwendet. Der *Takeoff point* war definiert als der Zyklus an dem die zweite Ableitung 20 % des Maximum Levels betrug und damit das Ende der Hintergrund-Fluoreszenz und den

Übergang in die exponentielle Phase andeutete. Die durchschnittliche Zunahme der Rohdaten wurde an vier Punkten nach dem *Takeoff Point* gemessen und ergab die Amplifikationseffizienz der Probe, wodurch eine Standardkurve nicht benötigt wurde. Die Amplifikationseffizienzen aller Proben ergaben die Durchschnitts-Amplifikationseffizienz, die zusammen mit den jeweiligen *Takeoff Points* der Probe und der Kontrollprobe zur Berechnung der relativen Konzentrationen eingesetzt wurden. Mit dieser Methode konnte eine relative Quantifizierung der Proben, die mit bzw. ohne Schwermetallsalz oder EDTA inkubiert wurden, durchgeführt werden.

Als Kontrollen wurden PCR-Reaktionen ohne *Template* (Negativkontrolle) und Reaktionen, bei denen die RNA ohne vorherige Umschreibung in cDNA eingesetzt wurde, mitgeführt.

## **2.4. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA**

### **2.4.1. Isolation 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 120 °C autoklaviert. Hitzeinstabile Geräte wurden mit 70 %igem (v/v) Ethanol abgerieben, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

#### **2.4.1.1. Gesamt-DNA-Isolation nach Marmur (Johnson, 1981)**

Diese Methode zur Isolierung von Gesamt-DNA, ist in abgewandelter Form für viele Bakterien durchführbar.

7.5 ml einer Übernachtskultur wurden in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 7.5 ml Phosphatpuffer [10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 6.8)] gewaschen und erneut bei 4 °C und 4500 rpm abzentrifugiert.

Die Zellen wurden in 8.5 ml eiskalter Saccharose-Lösung [250 g/l Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] resuspendiert und anschließend auf Eis gelagert. Durch Schwenken wurden 0.1 ml Lysozym-Lösung [10 mg/ml Lysozym, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] eingemischt. Der Ansatz verblieb für 15 min bei 30 °C im Wasserbad. Danach wurden 1.25 ml Saccharose-Lösung, 0.1 ml Proteinase-K Lösung [2.5 g/l Proteinase K, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] und 1.25 ml SDS-Lösung [15 g/l] zugegeben, für 3 h bei 37 °C und anschließend 15 min bei 55 °C inkubiert. Es erfolgte eine Abkühlung des Ansatzes bei Raumtemperatur. Folgende Chemikalien wurden für 10-15 min durch kräftiges Schwenken eingemischt: 0.94 ml Natriumperchlorat-Lösung [5 M in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>], 1.25 ml Phenol/NaCl (gesättigt mit steriler 3 % NaCl-Lösung durch kräftiges Schütteln, nach

Phasentrennung über Nacht Oberphase abgenommen und mit 0.1 % Hydroxychinolin versetzt) und 1.25 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:1). Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4200 rpm und 20 °C für 20 min in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg). Danach wurde die Oberphase abgenommen und in ein steriles Greinerröhrchen überführt. Die stark viskose Lösung wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol von Phenolresten befreit, indem kräftig aus dem Handgelenk geschüttelt wurde. Die wäßrige Oberphase wurde nach erneuter Zentrifugation bei 4200 rpm und 20 °C für 10 min in ein neues steriles Röhrchen überführt. Es wurden 120 µl 10 %ige sterile Essigsäure zur Neutralisation der DNA zugegeben. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit 6 ml Diethylether, dabei wurde wieder aus dem Handgelenk geschwenkt bis ein homogenes Gemisch entstand. Nach einer Zentrifugation bei 4500 rpm und 4 °C für 10 min wurde die Unterphase in ein neues steriles Greinerröhrchen überführt und zum Abdampfen der Diethyletherreste bei 60 °C im Wasserbad inkubiert (Geruchsprobe).

Nach Zugabe von 6 ml eiskaltem 96 %igem Ethanol erfolgte die Fällung der DNA bei -20 °C über Nacht. Nach einer Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R bei 4500 rpm und 4 °C für 30 min wurde das Pellet in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl steriler 5 M NaCl-Lösung und 1 ml eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol für 2 h bei -20 °C umgefällt. Anschließend wurde für 60 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert (gekühlte Eppendorf Laborzentrifuge 5417R). Die DNA wurde in 100-250 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei 50 °C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

Diese Methode diente der Isolierung genomischer DNA von *C. metallidurans* CH34, *C. metallidurans* AE104 und *C. metallidurans* AE128, die als *Template* für PCR-Reaktionen eingesetzt wurden.

#### **2.4.1.2. Plasmidisolation mittels E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)**

3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 12000 rpm pelletiert. Die anschließende Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert.

### **2.4.1.3. Plasmidisolierung mittels *OIAfilter*<sup>TM</sup> *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden)**

Mittels dieser Methode konnte ebenfalls eine präparative Plasmidisolierung oder eine Isolierung von großen Plasmiden (z.B. pVDZ'2) durchgeführt werden. 50 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 5000 rpm pelletiert. Die anschließende Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eluiert.

## **2.4.2. Standard-DNA-Techniken**

### **2.4.2.1. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern (Easy Cast<sup>TM</sup> Elektrophoresis System). Dabei variierte die Gelkonzentration von 0.8 % (w/v) bei großen Fragmenten bis zu 2.5 % (w/v) bei kleinen Fragmenten.

Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)] eingesetzt. Die Agarose wurde dem Puffer zugegeben und in einer Mikrowelle (Bosch Hausgeräte) gelöst. Dann wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid (0.5 g/l) zugesetzt und das Gel in den Träger in der Elektrophoresekammer gegossen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Volumen Stop-Lösung [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 % (v/v) Glycerin, 0.03 % Xylen Cyanol FF, 60 mM EDTA, 0.03 % Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach der DNA-Größe und deren Konzentration. Sie betrug 1-20 µl (analytische Gele) bzw. 20-100 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen), bis die gesuchten Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (Gel Jet Imager, Intas, Göttingen), die Dokumentation mittels der dazugehörigen Bild-Aufnahme-Software.

### **2.4.2.2. DNA-Größenstandards**

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des *Gene Ruler*<sup>TM</sup> 100 bp DNA *LadderPlus* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) (14 Fragmentgrößen: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp) und des *Gene Ruler*<sup>TM</sup> 1 kb DNA *Ladder* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) (14 Fragmentgrößen: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp).

### **2.4.2.3. 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.

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

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die zehnfach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro 1 µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und für mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzyms ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37 °C spaltet.

Nach Überprüfung auf vollständige Spaltung mittels Agarosegelelektrophorese wurden die Enzyme mit Hilfe des *E.Z.N.A.*<sup>®</sup> *Cycle-Pure Kit* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) entfernt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

### **2.4.2.5. 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 mm (Millipore GmbH, Eschborn) auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die DNA-Probe wurde auf den Filter getropft und nach ca. 30 min wieder abgenommen.

### **2.4.2.6. Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels *E.Z.N.A.*<sup>®</sup> *Cycle-Pure Kit* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)**

Diese Reinigungsmethode basierte auf der Eigenschaft der DNA, bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Membran zu adsorbieren (Vogelstein und 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.

#### **2.4.2.7. 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.

#### **2.4.2.8. 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 wurden 0.5 µl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison) verwendet. Die Ligation wurde über Nacht (z. B. pGEM<sup>®</sup>-T Easy) bzw. für mehrere Tage bei 4 °C inkubiert.

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

#### **2.4.3.1. Auswahl der Primer**

Die Ableitung der Primer (Tab. 4) erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms *OLIGO* (Version 3.4, Wiemann *et al.*, 1995) aus bekannten Sequenzen.

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von kommerziellen Anbietern (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. 4: Übersicht über die verwendeten Primer**

<b>Name/Orientierung</b>	<b>Sequenz 5' -&gt; 3' <sup>a)</sup> Position</b>	<b>Bemerkungen</b>
<b>PRIMER FÜR ÜBEREXPRESSION</b>		
D-pASK 5-3' ←	AAA <u>CCA TGG</u> TTT CCT CCT GCA GCA AGC GAC	Expressionssystem <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> , <i>NcoI</i> - Restriktionsschnittstelle
D-pASK 5- 5' →	AAA <u>GAA TTC</u> GGG CGC AGG TCA CTC ACA C	Expressionssystem <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> , <i>EcoRI</i> - Restriktionsschnittstelle

## Fortsetzung Tab. 4

Name/Orientierung	Sequenz 5' -> 3' <sup>a)</sup>	Bemerkungen
Nur C-term D-5' →	AAA <u>GAA TTC</u> AGC CTG AAT GTG CTG CTC	Expressionssystem <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> , <i>EcoRI</i> - Restriktionsschnittstelle
CzcD-pASK3/7-3' ←	AAA <u>CCA TGG</u> GTT TCC TCC TGC AGC AAG CGA C	Expressionssystem <i>Strep-tag II</i> <sup>®</sup> , <i>NcoI</i> - Restriktionsschnittstelle
His5Arg-5' →	TCG GGC GCA GGT <u>CGC</u> TCA CAC GAC CAT	<i>Quick-Change</i> Primer für His5Arg-Austausch
His5Arg-3' ←	ATG GTC GTG TGA <u>GCG</u> ACC TGC GCC CGA	<i>Quick-Change</i> Primer für His5Arg-Austausch
His7Arg-5' →	GCA GGT CAC TCA <u>CGC</u> GAC CAT CCC GGT	<i>Quick-Change</i> Primer für His7Arg-Austausch
His7Arg-3' ←	ACC GGG ATG GTC <u>GCG</u> TGA GTG ACC TGC	<i>Quick-Change</i> Primer für His7Arg-Austausch
His9Arg-5' →	CAC TCA CAC GAC <u>CGT</u> CCC GGT GGC AAC	<i>Quick-Change</i> Primer für His9Arg-Austausch
His9Arg-3' ←	GTT GCC ACC GGG <u>ACG</u> GTC GTG TGA GTG	<i>Quick-Change</i> Primer für His9Arg-Austausch
His49Arg-5' →	CGA CGC CGC <u>GCG</u> CAT GCT CAC GGA CAC C	<i>Quick-Change</i> Primer für His49Arg-Austausch
His49Arg-3' ←	GGT GTC CGT GAG CAT <u>GCG</u> CGC GGC GTC G	<i>Quick-Change</i> Primer für His49Arg-Austausch
His49Ala-5' →	CGA CGC CGC <u>GGC</u> CAT GCT CAC GG	<i>Quick-Change</i> Primer für His49Ala-Austausch
His49Ala-3' ←	CCG TGA GCA <u>TGG</u> <u>CCG</u> CGG CGT CG	<i>Quick-Change</i> Primer für His49Ala-Austausch
His234Arg-5' →	GTA AAA AGC TTC <u>CGT</u> GAC CTC CAC ATC	<i>Quick-Change</i> Primer für His234Arg-Austausch
His234Arg-3' ←	GAT GTG GAG GTC <u>ACG</u> GAA GCT TTT TAC	<i>Quick-Change</i> Primer für His234Arg-Austausch
His234Ala-5' →	GGT AAA AAG CTT <u>CGC</u> TGA CCT CCA CAT C	<i>Quick-Change</i> Primer für His234Ala-Austausch
His234Ala-3' ←	GAT GTG GAG GTC <u>AGC</u> GAA GCT TTT TAC C	<i>Quick-Change</i> Primer für His234Ala-Austausch
His237Arg-5' →	CCA TGA CCT CCA <u>CGT</u> CTG GGC ACT TAC	<i>Quick-Change</i> Primer für His237Arg-Austausch
His237Arg-3' ←	GTA AGT GCC CAG <u>ACG</u> TGG AGG TCA TGG	<i>Quick-Change</i> Primer für His237Arg-Austausch
His251Ala-5' →	CGA GCT TGA CGG <u>TTG</u> <u>CTG</u> TCG TGA ATG ACA	<i>Quick-Change</i> Primer für His251Ala-Austausch



## Fortsetzung Tab. 4

Name/Orientierung	Sequenz 5'->3' <sup>a)</sup>	Bemerkungen
His251Ala-3'	← TGT CAT TCA CGA <u>CAG</u> <u>CAA</u> CCG TCA AGC TCG	<i>Quick-Change</i> Primer für His251Ala-Austausch
His280Arg-5'	→ CAA ATT CGA TAT CAC <u>GCG</u> CGT GAC CAT TCA GTT CG	<i>Quick-Change</i> Primer für His280Arg-Austausch
His280Arg-3'	← CGA ACT GAA TGG TCA <u>CGC</u> GCG TGA TAT CGA ATT TG	<i>Quick-Change</i> Primer für His280Arg-Austausch
His280Ala-5'	→ AAA TTC GAT ATC ACG <u>GCC</u> GTG ACC ATT CAG TTC	<i>Quick-Change</i> Primer für His280Ala-Austausch
His280Ala-3'	← GAA CTG AAT GGT CAC <u>GGC</u> CGT GAT ATC GAA TTT	<i>Quick-Change</i> Primer für His280Ala-Austausch
His298Arg-5'	→ GAT GCA GCT CAG <u>CGT</u> TTC AAT GCA TCG	<i>Quick-Change</i> Primer für His298Arg-Austausch
His298Arg-3'	← CGA TGC ATT GAA <u>ACG</u> CTG AGC TGC ATC	<i>Quick-Change</i> Primer für His298Arg-Austausch
His298Ala-5'	→ GAT GCA GCT CAG <u>GCT</u> TTC AAT GCA TCG	<i>Quick-Change</i> Primer für His298Ala-Austausch
His298Ala-3'	← CGA TGC ATT GAA <u>AGC</u> CTG AGC TGC ATC	<i>Quick-Change</i> Primer für His298Ala-Austausch
Cys290Ser-5'	→ AAC TGG CAC CAT <u>CCG</u> AAC AAG CGG A	<i>Quick-Change</i> Primer für Cys290Ser-Austausch
Cys290Ser-3'	← TCC GCT TGT TCG <u>GAT</u> GGT GCC AGT T	<i>Quick-Change</i> Primer für Cys290Ser-Austausch
Glu31Asp-5'	→ TTC CTG ATT GCC <u>GAC</u> GTG GTC GGT G	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu31Asp-Austausch
Glu31Asp-3'	← CAC CGA CCA <u>CGT</u> CGG CAA TCA GGA A	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu31Asp-Austausch
Glu31Asn-5'	→ TTC CTG ATT GCC <u>AAC</u> GTG GTC GGT G	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu31Asn-Austausch
Glu31Asn-3'	← CAC CGA CCA <u>CGT</u> <u>TGG</u> CAA TCA GGA A	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu31Asn-Austausch
Glu31Lys-5'	→ TTC CTG ATT GCC <u>AAA</u> GTG GTC GGT G	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu31Lys-Austausch
Glu31Lys-3'	← CAC CGA CCA CTT <u>TGG</u> CAA TCA GGA A	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu31Lys-Austausch
Glu154Asp-5'	→ GGT GCT TAT CTG <u>GAC</u> GTC TGG AGC GAT	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu154Asp-Austausch
Glu154Asp-3'	← ATC GCT CCA GAC <u>GTC</u> CAG ATA AGC ACC	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu154Asp-Austausch
Glu154Asn-5'	→ GGT GCT TAT CTG <u>AAC</u> GTC TGG AGC GAT	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu154Asn-Austausch

## Fortsetzung Tab. 4

Name/Orientierung	Sequenz 5' -> 3' Position <sup>a)</sup>	Bemerkungen
Glu154Asn-3'	← ATC GCT CCA GAC <u>GTT</u> CAG ATA AGC ACC	<i>Quick-Change</i> Primer für Glu154Asn-Austausch
Asp53Glu-5'	→ CAC ATG CTC ACG <u>GAA</u> ACC GTC GCA CTG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp53Glu-Austausch
Asp53Glu-3'	← CAG TGC GAC GGT <u>TTC</u> CGT GAG CAT GTG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp53Glu-Austausch
Asp53Ala-5'	→ CAC ATG CTC ACG <u>GCC</u> ACC GTC GCA CTG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp53Ala-Austausch
Asp53Ala-3'	← CAG TGC GAC GGT <u>GGC</u> CGT GAG CAT GTG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp53Ala-Austausch
Asp53Asn-5'	→ CGC ACA TGC TCA <u>CGA</u> ACA CCG TCG CAC TG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>53</sub> Asn-Austausch
Asp53Asn-3'	← CAG TGC GAC GGT <u>GTT</u> CGT GAG CAT GTG CG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>53</sub> Asn-Austausch
Asp158Ala-5'	→ GAA GTC TGG AGC <u>GCC</u> CTG CTC GGG TCG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp158Ala-Austausch
Asp158Ala-3'	← CGA CCC GAG CAG <u>GGC</u> GCT CCA GAC TTC	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp158Ala-Austausch
Asp158Glu-5'	→ GAA GTC TGG AGC <u>GAA</u> CTG CTC GGG TCG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp158Glu-Austausch
Asp158Glu-3'	← CGA CCC GAG CAG <u>TTC</u> GCT CCA GAC TTC	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp158Glu-Austausch
Asp158Asn-5'	→ CTT ATC TGG AAG TCT GGA <u>GCA</u> ATC TGC TCG GGT CGG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>158</sub> Asn-Austausch
Asp158Asn-3'	← CCG ACC CGA GCA GAT <u>TGC</u> TCC AGA CTT CCA GAT AAG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>158</sub> Asn-Austausch
Asp181Glu-5'	→ GGC GTG GGT CGA <u>GTC</u> CGC CAT TGC G	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp181Glu-Austausch
Asp181Glu-3'	← CGC AAT GGC GGA <u>CTC</u> GAC CCA CGC C	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>181</sub> Glu-Austausch
Asp181Asn-5'	→ GCT GGG CGT GGG <u>TCA</u> ACT CCG CCA TTG CG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>181</sub> Asn-Austausch
Asp181Asn-3'	← CGC AAT GGC GGA <u>GTT</u> GAC CCA CGC CCA GC	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>181</sub> Asn-Austausch
Asp181Ala-5'	→ TGG GCG TGG GTC <u>GCC</u> TCC GCC ATT GCG	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>181</sub> Ala-Austausch
Asp181Ala-3'	← CGC AAT GGC GGA <u>GGC</u> GAC CCA CGC CCA	<i>Quick-Change</i> Primer für Asp <sub>181</sub> Ala-Austausch
Met50Lys-5'	→ GAC GCC GCG CAC <u>AAG</u> CTC ACG GAC ACC	<i>Quick-Change</i> Primer für Met50Lys-Austausch

## Fortsetzung Tab. 4

Name/Orientierung	Sequenz 5' -> 3' Position <sup>a)</sup>	Bemerkungen
Met50Lys-3'	← GGT GTC CGT GAG <u>C</u> TT GTG CGC GGC GTC	<i>Quick-Change</i> Primer für Met50Lys-Austausch
<b>PRIMER FÜR PROMOTORSTUDIEN</b>		
<i>czcD</i> Promo <i>up</i> 7481 <i>Bam</i>	→ AAA <u>GGA TCC</u> CCC TGG TGG CAT CCC TGG	Amplifikation eines 221 bp-Fragmentes innerhalb von <i>czcDp</i> , das den Promotor von <i>czcDp</i> ohne Terminatorstruktur enthält
<i>czcD</i> Promo down 7702 <i>Bam</i>	← AAA <u>GGA TCC</u> TAC GTC ATG CAG GCT GGC G	Amplifikation eines 298 bp-Fragmentes innerhalb von <i>czcD</i> , das den Promotor von <i>czcDp</i> mit Terminatorstruktur enthält
<i>czcD</i> Promo <i>up</i> 7481 <i>Bam</i>	→ AAA <u>GGA TCC</u> CCC TGG TGG CAT CCC TGG	Amplifikation eines 298 bp-Fragmentes innerhalb von <i>czcD</i> , das den Promotor von <i>czcDp</i> mit Terminatorstruktur enthält
<i>czcD</i> Promo down 7779 <i>Bam</i>	← AAA <u>GGA TCC</u> CGG GAT GGT CGT GTG AGT G	Amplifikation eines 150 bp-Fragmentes innerhalb von <i>czcD</i>
<b>PRIMER FÜR REAL-TIME-PCR</b>		
qPCR <i>czcD</i> 8126 <i>up</i>	→ GTT CGT CGT GGC TGT GCT G	Amplifikation eines 150 bp-Fragmentes innerhalb von <i>czcD</i>
qPCR <i>czcD</i> 8240 <i>down</i>	← GCC AAC CGA CCC GAG CAG A	Amplifikation eines 207 bp-Fragmentes innerhalb von <i>dmeF</i>
qPCR CDF1 2403 <i>up</i>	→ TTC TCG CCG CAT TCG CCG	Amplifikation eines 129 bp-Fragmentes innerhalb von <i>fieF</i>
qPCR CDF1 2590 <i>down</i>	← TCG TGC CCG TGC CCG TGA	Amplifikation eines 112 bp-Fragmentes innerhalb von <i>rpoZ</i>
qPCR CDF2 1355 <i>up</i>	→ GCT GGG TGT CGG TGG CAA	Amplifikation eines 112 bp-Fragmentes innerhalb von <i>rpoZ</i>
qPCR CDF2 1464 <i>down</i>	← CGG TCC ATC AGG TCG CTC AG	Amplifikation eines 112 bp-Fragmentes innerhalb von <i>rpoZ</i>
<i>rpoZ</i> Ralme 28 <i>up</i> qPCR	→ ACG GTG GGC TTG TCC TTT G	Amplifikation eines 112 bp-Fragmentes innerhalb von <i>rpoZ</i>
<i>rpoZ</i> Ralme 120 <i>down</i> qPCR	← ACG GTG GGC TTG TCC TTT G	Amplifikation eines 112 bp-Fragmentes innerhalb von <i>rpoZ</i>
<b>SEQUENZIERPRIMER</b>		
pGEM fwd	→ GCG AAA GGG GGA TGT GCT GC	<i>forward</i> Sequenzierprimer für pGEM-T Easy-Konstrukte
pGEM rev	← ATA TGG TCG ACC TGC AGG CG	<i>reverse</i> Sequenzierprimer für pGEM-T Easy-Konstrukte
Upr-pASK	← AAA AGT GAA ATG AAT AGT TCG ACA AAA ATC	<i>forward</i> Sequenzierprimer für pASK-IBA-Konstrukte
Rpr-pASK	→ CGG TAA ACG GCA GAC AAA AAA AAT G	<i>reverse</i> Sequenzierprimer für pASK-IBA-Konstrukte

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

### **2.4.3.2. 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  
                           1 µl    10 mM dNTP-Mix  
                           1 µl    Primer 1 (10 pmol/µl)  
                           1 µl    Primer 2 (10 pmol/µl)  
                           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.

### **2.4.3.3. Quick-Change<sup>TM</sup> 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<sup>®</sup>-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 DNA, nicht aber das PCR-Produkt. Der mutierte Vektor konnte dann für Transformationsexperimente mittels Elektroporation eingesetzt werden, ohne dass er vorher ligiert werden musste.

### **2.4.4. DNA-Transfer und Herstellung bzw. Selektion rekombinanter Klone**

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

##### A.) Herstellung kompetenter Zellen

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

Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. 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 5000 rpm und 4 °C in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf). 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 °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 °C bzw. 30 °C wurde auf Selektionsagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.

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

##### A.) Herstellung kompetenter Zellen

200 ml SOB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach Abkühlung auf Eis (15 min) zentrifugiert (15 min 5000 rpm, 4 °C) und das Zellpellet zweimal mit je 50 ml eiskaltem, 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 30 ml 10 % (v/v) Glycerin gewaschen, vereinigt und die Zellen nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4 °C) in 500  $\mu\text{l}$  10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden als 40  $\mu\text{l}$ -Aliquote bei -80 °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  $\mu\text{F}$ , 1.8 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 SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. 50-200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden auf Selektionsagar ausplattiert.

#### **2.4.4.3. 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.

#### **2.4.4.4. Plasmidtransfer durch Konjugation**

Der konjugative Plasmidtransfer wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) und *C. metallidurans*-Zellen aus NB-Übernachtskulturen durchgeführt. Je 200 µl der konjugierenden Stämme wurden auf einer NA-Platte zusammen ausplattiert und 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Konjuganten wurden direkt mit einer Impföse von der bewachsenen Platte entnommen und auf Tris-Minimalmedium-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.

#### **2.4.5. 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.

##### **2.4.5.1. Sequenzierung unter Verwendung des *DYEnamic<sup>TM</sup> ET terminator cycle sequencing kits* (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg i. Br.)**

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

Plasmid-DNA (0.5 µg)	1-6 µl
Primer (10 pmol/µl)	2 µl
<i>Sequencing-Mix</i>	2 µl
<i>aqua bidest.</i>	ad 10 µl

Die Ansätze wurden mit folgendem Programm gefahren:

- |    |          |       |                                   |
|----|----------|-------|-----------------------------------|
| 1) | 95 °C    | 1 min | Denaturierung                     |
| 2) | 95 °C    | 1 min | Denaturierung                     |
| 3) | 46-60 °C | 30 s  | <i>Annealing</i> (je nach Primer) |
| 4) | 60 °C    | 2 min | <i>Extension</i>                  |

Schritt 2 bis 4 wurde in 33 Zyklen wiederholt.

- |    |      |       |         |
|----|------|-------|---------|
| 5) | 4 °C | Pause | Kühlung |
|----|------|-------|---------|

Nach Ablauf des Programms wurde die DNA zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 30 µl 96 %iger (v/v) Ethanol zugegeben wurden. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm in der Eppendorf-

Zentrifuge 5417R und anschließendem 5 minütigen Waschen mit 70 %igem (v/v) Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und war bei -20 °C bis zur Sequenzierung stabil.

#### **2.4.5.2. Das Sequenziergel**

Die Sequenzierung erfolgte am ABI™ DNA-Sequencer im 7 %igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel am Institut für Genetik durch Ute Lindenstraus.

#### **2.4.5.3. Auswertung der Sequenzdaten**

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Programms *Chromas* (Version 1.45, 1996). Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit dem Computerprogramm *Clone 4* (*Clone Manager*-Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, USA) ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken NCBI (*Nation Center For Biotechnology Information*) und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Internet-Programm *Basic Logic Alignment Search Tool* [[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/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 *Expaty Molecular Biology Server* [Institut für Bioinformatik, Genf (Schweiz)].

## **2.5. Versuche zum Zellwachstum**

### **2.5.1. Wachstumsversuche von *E. coli*-Stämmen in Flüssigmedien**

#### **2.5.1.1. Messung der Zelltrübung**

Die Zelldichte wurde nach einer definierten Wachstumszeit (16 h) bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm mit einem Spektrophotometer SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Amsterdam) gemessen.



### **2.5.1.2. Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen in Wachstumsversuchen**

#### Endpunktbestimmungen von Wachstumsversuchen

Die Zelltrübungsmessungen wurden für die Versuche mit Zn(II) in LB-Medium und für die Experimente mit Co(II) in Tris-Minimalmedium (3 g/l Caseinhydrolysat und 0.2 % (v/v) Glycerin) durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte eine einheitliche, in LB-Medium bzw. in Tris-Minimalmedium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogene Vorkultur des jeweiligen Stammes. Für Zn(II) wurden die Hauptkulturen aus einer Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Messung der Optischen Dichte erfolgte bei 600 nm an einem Spektrophotometer SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Amsterdam). Für die Experimente mit Co(II) wurden Übernachtskulturen von den *E. coli*-Stämmen aus LB-Medium 1:400 in Tris-Minimalmedium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-Minimalmedium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-Minimalmedium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm am Spektrophotometer SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Amsterdam) bestimmt.

Als Endergebnis wurde mittels Regression die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IGC<sub>50</sub>) für Zn(II) und Co(II) in EXCEL graphisch ermittelt. IGC<sub>50</sub> ist die Substratkonzentration, bei der eine 50 %ige Wachstumshemmung der Kulturen eintrat.

## **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 *C. metallidurans* wurden in Tris-Minimalmedium mit Natriumgluconat bei 30 °C inkubiert. Aus einer 48 h-Vorkultur wurden 20 ml Hauptkultur auf 30 KE angeimpft und unter Schütteln 3-6 h bei 30 °C inkubiert. Nach Verdopplung der Zelldichte erfolgte eine Aufteilung der Kulturen und die Inkubation mit verschiedenen Metallkonzentrationen bzw. ohne Metall oder verschiedenen EDTA-Konzentrationen für 3 h bei 30 °C. Nach dieser Zeit wurden je 0.2 ml

Kultur in ein 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (10 min, 14000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung am nächsten Tag bei -20 °C gelagert. Unmittelbar nach den Probeentnahmen wurde die Zelldichte der Kulturen unter Verwendung des Klett-Summerson-Colorimeters bestimmt.

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

Das Zellpellet wurde in 950  $\mu$ l Z-Puffer [60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM  $\beta$ -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 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem Spektrophotometer SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Amsteram) 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.

## 2.7. Proteinbiochemische Methoden

### 2.7.1. Expression und Proteinreinigung 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 Einschnitt-Affinitätschromatographie bis 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 Waschschrilles entfernt werden, während das *Target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule eluiert werden konnte.

#### 2.7.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21(pLys) 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 Genexpression wurde durch die Zugabe von 200 µg AHT/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.

#### 2.7.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Membranproteinfraktionen

##### A.) French-Press

Das Zellpellet wurde in 40 ml (pro Liter Kultur) Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)] resuspendiert und mit DNaseI (10 mg/ml) (Roche, Mannheim) und 2 ml Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma GmbH, Osterode, P 8465) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French-Press* (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm<sup>2</sup>) in

mehreren Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 1 h bei 5000 rpm und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5804 R) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

### B.) Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand einer Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 1.5 h bei 4 °C unterzogen (TY 65, L8-60M Ultrazentrifuge, Beckman). Das so gewonnene Membranpellet wurde in Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)] aufgenommen und einer Membranproteinbestimmung unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde danach auf 5 mg/ml eingestellt. Die so gewonnene Membranfraktion wurde mit verschiedenen Detergenzien für 30 min auf Eis solubilisiert, wobei ein Verhältnis von 2 mg Detergenz/1mg Membranprotein eingestellt wurde. Nach erfolgter Solubilisierung wurden ungelöste Membranreste sowie Zelltrümmer durch eine weitere Ultrazentrifugation (100000 x g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Die so gewonnenen Membranproteine konnten für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

#### **2.7.1.3. Native Proteinreinigung mittels *StrepTactin*-Chromatographie**

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml - 10 ml, QIAGEN GmbH, Hilden) wurde mit 1-3 ml Säulenmaterial (*StrepTactin*) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.05 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid oder 0.025 % Fos-Choline 14] equilibriert. Die solubilisierete 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), 0.05 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid oder 0.025 % Fos-Choline 14, 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.

#### **2.7.1.4. Gelfiltrationsexperimente**

Die Gelfiltrationsexperimente wurden am Institute de Biologie Structurale am *Membrane Protein Laboratory* in Grenoble (Frankreich) durchgeführt.

Zur Steuerung, Detektion und Fraktionierung wurden sowohl das HiLoad<sup>TM</sup>-System (bestehend aus Programmer GP-10, Peristaltische Pumpe P-1, Uvicord S II, Fraktionsammler (RediFrac) als auch das FPLC-System (bestehend aus Programmer GP-250, High Precision Pump P-500, Uvicord S II, Fraktionsammler (RediFrac) (GE Healthcare/Amersham

Biosciences, Freiburg i. Br.) genutzt. Die Temperatur betrug bei allen Versuchen 4 °C. Die gepackten Säulen wurden vor dem Auftragen der Proteinlösung mit dem entsprechenden Puffer bis zur konstanten Extinktion des Eluates equilibriert. Die Elution erfolgte im Equilibrierungspuffer ohne Änderung der Flussrate.

#### A.) Gelfiltration an Superdex 200

Mittels analytischer Gelfiltration an Superdex 200 sollte der native Zustand von CzcD untersucht werden. Dazu wurden einzelne Proteineluate von CzcD aufkonzentriert. Für die Gelfiltrationsexperimente wurden ca. 2 mg/ml Membranprotein verwendet. Das Protein lag für die Versuche in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 0.05 % n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid vor. Nachdem die Säule 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 0.05 % n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid equilibriert wurde, wurden 2 mg/ml Protein auf die Säule gegeben. Bei einer Fluss-Rate von 0.5 ml/min wurde das Protein nach seiner Größe getrennt und in Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Die Poolfraktion mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurde zur Analyse auf einer SDS-PAGE bzw. nativen PAGE aufgetragen.

#### B.) Gelfiltration an Superdex 75

Für präparative Zwecke wurde die zytoplasmatische lösliche Domäne von CzcD einer Gelfiltration an Superdex 75 unterzogen. Dabei lag die lösliche Domäne von CzcD in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) vor. Nachdem die Säule mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) equilibriert wurde, wurden aufkonzentrierte Proteineluate der löslichen Domäne auf die Säule geladen. Bei einer Fluss-Rate von 0.8 ml/min wurde das Protein entsprechend nach Größe getrennt und in Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Mittels der präparativen Gelfiltration konnten eventuelle Verunreinigungen des Proteins eliminiert werden. Der Pool mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurde auf einer SDS-PAGE analysiert und die gesammelten Eluate wurden mittels Konzentratoren (Vivaspin; Sartorius AG, Göttingen) auf 15 mg/ml eingengt und für Kristallisationszwecke genutzt.

#### **2.7.1.5. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Mit der Methode der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation können Proteine gereinigt und der native Zustand analysiert werden. Für die Versuche mit CzcD wurden 0.5 M Saccharose und 100 mM Tris (pH 8.0) verwendet. Da CzcD mit verschiedenen Reinigungsprotokollen gereinigt wurde, wurden für die Gradienten unterschiedliche Komponenten gewählt. So kamen die Detergenzien 0.05 % (w/v) n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid

oder 0.025 % Fos-Choline 14 mit unterschiedlichen Ionenstärken an NaCl, 1 mM EDTA oder 0.02 % SDS zum Einsatz. Nach der Reinigung mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System wurden die einzelnen Proteineluate von CzcD vereint und aufkonzentriert. Für die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden ca. 2-4 mg/ml CzcD-Protein verwendet. Damit sich der Gradient ausbilden konnte, wurde der Ansatz für einige Stunden bei -80 °C gelagert. Mindestens 1 ml des aufkonzentrierten Membranproteins wurden vorsichtig in den Ansatz pipettiert und in einer Ultrazentrifuge bei 100000 x g für 4 °C und 16 h (SW40, L8-60M, Beckmann) zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden 11-15 Eluate von 1 ml gesammelt und 10 µl zur Analyse auf einer SDS-PAGE aufgetragen. Traten mehrere Banden auf, die sich durch den Gradienten zogen, konnte man von Proteinspezies unterschiedlicher Dichte ausgehen und somit von einem heterogenen Protein.

## **2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

### **2.7.2.1. BCA-Test (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma GmbH, Osterode)**

Das Prinzip des BCA-Testes ist ähnlich dem der Lowry-Methode (2.7.2.3). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll: Die BCA-Lösung wurde aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B hergestellt. Zu 50 µl einer Proteinprobe wurde 1 ml BCA-Lösung zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert und danach die Absorption bei 562 nm gegen einen Nullwert bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichreihe, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml BSA-Lösung erstellt wurde.

### **2.7.2.2. Bradford-Proteinbestimmung (Bradford, 1976)**

Für die Proteinbestimmung wurden 20 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. Verdünnung mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die mit Verdünnungen einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung erstellt wurde. Die Herstellung der Bradford-Lösung erfolgte, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96 %igen Ethanol 1 h gerührt und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85 %ige o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte im Kühlschrank.

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

Um die Konzentration membranassoziierter Proteine in Lösungen zu bestimmen, wurde eine modifizierte Lowry-Methode angewandt (Lowry *et al.*, 1951; Bensadoun und Weinstein, 1976; Hess und 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 Cu<sub>2</sub>SO<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 µl verdünnt, mit 10 µl 1 % iger (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und nach Durchmischung 15 min bei RT inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 200 µl 24 % (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation für 7 min und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (*Sigma 112*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden die Überstände sorgfältig entfernt und das Pellet mit 450 µl Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente resuspendiert waren, wurden den Proben 2 x 300 µl 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.

#### **2.7.2.4. 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 des Lichtweges durch die 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:

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

#### **2.7.3. Konzentrieren von Proteinlösungen**

Proteinlösungen konnten mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert oder in andere Lösungen umgepuffert werden. Vor dem Benutzen wurden die Vivaspin-Röhrchen einmal mit dem zu verwendeten Puffer bei 5000 rpm und 4 °C in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R gespült (Eppendorf AG, Hamburg). Anschließend wurde die einzuengende Proteinlösung in die Röhrchen gegeben und erneut bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert, bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war. Zur Lagerung wurde die Säule zunächst mit 70 %igem Ethanol gespült und anschließend in 20 % Ethanol gelagert.

#### **2.7.4. Elektrophoretische Methoden**

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

##### **2.7.4.1. 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 15 min bei 40 °C inkubiert bzw. ohne Erhitzung auf das Gel aufgetragen.



### **2.7.4.2. Proteinmarker**

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

Dabei wurden der *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit zehn Proteinbanden der Größen 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 und 10 kDa verwendet. Außerdem wurde der *Strep-tag* Proteinmarker (IBA GmbH, Göttingen) mit Proteinbanden der Größen 100, 60, 45, 30, 23.5 und 16 kDa verwendet.

### **2.7.4.3. Lineare SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)**

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 10, 12.5, 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 [25 mM Tris (pH 8.3), 0.2 M Glycin, 10 g/l SDS] wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben. Das Gel wurde mittels Klemmen an der Kammer befestigt und der Kamm unter Puffer entnommen.

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

#### **2.7.4.4. 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 wurde Albumin und Ovalbumin als molekularer Größenvergleich eingesetzt.

##### **C.) Native PAGE**

Die native Auftrennung von Proteinen konnte mit dieser PAGE bewerkstelligt werden.

Gelzusammensetzung:	Trenngel
30 % (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1	8 % 1.3 ml
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1.875 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2.4 ml
TEMED	5 µl
10 % (w/v) APS	50 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 100V und  $I_{\max}$  für 6 h durchgeführt.

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

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran; Roche, Mannheim) mittels *Semi-dry*-Blot.

Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol). Sechs Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in Towbin-Puffer getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer für 15 min in Towbin-Puffer geschwenkt. In der Blot-Apparatur (BioRad, München) wurden drei Lagen Whatman-Papier, die Membran, das Proteingel und weitere drei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinander gelegt, die Apparatur verschlossen und Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 45 min bei konstanter Spannung (ca. 15 V), die Stromstärke sollte dabei 3 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche nicht überschreiten. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt.

#### **2.7.4.6. 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 1 x PBS-Puffer (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl) mit 3 % BSA (w/v) und 0.5 % Tween20 für 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>bidest</sub> 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>bidest</sub> 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>bidest</sub> gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

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

Der spezifische Nachweis beruht auf der Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären 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. 5).

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. 5) 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.5: Übersicht über die verwendeten AK und ihre Verdünnungen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>AK-Typ</b>	<b>Antigen</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Primäre AK</b>			
Anti-CzcD-AK	Kaninchen-IgG	CzcD	1:10000
<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 GE Healthcare/ Amersham Biosciences, Freiburg i. Br.] 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 (2.7.4.6.) 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 Immunokomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

## **2.7.5. Färbung und Trocknung von SDS- Polyacrylamid-Gelen**

### **2.7.5.1. Coomassie-Färbung von Proteinen** (verändert nach Weber und Osborn, 1969)

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel 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, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>] geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärbelösung [40 % (v/v) Ethanol, 7.5 % (v/v) Essigsäure]. Die Gele wurden bis zur Trocknung in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufbewahrt.

### **2.7.5.2. 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  $\mu\text{l}$  37 % (v/v) HCHO in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ] wurde es 3 x 20 s in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. An einen erneuten kurzen Waschschrift mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  schloss sich die Entwicklung (3 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.5 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  und 35  $\mu\text{l}$  HCHO in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ) an. Die Färbereaktion wurde durch 2 x 2 min Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  und 10 min in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure bei gewünschter Intensität der Proteinbanden gestoppt. Das Gel wurde abschließend 20 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen und konnte dann aufbewahrt oder getrocknet werden.

### **2.7.5.3. Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Um die SDS-Polyacrylamid-Gele haltbar zu machen, wurden die Gele 15 min in Geltrocknungslösung [10 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) Ethanol] inkubiert. Anschliessend wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Geltrocknungslösung benetzte Folien gelegt und in einem Rahmen fest eingespannt. Die Gele wurden bis zur vollständigen Trocknung bei 37 °C gelagert.

### **2.7.6. Massenspektrometrie**

Die massenspektroskopischen Untersuchungen der löslichen zytoplasmatischen Domäne von CzcD dienen der Überprüfung der Reinheit und der Feststellung der korrekten Molekularmasse und erfolgte mittels MALDI-TOF am Institut de Biologie Structurale in Grenoble. Das Protein lag dabei in einer Konzentration von 15 mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) vor. Prinzip der Messmethode ist die Ionisierung der in einer Matrix befindlichen Probe mit einem Laserstrahl. Das geladene Molekül wird daraufhin in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Zeit, die das betreffende Molekül benötigt um die Wegstrecke zum Detektor zurück zu legen, gibt Auskunft über dessen Molekulargewicht oder Ladung. Prinzipiell gilt, dass je kleiner oder je stärker ein Molekül geladen ist, desto größer ist dessen Geschwindigkeit. Weist ein Molekül die doppelte Ladung auf, bewegt es sich auch doppelt so schnell im Feld und erscheint im Spektrogramm bei dem halben Molekulargewicht.

## **2.8. Transportstudien**

### **2.8.1. Aufnahmeexperimente mit dem radioaktiven Isotop $^{65}\text{Zn}$ in ganzen Zellen (Rosen, 1986; Nies und Silver, 1989)**

Nach einer Vorkultur in LB-Medium, wurden die Zellen 1:100 in Tris-Minimalmedium, welches 0.2 % (w/v) Glukose und 0.1 % (w/v) Hefeextrakt enthielt, verdünnt. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Expression der Gene 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 enthielt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 15 µl einer radioaktiven <sup>65</sup>Zn(II)-Lösung (3 mM, DuPont, Bad Homburg) gestartet. Nach definierten Zeiten (1, 5, 10, 20, 30 und 40 min) 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 MgCl<sub>2</sub>] gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt.

Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min. Die gemessene Radioaktivität wurde in *counts per million* (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.

### **2.8.2. Aufnahmeexperimente mit dem radioaktiven Isotop <sup>55</sup>Fe in ganzen Zellen** (nach Kammler, 1993)

Nach einer Vorkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C wurden die Zellen in Tris-Minimalmedium mit 3 g/l Caseinhydrolysat und 0.2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle überimpft, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt. Das Wachstum dieser Mittelkultur erfolgte schüttelnd bei 37 °C über Nacht. Mit der Mittelkultur wurden 15 ml Tris-Minimalmedium mit Ampicillin auf ca. 30 Klett angeimpft. Bis zur Verdopplung der Klettzahl erfolgte das Zellwachstum bei 37 °C schüttelnd. Die Kultur wurde jetzt mit AHT (200 µg/l) induziert und für 30 min weitergeschüttelt. Diese Zellen wurden anschließend direkt für die Transportstudien eingesetzt.

Zu Beginn wurde die Zelldichte mittels des Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) bestimmt. Die Aufnahmeuntersuchungen wurden nach der Filtrationsmethode in einem Wasserbad bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl einer radioaktiven <sup>55</sup>Fe(II)-Lösung (1 mCi in 0.1 M HCL, Perkin Elmer *Life Science* INC., Boston)

gestartet, die neben dem radioaktiven Metallisotop 100 mM Fe-(II)-So<sub>4</sub> und 1 M Ascorbat enthielt. Nach definierten Zeiten (1, 5, 10, 20 und 40 min) wurden 500 µl Proben entnommen und filtriert (NC 45, Schleicher und Schüll, Dassel). Um unspezifisch gebundenes Metall von der Zelloberfläche zu entfernen, wurden die Filter mit 6 ml Waschpuffer (0.1 mM LiCl) gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt. Die Zählzeit betrug 4 min. Die gemessene Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Als Absolutwert wurden 500 µl Probe aus der jeweiligen Kultur entnommen und ohne Filtration in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt und vermessen.

### **2.8.3. Transportstudien mit radioaktiven Isotopen in *inside out vesicles***

#### **2.8.3.1. Präparation von *inside out vesicles***

Einer Übernacht-Kultur in LB-Medium wurden 10 ml entnommen, damit wurde 1 l frisches LB-Medium angeimpft (1:100). Diese Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 - 0.7 schüttelnd inkubiert. Die Expression wurde mit AHT (200 µg/l) induziert und die Kultur für weitere 3 h schüttelnd inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (Sorvall RC 5C) bei 4 °C und 5000 rpm für 10 min. Das erhaltene Pellet wurde in 100 ml Puffer A gewaschen, erneut wie angegeben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde an dieser Stelle in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

Das gefrorene Pellet wurde bei 37 °C für 5 min aufgetaut und in 10 ml Puffer A komplett resuspendiert. Die erhaltenen 10 ml Aliquots wurden jeweils einmal bei 10000 psi mit der *French-Press* (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) behandelt. Direkt im Anschluss wurden 100 µl PMSF (100 mM in Isopropanol) und 10 µl DNaseI (10 mg/ml) dazugegeben und der gesamte Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 5000 rpm für 30 min, um Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen. Die im Überstand enthaltenen Membranvesikel wurden mittels einer Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 90 min und 4 °C abzentrifugiert (TY 65, L8-60M Ultrazentrifuge, Beckman). Das erhaltene Membranpellet wurde mit einem weichen Pinsel vorsichtig in 1 ml Puffer A2 resuspendiert und erneut einer Ultrazentrifugation unterzogen. Die gewaschenen und sedimentierten Vesikel wurden nun in 200 µl Puffer A2/l Originalkultur resuspendiert, die Gesamt-Proteinkonzentration bestimmt, die Suspension in



geeignete Aliquots aufgeteilt und diese anschliessend in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Puffer A:                    250 mM Saccharose  
                                  25 mM Tris-HCl  
                                  150 mM KCl  
                                  0.5 mM EDTA  
                                  pH 7.0

Puffer A2:                    wie Puffer A, nur **ohne** EDTA

### **2.8.3.2. Transportexperimente mit *inside out vesicles***

Die bei -80 °C gelagerten Vesikel wurden in den gebrauchten Mengen kurz bei 37 °C aufgetaut und auf 0.2 mg/ml in Reaktionspuffer (Puffer B) verdünnt.

Für Transportexperimente mit Zink wurde zu den verdünnten Vesikeln 2 µM eines Zn/<sup>65</sup>Zn - Gemisches gegeben (entsprechende Verdünnungen wurden für die Versuche mit Cobalt und Cadmium hergestellt). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM NADH gestartet.

Zu festgesetzten Zeitpunkten wurden 100 µl Proben entnommen und filtriert (NC 20, Schleicher und Schüll, Dassel), mit 10 ml Puffer C gewaschen und in Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe<sup>TM</sup> wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt. Die Zählzeit betrug 10 min. Die gemessene Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Als Absolutwert wurden eine 100 µl Probe direkt in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt und vermessen.

Als Nullkontrollen wurden alle Experimente zusätzlich ohne Zugabe von NADH durchgeführt.

Puffer B:	Puffer C:
250 mM Saccharose	250 mM Saccharose
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl
50 mM KCl	50 mM KCl
2 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM MgCl <sub>2</sub>
pH 7.5	10 mM ZnCl <sub>2</sub> (für <sup>65</sup> Zn)
	10 mM CoCl <sub>2</sub> (für <sup>57</sup> Co)
	10 mM CdCl <sub>2</sub> (für <sup>109</sup> Cd)
	pH 6.3

## **2.8.4. Rekonstitution von CzcD in Proteoliposomen und Transportstudien**

### **2.8.4.1. Reinigung von CzcD**

Die Reinigung von CzcD erfolgte wie unter 2.7. beschrieben.

### **2.8.4.2. Rekonstitution von CzcD in Proteoliposomen**

Die Rekonstituierung erfolgte wie für ZitB und FieF beschrieben (Chao und Fu, 2004a; Grass *et al.*, 2005). Dazu wurden 50 mg chloroformische Phospholipide von *E. coli* (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) getrocknet und in 1 ml BisTris-Puffer (20 mM, pH 6.8, Puffer A) unter 1 minütigem Vortexen und Ultraschallbehandlung (Bandelin *electronic* RK 52H, Berlin) bei 40 °C für 5 min rehydriert. Ein Aliquot dieser Suspension (12.5 mg Phospholipid) wurde in Puffer A mit Octylglykosid (1 % w/v Endkonzentration) verdünnt. Dieses Aliquot wurde mit einer Verdünnung von CzcD (0.25 mg/ml) in Puffer A gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überschuss an Detergenz wurde an einer Amberlite XAD-16 Säule (d = 2 cm, h = 7 cm, Volumen = 6 ml) adsorbiert. Die Säule wurde mit Puffer A equilibriert, die Fraktionen wurden in 2 ml Volumina (Highload System, GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg i. Br.) gesammelt. Die Fraktionen wurden vereint, auf 20 ml mit Puffer A verdünnt und bei 100000 x g für 90 min abzentrifugiert (TY 65, L8-60M Ultrazentrifuge, Beckman). Das Pellet wurde in 400 µl Puffer A resuspendiert, anschließend wurden 40 µl einer 2 mM PhenGreen SK Lösung (Molecular Probes, Oregon, USA) für die Versuche mit Eisen bzw. NewPortGreen DCF Lösung (Molecular Probes, Oregon, USA) für die Versuche mit Zink zugegeben. Der Mix wurde bei 40 °C einer Ultraschallbehandlung von 10 Sekunden und anschließend einem Frier-Tau-Zyklus in Flüssigstickstoff unterzogen. Der nicht eingekapselte Farbstoff wurde durch eine Entsalzungssäule (PD-10, GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg i.Br.) abgetrennt. Die Säule wurde mit Tris-HCl Puffer (20 mM, pH 7.8, Puffer B) equilibriert. Die gesammelten Fraktionen wurden vereint und bei 100000 x g für 90 min abzentrifugiert (TY 65, L8-60M Ultrazentrifuge, Beckman).

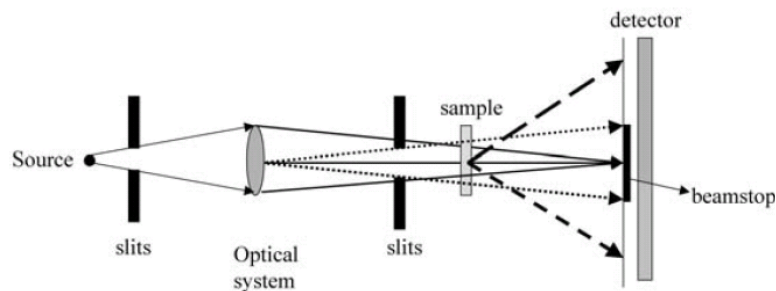
### **2.8.4.3 Fluoreszenzmessung des Zink- und Eisentransportes von CzcD in Proteoliposomen**

Für die Experimente mit Zink wurde der Farbstoff NewPortGreen DCF verwendet. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswelle von 505 nm und bei einer Abstrahlung von 535 nm an einem F-2000 Fluoreszenz-Spektrophotometer (Hitachi, Tokyo).

Für die Versuche mit Eisen wurde der Farbstoff PhenGreen SK verwendet. Die Messung der Fluoreszenz von PhenGreen SK erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm und bei einer Abstrahlung von 530 nm am Fluoreszenz-Spektrophotometer. PhenGreen SK ist membranimpermeabel und seine Fluoreszenz wird bei Bindung von Eisen gequenchet, während die Fluoreszenz von NewPortGreen DCF bei Bindung von Zink verstärkt wird. Für die Versuche mit Zink wurden unterschiedliche Stammlösungen in einem Bereich von 100  $\mu\text{M}$ -6 mM im Puffer B hergestellt. Für alle Versuche wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der einzelnen Stammlösung für die Verdünnungen im Bereich von 1  $\mu\text{M}$ -60  $\mu\text{M}$  verwendet. Eine 20 mM Eisenstammlösung (Ammonium Eisen-II-Sulfat, Alfa Aesar, Karlsruhe) wurde für die Experimente mit Eisen in Puffer B hergestellt und mit Ascorbat (1% w/v) stabilisiert. Von dieser Stammlösung wurden Verdünnungen in einem Bereich von 0.1 bis 10  $\mu\text{M}$  in Puffer B hergestellt. Von den präparierten Proteoliposomen wurden 50  $\mu\text{l}$  in Puffer B, 1 ml Endvolumen, verdünnt und unter Rühren präequilibriert bis die Basislinie sich stabilisiert hatte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Zink bzw. Eisen gestartet und die Fluoreszenz wurde gemessen.

## 2.9. Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung ist eine Methode zur Aufklärung von Protein- oder DNA-Strukturen mit niedriger Auflösung (Svergun, *et al.*, 1998; Perkins, 2001). Dabei können wichtige strukturelle Informationen über Makromoleküle in wässrigen Lösungen gewonnen werden. Bei der Röntgenstreuung handelt es sich um die Streuung von Röntgenstrahlen an Materie. Die zu untersuchende Probe wird einem kollimierten, monochromatischen Röntgenstrahl ausgesetzt und winkelabhängig die transmittierte Intensität gemessen (Koch *et al.*, 2003) (Abb. 1). Dabei erhält man typische Beugungsbilder, die in eindimensionalen Streukurven (Streuintensität als Funktion des Streuvektors) resultieren, aus denen sich dann die primären Streuparameter  $R_G$  (d.h. der mittlere Abstand zweier Streuzentren in einem Partikel) und die Streuintensität  $I(0)$  bestimmen lassen. Aus diesen Parametern können Schlussfolgerungen über Partikelgröße und Molekülmasse geschlossen werden.



**Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Röntgenkleinwinkelstreuungsanlage** (Koch *et al.*, 2003). Die zu untersuchende Probe wird einem Röntgenstrahl ausgesetzt und die Streuintensität winkelabhängig gemessen. Als optisches System dient eine doppelfokussierende Monochromator-Spiegelkamera, die die Wellenlänge aus einem Spektrum auswählt und den Strahl auf den Detektor fokussiert.

Für die Experimente wurde der Messplatzaufbau X33 der EMBL-Außenstelle Hamburg am Hasylab genutzt (*Multiwire-Proportional-Detektor* mit Fremdgasfüllung und einer doppelfokussierenden Monochromator-Spiegelkamera mit einer Länge von 2.0-2.4 m). Die Experimente wurden bei einer Wellenlänge von 0.15 nm durchgeführt. Es wurden BSA-Lösungen als Molekularmassenstandard mit einer Konzentration von 5-7.5 mg/ml, CzcD und der zytoplasmatischen Domäne von CzcD mit unterschiedlichen Proteinkonzentration in 10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.2) und 0.1 M TAPS (pH 8.0) verwendet. Die Proben wurden in einer Glimmerküvette (1 mm Schichtdicke) bei 12 °C thermostatiert. Vor und nach jeder Proteinprobe wurde eine Referenzmessung mit Puffer durchgeführt, um für den Streubeitrag des Puffers und die im Verlauf einer Füllung des Synchrotron-Speicherrings fallende Strahlintensität korrigieren zu können. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Computerprogramme GNOM (<http://www.embl-hamburg.de/External/Info/Research/Sax/gnom.html>) und DAMMIN (<http://www.embl-hamburg.de/External/Info/Research/Sax/dammin.html>). Die Messungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung am Messplatz X33 und die Auswertung der Daten erfolgte durch PD Dr. Stephan König vom Institut für Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

## 2.10. Kristallisation von CzcD und der zytoplasmatischen Domäne

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 und der löslichen Domäne wurde die Technik der Gasphasendiffusion am hängenden Tropfen

gewählt, um einen Proteinkristall zu erhalten. Zu Beginn der Arbeit wurde CzcD mit einem speziellen Membrankristallisationskit (*JB Screen Mixes, Crystal Screening Kit*, Jena Bioscience GmbH, Germany) kristallisiert. Nachdem jedoch der heterogene Zustand des CzcD-Proteins festgestellt wurde, sollte zunächst die lösliche Domäne von CzcD kristallisiert werden. Voraussetzung hierfür war die erfolgreiche homogene Reinigung des Proteins mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Systems.

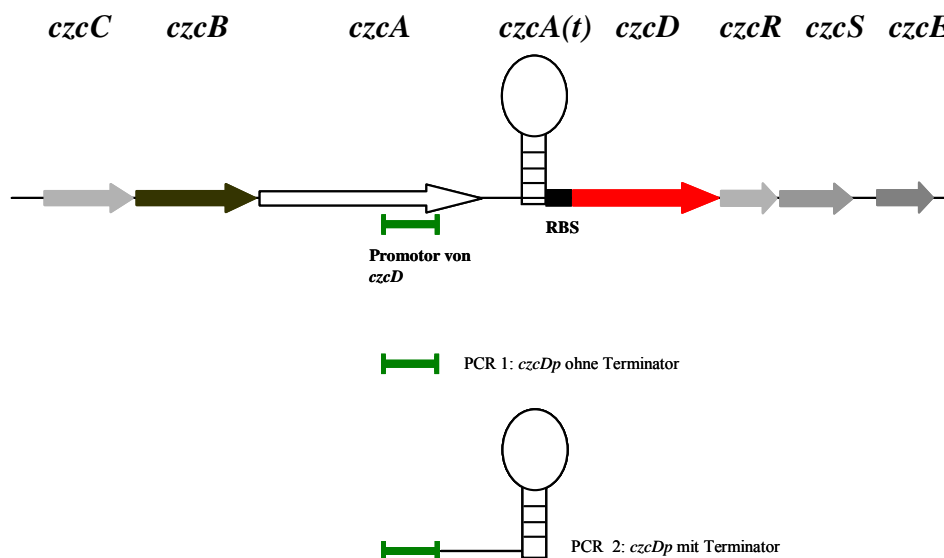
Für die Kristallisationen wurde eine Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 15 g/ml verwendet. Als Kristallisationskits wurden *CrystalScreen*<sup>®</sup> und *CrystalScreen2*<sup>®</sup> (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) verwendet. Diese enthielten mit 50 Reaktionsbedingungen unterschiedliche Salze, Puffer und Fällungsmittel ([www.hamptonresearch.com](http://www.hamptonresearch.com)). 2 ml der Präzipitationslösungen wurden in ein Reservoir der Kristallisationsschalen (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) pipettiert. Anschließend wurden 1 µl Proteinlösung und 1 µl Präzipitationslösung auf einem silanisierten Deckgläschen (Durchmesser 18 mm) gemischt. Diese Deckgläschen wurden dann auf der Kristallisationsschale mit Silikonkleber luftdicht befestigt. Mittels der Gasphasendiffusion stellte sich nach bestimmter Zeit ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Tropfen und Präzipitationsreservoir ein, indem Wasser aus dem Tropfen austrat und im Reservoir endete.

Die Platten wurden bei 20 °C inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Platten unter dem Binokular analysiert und ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Regulation von *czcD* in *Cupriavidus metallidurans*

Auf dem größeren der beiden Megaplasmide pMOL30 in *C. metallidurans* befinden sich die Gene *czcCBA* für den RND-Efflux-Komplex. Stromabwärts davon liegen die Gene *czcD*, *czcR* und *czcS*, die als gemeinsames Operon transkribiert werden. Stromabwärts von *czcA* befindet sich der potenzielle Terminator von *czcA*. Diese Terminatorstruktur liegt stromaufwärts der Ribosomenbindestelle von *czcD*. Die Promotorregion von *czcD* befindet sich im *czcA*-Gen unmittelbar stromaufwärts des 3'-Endes und des Terminators von *czcA*. Die regulatorischen Genbereiche von *czcA* und *czcD* überlappen (Große *et al.*, 1999), da der Terminator von *czcA* zwischen dem Promotor und der Ribosomenbindestelle von *czcD* liegt (Abb. 2) (van der Lelie *et al.*, 1997).

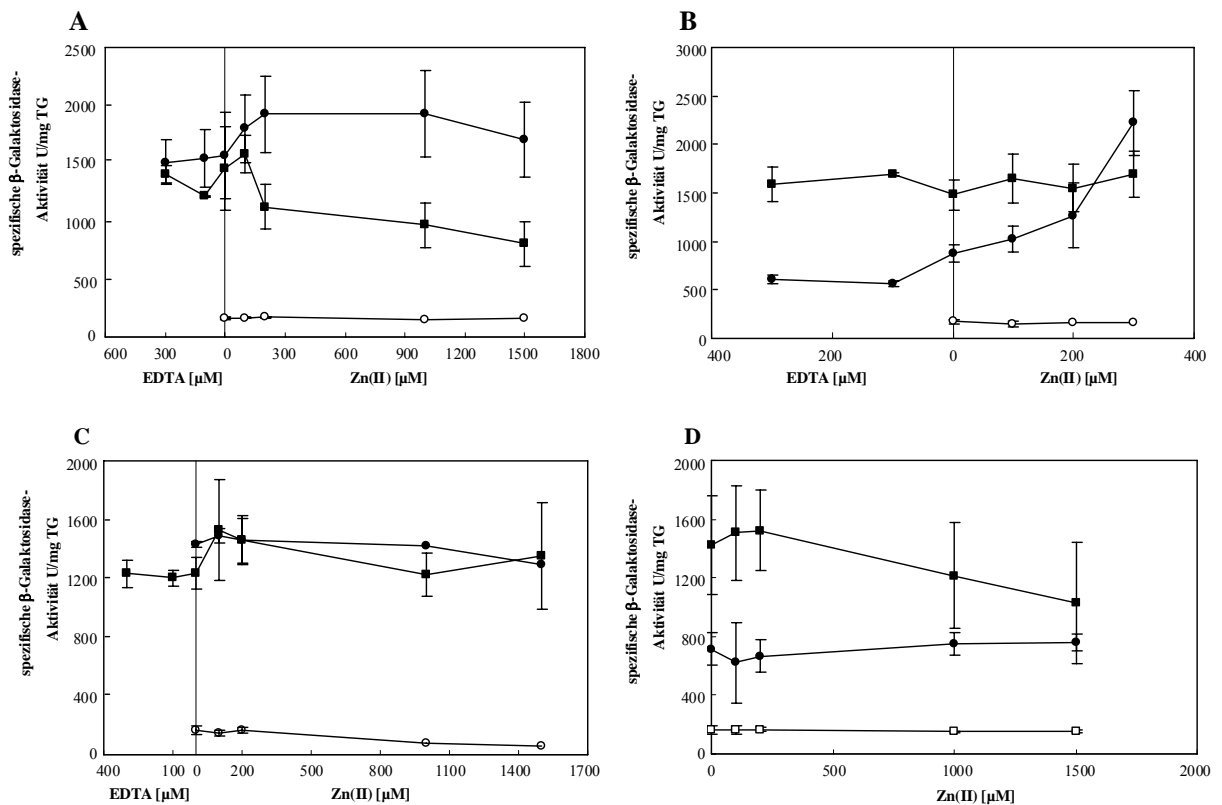


**Abb. 2: Die Gene der *czc*-Resistenz-Determinante**

Dargestellt sind die Gene *czcCBA*, *czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE*. Der Terminator *czcA(t)* vom Gen *czcA* befindet sich zwischen dem Promotor von *czcD* und der Ribosomenbindestelle (RBS) von *czcD*, so dass es hier zum Überlappen der Promotorregion von *czcD* und des Terminators *czcA(t)* kommt. PCR 1 bezeichnet das Promotor-Konstrukt *czcDp* ohne Terminator. PCR 2 bezeichnet das Promotor-Konstrukt *czcDp* mit Terminator.

Der Einfluss der potentiellen Terminatorstruktur vor der Ribosomenbindestelle von *czcD* sollte in der vorliegenden Arbeit mittels Promotor-*lacZ*-Fusionen aufgeklärt werden. Dabei wurde stromaufwärts von *czcD* ein Promotor-Konstrukt mit der potentiellen Terminatorsequenz und ein Konstrukt ohne Terminatorsequenz amplifiziert. Die dabei gewonnenen *czcDp-lacZ*-Konstrukte waren ca. 300 bp lang und wurden in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy kloniert. Die Konstrukte wurden sequenziert und in pVDZ'2-*lacZ* nach Verdau mit *Bam*HI kloniert. Die Kontrolle auf korrekte Insertion und Orientierung der

Fragmente erfolgte mittels Restriktionsanalyse und PCR. Die  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukte mit bzw. ohne Terminator wurden in die Stämme AE128(pMOL30), AE104 und in die Deletionsstämme DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ), DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ), DN182(pMOL30-14,  $\Delta czcD$ ), DN191(pMOL30-22,  $\Delta czcE$ ) und DN193(pMOL30-24,  $\Delta czcDRSE$ ) konjugiert. Mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen sollte die Induktion der *czcDp-lacZ*-Fusionen durch Zink untersucht werden. Dabei sollte untersucht werden, ob das *czcD*-Konstrukt mit bzw. ohne der potenziellen Terminatorstruktur Unterschiede in der Induzierbarkeit zeigen.



**Abb. 3:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Fusionen in Gegenwart verschiedener Zn(II)- oder EDTA-Konzentrationen in den Stämmen AE128(pMOL30) (A), AE104 (B), DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) (C) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) (D)**

**A:** AE128(pDNA393; *czcDp* ohne Terminator) (●), AE128(pDNA392; *czcDp* mit Terminator) (■) und AE128(pVDZ'2-*lacZ*) (○). **B:** AE104(pDNA393; *czcDp* ohne Terminator) (●), AE104(pDNA392; *czcDp* mit Terminator) (■) und AE104(pVDZ'2-*lacZ*) (○). **C:** DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ )(pDNA393; *czcDp* ohne Terminator) (●), DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ )(pDNA392; *czcDp* mit Terminator) (■) und pVDZ'2-*lacZ* (○). **D:** DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ )(pDNA393; *czcDp* ohne Terminator) (●), DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ )(pDNA392; *czcDp* mit Terminator) (■) und pVDZ'2-*lacZ* (○). Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen geteilt und verschiedene Konzentrationen an Zn(II) oder EDTA zugegeben. Die Zellen wurden bei 30 °C schüttelnd inkubiert, nach 3 h wurde die Trübung gemessen und die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Die Inkubation mit 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M und 1500  $\mu$ M Zn(II) führte zu einer konstitutiven Expression des  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstruktes ohne Terminator im Stamm

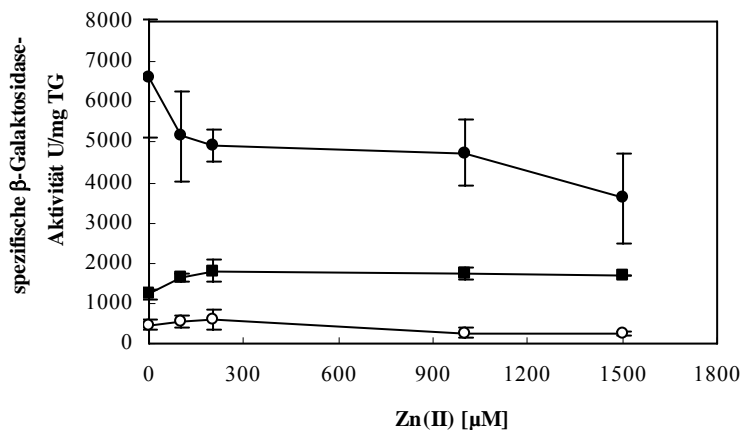
AE128(pMOL30) (Abb. 3A). Für das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt mit Terminator konnte mit zunehmender Zn(II)-Konzentration eine leichte Repression beobachtet werden (Abb. 3A). Das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt mit Terminator wurde im Stamm AE104 nicht durch Zn(II) induziert (Abb. 3B). Bezieht man EDTA mit ein, konnte für das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt ohne Terminator im Stamm AE104 eine ca. 4fache Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden (Abb. 3B). Da bekannt ist, dass im Tris-Minimalmedium zusätzliche Zinkionen vorhanden sind, wurden die Stämme mit unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen inkubiert und damit Zn(II)-Mangel simuliert. Unter Metallmangel wurde keine Induktion aller Promotor-*lacZ*-Fusionen festgestellt (Abb. 3A und 3B).

In Western-Blot-Analysen wurde untersucht, wie bzw. ob sich *czcD* durch das Zweikomponentenregulationssystem CzcRS regulieren lässt. Dabei wurden der Wildtypstamm AE128(pMOL30) und die beiden Deletionsstämme DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) mit 100  $\mu$ M Zn(II) inkubiert und zu bestimmten Zeiten Proben entnommen. Die Proteinproben wurden auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und CzcD mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Dabei konnte sowohl in AE128(pMOL30) als auch in den beiden Deletionsstämmen DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) CzcD nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm AE128(pMOL30) und den beiden Deletionsstämmen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen zeigten unter Anwesenheit verschiedener Zn(II)-Konzentrationen keine Induktion der *lacZ*-Fusionen *czcDp* mit bzw. ohne Terminator in den Deletionsstämmen DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) (Abb. 3C) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) (Abb. 3D). Für das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt mit Terminator wurde der Einfluss von 100  $\mu$ M und 300  $\mu$ M EDTA im Stamm DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) untersucht. Für dieses Konstrukt konnte keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beobachtet werden (Abb. 3C). Für die  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukte konnte in DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) (Abb. 3C) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) (Abb. 3D) keine Induktion durch Zn(II), jedoch eine erhöhte konstitutive Grundaktivität beobachtet werden. Das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt mit Terminator zeigte ähnlich wie im Wildtypstamm AE128(pMOL30) im Stamm DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) eine leichte Repression mit zunehmender Zn(II)-Konzentration (Abb. 3D).

Das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt mit bzw. ohne Terminator wurde im Deletionsstamm DN193(pMOL30-24,  $\Delta czcDRSE$ ) durch unterschiedliche Zn(II)-Konzentrationen nicht induziert (Abb. 4). Auffällig war jedoch die konstitutiv hohe Expression der  $\phi(czcDp-lacZ)$ -



Fusion ohne Terminator in diesem Stamm. Das Promotorkonstrukt wurde mit ca. 6600 U/mg TG auf sehr hohem Niveau exprimiert. Im Vergleich dazu lag die Expression der  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Fusion mit Terminator auf einem deutlich niedrigeren Level (1140 U/mg TG).



**Abb. 4:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Fusionen in Gegenwart verschiedener Zn(II)-Konzentrationen im Stamm DN193(pMOL30-24,  $\Delta czcDRSE$ ):** (pDNA393; *czcDp* ohne Terminator) (●), (pDNA392; *czcDp* mit Terminator) (■) und pVDZ'2-*lacZ* (○). Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen geteilt und verschiedene Konzentrationen an Zn(II) zugegeben. Die Zellen wurden bei 30 °C schüttelnd inkubiert, nach 3 h wurde die Trübung gemessen und die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

In den Deletionsstämmen DN182(pMOL30-14,  $\Delta czcD$ ) und DN191(pMOL30-22,  $\Delta czcE$ ) konnte keine Induktion der  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Fusionen mit bzw. ohne Terminator durch Zn(II) nachgewiesen werden. In beiden Stämmen zeigten die  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukte eine erhöhte konstitutive Expression von ca. 1000-2000 U/mg TG (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt ohne Terminator im Stamm AE104 eine Induktion durch Zn(II) zeigte. Im Wildtypstamm AE128(pMOL30) konnte für das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt mit Terminator eine geringe Repression beobachtet werden. In den unterschiedlichen Deletionsstämmen wurde keine Induktion durch Zn(II) beobachtet. In allen Stämmen konnte eine erhöhte Grundaktivität der Promotorkonstrukte von *czcD* gezeigt werden. Dabei war der Unterschied der hohen Grundaktivität zwischen den  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Fusionen mit bzw. ohne Terminator in den Deletionsstämmen DN193(pMOL30-24,  $\Delta czcDRSE$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) am größten.

## 3.2. Quantifizierung der Transkription von *czcD* durch *real-time-RT-PCR*

### 3.2.1. Die Transkription von *czcD* wird durch Zn(II) induziert

Anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Tests wurde gezeigt, dass das Promotorkonstrukt vom *czcD*-Gen ohne Terminator im Stamm AE104 durch Zn(II) induziert wurde. Im Stamm AE128(pMOL30) konnte eine konstitutive Expression ( $\phi(\textit{czcDp-lacZ})$  ohne Terminator) bzw. eine leichte Repression ( $\phi(\textit{czcDp-lacZ})$  mit Terminator) gemessen werden. Die Methode der *real-time-PCR* ermöglichte nun eine relative Quantifizierung der Transkriptmenge von *czcD* mit bzw. ohne Schwermetallsalz oder EDTA. Die Induktionsfaktoren des Transkriptes von *czcD* wurden mit denen der chromosomal kodierten CDF-Proteine *dmeF* und *fieF* verglichen. Für die *real-time-PCR* wurde von *czcD* und *dmeF* ein ca. 150 bp großes Fragment und von *fieF* ein ca. 200 bp großes Fragment mittels spezifischen Primern amplifiziert.

Um die Expression der Transkripte mittels *real-time-PCR* messen zu können, wurden zwei unabhängige RNA-Isolationen von den Stämmen AE128(pMOL30), DN178(pMOL30-10,  $\Delta\textit{czcR}$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta\textit{czcS}$ ) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde mit RNase-freier DNase verdaut und mittels PCR auf Verunreinigungen mit DNA überprüft. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wurde die Gesamt-RNA mit *random* Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als Doppelbestimmung mittels *real-time-PCR* amplifiziert. Die Induktionswerte ergaben sich jeweils als Relation zu den mit EDTA inkubierten Stämmen AE128(pMOL30), DN178(pMOL30-10,  $\Delta\textit{czcR}$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta\textit{czcS}$ ) die in der *comparative quantitation*-Auswertung (Rotor Gene Version 6.0) als Faktor 1 gesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte für jeden Stamm unabhängig voneinander. Wenn die Faktoren der Proben, die mit Schwermetallsalz inkubiert wurden  $\geq 2$  waren, wurde dies nach allgemeinen Standard als Induktion definiert. Werte  $< 2$  wurden als nicht reguliert betrachtet.

Die Transkription des *czcD*-Gens wurde in den Stämmen AE128(pMOL30) (29fach), DN179(pMOL30-11,  $\Delta\textit{czcS}$ ) (42fach) und DN178(pMOL30-10,  $\Delta\textit{czcR}$ ) (57fach) in Anwesenheit von 300  $\mu\text{M}$  Zn(II) stark induziert. In den Stämmen AE128(pMOL30) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta\textit{czcS}$ ) ohne Zn(II)-Zugabe konnte eine leichte Induktion (2fach) beobachtet werden (Tab. 6). Die Transkription des *dmeF*-Gens wurde im Stamm AE128(pMOL30) durch 300  $\mu\text{M}$  Zn(II) nicht induziert. In den Stämmen DN179(pMOL30-11,  $\Delta\textit{czcS}$ ) und DN178(pMOL30-10,  $\Delta\textit{czcR}$ ) konnte in Anwesenheit von Zn(II) eine geringe Induktion (2fach) gezeigt werden (Tab. 6). Im Vergleich dazu wurde die Transkription von *fieF* in den Stämmen AE128(pMOL30), DN179(pMOL30-11,  $\Delta\textit{czcS}$ ) und DN178(pMOL30-

10,  $\Delta czcR$ ) nicht durch Zn(II) reguliert. Es konnten für *dmeF* und *fieF* keine signifikanten Unterschiede der Ratio der zinkinkubierten Proben mit den Proben ohne Zn(II) beobachtet werden. Damit war nach *real-time*-RT-PCR *czcD* das einzige CDF-Gen, das durch Zn(II) induziert wurde.

Für die Synthese der cDNA und für die *real-time*-PCR-Experimente war es notwendig, gleiche Mengen an RNA zu verwenden. Dazu erfolgte eine spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA. Des Weiteren war es notwendig für die Auswertung der *real-time*-PCR die Transkription eines *housekeeping*-Gens zu untersuchen. Als interner Standard wurde das *rpoZ*-Gen (kodiert für die  $\omega$ -Untereinheit der RNA-Polymerase) verwendet, dessen Transkription keiner Regulation unterlag. Es wurden zwei unabhängige RNA-Isolationen von den Stämmen AE128(pMOL30), DN178 (pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) und DN179 (pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) durchgeführt. Die Experimente zeigten, dass das *housekeeping*-Gen unter den untersuchten Bedingungen konstant exprimiert wurde und somit keiner Genregulation unterlag (Tab. 6). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die gleiche Konzentration an RNA für alle *real-time*-PCR-Experimente eingesetzt wurde.

**Tab. 6: Quantifizierung der Transkriptmengen der CDF-Gene und *rpoZ* durch *real-time*-PCR nach Inkubation der Zellen mit 300  $\mu$ M Zn(II) bzw. ohne Zn(II) <sup>1</sup>**

Gen	Stamm	300 $\mu$ M Zn(II)	ohne Zn(II)
<i>czcD</i>	AE128(pMOL30)	<b>29.2</b> $\pm$ 9.2	<b>2.47</b> $\pm$ 1.48
	DN179(pMOL30-11, $\Delta czcS$ )	<b>42.3</b> $\pm$ 24.4	<b>2.56</b> $\pm$ 1.48
	DN178(pMOL30-10, $\Delta czcR$ )	<b>57.0</b> $\pm$ 35.9	1.80 $\pm$ 1.05
<i>dmeF</i>	AE128(pMOL30)	1.71 $\pm$ 1.27	1.25 $\pm$ 0.63
	DN179(pMOL30-11, $\Delta czcS$ )	<b>2.24</b> $\pm$ 0.69	1.28 $\pm$ 0.32
	DN178(pMOL30-10, $\Delta czcR$ )	<b>2.70</b> $\pm$ 1.23	1.63 $\pm$ 0.57
<i>fieF</i>	AE128(pMOL30)	1.11 $\pm$ 0.37	1.26 $\pm$ 0.79
	DN179(pMOL30-11, $\Delta czcS$ )	1.19 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.18
	DN178(pMOL30-10, $\Delta czcR$ )	1.22 $\pm$ 0.27	0.90 $\pm$ 0.26
<i>rpoZ</i>	AE128(pMOL30)	1.02 $\pm$ 0.31	1.15 $\pm$ 0.29
	DN179(pMOL30-11, $\Delta czcS$ )	0.89 $\pm$ 0.25	0.99 $\pm$ 0.39
	DN178(pMOL30-10, $\Delta czcR$ )	0.94 $\pm$ 0.40	1.01 $\pm$ 0.42

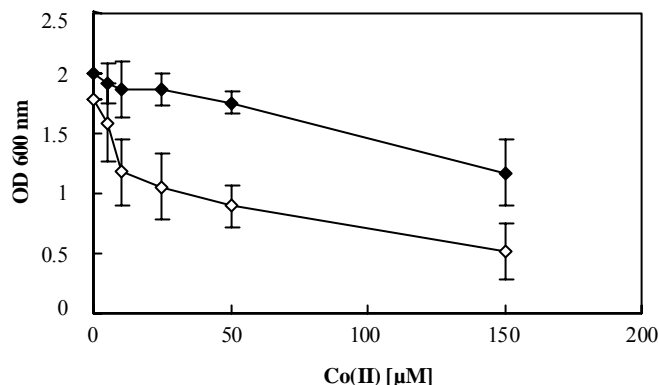
<sup>1</sup>Die Stämme *C. metallidurans* AE128(pMOL30), DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) wurden 10 min mit 300  $\mu$ M Zn(II) bzw. ohne Zn(II) inkubiert. Als Kontrolle wurde für jeden Stamm eine Probe mit 300  $\mu$ M EDTA mitgeführt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, DNase verdaut, revers transkribiert und mit den für die Gene *czcD*, *dmeF*, *fieF* und *rpoZ* spezifischen Primern durch *real-time*-PCR amplifiziert. Die Tabelle zeigt die Induktionswerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen cDNA-Synthesen und zwei biologisch unabhängigen Experimenten. Die mit 300  $\mu$ M EDTA inkubierten Stämme AE128(pMOL30), DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) wurden durch die *comparative quantitation*-Auswertung (Rotor Gene Version 6.0) als Faktor 1 gesetzt. Die Auswertung erfolgte für jeden Stamm einzeln. Faktoren  $\geq 2$  sind **fett** dargestellt.

### 3.3. Die Transportaktivität von CzcD

#### 3.3.1. CzcD zeigt Cobalt-Resistenz im cobaltsensitiven *Escherichia coli*-Stamm ECA349

In Vorarbeiten führte die Expression von *czcD* im zinksensitiven *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) zu einer erhöhten Zink-Resistenz (Anton *et al.*, 2004). Die erhöhte Zink-Sensitivität des Expressionsstammes GG48 beruht auf der Deletion der Gene *zntA* und *zitB* (Grass *et al.*, 2001b). Beide Gene sind in der Zink-Resistenz in *E. coli* involviert.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Wachstumsverhalten von CzcD zusätzlich unter Anwesenheit verschiedener Co(II)-Konzentrationen untersucht werden. Aus Vorversuchen mit LB-Medium zeigte sich, dass die *E. coli*-Stämme GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) und ECA334 ( $\Delta yohM::cat$ ) für die Versuche mit Co(II) nicht geeignet waren. Vermutlich war im Stamm ECA334 ( $\Delta yohM::cat$ ) der Cobalt-Hintergrund zu hoch, da die bekannten Aufnahmesysteme ZupT und CorA noch vorhanden waren. Deshalb wurde der *E. coli*-Stamm ECA349 verwendet, der in den bekannten Aufnahmesystemen CorA, ZupT und im Efflux-System YohM deletiert war. Die Wachstumsversuche wurden mit ECA349 ( $\Delta corA$ ,  $\Delta zupT::cat$ ,  $\Delta yohM$ ) zunächst im LB-Medium und unter Zugabe von 200  $\mu\text{g}$  AHT/l durchgeführt. Da jedoch Co(II) mit AHT Komplexverbindungen eingeht, wurden die Wachstumsversuche im Tris-Minimalmedium (Tris-MM-Medium) für *E. coli* und ohne Induktion von *czcD* durch AHT durchgeführt, um reproduzierbare Effekte zu erzielen. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm ECA349 ( $\Delta corA$ ,  $\Delta zupT::cat$ ,  $\Delta yohM$ ) mit dem Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) transformiert und der Einfluss unterschiedlicher Co(II)-Konzentrationen (0-150  $\mu\text{M}$ ) auf das Wachstum von CzcD untersucht (Abb. 5).



**Abb. 5: Wachstumsverhalten von *E. coli* ECA349(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress**

Übernachtskulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Es konnte gezeigt werden, dass in Wachstumsversuchen in Tris-Minimalmedium der Stamm ECA349(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) einen deutlichen Effekt auf die Co(II)-Resistenz ausübte. So zeigte der Stamm mit CzcD unter Anwesenheit unterschiedlicher Co(II)-Konzentrationen ein erheblich verbessertes Wachstum. Schon ab einer Konzentration von 25-50  $\mu\text{M}$  Co(II) erreichte der Stamm ECA349(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) mehr als das Doppelte der optischen Dichte als der Stamm ECA349(pASK-IBA5) (Abb. 5).

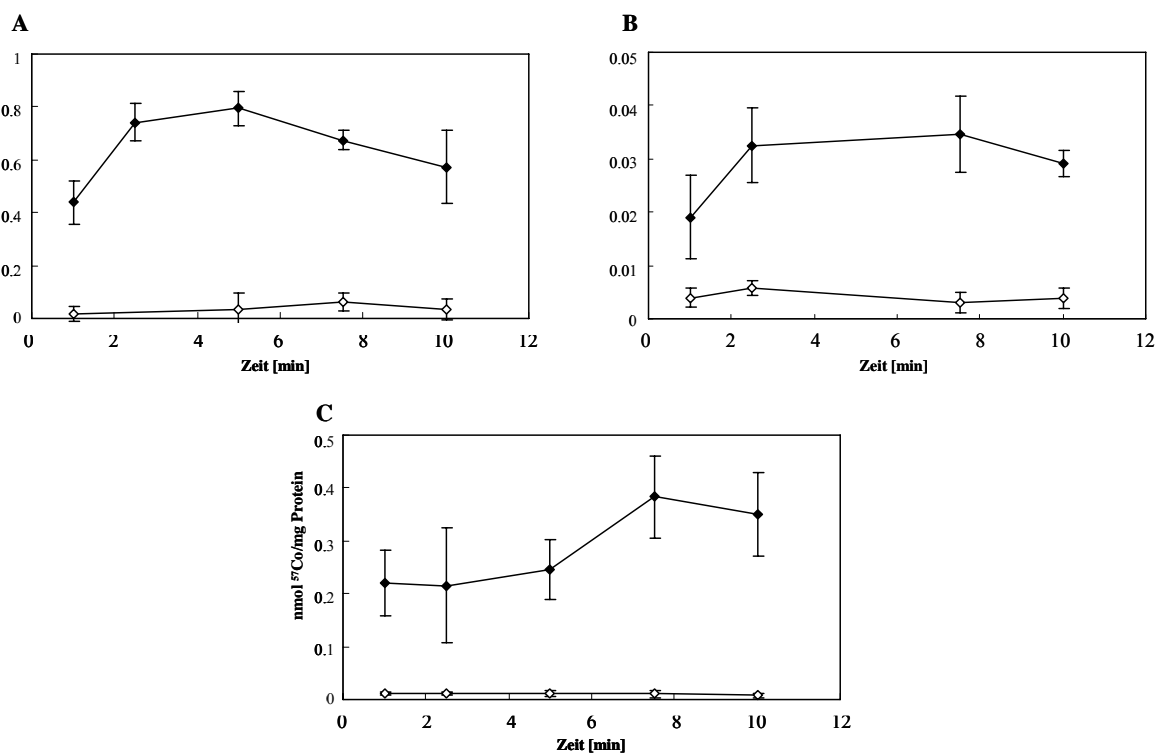
### **3.3.2. CzcD zeigt in *inside out vesicles* eine Transportaktivität für Zink, Cobalt und Cadmium**

In früheren Studien wurde mittels Akkumulationsexperimenten versucht, die Transportaktivität von CzcD zu demonstrieren (Anton, 2001). Jedoch konnte der direkte Transport gegen einen Protonengradienten in den damaligen Experimenten nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit für CzcD eine neue Methode basierend auf Experimenten mit *inside out vesicles* etabliert. Dadurch konnte die direkte Transportaktivität von CzcD gegen einen Protonengradienten erstmalig gezeigt werden.

Bei diesem Experiment konnte der Transport von Zn(II), Co(II) und Cd(II) durch CzcD nachgewiesen werden. In Vesikeln kann die Aktivität des Transporters direkt gemessen werden. Unter Zugabe von NADH entsteht dabei ein Protonengradient. In allen gemessenen Aufnahmeexperimenten war die Transportaktivität des Proteins CzcD von einem Protonengradienten abhängig und es konnte kein Transport beobachtet werden, wenn NADH im Reaktionsansatz fehlte (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies deutete daraufhin, dass ein Protonengradient für die Aktivität von CzcD notwendig war. Für die Experimente wurden Stämme gewählt, die in allen bekannten Aufnahme- und Efflux-Systemen für die entsprechenden Metalle deletiert sind. Der Stamm GR362 ( $\Delta zntA::kan$ ,  $\Delta zntB::cat$ ,  $\Delta zitB$ ,  $\Delta zupT$ ,  $\Delta znuABC$ ) wurde mit dem Plasmid pECD723(pASK-IBA5::*czcD*) transformiert und der Einfluss von radioaktivem  $^{65}\text{Zn(II)}$  und  $^{109}\text{Cd(II)}$  untersucht. In den *inside out vesicles* konnte eine Transportaktivität für  $^{65}\text{Zn(II)}$  durch CzcD nachgewiesen werden, wobei eine erhöhte Akkumulation von  $^{65}\text{Zn(II)}$  beobachtet wurde (Abb. 6A). Im Fall von  $^{65}\text{Zn(II)}$  akkumulierte CzcD nach 5 min ca.  $0.8 \pm 0.06$  nmol  $^{65}\text{Zn/mg}$  Protein. Danach war die maximale Akkumulation erreicht. Nach mehr als 5 min konnte ein Abfall der Akkumulation durch den Stamm GR362(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) beobachtet werden (Abb. 6A). Dies deutete wahrscheinlich auf die Instabilität der Vesikel hin. In Anwesenheit von  $^{109}\text{Cd(II)}$  akkumulierte der Stamm GR362(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) nach 2-8 min

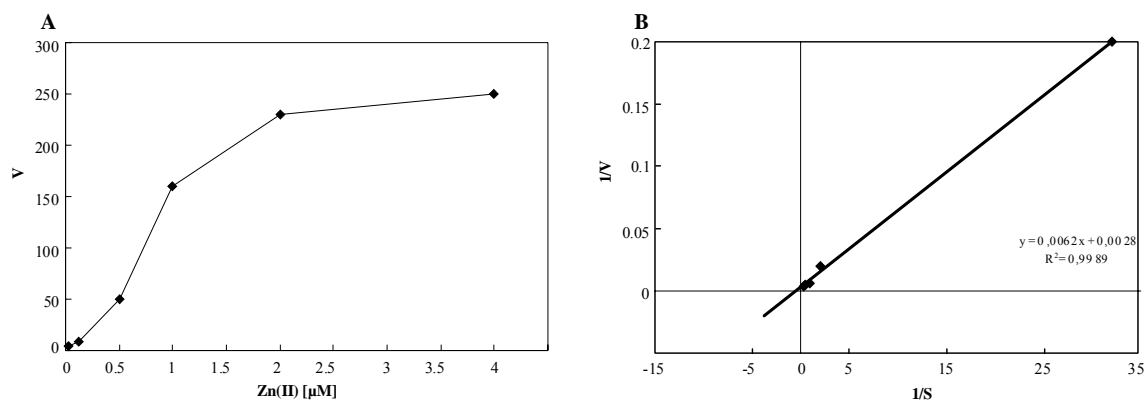
$0.03 \pm 0.007$  nmol  $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$  Protein. Danach sank auch hier die maximale Akkumulation von  $^{109}\text{Cd}(\text{II})$  im Stamm GR362 (Abb. 6B).

Für die Experimente mit radioaktivem  $^{57}\text{Co}(\text{II})$  wurde der Stamm ECA349 ( $\Delta\text{corA}$ ,  $\Delta\text{yohM}$ ,  $\Delta\text{zupT}::\text{cat}$ ) mit dem Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) transformiert. Wie auch für Zn(II) und Cd(II) konnte eine Transportaktivität für Co(II) durch CzcD nachgewiesen werden. Im Fall von  $^{57}\text{Co}(\text{II})$  akkumulierte der Stamm ECA349(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) nach 5 min ca.  $0.25 \pm 0.06$  nmol  $^{57}\text{Co}/\text{mg}$  Protein. Nach mehr als 8 min war die maximale Aufnahme mit  $0.4 \pm 0.08$  nmol  $^{57}\text{Co}/\text{mg}$  Protein erreicht. Danach sank die Akkumulation von  $^{57}\text{Co}(\text{II})$  durch CzcD auf  $0.34 \pm 0.08$  nmol  $^{57}\text{Co}/\text{mg}$  Protein (Abb. 6C).



**Abb. 6: NADH-abhängiger Transport durch CzcD in inside out vesicles.** Die Vesikel wurden auf eine Proteinkonzentration von 0.2 mg/ml in Reaktionspuffer verdünnt. Die radioaktiven Metall-Gemische wurde für die einzelnen Versuche in einer Endkonzentration von  $2 \mu\text{M}$  zugegeben. Die Reaktion wurde mit 5 mM NADH gestartet. Eine Kontrollreaktion wurde ohne NADH durchgeführt. 100  $\mu\text{l}$  Probenvolumen wurden zu definierten Zeiten entnommen und mit einem Flüssigscintillationszähler die Radioaktivität gemessen. Die Daten der Experimente mit nicht-energetisierten Vesikeln wurden von den experimentellen Daten der energetisierten Vesikeln mit NADH abgezogen und die Rohdaten wurden auf die eingesetzte Menge an Protein und transportierbares Metall bezogen und umgerechnet. **A:**  $^{65}\text{Zn}(\text{II})$ : Vesikel aus dem *E. coli*-Stamm GR362 mit dem Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆) und GR362 mit dem Vektorplasmid pASK-IBA5 (◇). **B:**  $^{109}\text{Cd}(\text{II})$ : Vesikel aus dem *E. coli*-Stamm GR362 mit dem Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆) und GR362 mit dem Vektorplasmid pASK-IBA5 (◇). **C:**  $^{57}\text{Co}(\text{II})$ : Vesikel aus dem *E. coli*-Stamm ECA349 mit dem Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆) und ECA349 mit dem Vektorplasmid pASK-IBA5 (◇). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals mittels *inside out vesicles* vom *E. coli*-Stamm GR362 ( $\Delta zntA::kan$ ,  $\Delta zntB::cat$ ,  $\Delta zitB$ ,  $\Delta zupT$ ,  $\Delta znuABC$ ) für CzcD kinetische Parameter, wie  $V_{max}$  und der Affinitätsparameter  $K_m$  für die Substrataffinität berechnet werden. Die Michaelis-Menten Konstante  $K_m$  ist als diejenige Substratkonzentration zu verstehen, bei der die halb-maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird.  $K_m$  und  $V_{max}$  konnten mittels unterschiedlicher Substratkonzentrationen für Zn(II) (0.03125  $\mu\text{M}$  - 4  $\mu\text{M}$ ) ermittelt werden. Anhand der errechneten Anstiege der einzelnen Substratkonzentrationen konnte die Geschwindigkeit berechnet werden, die damit direkt abhängig von der Substratkonzentration ist. Die Geschwindigkeit des CzcD-vermittelten Zn(II)-Transportes wurde als sigmoidale Sättigungskurve dargestellt, die einer hyperbolen Gleichung folgt (Abb. 7A). Die daraus resultierende Geschwindigkeit wurde genutzt, um ein Lineweaver-Burke-Diagramm zu erstellen, aus dem sich  $K_m$  und  $V_{max}$  ergaben (Abb. 7B). Im *E. coli*-Stamm GR362 transportierte CzcD in energetisierten Membranvesikeln mit NADH  $^{65}\text{Zn(II)}$  mit einem  $K_m$  von 2.2  $\mu\text{M}$  und einer  $V_{max}$  von 0.35  $\mu\text{mol Zn/min g Protein}$ .



**Abb. 7:**  $^{65}\text{Zn(II)}$ -Transportkinetik für CzcD in *inside out vesicles*

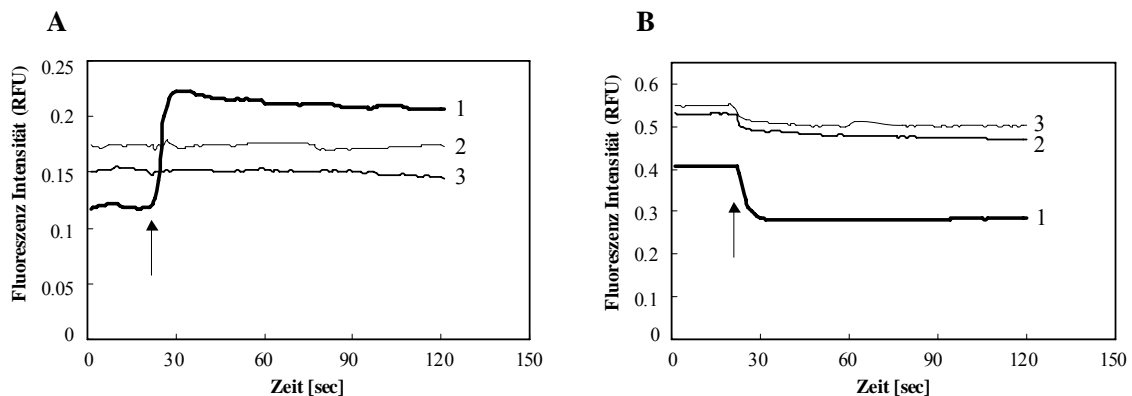
**A:** Substratsättigungskurve. Die Initialgeschwindigkeit der Zn(II)-Aufnahme ( $\blacklozenge$ ) durch CzcD wurde bestimmt und gegen die einzelnen Substratkonzentrationen aufgetragen. **B:** Lineweaver-Burke-Diagramm berechnet für die Initialgeschwindigkeit der Zn(II)-Aufnahme ( $\blacklozenge$ ). Aus dieser Kurve konnten  $K_m$  und  $V_{max}$  für CzcD kalkuliert werden.

### **3.3.3. CzcD kann in Proteoliposomen rekonstituiert werden und zeigt Transportaktivität für Zink und Eisen**

Die bisherigen Experimente in der vorliegenden Arbeit mit *inside out vesicles* deuteten auf eine direkte Transportaktivität für Zn(II), Co(II) und Cd(II) durch CzcD hin. Da bekannt ist, dass CDF-Proteine ein breites Substratspektrum besitzen, sollte auch Fe(II) als weiteres Metall für CzcD getestet werden. Auf der Grundlage eines künstlich basierenden Transportsystems, wurde daher der Transport von Fe(II) und Zn(II) durch das CzcD-Protein in Proteoliposomen untersucht.

CzcD wurde hierfür mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System gereinigt. Für die Überexpression wurde der *E. coli* Expressionstamm BL21 mit dem Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) transformiert. CzcD wurde mittels n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) bzw. Fos-Choline 14 aus der Membran solubilisiert. Zur Rekonstitution von CzcD in die Proteoliposomen wurde das Protein nach der Reinigung aufkonzentriert. Durch *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper wurde der Einbau von CzcD in die Proteoliposomen bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Während der Präparation wurde der pH-Wert innerhalb der Proteoliposomen auf pH 6.8 eingestellt, während der pH-Wert außerhalb auf pH 7.8 eingestellt wurde. Unter diesen Bedingungen sollte CzcD Zn(II) bzw. Fe(II) über den pH-Gradienten in die Liposomen transportieren. Je nachdem ob die Proteoliposomen mit dem metallbindenden Fluoreszenz-Farbstoff NewPortGreen DCF oder PhenGreen SK beladen wurden, konnte eine Fluoreszenzzunahme oder ein Quenching beobachtet werden. Wurde Zn(II) zum Ansatz pipettiert, konnte eine Fluoreszenzzunahme des Farbstoffes NewPortGreen DCF beobachtet werden, d.h. Zn(II) wurde durch CzcD in die Proteoliposomen transportiert. CzcD-freie Proteoliposomen bzw. die Zugabe von Puffer B ohne Metall zeigten keine Fluoreszenzzunahme (Abb. 8A). Wurden die Proteoliposomen mit PhenGreen SK beladen und die Reaktion durch Fe(II) gestartet, konnte ein Fluoreszenzquenching beobachtet werden. Dies sprach für ein Transport von Fe(II) durch CzcD. Wurde als Nullkontrolle nur Reaktionspuffer B zugegeben, wurde kein Quenching beobachtet (Abb. 8B).



**Abb. 8: Rekonstitution von CzcD in Proteoliposomen**

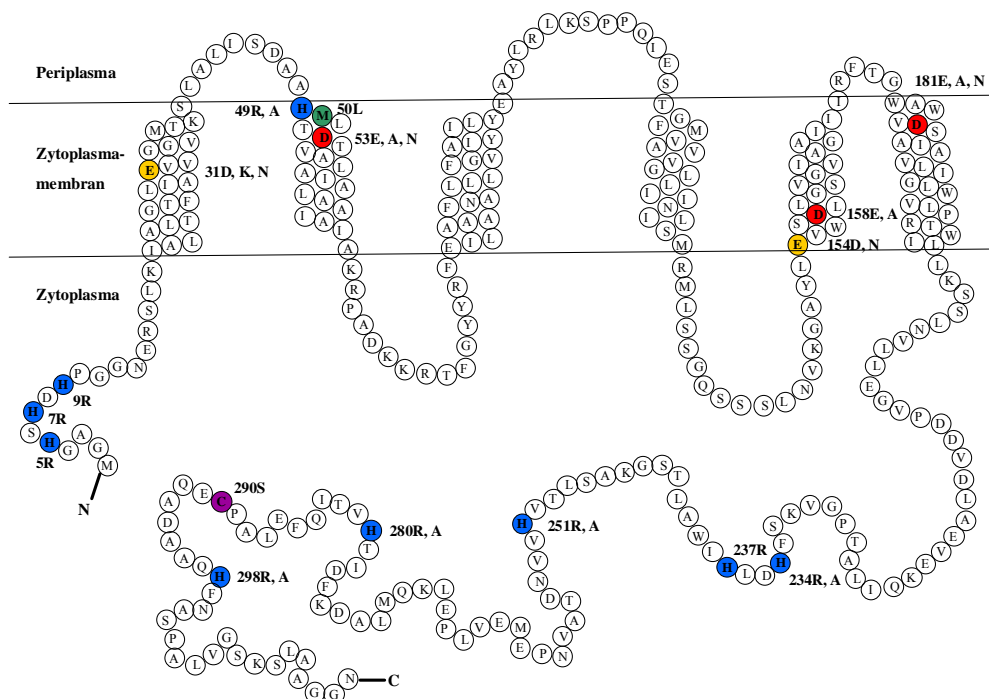
Proteoliposomen wurden in Puffer B verdünnt und unter Rühren bis zur Stabilität der Basislinie inkubiert. **A:** Fluoreszenzverstärkung von NewPortGreen DCF. **1:** Mit CzcD beladene Proteoliposomen, Zugabe von 10  $\mu$ M Zinkchlorid in Puffer B gelöst, **2:** Mit CzcD beladene Proteoliposomen, Zugabe von Puffer B, **3:** CzcD-freie Proteoliposomen, Zugabe von Puffer B. Der Pfeil markiert die Zugabe von Zn(II) bzw. Puffer B. **B:** Fluoreszenzquenching von PhenGreen SK. **1:** Mit CzcD beladene Proteoliposomen, Zugabe von 10  $\mu$ M Eisen(II)ammoniumsulfat in Puffer B gelöst, **2:** Mit CzcD beladene Proteoliposomen, Zugabe von Puffer B, **3:** CzcD-freie Proteoliposomen, Zugabe von Puffer B. Der Pfeil markiert die Zugabe von Fe(II) bzw. Puffer B.



### 3.4. Zink- und Cobalt-Wachstumsversuche mit Aminosäureaustausch-Mutanten von CzcD

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transportaktivität des CDF-Proteins CzcD untersucht und aufgeklärt. Um die Funktion einzelner wichtiger Aminosäuren in CzcD näher zu verifizieren, die möglicherweise an einer Bindung oder dem Transport von Schwermetallionen beteiligt sind, wurden verschiedene Basenpaare im *czcD*-Gen mittels *Quick-Change<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis-PCR* ausgetauscht. Die so gewonnenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Restriktionsanalysen verifiziert. CzcD zeigte in Wachstumsversuchen mit Zn(II) und Co(II) in schwermetallsensitiven *E.coli*-Stämmen erhöhte Resistenz gegenüber diesen Metallkationen. Mit Hilfe gezielter Aminosäureaustausch-Mutanten konnte ein möglicher Weg für den Export der Metalle bzw. den Einstrom von Protonen untersucht werden. In früheren Experimenten wurden erste Hinweise für die Beteiligung am Transport der Metallkationen von drei Aspartat-Resten an den Positionen 53, 158 und 181 erbracht (Anton, 2001).

Als Ausgangspunkt für die gewünschten Mutationen diente das Plasmid (pECD723; pASK-IBA5::*czcD*). Mittels *Quick-Change-PCR* wurden in der vorliegenden Arbeit folgende 23 Aminosäureaustausche in *czcD* eingeführt und näher charakterisiert: H5R, H7R, H9R, H49R, H49A, H237R, H251R, H251A, H280R, H280A, C290S, E31D, E31N, E31K, E154D, E154N, D53E, D53A, D158A, D158E, D181E, D181A und M50L (Abb. 9 und Tab. 7).



**Abb. 9:** Modell des Membranproteins CzcD aus *C. metallidurans*.

Die Aminosäureaustausche an den jeweiligen Positionen im Protein wurden farbig unterlegt.

**Tab. 7: Effekte der ausgetauschten Aminosäuren**

CzcD-Derivat	Effekt mit Zn(II) [ $\mu$ M] in <i>E. coli</i> GG48	IGC <sub>50</sub> Zn (II) [ $\mu$ M] <sup>a</sup>	Effekt mit Co(II) [ $\mu$ M] in <i>E. coli</i> ECA349	IGC <sub>50</sub> Co(II) [ $\mu$ M] <sup>b</sup>
Wildtyp CzcD	resistent	204	resistent	206
Vektor-Kontrolle (pASK-IBA5)	sensitiv	108	sensitiv	54
C290S	hypersensitiv <sup>c</sup>	<b>78</b>	hypersensitiv	<b>13</b>
E31D	intermediär <sup>d</sup>	125	k.F.	23
E31K	k.F. <sup>e</sup>	125	n.b.	n.b. <sup>f</sup>
E154D	k.F.	116	hypersensitiv	12
E154N	k.F.	100	hypersensitiv	8
D53A	hypersensitiv	<b>56</b>	n.b.	n.b.
D53E	hypersensitiv	<b>60</b>	hypersensitiv	<b>11</b>
D53N	hypersensitiv	<b>48</b>	n.b.	n.b.
D158A	k.F.	<b>85</b>	hypersensitiv	<b>25</b>
D158E	k.F.	112	hypersensitiv	<b>24</b>
D181A	intermediär	136	hypersensitiv	<b>43</b>
D181E	hypersensitiv	112	hypersensitiv	<b>27</b>
D181N	hypersensitiv	<b>59</b>	hypersensitiv	<b>27</b>
H5R	intermediär	163	hypersensitiv	<b>5</b>
H7R	k.F.	105	hypersensitiv	<b>15</b>
H9R	intermediär	154	intermediär	65
H49A	k.F.	118	intermediär	79
H49R	nicht exprimiert	n.b.	nicht exprimiert	n.b.
H237R	k.F.	118	n.b.	n.b.
H251A	intermediär	137	n.b.	n.b.
H251R	nicht exprimiert	n.b.	nicht exprimiert	n.b.
H280A	k.F.	93	hypersensitiv	<b>32</b>
H280R	nicht exprimiert	n.b.	nicht exprimiert	n.b.
H298A	k.F.	102	intermediär	130
H298R	nicht exprimiert	n.b.	nicht exprimiert	n.b.
M50L	hypersensitiv	<b>63</b>	intermediär	74

<sup>a,b</sup>IGC<sub>50</sub>, 50 % *Inhibition Growth Concentration*, IGC<sub>50</sub> beschreibt die Konzentration des Schwermetalls, die benötigt wird, um das Wachstum der Kulturen um die Hälfte zu reduzieren.

<sup>c</sup>Das CzcD-Derivat zeigte ein deutlich vermindertes Wachstum als die Vektorkontrolle pASK-IBA5 und erhöhte zusätzlich die Metall-Sensibilität. Dieser Phänotyp wurde als hypersensitiv definiert. Die hypersensitiven Effekte wurden **dick** hervorgehoben.

<sup>d</sup>Das CzcD-Derivat zeigte im Vergleich zur Vektorkontrolle pASK-IBA5 geringfügig Resistenz. Dieser Phänotyp wurde als intermediär definiert.

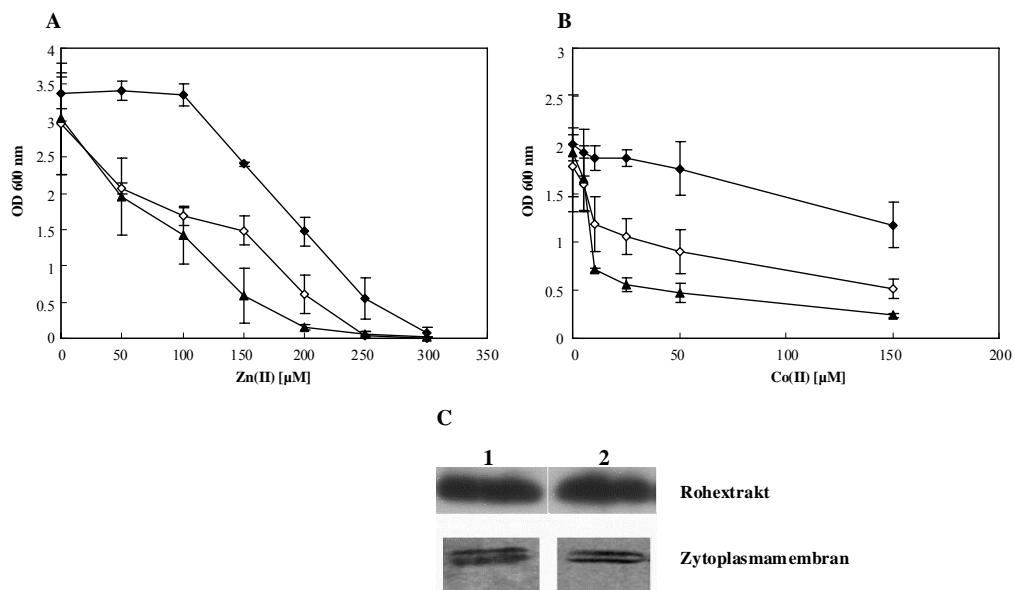
<sup>e</sup> k.F., keine Funktion : kein Unterschied im Vergleich zur Vektorkontrolle pASK-IBA5 im Wachstum.

<sup>f</sup> n.b., nicht bestimmt

### 3.4.1. Der einzige Cystein-Rest ist notwendig für die Funktion von CzcD

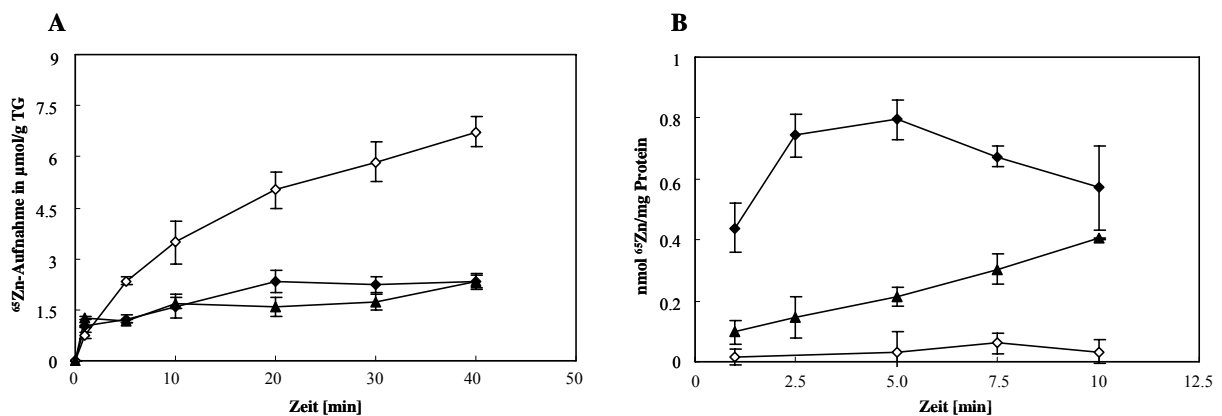
Der einzig vorhandene Cystein-Rest an Position 290 in CzcD wurde gegen einen Serin-Rest ausgetauscht. Der Einfluss dieser Mutation wurde in Wachstumsversuchen mit Zn(II) und Co(II) untersucht. Unter Anwesenheit unterschiedlicher Co(II)- und Zn(II)-Konzentrationen waren die Zellen, die *czcD*<sub>C290S</sub> exprimierten, nicht mehr in der Lage Resistenz gegenüber diesen Schwermetallkationen zu vermitteln (Abb. 10A und 10B). Die *E. coli*-Stämme GG48(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) [Zn(II)] und ECA349(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) [Co(II)] zeigten vermindertes Wachstum. Da CzcD<sub>C290S</sub> die Schwermetall-Sensibilität zusätzlich erhöhte und der Stamm schlechter wuchs als die Negativkontrolle GG48(pASK-IBA5), wurde dies als hypersensitiver Phänotyp definiert.

Die Anwesenheit des Wildtypproteins CzcD und des Mutantenproteins CzcD<sub>C290S</sub> wurde im Rohextrakt aus Zellen mittels spezifischen CzcD-Antikörper und in der Zytoplasmamembran mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper nachgewiesen. Das Expressionslevel von CzcD<sub>C290S</sub> war vergleichbar mit dem von CzcD (Abb. 10C).



**Abb. 10: Der Effekt der Austauschmutante CzcD<sub>C290S</sub> auf die Funktion von CzcD** **A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) (▲) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 µg AHT/1 zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), ECA349(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) (▲) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtskulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **C:** Western-Blot-Analyse der Proteine CzcD und CzcD<sub>C290S</sub>. Je 20 µg Rohextrakt der Zellen mit den Proteinen CzcD (1) und CzcD<sub>C290S</sub> (2) wurden aufgetragen und die Proteine mittels CzcD-Antikörper nachgewiesen. Je 10 µg Membranfraktion von CzcD (1) und CzcD<sub>C290S</sub> (2) wurden aufgetragen und mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper in der isolierten Zytoplasmamembran nachgewiesen.

Nachdem der Effekt auf das Wachstum der ausgetauschten Aminosäure Cystein in Wachstumsversuchen mit Zn(II) und Co(II) untersucht wurde und das Cystein essenziell für die Funktion von CzcD ist, wurde die Funktion des CzcD-Derivates CzcD<sub>C290S</sub> in Transportexperimenten mit <sup>65</sup>Zn(II) in ganzen Zellen vom *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) und in *inside out vesicles* untersucht. In ganzen Zellen zeigte der Stamm GG48(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) eine verminderte Zn(II)-Akkumulation, ähnlich wie der *E. coli*-Stamm GG48(pECD723, pASK-IBA5::czcD) (Abb. 11A). In *inside out vesicles* konnte für CzcD<sub>C290S</sub> eine verminderte Transportaktivität im Vergleich zum Wildtypstamm mit CzcD beobachtet werden (Abb. 11B). Jedoch verlor das CzcD-Derivat CzcD<sub>C290S</sub> im Vergleich zur Kontrolle GR362(pASK-IBA5) nicht vollständig die Transportaktivität. CzcD<sub>C290S</sub> akkumulierte <sup>65</sup>Zn(II) mit einer Transportkapazität von ca. 34 % im Vergleich zu CzcD. In Abhängigkeit zur Zeit konnte sogar ein Anstieg der Transportaktivität gemessen werden (Abb. 11B).

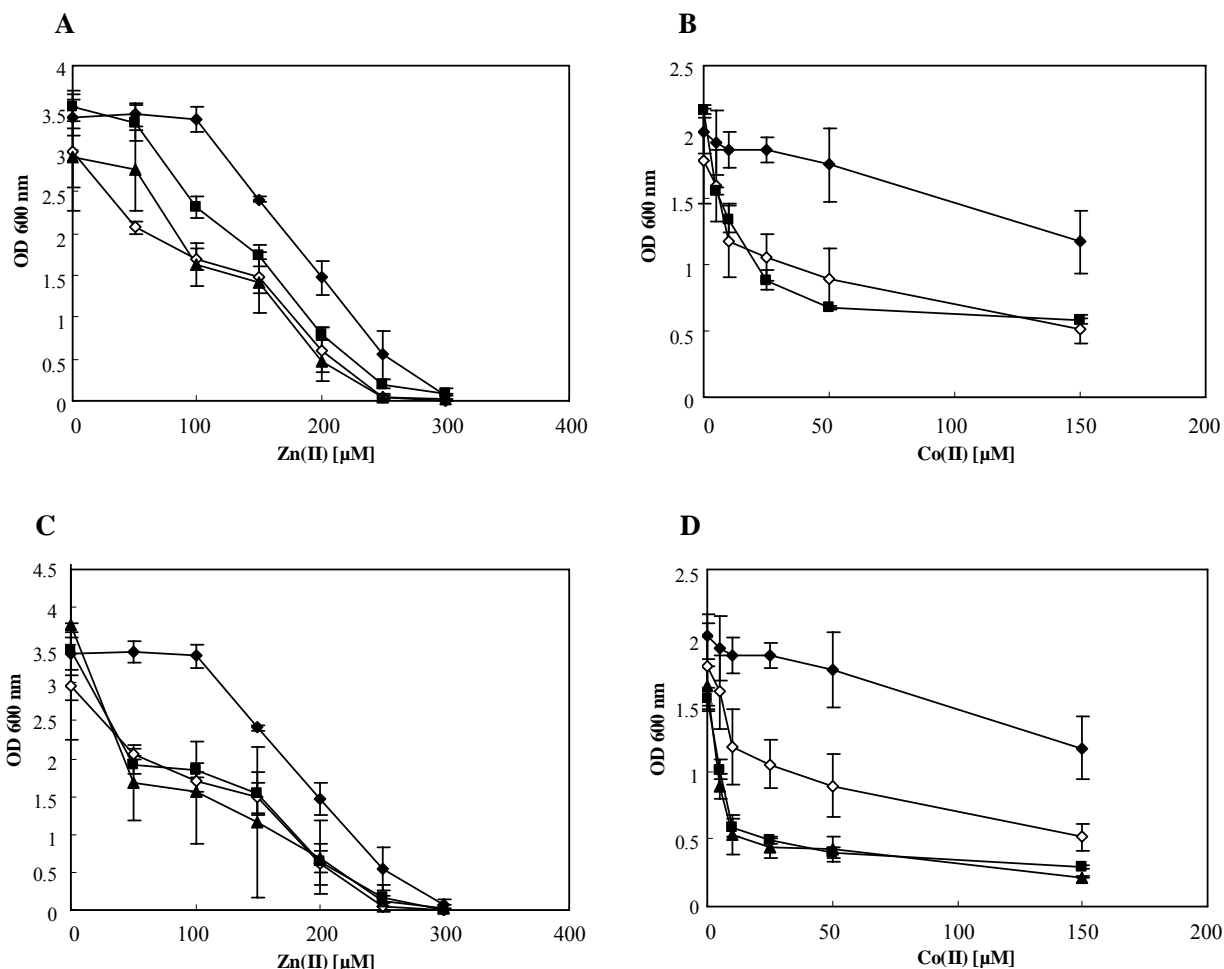


**Abb. 11: Transportexperimente durch CzcD<sub>C290S</sub> mit <sup>65</sup>Zn(II)** **A:** Aufnahmeexperimente an frühstationären Zellen mit 15  $\mu$ M <sup>65</sup>Zn(II) in den *E. coli*-Stämmen GG48(pECD723, pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) (▲) und GG48(pASK-IBA5) (◇). **B:** NADH-abhängiger <sup>65</sup>Zn(II)-Transport in *inside out vesicles* aus den *E. coli*-Stämmen GR362(pECD723, pASK-IBA5::czcD) (◆), GR362(pECD915; CzcD<sub>C290S</sub>) (▲) und GR362(pASK-IBA5) (◇). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

### 3.4.2. Der Einfluss der Glutamat-Reste der TMH I und TMH V

An der Position 31 in CzcD (Abb. 9) wurde der zwischen den Zn(II)-transportierenden CDF-Proteinen konservierte Glutamat-Rest in Asparagin, Aspartat und Lysin ausgetauscht. In Wachstumsversuchen in Anwesenheit unterschiedlicher Zn(II)- und Co(II)-Konzentrationen sollten die Effekte der Aminosäureaustausche auf die Resistenz von CzcD näher untersucht werden. Das CzcD-Derivat CzcD<sub>E31K</sub> zeigte in Wachstumsversuchen mit Zn(II) im *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) vermindertes Wachstum (Abb. 12A). Während die Zellen, die *czcD*<sub>E31D</sub> exprimierten, keine signifikanten Effekte bzw. noch geringes Wachstum

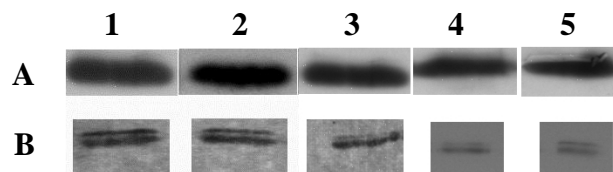
mit Zn(II) zeigten (Abb. 12A), konnte in Anwesenheit von Co(II) ein vermindertes Wachstumsverhalten beobachtet werden (Abb. 12B).



**Abb. 12: Einfluss von Zink- und Cobaltionen auf das Wachstum der Stämme GG48 (A), (C) und ECA349 (B) und (D) mit den CzcD-Glutamat-Derivaten** **A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD909; CzcD<sub>E31D</sub>) (■), GG48(pECD908; CzcD<sub>E31K</sub>) (▲) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 μg AHT/l zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), ECA349(pECD909; CzcD<sub>E31D</sub>) (■) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtskulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **C:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD910; CzcD<sub>E154D</sub>) (■), GG48(pECD911; CzcD<sub>E154N</sub>) (▲) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. **D:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), ECA349(pECD910; CzcD<sub>E154D</sub>) (■), ECA349(pECD911; CzcD<sub>E154N</sub>) (▲) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress.

Vier Aminosäuren stromaufwärts vom Motiv DLLGSVG befindet sich an der Position 154 in CzcD ein Glutamat-Rest, ein nicht konservierter Aminosäure-Rest zwischen den einzelnen Vertretern der CDF-Familie. Dieser Aminosäure-Rest wurde in ein Aspartat oder ein Asparagin umgewandelt. In Wachstumsversuchen mit unterschiedlichen Zn(II)- und Co(II)-

Konzentrationen zeigten die Zellen mit CzcD<sub>E154D</sub> und CzcD<sub>E154N</sub> verminderte Resistenz (Abb. 12C und 12D). In Anwesenheit von Co(II) führte die verminderte Resistenz zu einem hypersensitiven Phänotyp dieser CzcD-Derivate, d.h. die Zellen mit CzcD<sub>E154D</sub> und CzcD<sub>E154N</sub> zeigten ein stark vermindertes Wachstum im Vergleich zur Negativkontrolle GG48(pASK-IBA5) (Abb. 12D). Da die Expression von *czcD*<sub>E31N</sub> nicht nachgewiesen werden konnte, wurde diese Mutante nicht in Wachstumsversuchen eingesetzt. Die Proteine der CzcD-Derivate CzcD<sub>E31D</sub>, CzcD<sub>E31K</sub>, CzcD<sub>E154D</sub> und CzcD<sub>E154N</sub> konnten im Rohextrakt und in der isolierten Zytoplasmamembran nachgewiesen werden, jedoch in geringerer Menge als das Wildtypprotein CzcD (Abb. 13).



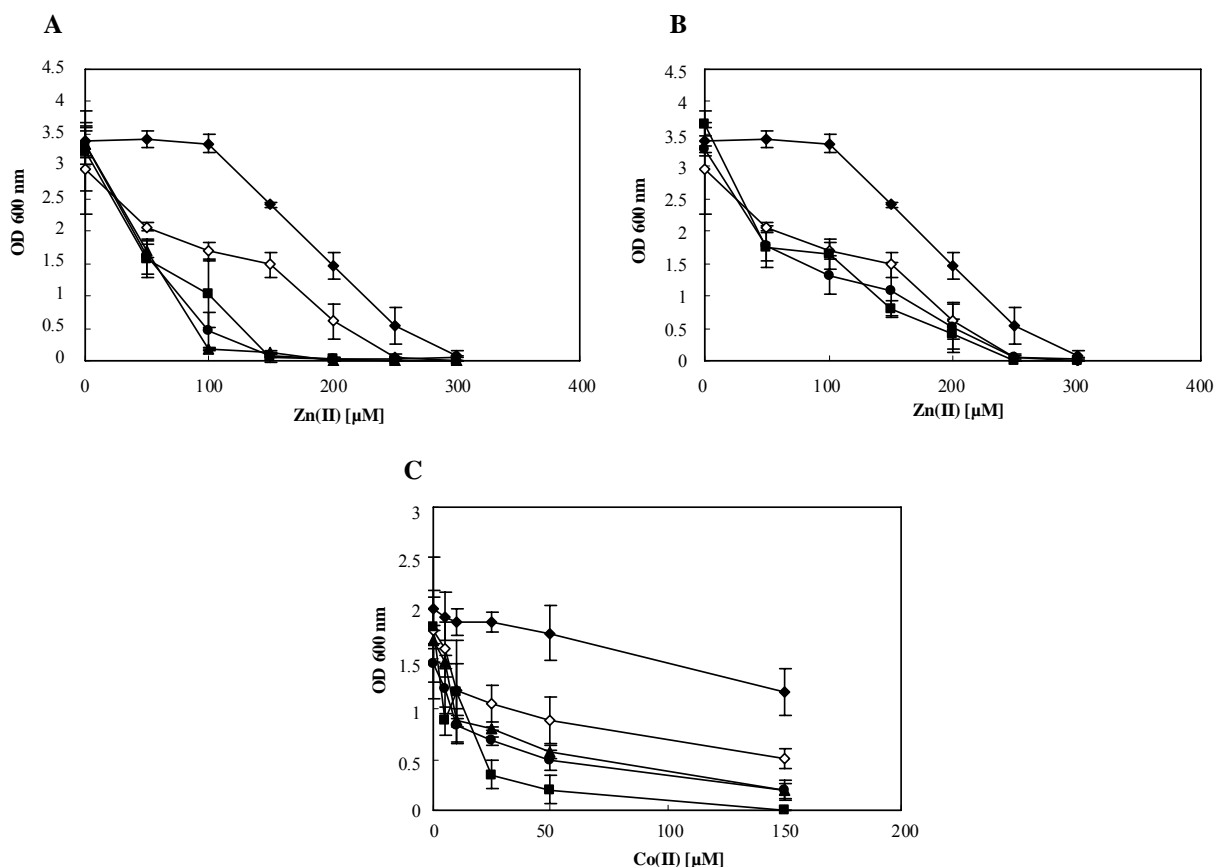
**Abb. 13: Western-Blot-Analyse der CzcD-Glutamat-Derivate** **A:** je 20 µg Rohextrakt der Zellen mit den Proteinen CzcD (1), CzcD<sub>E31D</sub> (2), CzcD<sub>E31K</sub> (3), CzcD<sub>E154D</sub> (4) und CzcD<sub>E154N</sub> (5) wurden aufgetragen und die Proteine mittels CzcD-Antikörper nachgewiesen. **B:** je 10 µg Membranfraktion von CzcD (1), CzcD<sub>E31D</sub> (2), CzcD<sub>E31K</sub> (3), CzcD<sub>E154D</sub> (4) und CzcD<sub>E154N</sub> (5) wurden aufgetragen und mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper in der isolierten Zytoplasmamembran nachgewiesen.

### **3.4.3. Aspartat-Reste innerhalb der TMHs II, V und VI sind in der Schwermetall-Homöostase beteiligt**

Die hochkonservierten Aspartat-Reste in den TMHs II, V und VI wurden ausgetauscht, um deren mögliche Beteiligung im Metalltransport aufzuklären.

Im mutmaßlichen Effluxkanal von CzcD sind in vorangegangenen Arbeiten folgende Aminosäureaustausche eingeführt worden: D53N, D158N und D181N (Anton, 2001).

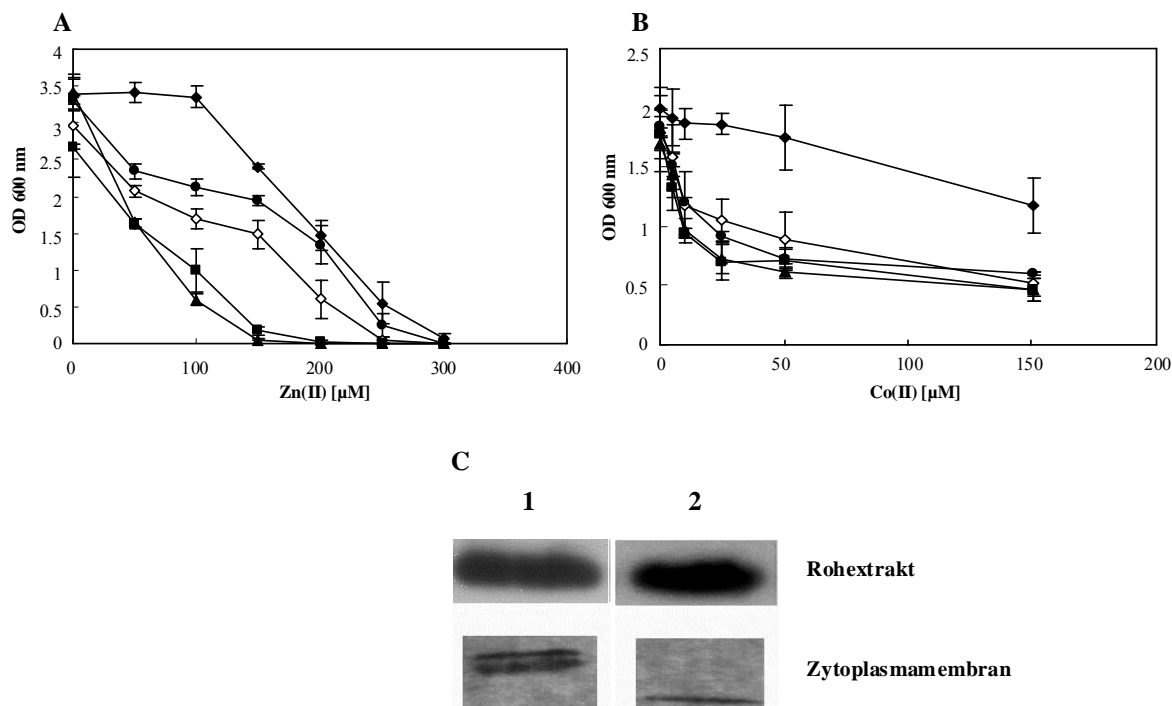
In der vorliegenden Arbeit wurden diese Aminosäure-Reste zusätzlich in Alanine und Glutamate ausgetauscht. Für die CzcD-Derivate CzcD<sub>D53A</sub>, CzcD<sub>D53E</sub> und CzcD<sub>D53N</sub> konnte in Anwesenheit von Zn(II) ein stark vermindertes Wachstum beobachtet werden (Abb. 13A). Wurde Co(II) in Wachstumsversuchen eingesetzt, konnte für das CzcD-Derivat CzcD<sub>D53E</sub> ebenfalls verminderte Resistenz gezeigt werden (Abb. 13C). In der TMH V von CzcD befindet sich ein konserviertes Motiv mit der Konsensussequenz DLLGSVG. Der Austausch dieses Aspartat-Restes in Alanin oder Glutamat führte zum Funktionsverlust von CzcD. In den Wachstumsversuchen mit Zn(II) und Co(II) zeigten die Stämme mit CzcD<sub>D158A</sub> und CzcD<sub>D158E</sub> im Vergleich zum Wildtypstamm GG48(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) vermindertes Wachstum (Abb. 13B und 13C).



**Abb. 13: Einfluss von Zink- und Cobaltionen auf das Wachstum der Stämme GG48 (A), (B) und ECA349 (C) mit den CzcD-Aspartat-Derivaten CzcD<sub>D53E</sub>, CzcD<sub>D53A</sub>, CzcD<sub>D53N</sub>, CzcD<sub>D158E</sub> und CzcD<sub>D158N</sub>** **A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD904; CzcD<sub>D53A</sub>) (●), GG48(pECD905; CzcD<sub>D53E</sub>) (■), GG48(pECD725; CzcD<sub>D53N</sub>) (▲) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD906; CzcD<sub>D158A</sub>) (●), GG48(pECD907; CzcD<sub>D158E</sub>) (■) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 µg AHT/l zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **C:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723, pASK-IBA5::czcD) (◆), ECA349(pECD905; CzcD<sub>D53E</sub>) (■), ECA349(pECD906; CzcD<sub>D158A</sub>) (●), ECA349(pECD907; CzcD<sub>D158E</sub>) (▲) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtkulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Wurden die Aspartat-Reste in der TMH VI gegen Alanin, Glutamat bzw. Asparagin substituiert, so konnte in Wachstumskurven für die CzcD-Derivate CzcD<sub>D181E</sub> und CzcD<sub>D181N</sub> ein stark vermindertes Wachstum in Anwesenheit von Zn(II) und Co(II) gezeigt werden (Abb. 14A und 14B). Zellen, die CzcD<sub>D181A</sub> exprimierten, führten in Anwesenheit von Co(II) zu einer stark verminderten Co(II)-Resistenz (Abb. 14B), während in Anwesenheit von Zn(II) noch geringfügig Zn(II)-Resistenz vermittelt wurde (Abb. 14A). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die CzcD-Aspartat-Derivate in Wachstumsversuchen die Schwermetall-

Sensibilität der *E. coli*-Stämme GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) und ECA349 ( $\Delta corA$ ,  $\Delta zupT::cat$ ,  $\Delta yohM$ ) zusätzlich erhöht und in einem hypersensitiven Phänotyp resultierten.



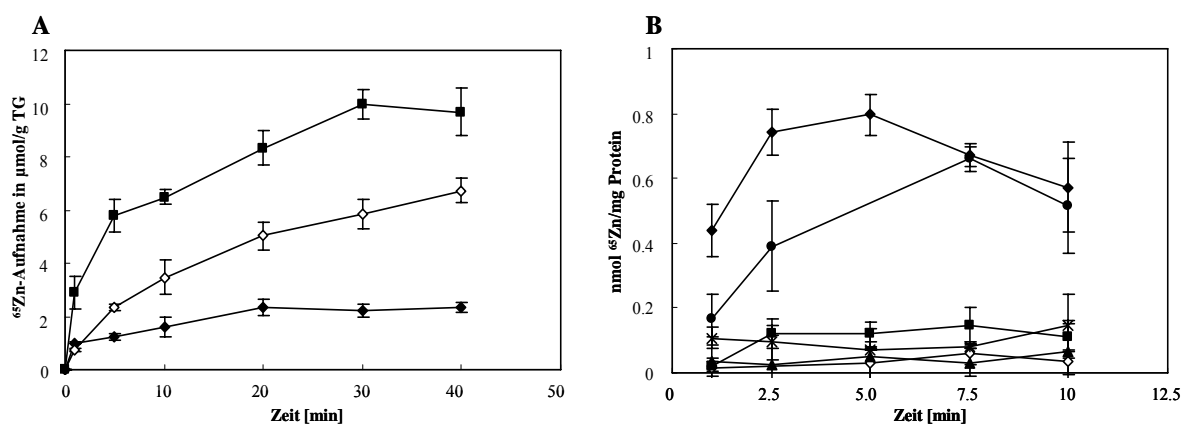
**Abb. 14: Einfluss von Zink- und Cobaltionen auf das Wachstum der Stämme GG48 (A) und ECA349 (B) mit den CzcD-Aspartat-Derivaten CzcD<sub>D181A</sub>, CzcD<sub>D181E</sub> und CzcD<sub>D181N</sub>.** **A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD727; CzcD<sub>D181N</sub>) (▲), GG48(pECD912; CzcD<sub>D181A</sub>) (●), GG48(pECD916; CzcD<sub>D181E</sub>) (■) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 µg AHT/I zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), ECA349(pECD727; CzcD<sub>D181N</sub>) (▲), ECA349(pECD912; CzcD<sub>D181A</sub>) (●), ECA349(pECD916; CzcD<sub>D181E</sub>) (■) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtskulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **C:** Western-Blot-Analyse der Proteine CzcD und CzcD<sub>D181E</sub>. Je 20 µg Rohextrakt der Zellen mit den Proteinen CzcD (1) und CzcD<sub>D181E</sub> (2) wurden aufgetragen und die Proteine mittels CzcD-Antikörper nachgewiesen. Je 10 µg Membranfraktion von CzcD (1) und CzcD<sub>D181E</sub> (2) wurden aufgetragen und mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper in der isolierten Zytoplasmamembran nachgewiesen.

Durch quantitative Western-Blot-Analyse konnte mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper die Anwesenheit der Proteine CzcD<sub>D53A</sub>, CzcD<sub>D53E</sub>, CzcD<sub>D53N</sub>, CzcD<sub>D158A</sub>, CzcD<sub>D158E</sub>, CzcD<sub>D181A</sub>, CzcD<sub>D181E</sub> und CzcD<sub>D181N</sub> in der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden, wobei die Stärke der Expression geringer war, als im Vergleich zum Wildtypprotein CzcD (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Fall von CzcD<sub>D181E</sub> war das Erscheinen einer kleineren Bande in der Zytoplasmamembran im Vergleich zum Wildtypprotein CzcD erkennbar (Abb. 14C). Dies deutete wahrscheinlich auf Proteolyse hin und damit auf ein instabiles CzcD-Derivat.



Nachdem in Wachstumsversuchen gezeigt wurde, dass die ausgetauschten Aspartat-Reste 53, 158 und 181 eine wesentliche Rolle in der Schwermetallresistenz von CzcD spielen, wurden nun Transportmessungen mit radioaktivem Zink durchgeführt.

Dabei wurde CzcD<sub>D181E</sub> zunächst für Akkumulationsexperimente mit ganzen Zellen und <sup>65</sup>Zn(II) eingesetzt. In den Aufnahmeexperimenten resultierte der Aminosäureaustausch CzcD<sub>D181E</sub> in einem deutlichen Effekt auf die Transportaktivität von CzcD. Während nach 20 min die Akkumulation von <sup>65</sup>Zn(II) im Stammes GG48(pECD723, pASK-IBA5::*czcD*) ein Maximum erreichte, akkumulierte der Stamm GG48(pECD916; CzcD<sub>D181E</sub>) über einen längeren Zeitraum weiter (Abb. 15A).



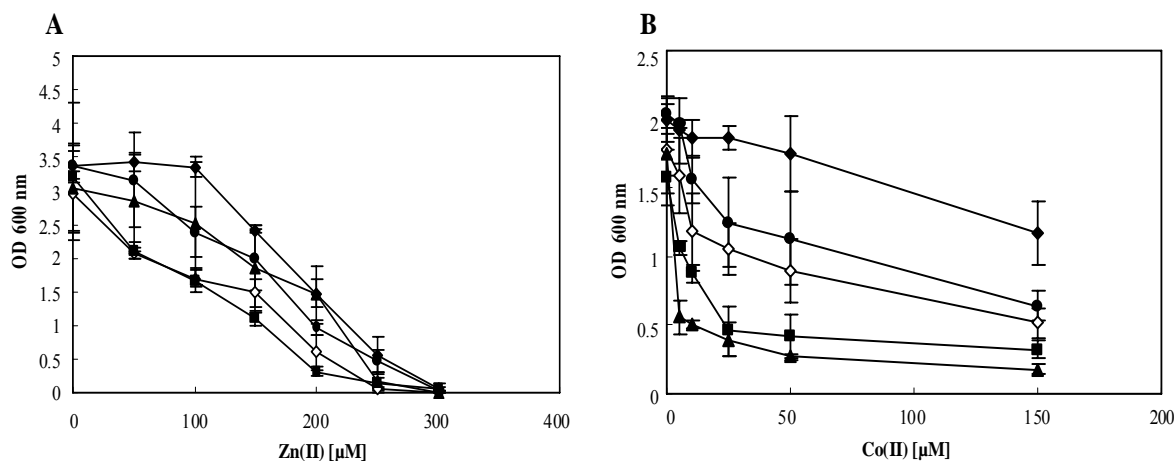
**Abb. 15: Transportexperimente mit CzcD-Aspartat-Derivaten mit <sup>65</sup>Zn(II)** **A:** Aufnahmeexperimente an frühstationären Zellen mit 15  $\mu$ M <sup>65</sup>Zn(II) in den *E. coli*-Stämmen GG48(pECD723, pASK-IBA5::*czcD*) (◆), GG48(pECD916; CzcD<sub>D181E</sub>) (■) und GG48(pASK-IBA5) (◇). **B:** NADH-abhängiger <sup>65</sup>Zn(II)-Transport in *inside out vesicles* aus den *E. coli*-Stämmen GR362(pECD723, pASK-IBA5::*czcD*) (◆), GR362(pECD905; CzcD<sub>D53E</sub>) (●), GR362(pECD915; CzcD<sub>D158E</sub>) (\*), GR362(pECD916; CzcD<sub>D181E</sub>) (■), GR362(pECD727; CzcD<sub>D181N</sub>) (▲) und GR362(pASK-IBA5) (◇). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Nachdem die Funktion von CzcD<sub>D181E</sub> in Akkumulationsexperimenten mit frühstationären Zellen untersucht wurde, sollte zusätzlich der direkte Transport der Aminosäureaustausch-Mutanten CzcD<sub>D53E</sub>, CzcD<sub>D158E</sub>, CzcD<sub>D181E</sub> und CzcD<sub>D181N</sub> in *inside out vesicles* untersucht werden. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm GR362 ( $\Delta$ *zntA*::*kan*,  $\Delta$ *zntB*::*cat*,  $\Delta$ *zitB*,  $\Delta$ *zupT*,  $\Delta$ *znuABC*) mit den Plasmiden (pECD905; CzcD<sub>D53E</sub>), (pECD907; CzcD<sub>D158E</sub>), (pECD916; CzcD<sub>D181E</sub>) und (pECD727; CzcD<sub>D181N</sub>) transformiert. Die Anwesenheit der Proteine wurde mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper gezeigt (Ergebnisse nicht gezeigt). In den Transportexperimenten mit *inside out vesicles* konnte für CzcD<sub>D158E</sub>, CzcD<sub>D181E</sub> und CzcD<sub>D181N</sub> eine verminderte Transportaktivität mit <sup>65</sup>Zn(II) gemessen werden (Abb. 15B). Für CzcD<sub>D53E</sub> konnte hingegen ähnlich wie für das Wildtypprotein CzcD eine erhöhte Akkumulation beobachtet werden. Nach ca. 7.5 min erreichte der Stamm GR362(pECD905; CzcD<sub>D53E</sub>) mit  $0.66 \pm 0.04$  nmol <sup>65</sup>Zn/mg Protein seine maximale Akkumulation (Abb. 15B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CzcD-Aspartat-Derivate im Vergleich zu CzcD  $^{65}\text{Zn(II)}$  nur noch zu 7-16 % akkumulierten. Nur CzcD<sub>D53E</sub> akkumulierte  $^{65}\text{Zn(II)}$  mit ca. 69 % im Vergleich zu CzcD. Dies deutete auf einen möglichen Zn(II)-Transport durch CzcD<sub>D53E</sub> *in vitro* hin.

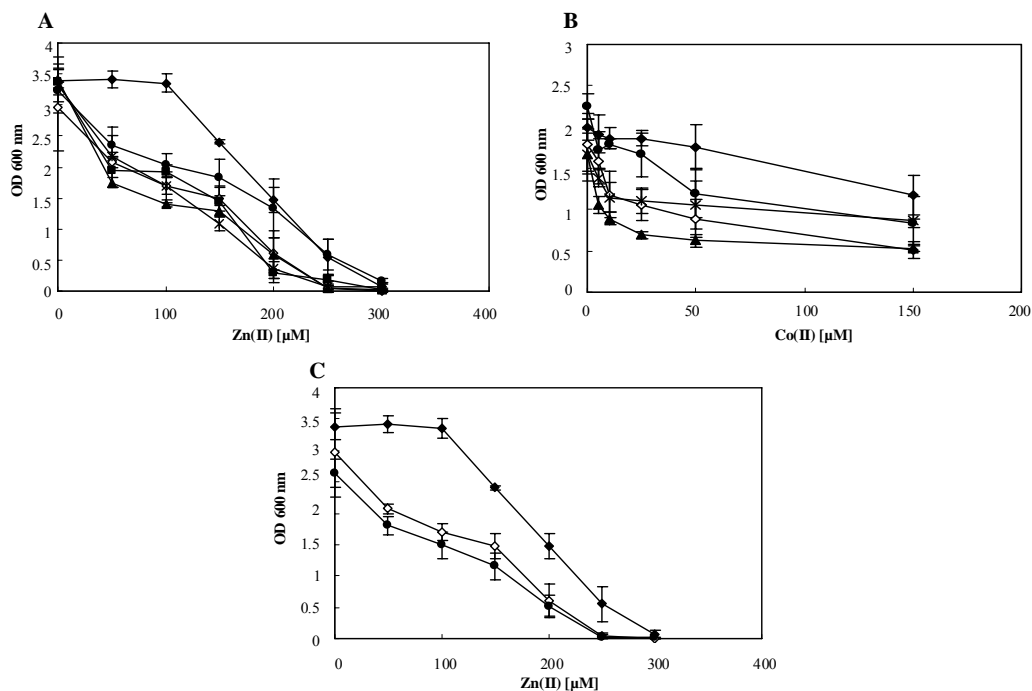
### 3.4.4. Die Histidin-Reste in CzcD sind wahrscheinlich am Metalltransport beteiligt

Auf der Annahme basierend, dass die konservierten Histidin-Reste in CzcD an der Bindung bzw. Weitergabe der Metalle beteiligt sind, wurde jedes der neun Histidin-Reste mittels *Quick-Change*-PCR ausgetauscht. Dabei sind drei Histidine im N-Terminus, fünf im C-Terminus und eins in der TMH II lokalisiert (Abb. 9). Um die funktionelle Bedeutung der Histidin-Reste aufzuklären, wurden die Histidin-Reste in Arginine ausgetauscht. Mit einer Ausnahme, dem Histidin-Rest an Position 234, konnten alle Histidin-Reste erfolgreich in Arginine umgewandelt werden. Alle *czcD*-Histidin-Derivate wurden im *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta\text{zitB}::\text{cat}$ ,  $\Delta\text{zntA}::\text{kan}$ ) überexprimiert.



**Abb. 16: Einfluss von Zink- und Cobaltionen auf das Wachstum der Stämme GG48 (A) und ECA349 (B) mit den CzcD-Histidin-Derivaten CzcD<sub>H5R</sub>, CzcD<sub>H7R</sub> und CzcD<sub>H9R</sub>** **A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::czcD) (◆), GG48(pECD913; CzcD<sub>H5R</sub>) (▲), GG48(pECD897; CzcD<sub>H7R</sub>) (■), GG48(pECD914; CzcD<sub>H9R</sub>) (●) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 µg AHT/l zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723, pASK-IBA5::czcD) (◆), ECA349(pECD913; CzcD<sub>H5R</sub>) (▲), ECA349(pECD897; CzcD<sub>H7R</sub>) (■), ECA349(pECD914; CzcD<sub>H9R</sub>) (●) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtkulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Unter Einfluss unterschiedlicher Zn(II)-Konzentrationen zeigten die CzcD-Derivate CzcD<sub>H5R</sub> und CzcD<sub>H9R</sub> in Zellen einen intermediären Phänotyp, d.h. sie zeigten im Vergleich zum Wildtypstamm vermindertes aber im Vergleich zur Negativkontrolle GG48(pASK-IBA5) besseres Wachstum (Abb. 16A). Die Zellen, die *czcD*<sub>H7R</sub> exprimierten, waren nicht mehr in der Lage die Zn(II)-Sensitivität des *E. coli*-Stammes GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) aufrechtzuerhalten und zeigten verminderte Zn(II)-Resistenz (Abb. 16A). In Anwesenheit von Cobaltionen führten die Aminosäureaustausche CzcD<sub>H5R</sub> und CzcD<sub>H7R</sub> zum vollständigen Funktionsverlust von CzcD. Das stark verminderte Wachstum resultierte in einem hypersensitiven Phänotyp (Abb. 16B). Wuchs der Stamm GG48(pECD914; CzcD<sub>H9R</sub>) in Anwesenheit von Co(II), so konnte ähnlich wie für Zn(II) noch geringe Co(II)-Resistenz beobachtet werden (Abb. 16B).

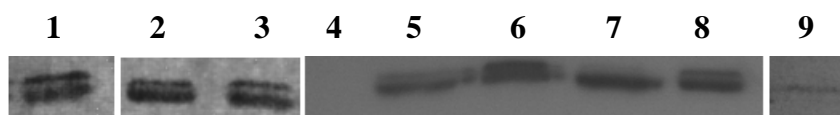


**Abb. 17: Einfluss von Zink- und Cobaltionen auf das Wachstum der Stämme GG48 (A), (C) und ECA349 (B) mit den CzcD-Histidin-Derivaten CzcD<sub>H237R</sub>, CzcD<sub>H251A</sub>, CzcD<sub>H280A</sub>, CzcD<sub>H298A</sub> und CzcD<sub>H49A</sub>**  
**A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆), GG48(pECD899; CzcD<sub>H237R</sub>) (■), GG48(pECD900; CzcD<sub>H251A</sub>) (●), GG48(pECD901; CzcD<sub>H280A</sub>) (▲), GG48(pECD902; CzcD<sub>H298A</sub>) (\*) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 µg AHT/l zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723, pASK-IBA5::*czcD*) (◆), ECA349(pECD898; CzcD<sub>H49A</sub>) (●), ECA349(pECD912; CzcD<sub>H280A</sub>) (▲), ECA349(pECD902; CzcD<sub>H298A</sub>) (\*) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtskulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **C:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆), GG48(pECD898; CzcD<sub>H49A</sub>) (●) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress.

In der zytoplasmatischen Domäne von CzcD befinden sich an Position 237, 251, 280 und 298 vier weitere Histidin-Reste (Abb. 9). Die Anwesenheit von CzcD<sub>H237R</sub> wurde in der Zytoplasmamembran mittels CzcD-Antikörper nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Anwesenheit der drei Proteine CzcD<sub>H251R</sub>, CzcD<sub>H280R</sub> und CzcD<sub>H298R</sub> konnte in der Zelle nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden diese Histidine zusätzlich in Alanine ausgetauscht. In Wachstumsversuchen mit unterschiedlichen Zn(II)-Konzentrationen zeigte der *E. coli*-Stamm GG48, der *czcD*<sub>H251A</sub> exprimiert, noch geringfügig Zn(II)-Resistenz (Abb. 17A). Die Zellen mit den Aminosäureaustausch-Mutanten CzcD<sub>H237R</sub>, CzcD<sub>H280A</sub> und CzcD<sub>H298A</sub> führten zu einem deutlich verminderten Wachstum. Diese CzcD-Derivate waren nicht mehr in der Lage, die Zn(II)-Sensitivität von GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) aufrechtzuerhalten (Abb. 17A). Auch unter Anwesenheit von Co(II) konnte für das CzcD-Derivat CzcD<sub>H280A</sub> ein Funktionsverlust von CzcD nachgewiesen werden (Abb. 17B). Zellen mit CzcD<sub>H298A</sub> zeigten in Wachstumsversuchen mit Co(II) noch geringfügig Co(II)-Resistenz und somit einen intermediären Phänotyp (Abb. 17B).

Der Austausch des Histidins an Position 49 in der TMH II führte in Wachstumsversuchen mit Zn(II) zu einer verminderten Zn(II)-Resistenz. Dabei führte die neu eingeführte Aminosäure Alanin zum vollständigen Funktionsverlust von CzcD (Abb. 17C). Wurde der Stamm GG48(pECD898; CzcD<sub>H49A</sub>) mit Co(II) angezogen, so konnte in Wachstumsversuchen für diesen Stamm noch geringfügig Co(II)-Resistenz vermittelt werden (Abb. 17B).

Die Anwesenheit der Proteine CzcD<sub>H5R</sub>, CzcD<sub>H9R</sub>, CzcD<sub>H49A</sub>, CzcD<sub>H237R</sub>, CzcD<sub>H251A</sub>, CzcD<sub>H280A</sub> und CzcD<sub>H298A</sub> konnte mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper in der Zytoplasmamembran bestätigt werden (Abb. 18). Während CzcD<sub>H5R</sub> und CzcD<sub>H7R</sub> eine ähnliche Proteinmenge wie das Wildtypprotein CzcD aufwiesen, konnte die Expression von *czcD*<sub>H7R</sub> nicht in der präparierten Zytoplasmamembran nachgewiesen werden, jedoch erschien eine Bande in Form von *inclusion bodies* im Rohextrakt (Ergebnisse nicht gezeigt). CzcD<sub>H49A</sub> konnte im Vergleich zu CzcD nur als schwache Bande detektiert werden, bei gleichen Proteinmengen, die aufgetragen wurden (Abb. 18).

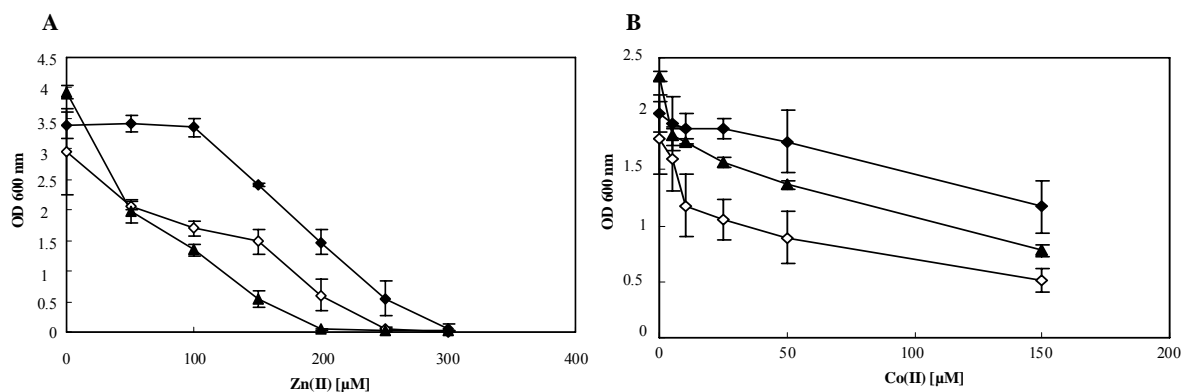


**Abb. 18: Western-Blot-Analyse der CzcD-Histidin-Derivate**

**A:** je 15  $\mu$ g Membranfraktion von CzcD (1), CzcD<sub>H5R</sub> (2), CzcD<sub>H9R</sub> (3), CzcD<sub>H7R</sub> (4), CzcD<sub>H237R</sub> (5), CzcD<sub>H251A</sub> (6), CzcD<sub>H280A</sub> (7), CzcD<sub>H298A</sub> (8) und CzcD<sub>H49A</sub> (9) wurden aufgetragen und mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Antikörper in der isolierten Zytoplasmamembran nachgewiesen.

### 3.4.5. Das CzcD-Derivat CzcD<sub>M50L</sub> hat Einfluss auf die Schwermetallresistenz von CzcD

An Position 50 innerhalb der TMH II in CzcD ist ein konservierter Methionin-Rest lokalisiert. Dieser Aminosäure-Rest wurde gegen ein Lysin substituiert. Unter Anwesenheit verschiedener Zn(II)-Konzentrationen zeigte der *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) mit CzcD<sub>M50L</sub> ein vermindertes Wachstum im Vergleich zu CzcD und zur Negativkontrolle GG48(pASK-IBA5). Der Austausch führte zur verminderten Zn(II)-Resistenz und resultierte letztendlich in einem hypersensitiven Phänotyp (Abb. 19A). Während unter Anwesenheit verschiedener Co(II)-Konzentrationen für das CzcD-Derivat CzcD<sub>M50L</sub> noch geringfügig Co(II)-Resistenz beobachtet werden konnte (Abb. 19B).



**Abb. 19: Einfluss von Zink- und Cobaltionen auf das Wachstum der Stämme GG48 (A) und ECA349 (B) mit dem CzcD-Methionin-Derivat CzcD<sub>M50L</sub>**

**A:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme GG48(pECD723; pASK-IBA5::*czcD*) (◆), GG48(pECD903; CzcD<sub>M50L</sub>) (▲) und GG48(pASK-IBA5) (◇) unter Zinkstress. Hauptkulturen wurden aus einer achtstündigen Vorkultur 1:100 in LB-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Kulturen 200 µg AHT/l zur Induktion von *czcD* hinzugegeben. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen. **B:** Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme ECA349(pECD723, pASK-IBA5::*czcD*) (◆), ECA349(pECD903; CzcD<sub>M50L</sub>) (▲) und ECA349(pASK-IBA5) (◇) unter Cobaltstress. Übernachtskulturen der einzelnen *E. coli*-Stämme wurden aus LB-Medium 1:400 in Tris-MM-Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in frischem Tris-MM-Medium 1:400 verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen 1:400 in Tris-MM-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Cobaltkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Die Anwesenheit des Proteins CzcD<sub>M50L</sub> konnte im Rohextrakt und in der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden, jedoch in geringerer Proteinmenge als im Vergleich zum Wildtypprotein CzcD (Ergebnisse nicht gezeigt).

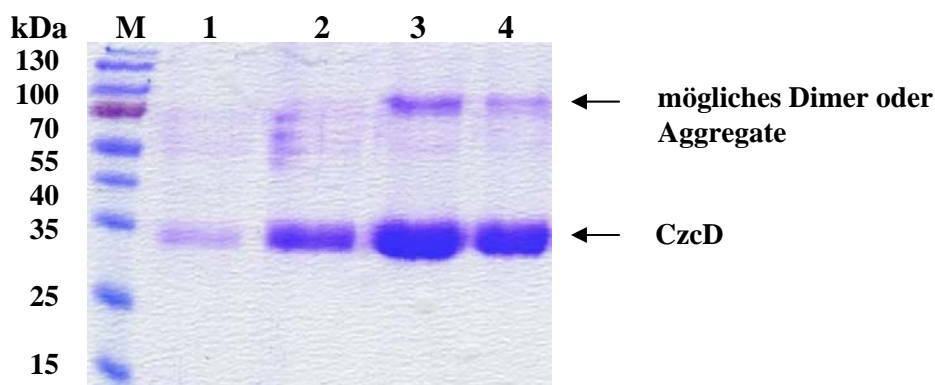
### 3.5. Biochemische Charakterisierung von CzcD

#### 3.5.1. Mittels des *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Systems kann CzcD nur als heterogenes Protein gereinigt werden

Es ist bekannt, dass sich das Protein CzcD mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Systems reinigen lässt (Anton, 2001), wobei die Genexpression und die Reinigung des Proteins auf der Bindung des *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Peptides (WSHPQFEK) an *StrepTactin*-Sepharose beruht.

Zu Beginn der Arbeit lag das *czcD*-Gen als *EcoRI/NcoI*-Fragment im Vektor pASK-IBA5 kloniert vor (Anton, 2001). Ausgehend von diesem Konstrukt wurde CzcD mit 2 mg n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM)/mg Membranprotein solubilisiert. Unter Verwendung von TB-Medium konnten pro Liter Kultur nach DDM-Solubilisierung ca. 6-7 mg Gesamtprotein erhalten werden.

Wurde das Protein nach der Reinigung auf eine SDS-PAGE aufgetragen und analysiert, so waren bei ca. 34 kDa und 70 kDa Banden sichtbar (Abb. 20). Die Bande bei 34 kDa konnte CzcD zugeordnet werden, während die Bande bei 70 kDa Aggregate oder ein potenzielles Dimer von CzcD sein könnte.

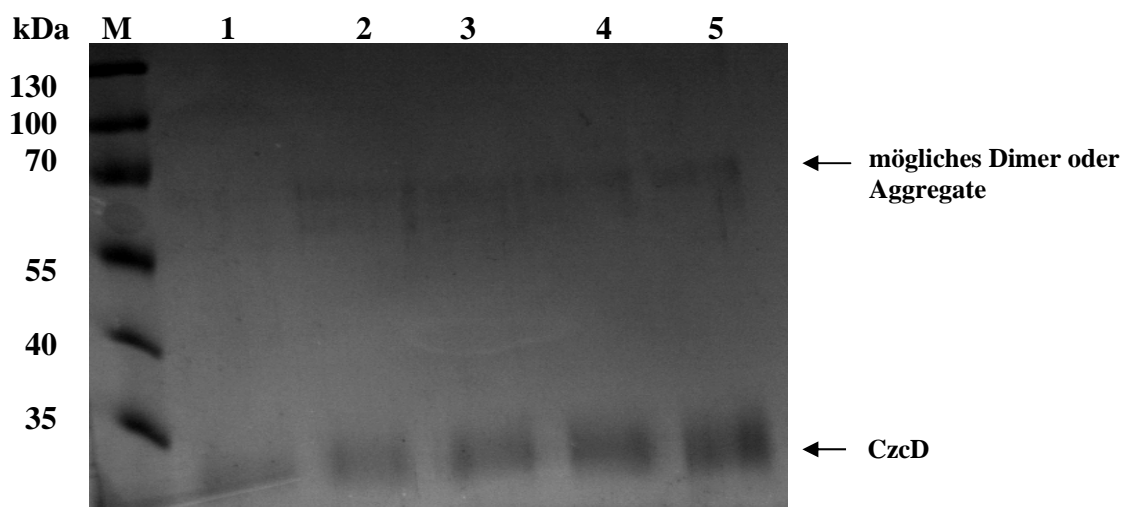


**Abb. 20: SDS-PAGE der Reinigung von CzcD als *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Fusion mit DDM**

Das mit DDM solubilisierte CzcD-Protein wurde auf eine 15 %ige (w/v) SDS-PAGE aufgetragen, Coomassie-Färbung. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-4:** 10  $\mu$ l der Elutionsfraktionen 1-4 des gereinigten CzcD-Proteins.

Für nachfolgende Experimente wie der Kristallisation und der Röntgenkleinwinkelstreuung ist es wichtig, dass ein Protein im homogenen Zustand vorliegt. In früheren Arbeiten wurde der native Zustand von CzcD nach der Reinigung nicht untersucht. In Grenoble am Institut de Biologie Structurale wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Covés der native Charakter von CzcD erstmals in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Um den oligomeren Zustand zu untersuchen, wurden für CzcD verschiedene Reinigungsprotokolle und Methoden, wie

Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und analytische Gelfiltration neu etabliert. Mit der Methode der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation werden die Dichteunterschiede verschieden konzentrierter Lösungen aufgebaut und ausgenutzt. Proteine und Komplexe trennen sich nach ihrer Dichte und lassen sich dadurch besonders gut nach Größe trennen. Je nach oligomerem Zustand von CzcD wurde das Protein in der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert. In Fraktionen höherer Dichte findet man große Komplexe. Die Fraktionen geringerer Dichte führen kleinere Komplexe. Durch den Saccharosegradienten erfolgte eine Auftrennung des Proteinlysates aufgrund der verschiedenen Massen der Partikel und deren Sedimentationsverhalten im Medium. Mit Hilfe des Dichtegradienten sollte festgestellt werden, ob CzcD im hetero- oder homogenen Zustand vorliegt. Im Optimalfall sollte eine einzige Bande des Proteins im Gradienten auftreten, die dann für die Homogenität spricht. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden 14 Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt. Die einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden auf eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetragen und analysiert (Abb. 21). Mit zunehmender Fraktionsnummer traten Proteine höherer Dichte auf.

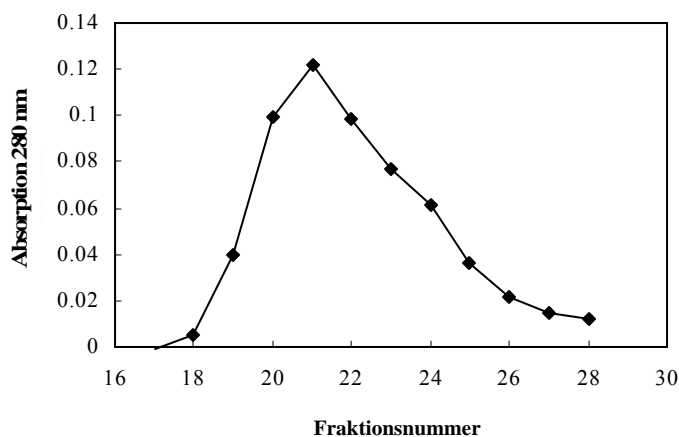


**Abb. 21: SDS-PAGE der Fraktionen des gereinigten CzcD-Proteins nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit DDM**

Das CzcD-Protein wurde mit 2 mg DDM/mg Membranprotein solubilisiert, die CzcD-Eluate aufkonzentriert und einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit 0.5 M Saccharose unterzogen. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-5:** 10 µl der Fraktionen 10-14 des Saccharose-Gradienten. Coomassie-Färbung.

In der SDS-PAGE konnte CzcD auf dem Boden des Saccharose-Dichtegradienten, also in den Elutionsfraktionen 10-14 nachgewiesen werden. Dies deutete auf größere Proteinkomplexe höherer Dichte hin. Da CzcD in fünf Fraktionen des Gradienten zu finden war, kann man hier von einem heterogenen Protein ausgehen. Analysen der ersten Fraktionen (1-9) des Gradienten in der SDS-PAGE zeigten keine Bande der Größe von 34 kDa, die CzcD

entsprach (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Bande bei 70 kDa konnte nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ebenfalls wieder im SDS-PAGE detektiert werden (Abb. 21). Mittels analytischer Gelfiltration an Superdex 200 sollte der mögliche heterogene Zustand von CzcD näher untersucht werden. Die Größen-Ausschluss-Chromatographie beruht darauf, dass Proteine unterschiedlicher Molekülgröße und entsprechend ihrer Retentionszeit getrennt werden. Dabei eluieren große Proteinkomplexe zuerst, während die kleineren langsamer durch die stationäre Phase wandern. Für die Gelfiltration wurden 2 mg/ml Membranprotein verwendet. Nach der Gelfiltration konnte ein Proteinpeak in den Fraktionen 18-26 detektiert werden. Dieser Peak deutete auf höhermolekulare Banden hin. Da die Säule nicht geeicht war, konnte die Größe des Peaks nicht genau verifiziert werden. Jedoch konnte anhand des asymmetrischen Peaks der heterogene Zustand von CzcD bestätigt werden (Abb. 22). Die erhaltenen Eluate der Gelfiltration sollten in einer nativen PAGE aufgetrennt werden, um den nativen Zustand der Proteineluate zu analysieren. Aufgrund der Aggregation oder Ladung des Proteins konnte beobachtet werden, dass kein Eluat von CzcD in das native PAGE-Gel hineinlief (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CzcD mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System in einem aggregierten Zustand gereinigt wurde. Der heterogene Charakter des CzcD-Proteins konnte mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration nachgewiesen werden.



**Abb. 22: Analytische Gelfiltration vom gereinigten CzcD-Protein an Superdex 200**

2mg/ml CzcD wurden auf die Säule gegeben. Während der Gelfiltration wurde ein Elutionsprofil der eluierten Proteingrößen erfasst. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurden bei 280 nm bestimmt und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

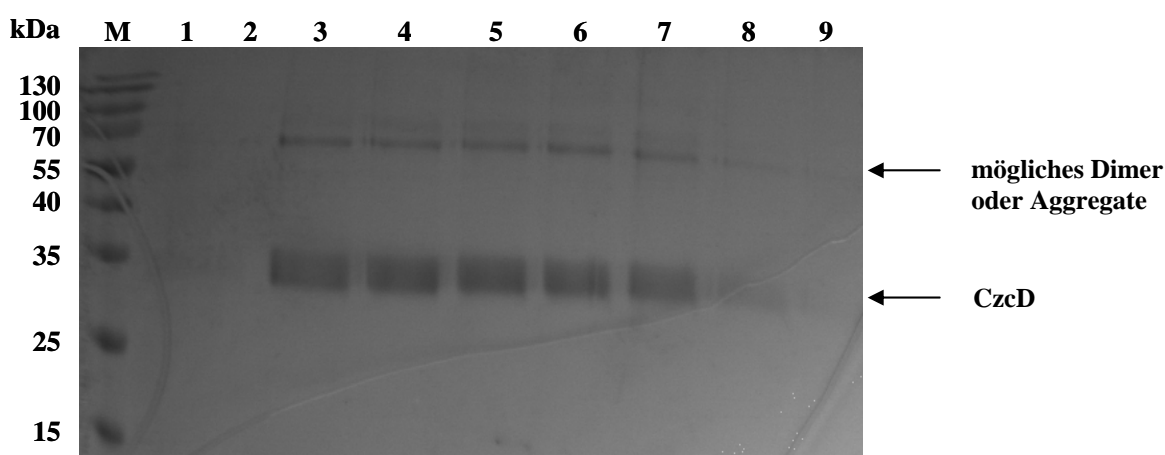
### **3.5.2. Nach Behandlung mit NaCl und EDTA liegt CzcD in dissoziierter Form vor**

Da bekannt ist, dass Salze wie NaCl in hohen Ionenstärken die Aggregatbildung von Proteinen verhindern bzw. auflösen, wurde CzcD nach der Reinigung im Puffer mit 1 M NaCl inkubiert und ebenfalls für eine Gelfiltration eingesetzt. Jedoch wurde wieder ein



asymmetrischer Peak identifiziert, der auf höhermolekulare Banden schließen ließ und somit auf Aggregatbildung von CzcD hindeutete (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da auch diese Gelfiltration in Anwesenheit von 1 M NaCl nicht zur gewünschten Homogenität von CzcD führte, wurde das Reinigungsprotokoll von CzcD verändert. So wurde das Protein in Anwesenheit von 1 M NaCl, 1 mM EDTA und 1 % DDM solubilisiert. Die anschließende Reinigung von CzcD über die *Strep*Tactin-Sepharose erfolgte ebenfalls in Anwesenheit von 1 M NaCl und 1 mM EDTA. In einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde der Zustand des Proteins analysiert. Nach der Zentrifugation wurden 15 Fraktionen zu 1 ml gesammelt und auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 23).



**Abb. 23: SDS-PAGE der Fraktionen des gereinigten CzcD-Proteins nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit DDM, 1 M NaCl und 1 mM EDTA**

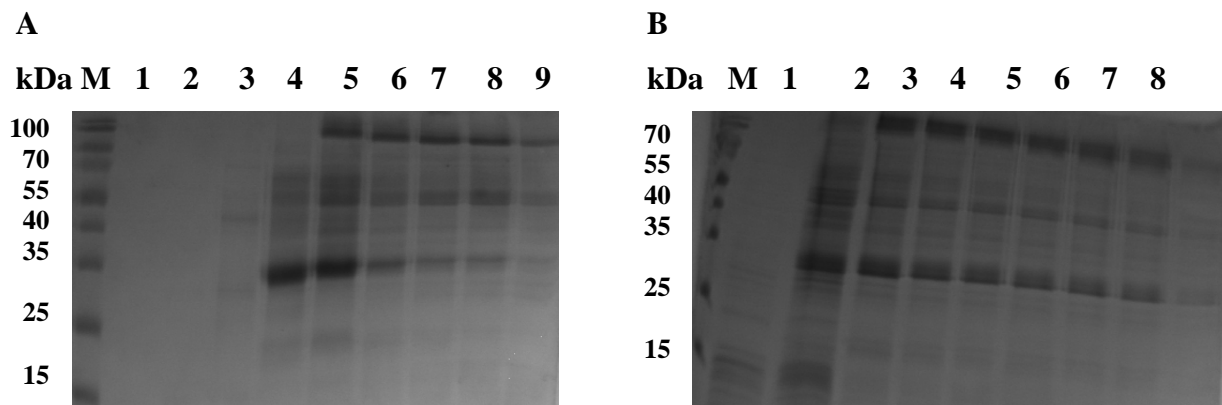
Das CzcD-Protein wurde mit DDM, 1 M NaCl und 1 mM EDTA solubilisiert und gereinigt, die Eluate aufkonzentriert und einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit 0.5 M Saccharose unterzogen. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-9:** 10  $\mu$ l der Fraktionen 1-9 des Saccharose-Gradienten. Coomassie-Färbung.

Die 34 kDa-Bande von CzcD konnte im Saccharose-Dichtegradienten mit 1 M NaCl und 1 mM EDTA in Fraktion 2-7 nachgewiesen werden (Abb. 23). Nach Salzbehandlung dissoziiert das Protein in kleinere Proteinkomplexe und befindet sich in geringeren Dichten des Gradienten wieder. Auch hier traten wieder Proteinspezies auf, die in verschiedenen Dichten des Gradienten zu finden waren, was für eine Heterogenität des Proteins spricht. Ab Fraktion 8-15 konnte kein Protein mehr detektiert werden. Auffällig in der SDS-PAGE sind die wieder zusätzlich auftretenden Banden bei 70 kDa. Neben der Reinigung mit 1 mM EDTA und 1 M NaCl wurde CzcD zusätzlich in Anwesenheit von 1 M NaCl und 0.02 % SDS gereinigt. Dabei wurde CzcD in geringerer Ausbeute gereinigt und der Saccharose-Dichtegradient zeigte ebenfalls wieder viele Banden, die sich durch den Gradienten zogen (Ergebnisse nicht gezeigt). Abschließend kann gesagt werden, dass CzcD nach Behandlung mit NaCl, EDTA und zusätzlich mit SDS nicht als homogenes Protein gereinigt werden

konnte. Nach Salzbehandlung konnte eine Dissoziation des CzcD-Proteins nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation beobachtet werden.

### **3.5.3. CzcD aggregiert während der Solubilisierung**

Da die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugationen nach der eigentlichen Reinigung von CzcD durchgeführt wurden, stellte sich die Frage wann CzcD aggregiert. Um den Zeitpunkt der Aggregation zu bestimmen, wurden 3 mg/ml Membranprotein mit 1 % DDM bzw. mit 1 % DDM unter Zusatz von 2 M NaCl solubilisiert. Danach wurde das klare Solubilisat von CzcD direkt für die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation eingesetzt, wobei ein Gradient ohne bzw. mit 2 M NaCl durchgeführt wurde. Es wurden 11 Eluate zu 1 ml gesammelt und auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 24A und 24B).



**Abb. 24: SDS-PAGE der solubilisierten Membranfraktionen nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ohne NaCl (A) bzw. mit 2 M NaCl (B)**

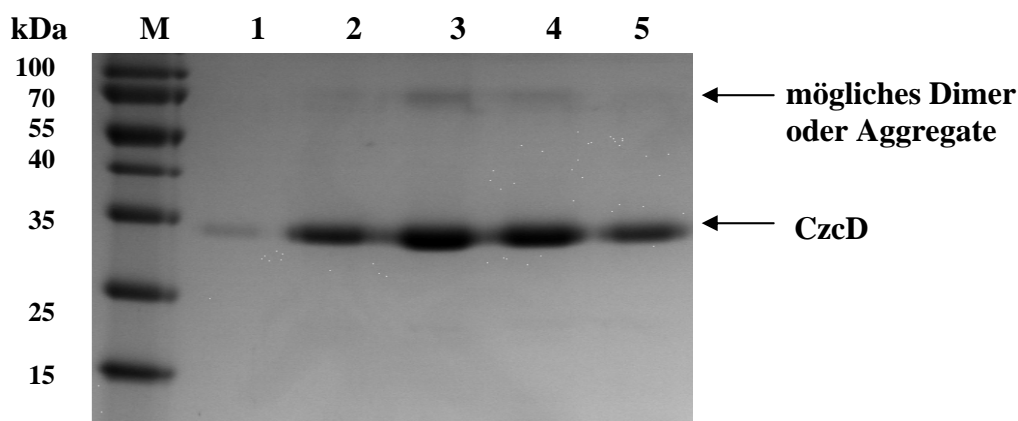
**A:** Membranfraktion mit 1 % DDM und in Abwesenheit von NaCl solubilisiert. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-9:** 10 µl der Fraktionen 1-9 des Saccharose-Gradienten. **B:** Membranfraktion mit 1 % DDM unter Zusatz von 2 M NaCl solubilisiert. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-8:** 10 µl der Fraktionen 1-8 des Saccharose-Gradienten. Coomassie-Färbung.

In der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde die Membranfraktion mit 1 % DDM und in Abwesenheit von NaCl solubilisiert (Abb. 24A). Hier erschienen die CzcD-Banden in den Fraktionen 4-5 und das Protein schien sich mit einem Maximum in diesen Fraktionen zu konzentrieren, was für ein homogeneres Protein sprach. Mit aufsteigender Fraktionsnummer wurde die CzcD-Bande schwächer. Wurde die Membran mit 1 % DDM und in Anwesenheit von 2 M NaCl solubilisiert, so erschien die CzcD-Bande schon ab Fraktion 2 des Gradienten. Jedoch zog sich die Bande bis zur Fraktion 8 (Abb. 24B). Auch in diesen Versuchen konnte wieder nur ein heterogenes Protein detektiert werden. Ab Fraktion 9-11 konnte das Protein nur noch in geringen Spuren bzw. gar nicht mehr nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). In den SDS-Gelen erschienen neben den 34 kDa-Banden und den

70 kDa-Banden zusätzliche Banden. Die 34 kDa-Banden können CzcD zugeordnet werden. Die 70 kDa-Banden können dem möglichen Dimer von CzcD bzw. den Aggregaten zugeteilt werden. Da es sich bei diesen Versuchen um eine solubilisierete Membranfraktion handelte und nicht um das gereinigte CzcD-Protein, erschienen zusätzliche unspezifische Banden im SDS-PAGE (Abb. 24A und 24B). Es konnte gezeigt werden, dass das CzcD-Protein bereits während bzw. nach der eigentlichen Solubilisierung mit DDM aggregierte und nicht erst nach der Säulenreinigung. Wurde CzcD im Puffer mit 2 M NaCl solubilisiert, lag das Protein danach in einer dissoziierten Form vor. Die Aggregatbildung des Proteins konnte nicht vollständig verhindert werden. Im Gegensatz dazu konnte CzcD während der Solubilisierung ohne NaCl in einer weniger heterogenen Form gereinigt werden.

#### **3.5.4. Fos-Choline 14 ist ein geeignetes Detergenz um CzcD zu solubilisieren**

Da geklärt werden konnte, wann CzcD aggregierte, sollte nun untersucht werden welchen Einfluss das Detergenz auf die Aggregation von CzcD ausübte. Mittels DDM wurde CzcD immer in ausreichender Menge solubilisiert, so dass nie ein Grund bestand das Detergenz zu wechseln. Mit Fos-Choline 14, einem zwitterionischen Detergenz, konnte CzcD ebenfalls in guter Ausbeute solubilisiert werden. CzcD wurde dabei für 30 min mit 0.4 % Fos-Choline 14 solubilisiert. Die Reinigung erfolgte über *Strep*Tactin-Sepharose. Als Puffer wurde 100 mM Tris-HCl mit 0.025 % Fos-Choline 14 verwendet. Außerdem wurde mittels hoher Ionenstärke (2 M NaCl) gereinigt.

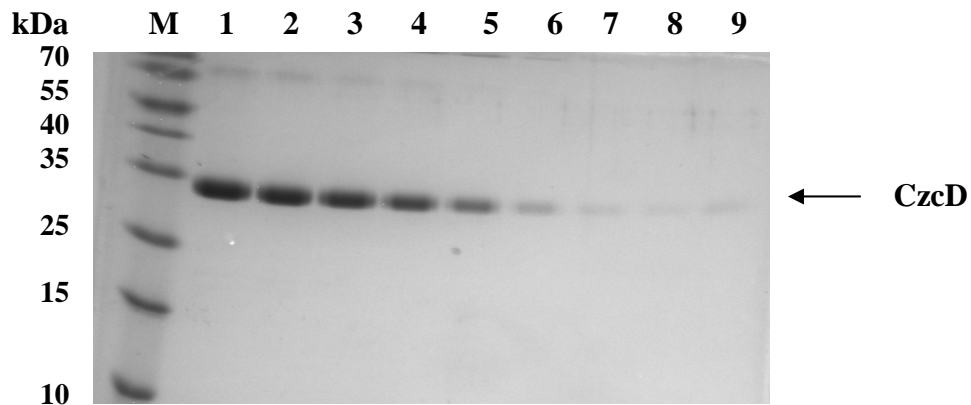


**Abb. 25: SDS-PAGE der Reinigung von CzcD als *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Fusion mit Fos-Choline 14**

Das mit Fos-Choline 14 und 2 M NaCl solubilisierete CzcD-Protein wurde auf eine 15 %ige (w/v) SDS-PAGE aufgetragen, Coomassie-Färbung. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-5:** 10 µl der Elutionsfraktionen 1-5 des gereinigten CzcD-Proteins.

Nach der Solubilisierung und Reinigung von CzcD mittels Fos-Choline 14 konnte das Protein ebenfalls mit guter Ausbeute gereinigt werden. Die Bande bei 34 kDa ist CzcD zuzuordnen. Nach der Solubilisierung und Reinigung mit Fos-Choline 14 erschienen in der SDS-PAGE

auch höhermolekulare Banden bei 70 kDa. Im Vergleich zur DDM-Reinigung erschienen jedoch die Banden in diesem Fall in geringerer Konzentration (Abb. 25). Die einzelnen Proteineluate wurden mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation analysiert. Nach der Zentrifugation wurden 1 ml zu 15 Fraktionen gesammelt und auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 26).



**Abb. 26: SDS-PAGE der Fraktionen des gereinigten CzcD-Proteins mit Fos-Choline 14 nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Das CzcD-Protein wurde mit 0,4 % Fos-Choline 14 und 2 M NaCl solubilisiert, gereinigt und die Eluate aufkonzentriert und einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit 0,5 M Saccharose unterzogen. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-9:** 10 µl der Fraktionen 1-9 des Saccharose-Gradienten. Coomassie-Färbung.

Nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation des mit Fos-Choline 14 solubilisierten CzcD wurden Banden in den ersten Fraktionen (1-5) detektiert (Abb. 26). Ab Fraktion 6-9 schwächte sich die Proteinbande ab und in den letzten gesammelten Fraktionen (10-15) wurde kein Protein mehr nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Nach der Solubilisierung mit Fos-Choline 14 und unter Zusatz hoher Salzkonzentrationen veränderte CzcD im Saccharose-Dichtegradienten sein Laufverhalten. Das Hauptmaximum von CzcD trat dabei in Fraktion 1-3 auf. Obwohl das Protein mit dieser Reinigungsmethode teilweise durch den Gradienten "schmierte", konnte CzcD mit Fos-Choline 14 in einer dissoziierten Form gereinigt werden. Die Banden bei 70 kDa konnten nicht bzw. nur in geringer Menge (Fraktion 1-3) detektiert werden (Abb. 26). Dies könnte bedeuten, dass diese potenziellen Aggregate von CzcD durch Fos-Choline 14 aufgelöst werden bzw. nicht entstehen.

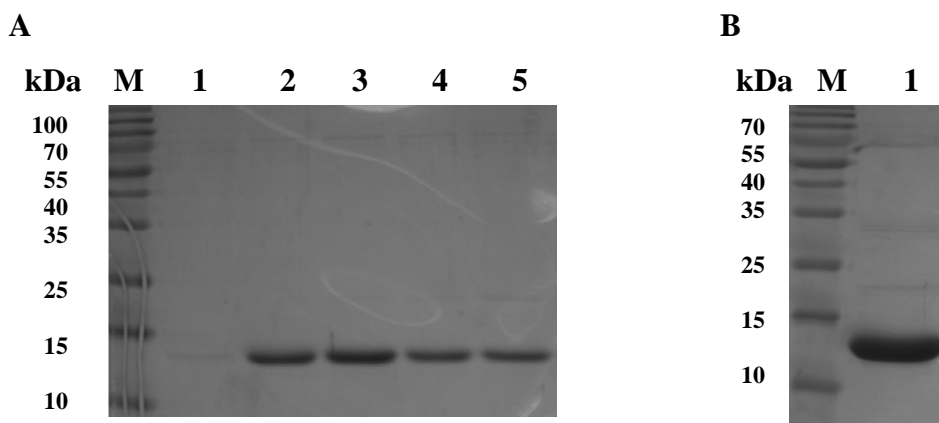
### 3.6. Kristallisationsexperimente

#### 3.6.1. Kristallisation von CzcD

Mittels der Kristallisation sollte die dreidimensionale Struktur von CzcD erhalten werden. Bei der Kristallisation eines Membranproteins ist dessen Zustand von entscheidender Bedeutung, wobei Bedingungen gefunden werden müssen, bei denen sich ein Protein kristallisieren lässt. Aus diesem Grund wurde auf Screeningkits mit unterschiedlichen Salzen, Puffern und Fällungsmitteln zurückgegriffen. Für CzcD wurde ein spezieller Kristallisationskit für Membranproteine (*JB Screen Mixes, Crystal Screening Kit*, Jena Bioscience GmbH, Germany) verwendet. Für die Gasphasendiffusion am hängenden Tropfen wurde eine Proteinkonzentrationen zwischen 4-10 mg/ml gewählt. Jedoch konnte bei vielen Ansätzen nur das Präzipitieren des Proteins beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Da nach der Reinigung von CzcD nur der heterogene Charakter von CzcD festgestellt wurde, war es nicht sinnvoll das Protein in diesem Zustand zu kristallisieren.

#### 3.6.2. Kristallisation der zytoplasmatischen Domäne

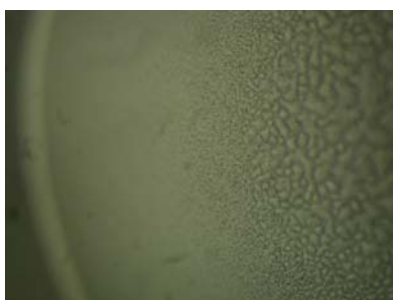
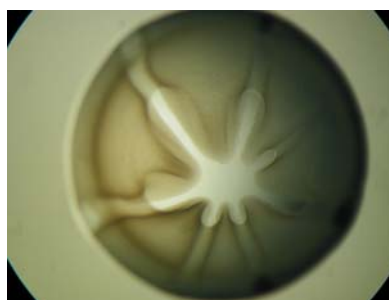
Da CzcD nach der Solubilisierung bzw. nach der Reinigung aggregiert vorlag, wurde damit begonnen die lösliche Domäne von CzcD zu kristallisieren. Da sich der schon vorhandene Klon EC926 (C-Terminus von CzcD) aus der Stammsammlung als falsch erwies, wurde der Teil für die 114 Aminosäuren lösliche zytoplasmatische Domäne kodierende Abschnitt des *czcD*-Gens neu amplifiziert und ein neuer Klon ECA297 hergestellt.



**Abb. 27: SDS-PAGE der Reinigung der zytoplasmatischen Domäne von CzcD**

**A:** 17.5 %ige (w/v) SDS-PAGE der gereinigten zytoplasmatischen Domäne von CzcD, Coomassie-Färbung. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1-5:** 10  $\mu$ l der gereinigten Proteineluate 1-5. **B:** 17.5 %ige (w/v) SDS-PAGE der aufkonzentrierten Proteineluate nach der Gelfiltration, Coomassie-Färbung. **M:** *Prestained* Proteinmarker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), **1:** 2.5  $\mu$ l des aufkonzentrierten Proteins (15 mg/ml) wurden auf das Gel aufgetragen.

Nach der Expression im *E. coli*-Stamm BL21 wurde die zytoplasmatische Domäne von CzcD mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System gereinigt. Nachdem das Protein gereinigt war, wurden die gesammelten Proteineluate 1-5 auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Während im Proteineluat 1 (Spur 1) wenig Protein eluiert wurde, konnte das Protein in den Eluaten 2-4 (Spur 2-5) in genügender Menge, mit einer Größe von ca. 14 kDa, eluiert werden (Abb. 27A). Um eine ausreichende Konzentration für die Kristallisation der zytoplasmatischen Domäne zu erhalten, wurde das Protein mehrmals über Affinitätschromatographie gereinigt. Die so gewonnenen Proteineluate wurden aufkonzentriert und einer präparativen Gelfiltration an Superdex 75 unterzogen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die darüber gewonnenen Proteineluate wurden auf eine SDS-PAGE analysiert und anschließend aufkonzentriert (Ergebnisse nicht gezeigt). Nach der Aufkonzentration konnten 15 mg/ml Protein erhalten werden. Zur Kontrolle wurde das Protein auf einer 17.5 %igen SDS-PAGE aufgetragen und die Bande des konzentrierten Proteins wurde bei ca. 14 kDa detektiert (Abb. 27B). Nachdem mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) die korrekte Größe identifiziert wurde und kein Abbau oder Verunreinigungen der löslichen Domäne nachweisbar waren, wurden die 15 mg/ml Protein für die Kristallisation eingesetzt. Für die Kristallisationsexperimente wurden *CrystalScreen*<sup>®</sup> und *CrystalScreen2*<sup>®</sup> verwendet (Hampton Research, Laguna Niguel, USA). Nach zwei Tagen wurden die Kristallisationsplatten unter einem Binokular analysiert. In vielen Fällen konnte im Kristallisationstropfen irreversibles stark denaturiertes Protein beobachtet werden (Abb. 28B). Jedoch konnten auch Kristallisationstropfen beobachtet werden, die kein präzipitiertes Protein zeigten und somit eine gute Voraussetzung für die Kristallisation waren (Abb. 28A).

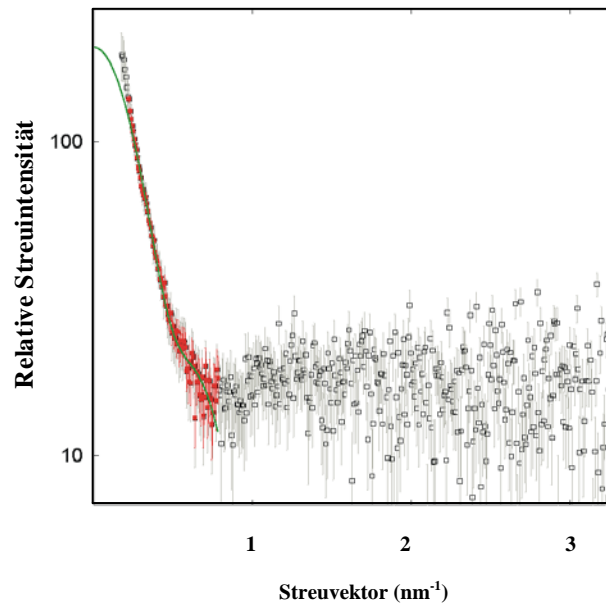
**A****B**

**Abb. 28: Kristallisationstropfen mit dem CzcD-Protein mit *Crystal Screen*<sup>®</sup>** **A:** Als Kristallisationsbedingungen wurden 1 M Natriumacetat Trihydrat als Präzipitant und 0.1 M Imidazole pH 6.5 als Puffer gewählt. **B:** Als Kristallisationsbedingungen wurden 18 % (w/v) PEG 8000 als Präzipitant, 0.1 M Natrium-Cacodylat pH 6.5 als Puffer und 0.2 M Zink-Acetat-Dihydrat als Salz verwendet. Die Bilder wurden nach dreitägiger Inkubation unter dem Binokular aufgenommen.

### 3.7. Röntgenkleinwinkelstreuung mit CzcD und der zytoplasmatischen Domäne von CzcD

Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung ist ein effektives Verfahren, um die Form und die molare Masse von Proteinen zu bestimmen.

Die Proteine von CzcD und der zytoplasmatischen Domäne von CzcD wurden in *E. coli* BL21 überexprimiert und mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System gereinigt. Für die Solubilisierung von CzcD wurden zu Beginn der Versuche 2 mg DDM/mg Membranprotein eingesetzt. Das Protein lag nach der Reinigung und Aufkonzentrierung in 10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.2) vor. Für die Versuche wurden zunächst variable Proteinkonzentrationen eingesetzt. Mittels der Röntgenkleinwinkelstreuung erhält man Beugungsbilder, die dann in eindimensionalen sogenannten Streukurven resultieren. Mit GNOM können Daten der Röntgenkleinwinkelstreuung umgewandelt, eindimensionale Streukurven gelesen und angepasst werden. Das Programm nutzt die sogenannte Regularisierungsmethode zur Umwandlung in eine P(R)-Funktion (Abstandsverteilungsfunktion). Die Streukurve ist eine halblogarithmische Darstellung, bei der die Streuintensität  $I(0)$  als Funktion des Streuvektors  $s$  aufgetragen wurde. Im Streuvektor ist der Streuwinkel  $\theta$  enthalten, der besagt, dass die Größe eines streuenden Objektes umgekehrt proportional zum Winkel ist, bei welchem die Streustrahlung auftritt. Die Messdaten der Streukurve verdeutlichten die relativ geringe Aussagekraft der Messungen, da trotz der niedrigen Proteinkonzentration noch signifikante Aggregationen auftraten. Deshalb konnte die Streukurve oberhalb von ca. 0.8/nm nicht mehr mit GNOM angepasst werden, so dass die Kurve nur bis zu diesem Punkt ausgewertet wurde. Ab diesem Punkt war faktisch keine Streuung mehr erkennbar und nur ein geringer Teil der Streukurve konnte analysiert werden (Abb. 28).

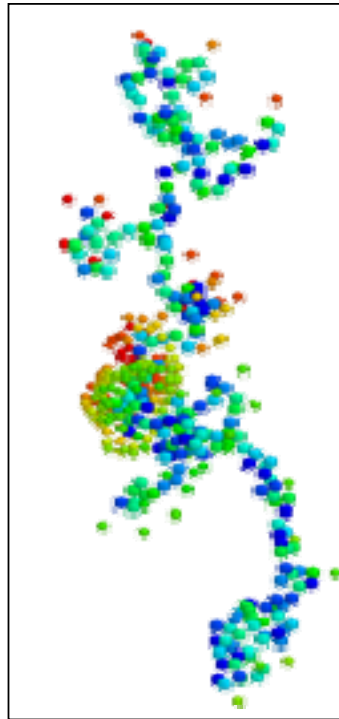


**Abb. 28: Eindimensionale Streukurve aus den Messdaten der Röntgenkleinwinkelstreuung für das CDF-Protein CzcD**

Ein Teil (rot markiert) der experimentellen Streudaten ( $\circ$ ) wurden mit dem Programm GNOM (<http://www.embl-hamburg.de/External/Info/Research/Sax/gnom.html>) (grüne Linie) angepasst.

Aus der Streukurve vom Gesamtprotein CzcD konnte geschlossen werden, dass das Protein in einem aggregierten Zustand vorlag. Dies war besonders der Fall, wenn hohe Konzentrationen von CzcD eingesetzt wurden. Ein weiteres Problem war die vermehrte Anhäufung von Mizellen, die wahrscheinlich bei der eigentlichen Aufkonzentrierung des Proteins auftraten. Eine höhere Proteinkonzentration von CzcD hatte nicht nur die Aggregatbildung des Proteins zur Folge, möglicherweise war auch die kritische Mizellenkonzentration der noch erhaltenen oberflächenaktiven Stoffe erreicht und somit überdeckte die Mizellenstreuung die eigentliche Messung. Um diese Interferenzen zu verhindern, wurde CzcD mit unterschiedlichen Reinigungsprotokollen gereinigt. Wurde CzcD mit 0.5-1 mg DDM/mg Membranprotein solubilisiert, ging die Bildung der Mizellen deutlich zurück. Jedoch war das weitaus größere Problem der Aggregatbildung nicht behoben und die Messungen konnten nur teilweise ausgewertet werden. Da die Proteinlösung von CzcD nicht monodispers vorlag, konnte nicht genau geklärt werden, in welchem oligomeren Zustand sich das Protein befand. Mit Hilfe des Gyrationradius  $R_G$  konnte der Durchmesser der Probe bestimmt werden. Für CzcD konnte bei verwendeten Konzentrationen von 2.5-3.4 mg/ml ein sehr großer Radius ermittelt werden, der bei 4.8 nm lag.

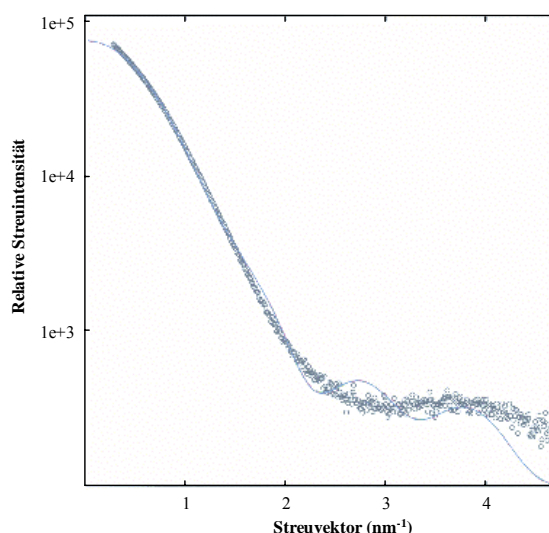




**Abb. 29: Modell der aus den Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung errechneten Struktur für CzcD**  
Mit Hilfe des Programmes DAMMIN (<http://www.embl-hamburg.de/External/Info/Research/Sax/dammin.html>) wurde das Modell errechnet.

Mit Hilfe des Computerprogrammes DAMMIN konnte für CzcD eine äußere Struktur berechnet werden. DAMMIN ist eines der möglichen Computerprogramme zur Berechnung sogenannter *low-resolution models* der Raumstruktur der Proteine. Dabei geht DAMMIN von einem ungeordneten Kugelhaufen, sogenannten *dummy atoms* aus, die aber keine Rückschlüsse auf die Anordnung einzelner Aminosäuren geben. Basierend auf der Grundlage, dass dem Computerprogramm GNOM fünf Modellformen (monodispers globulär, monodispers gestreckt, monodispers planar, polydispers kugelförmig und polydisperse Systeme, die willkürliche Formen bilden) zugrunde liegen, konnten die erhaltenen Daten für CzcD als flaches, langgestrecktes, zylindrisches Modell interpretiert werden (Abb. 29).

Da CzcD als Gesamtprotein aggregiert vorlag, wurde die zytoplasmatische Domäne von CzcD gereinigt und ebenfalls für Experimente zur Röntgenkleinwinkelstreuung eingesetzt. Der Vorteil dabei war, dass das Protein nicht mit Detergenzien solubilisiert werden musste, die die Messungen störten. Des Weiteren aggregierte das lösliche Protein nicht, wie das bei CzcD der Fall war. Jedoch wurde für die zytoplasmatische Domäne eine Streuung beobachtet, die nicht optimal war (Abb. 30). Dies ist möglicherweise auf die kleine Größe der zytoplasmatischen Domäne zurückzuführen.



**Abb. 30: Eindimensionale Streukurve aus den Messdaten der Röntgenkleinwinkelstreuung für die zytoplasmatische Domäne von CzcD**

Die experimentellen Streudaten (o) wurden mit dem Programm GNOM (graue Linie) angepasst.

Mittels der Streukurve konnten die Streuparameter für den Gyrationradius  $R_G$  und der Streuintensität  $I(0)$  kalkuliert werden. Die berechneten Werte für den Gyrationradius  $R_G$  bewegten sich im Bereich zwischen 2.23-2.31 nm (Tab. 8). Durch die Streuintensität, die direkt abhängig von der Konzentration der Lösung ist, konnte die molekulare Masse bestimmt werden. Dazu wurde BSA als entsprechender Standard mitgeführt. Die hier ermittelten Molmassen lagen im Bereich von 14-20 kDa und schienen in diesem Fall abhängig von der Proteinkonzentration zu sein (Tab. 8).

**Tab. 8: Ermittelte Daten für die Molmasse und den Gyrationradius  $R_G$  aus den Streukurven der zytoplasmatischen Domäne von CzcD**

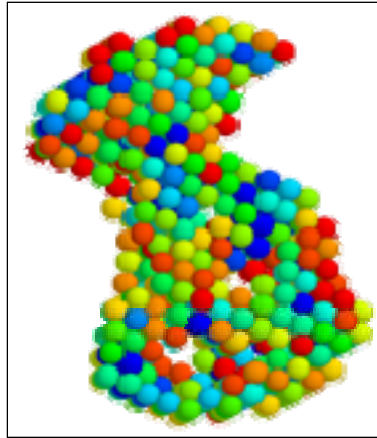
Proteinkonzentration [mg/ml]	Streuintensität $I_{(0)}$ <sup>1</sup>	Gyrationradius $R_G$ <sup>2</sup> [nm]	Molmasse [kDa]
11	42360	2.31	16.5
15	46970	2.30	13.4
16	76170	2.23	20.4

<sup>1</sup>Die Streuintensität  $I_{(0)}$  ist direkt abhängig von der Proteinkonzentration und mit BSA als Standardprotein konnte darüber die molekulare Masse der zytoplasmatischen Domäne abgeschätzt werden. <sup>2</sup>Der Gyrationradius  $R_G$  ist ein Maß für die Größe des untersuchten Moleküls. Die Berechnung der Streuparameter  $I_{(0)}$  und  $R_G$  erfolgte mit dem Programm GNOM.

Anhand der Streuintensität konnte der oligomere Zustand der zytoplasmatischen Domäne mit dem Molekulargewicht von BSA verglichen werden. Für die zytoplasmatische Domäne von CzcD konnte ein Monomer abgeleitet werden.

Mit Hilfe der Kalkulationsprogramme GNOM und DAMMIN wurden die Streudaten der zytoplasmatischen Domäne in vorgegebene Modelle angepasst. Die Daten für die

zytoplasmatische Domäne von CzcD korrelierten dabei am besten mit der Kugelform. Letztendlich wurde diese Form für die zytoplasmatische Domäne postuliert (Abb. 31).



**Abb. 31: Modell der aus den Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung errechneten Struktur für die zytoplasmatische Domäne von CzcD**

Mit Hilfe des Programmes DAMMIN wurde das Modell errechnet.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit der Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung erste Hinweise auf die äußere Struktur des Gesamtproteins CzcD und dessen löslicher zytoplasmatischer Domäne abgeleitet werden konnte. Dabei wurde für das Gesamtprotein CzcD eine langgestreckte Oberflächenstruktur nachgewiesen. Jedoch konnte aufgrund der Aggregatbildung von CzcD der native Zustand nicht genau definiert werden. Für die zytoplasmatische Domäne von CzcD wurde eine kompakte Kugelform definiert. Das Protein lag dabei als Monomer vor.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Regulation des CDF-Proteins CzcD

Das Czc-System in *Cupriavidus metallidurans* vermittelt Resistenz gegen Cobalt, Zink und Cadmium. Dabei ist der CzcCBA-Kationen-Protonen-Antiporter ein effizientes System, um Schwermetalle zu entgiften. Die Expression von *czc* ist komplex und wird durch verschiedene Regulatoren kontrolliert (Große *et al.*, 2004). Deletionsstudien demonstrierten, dass vier Regulatoren *downstream* vom *czcCBA*-Operon in die Induktion von *czc* involviert sind. Das CDF-Transportprotein CzcD, das Zweikomponentenregulationssystem CzcRS und das periplasmatisch metallbindende Protein CzcE haben Einfluss auf die metallabhängige Kontrolle der *czcNICBA* Expression (van der Lelie *et al.*, 1997; Große *et al.*, 2004). Für das Operon *czcDRS* konnte durch Northern-Blot Analyse und/oder RT-PCR eine gemeinsame mRNA nachgewiesen werden. *Upstream* von *czcD* konnten für *czcNICBA*, *czcICBA*, *czcCBA*, *czcNI* und *czcI* fünf verschiedene Transkripte identifiziert werden (Große *et al.*, 1999). Jedoch werden die Transkripte durch den Terminator *czcA(t)* abgebrochen bzw. gestoppt. Diese potenzielle Terminatorstruktur befindet sich zwischen den Genen *czcA* und *czcD* (Abb. 2). Durch einen Genabstand von nur 50 bp kommt es zu einer Überlappung des Promotors von *czcD* und der Terminatorstruktur von *czcA* (Große *et al.*, 1999). Anfangs wurde davon ausgegangen, dass es möglicherweise keinen eigenen Raum für einen Promotor von *czcD* gibt (van der Lelie *et al.*, 1997). Mittels *primer extension* wurde der Startpunkt aller *czc* mRNAs in zinkinduzierten Zellen des Stammes AE128(pMOL30) bestimmt (Große *et al.*, 1999). Dabei konnte für *czcD* ein 5'-RNA-Ende nachgewiesen werden. Für *czcD* wurde damit ein eigener Promotor postuliert (Große *et al.*, 1999). Mittels verschiedener *czcD::lacZ*-Reporter-gen-Fusionen wurde in früheren Arbeiten die Expression von *czcD* untersucht (van der Lelie *et al.*, 1997). Dabei konnte keine Induktion der Expression des *czcD*-Gens nachgewiesen werden. Wurden *czcCBA* und zusätzlich der Terminator *czcA(t)* deletiert, sank die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf 1.8 U/mg. In diesem Fall hatten Metallkationen oder die Anwesenheit von pMOL30 keinen Einfluss auf die Aktivität des Reporterproteins (van der Lelie *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit die Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität einer  $\phi$ (*czcDp-lacZ*)-Fusion im Stamm AE104 gezeigt werden (Abb. 3B). Im Stamm AE104 ist das Megaplasmid pMOL30 nicht vorhanden, somit kann *czc* keinen Einfluss auf die Induktion des Promotors haben. Möglicherweise könnte ein unbekannter Sigmafaktor als Regulator die Expression kontrollieren. Für das  $\phi$ (*czcDp-lacZ*)-

Konstrukt mit Terminator konnte keine Induktion durch Zn(II) im Stamm AE104 gezeigt werden (Abb. 3B). Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Transkription durch den Terminator *czcA(t)* gestoppt wurde. Dies führt aber zur Frage: warum wird *czcD* überhaupt im Wildtypstamm CH34 exprimiert? Wird unter bestimmten Umständen die Terminatorstruktur nicht ausgebildet oder liest die Polymerase weiter, so dass das *czcD*-Transkript gebildet werden kann? *In vivo* könnte es eine Kopplung zwischen Terminator und RNA-Polymerase geben. Gelangen hohe Konzentrationen an Schwermetallionen in das Zytoplasma und die RNA-Polymerase pausiert am Terminator, könnte der Terminator möglicherweise als Sensor für die Metallionen fungieren und die Polymerase liest über den Terminator hinweg. Die Hauptinduktion von *czcD* erfolgt demnach wahrscheinlich durch ein *read through* der RNA-Polymerase. Dass die Anwesenheit verschiedener Substrate ein Durchlesen der RNA-Polymerase über dem Terminator hinweg zur Folge haben kann, konnte für das *bgl* Operon aus *Escherichia coli* und für das *sac*-System aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden. In beiden Fällen induzierte die Anwesenheit von Zucker das Durchlesen der Polymerase über den Terminator (Henkin, 1996; Steinmetz *et al.*, 1989; Amster-Choder und Wright, 1990). Auch die Tryptophan-Biosynthese, die vom *trpEDCFBA* Operon aus *B. subtilis* kodiert wird, untersteht der Kontrolle eines Durchlesens an der Terminatorstruktur (Henkin, 1996). Ähnlich wie für *czcD* diskutiert, konnte für das *hut* Operon aus *B. subtilis* gezeigt werden, dass die Termination durch Magnesiumionen abgebrochen und dadurch die Expression der *hut*-Gene reguliert wird (Kumarevel *et al.*, 2005). Somit könnte auch der Mechanismus der Genregulation von *czcD* durch Abbruch der Termination reguliert werden, die durch Anwesenheit von Schwermetallionen kontrolliert wird. Außerdem zeigten die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Grundaktivität des *czcD*-Promotors, die mit ca. 7000 U/mg TG für das  $\phi(\text{czcDp-lacZ})$ -Konstrukt ohne Terminator im Stamm DN193(pMOL30-24,  $\Delta\text{czcDRSE}$ ) am größten war (Abb. 4). Eine mögliche Erklärung für die hohe Grundaktivität des *czcD*-Promotors könnte sein, dass CzcD in der Zelle als *back up*-System dient und somit den Ionenhaushalt als möglicher Regulator in der Zelle beeinflusst. Fungiert das Protein CzcD als Sensor bzw. als Regulator, ist eine Hintergrundaktivität des *czcD*-Promotors sinnvoll. Steigt beispielsweise die Zn(II)-Konzentration in der Zelle an, interagiert CzcD mit CzcI und die Expression von *czcCBA* wird sofort initiiert (van der Lelie *et al.*, 1997).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht genau bekannt, welche Proteine für die Kontrolle der *czc*-Promotoren verantwortlich sind (Große *et al.*, 1999). Welchen Einfluss hat dabei das Zweikomponentenregulationssystem CzcRS auf die Expression von *czc* bzw. *czcD*? In der

vorliegenden Arbeit konnte im Stamm AE128(pMOL30) für das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt ohne Terminator eine konstitutive Expression gezeigt werden (Abb. 3A). Für das Konstrukt mit Terminator konnte in diesem Stamm eine leichte Repression beobachtet werden (Abb. 3A). Diese Repression könnte möglicherweise von CzcR abhängig sein. In Abwesenheit von *czcR* wird diese Tatsache unterstützt, da hier keine Repression beobachtet wurde (Abb. 3C). In Abwesenheit von CzcS konnte für das  $\phi(czcDp-lacZ)$ -Konstrukt ohne Terminator eine konstitutive Expression von ca. 800 U/mg TG beobachtet werden (Abb. 3D). In diesem Fall liegt CzcR unphosphoryliert vor, da die Phosphorylierung von CzcS abhängig ist (Egler, 2000). Mit der Terminatorstruktur konnte in Abwesenheit von CzcS eine leichte Repression, ähnlich wie für AE128(pMOL30), beobachtet werden (Abb. 3D). Mit steigender Zn(II)-Konzentration könnte CzcR im unphosphorylierten Zustand für die Repression in AE128(pMOL30) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) verantwortlich sein. Die Termination am Terminator *czcA(t)* verursacht wahrscheinlich diese Repression.

Mittels *real-time*-RT-PCR konnte eine Induktion von *czcD* in den Stämmen AE128(pMOL30) (29fach), DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) (57fach) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) (42fach) gezeigt werden (Tab. 6). Auf Proteinebene konnte die zinkabhängige Expression von *czcD* ebenfalls in diesen Stämmen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Obwohl hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypstamm und Deletionsstämmen gezeigt werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass CzcR als positiver Regulator die Expression von *czcD* beeinflusst. Dass CzcR und CzcS bei der Regulation von *czc* beteiligt sind, wurde durch Große *et al.* (1999) beschrieben. Wurde das Gen *czcS* deletiert, befindet sich CzcR in einem unphosphorylierten Zustand. Im Vergleich zum Wildtyp AE128(pMOL30) war die Expression von *czcCBA* in uninduzierten Zellen 4fach höher. In zinkinduzierten Zellen war die Expression von *czcCBA* nur geringfügig höher. In Abwesenheit von *czcR* wurde die Transkription von *czcCBA* in uninduzierten Zellen vermindert, jedoch in induzierten Zellen erhöht. Wurden die Gene *czcR* und *czcS* deletiert, führte dies zu einer besseren Induzierbarkeit von *czcCBA* bzw. zur Derepression des RND-Efflux-Systems. Beide Deletionen zeigten in der Bestimmung der MIC keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. CzcR und CzcS sind demnach nicht essenziell für die Expression von *czcCBA* (Große *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte die zinkabhängige Expression von *czcD* mittels *real-time*-RT-PCR gezeigt werden. Eine Induktion der beiden CDF-Gene *dmeF* und *fieF* konnte mittels *real-time*-RT-PCR nicht nachgewiesen werden (Tab. 6). Diese Ergebnisse werden durch Munkelt *et al.* (2004) bestätigt. Mittels Reportergen-Fusionen wurde gezeigt, dass die beiden

CDF-Gene *dmeF* und *fieF* nicht metallabhängig induzierbar waren, also auf einem konstitutiv niedrigen Niveau exprimiert wurden. CzcD wird demnach erst angeschaltet, wenn DmeF und FieF nicht mehr in der Lage sind, die Zelle zu entgiften. In der Zelle könnte CzcD als Sensor für Schwermetallionen fungieren. Wenn CzcD die Kationen aus dem Zytoplasma ins Periplasma transportiert, wird die Expression des *czcCBA*-Efflux-Komplexes reprimiert. Steigt dann die Konzentration der Kationen im Zytoplasma an, kann über eine Signaltransduktionskaskade die Expression von *czcCBA* angeschaltet und somit die periplasmatische Metallkationenkonzentration reguliert werden und letztendlich die Zelle entgiftet werden (Große *et al.*, 2004).

Der zum Teil beobachtete Widerspruch zwischen den Ergebnissen der *real-time*-RT-PCR und der pVDZ'2-*lacZ*-Konstrukte in bezug auf die Messdaten in den Stämmen DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ), DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) und AE128(pMOL30), kann vermutlich auf das verwendete System zurückgeführt werden. Die *lacZ*-Messungen mit Hilfe von pVDZ'2-*lacZ* sind ein artifizielles System. In *C. metallidurans* wird pVDZ'2-*lacZ* als zusätzliches Plasmid *in trans* exprimiert. Der Vektor pVDZ'2-*lacZ* ist nicht in der Lage in *C. metallidurans* zu rekombinieren. Im Unterschied zu den  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen wird bei der *real-time*-RT-PCR direkt die RNA aus metallinkubierten Zellen analysiert. Um die Induktion des *czcD*-Promotors besser zu verifizieren, könnte man hier auf pLO2-Rekombination zurückgreifen. Jedoch konnten auch schon in früheren Arbeiten Widersprüche zwischen *real-time*-RT-PCR und den Ergebnissen von Promotor-*lacZ*-Fusionen gezeigt werden (Rehbein, 2003; Friedrich, 2004).

#### 4.2. Die Rolle des CDF-Proteins CzcD in der Schwermetall-Homöostase

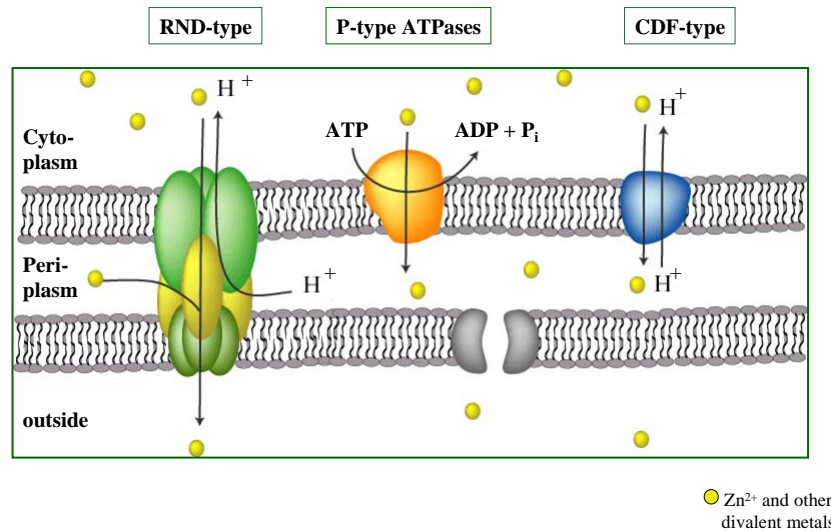
*Cation diffusion facilitator* (CDF) Proteine sind phylogenetisch ubiquitär verbreitete Membran-Transporter. Mit einem breiten Spektrum an divalenten Metallkationen spielen sie eine wichtige Rolle in der Schwermetall-Homöostase (Haney *et al.*, 2005). Für den Efflux von Schwermetallionen aus dem Zytoplasma ins Periplasma, die Abgabe der Ionen in angrenzende Zellkompartimente oder den Export der Metallkationen aus der Zelle, sind die CDF-Proteine eine wesentliche Komponente in der Schwermetallresistenz (Grass *et al.*, 2005; Guffanti *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

Wie ist nun die Zelle in der Lage giftige Schwermetallionen zu entgiften und wie interagieren die verschiedenen Resistenz-Mechanismen untereinander? Hier wird das Zusammenspiel von CDF-Proteinen und anderen Resistenz-Systemen deutlich (Abb. 32). In *C. metallidurans* CH34 ist das RND-Efflux-System CzcCBA für die Entgiftung hoher

Schwermetallkonzentrationen von Co(II), Zn(II) und Cd(II) verantwortlich (Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989; Rensing *et al.*, 1997). Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass RND-Transporter ihre Substrate aus dem Zytoplasma erhalten (Legatzki *et al.*, 2003; Lomovskaya *et al.*, 2002; Nikaido *et al.*, 1998; Nikaido und Zgurskaya, 2001; Rensing und Grass, 2003). Für die vollständige Entgiftung der Zelle sind neben RND-Transportern auch andere Transportsysteme, wie die CDF-Proteine oder P-Typ-ATPasen notwendig. Dabei sind diese drei Transportsysteme in die Detoxifikation von Metallkationen gleichermaßen involviert. Munkelt *et al.* (2004) demonstrierten das Zusammenspiel von DmeF und FieF, den beiden chromosomal kodierten CDF-Proteinen, mit dem Kationen-Protonen-Antiporter CzcCBA in *C. metallidurans*. Dabei wurde gezeigt, dass das cobalttransportierende CDF-Protein DmeF essenziell für die durch den RND-Komplex CzcCBA vermittelte Co(II)-Entgiftung ist. In Abwesenheit von DmeF, aber in Anwesenheit der zwei unabhängigen HME-RND-Systeme Czc und Cnr (Co(II)-, Ni(II)-Resistenz), wurde die Co(II)-Resistenz auf weniger als 1 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Wurde zusätzlich *czcD* deletiert, verminderte sich die Co(II)-Resistenz in *C. metallidurans* weiter. Folglich ist durch die Abwesenheit beider Co(II)-entgiftender CDF-Proteine CzcD und DmeF das Resistenz-vermittelnde-Efflux-System CzcCBA eingeschränkt in der Lage Co(II) zu entgiften. Das bedeutet, die CDF-Proteine transportieren Co(II) vom Zytoplasma ins Periplasma, dem möglicherweise danach ein Transport vom Periplasma aus der Zelle durch CzcCBA folgt (Munkelt *et al.*, 2004). Mit den beiden P-Typ-ATPasen ZntA und CadA aus *C. metallidurans* konnten durch Legatzki *et al.* (2003) ähnliche Effekte gezeigt werden. Beide Proteine vermitteln Resistenz gegen Zn(II) und Cd(II). Wurden beide Gene inaktiviert, führte dies in Anwesenheit von CzcCBA zu einer Verminderung der Cadmium-Resistenz. Ähnliche Experimente konnten mit dem kristallisierten RND-Protein AcrB demonstriert werden (Murakami *et al.*, 2002), das seine Substrate bevorzugt aus dem Periplasma aufnimmt (Middlemiss und Poole, 2004; Nies, 2003).

Diese Beispiele zeigen, dass zusätzlich zum HME-RND-System, sekundäre Transporter, wie z.B. die CDF-Proteine, für den Metall-Efflux notwendig sind. Diese zusätzlichen Transporter sind in der Lage die überschüssigen Metallionen über die Zytoplasmamembran zu transportieren, da RND-Transporter ihre Substrate nicht vorwiegend direkt aus dem Zytoplasma beziehen (Haney *et al.*, 2005).





**Abb. 32: Das Zusammenspiel von Transportern unterschiedlicher Metall-Efflux-Familien in der Metallentgiftung** (Haney *et al.*, 2005).

Die CDF-Proteine transportieren ihre Substrate getrieben durch die *proton motive force* (pmf) über die Zytoplasmamembran. P-Typ-ATPasen transportieren die Metallkationen unter ATP-Hydrolyse vom Zytoplasma ins Periplasma. HME-RND-Systeme koppeln den Antiport von Protonen mit dem Efflux der periplasmatischen Kationen zur Außenseite der Zelle.

Das Zusammenspiel mit anderen Efflux-Systemen und die Beteiligung in metallabhängige regulatorische Prozesse zeigt die Notwendigkeit der CDF-Protein-Familie. CDF-Proteine sind nicht nur in der Lage Metallionen zu transportieren und die Zelle zu entgiften, sondern als Homöostase-Efflux-Pumpe dienen sie auch zur Regulierung des Schwermetallhaushaltes. Dies konnte am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* demonstriert werden. Durch das CDF-Protein ZRC1 wird Zink in die Vakuole transportiert und dort als Zink-Pool gespeichert. Sinkt nun die intrazelluläre Zinkkonzentration werden die beiden ZIP-Proteine ZRT1 und ZRT2 exprimiert und Zink wurde in die Zelle aufgenommen. Zusätzlich wurde ein dritter ZIP-Transporter, ZRT3 exprimiert. Dieser ist in der Membran der Vakuole lokalisiert und mobilisiert Zinkionen aus der Vakuole (Miyabe *et al.*, 2001; MacDiarmid *et al.*, 2000). Durch diesen Mechanismus kann die Hefezelle ihren Zinkhaushalt regulieren.

Wie erfolgt der Transport von Metallionen durch CDF-Proteine? Für Efflux-Proteine konnte ein Antiport gegen einen Protonengradienten, mit dem sie ihre Substrate aus der Zelle transportieren, postuliert werden (Stein, 1990). In den letzten Jahren wurde der Transport von Schwermetallen durch CDF-Proteine weiter aufgeklärt. Der Transport der Metallionen kann über einen Konzentrationsgradienten, einen chemiosmotischen Gradienten,  $\Delta\Psi$ ,  $\Delta\text{pH}$  oder einem Kaliumgradienten erfolgen (Guffanti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Bloss *et al.*, 2002). Anton *et al.* (2004) zeigten, dass unter Zugabe des Entkopplers FCCP zu Vesikeln von CzcD der Protonengradient zusammenbrach. In Zellen akkumulierte CzcD nach Zugabe von

FCCP verstärkt Zn(II). Damit wurden erste Hinweise erbracht, dass der Efflux der Schwermetalle durch CzcD von einem Protonengradienten abhängig ist. Neben den Transportmessungen mit  $^{65}\text{Zn(II)}$  und FCCP, wurde der Transport von  $^{57}\text{Co(II)}$ ,  $^{109}\text{Cd(II)}$  und  $^{63}\text{Ni(II)}$  in ganzen Zellen in *E. coli* untersucht (Anton *et al.*, 2004). Es konnte kein Transport für Co(II) und Ni(II), jedoch aber für Cd(II) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in Wachstumsversuchen gezeigt, dass CzcD in der Lage war, im zinksensitiven *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta\text{zitB}::\text{cat}$ ,  $\Delta\text{zntA}::\text{kan}$ ) Zn(II)-Resistenz zu vermitteln (Anton *et al.*, 2004). Diese Experimente deuteten auf den Transport unterschiedlicher Metalle durch CzcD hin. Jedoch konnte in den damaligen Untersuchungen der direkte Beweis durch Transportmessungen an *inside out vesicles* oder nach Rekonstitution in Proteoliposomen nicht erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Transport von Zn(II) (Abb. 6A), Cd(II) (6B) und Co(II) (Abb. 6C) in Vesikeln durch CzcD gezeigt. Das Maximum der Akkumulation von  $^{65}\text{Zn(II)}$  durch CzcD war nach 5 min erreicht. Danach sank die Zn(II)-Aufnahme (Abb. 6A). Höchstwahrscheinlich ist die Abnahme des Zn(II)-Transportes in einer Instabilität der Vesikel zu begründen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CzcD in der Lage ist Cd(II) zu transportieren. Jedoch konnte im Vergleich zu den Daten mit  $^{65}\text{Zn(II)}$  und  $^{57}\text{Co(II)}$  eine geringere Akkumulation durch CzcD beobachtet werden (Abb. 6B). Dies ist möglicherweise mit der höheren Toxizität von Cd(II) zu begründen (Williams *et al.*, 2000), obwohl im Laufe der Zeit Organismen charakterisiert wurden, die eine hohe Cd(II)-Resistenz aufweisen. Kürzlich wurde der Cd(II)-Transport in den Chloroplasten in *Euglena gracilis* beschrieben (Mendoza-Cózatl und Moreno-Sánchez, 2005). Wurde *E. gracilis* auf cadmiumhaltigem Medium kultiviert, konnte der Organismus 60 % des vorhandenen Cd(II) im Chloroplasten speichern (Mendoza-Cózatl und Moreno-Sánchez, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CzcD in der Lage war, im *E. coli*-Stamm ECA349 ( $\Delta\text{corA}$ ,  $\Delta\text{zupT}::\text{cat}$ ,  $\Delta\text{yohM}$ ) Co(II)-Resistenz zu vermitteln (Abb. 5 und Tab. 7). Der direkte Transport von  $^{57}\text{Co(II)}$  durch CzcD konnte in isolierten Vesikeln gezeigt werden (Abb. 6C). Jedoch korrelierten die Daten in der vorliegenden Arbeit für die Transportmessungen von  $^{57}\text{Co(II)}$  nicht mit den gemessenen Daten von Anton *et al.* (2004). In dieser Veröffentlichung wurde kein Transport für  $^{57}\text{Co(II)}$  in Zellen gezeigt. Möglicherweise könnte in den Versuchen mit  $^{57}\text{Co(II)}$  im *E. coli*-Stamm GG48 ( $\Delta\text{zitB}::\text{cat}$ ,  $\Delta\text{zntA}::\text{kan}$ ) in frühstationären Zellen ein weiteres, bis dahin unbekanntes Cobalt-Resistenz-System, involviert gewesen sein. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit für die Experimente mit *inside out vesicles* *E. coli*-Stämme gewählt, die in allen bekannten Aufnahme- und Efflux-Systemen deletiert waren. Aufgrund der gemessenen Daten konnte in

der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass das CDF-Protein CzcD die Schwermetalle gegen einen Protonengradienten transportiert. Auch für die beiden CDF-Proteine ZitB und FieF aus *E. coli* konnte der direkte Transport von Zn(II) durch die pmf in *inside out vesicles* über die Zytoplasmamembran gezeigt werden (Anton *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2005). Ähnlich wie für CzcD konnte auch für FieF ein möglicher "Kollaps" der Vesikel gezeigt werden. Bis ca. 8 min war die Aufnahme von Zn(II) in *inside out vesicles* stabil, danach sank auch hier die Aufnahme durch die mit FieF beladenen Vesikel (Grass *et al.*, 2005).

Auch in Eukaryoten wurde nachgewiesen, dass ein Protonengradient für den Transport der Schwermetalle notwendig ist. MacDiarmid *et al.* (2002) beschrieben die Merkmale des Zink-Transports durch ZRC1 in vakuolären Membranvesikeln aus der Hefe. Die Zn(II)-Akkumulation in den Vesikeln war ATP-abhängig und benötigte einen Protonengradienten, der durch die V-ATPase regeneriert wurde. Durch die Zugabe von FCCP und Nigericin konnte in der Hefezelle der Zusammenbruch des Protonengradienten simuliert werden. Damit einher ging die verminderte Akkumulation von Zn(II) durch ZRC1 in den Vesikeln (MacDiarmid *et al.*, 2002). Sowohl Eide *et al.* (1993) als auch Ramsay und Gadd (1997) zeigten, dass die Zinksensitivität erhöht wurde, wenn die V-ATPase deletiert wurde. Die Zn(II)-Akkumulation ist somit abhängig vom Protonengradienten und der V-ATPase. Wie der vakuoläre Protonengradient durch die V-ATPase regeneriert wird, ist durch einen Zn(II)/H<sup>+</sup>-Antiport zu erklären. Dabei spielt der niedrige pH-Wert in der Vakuole eine entscheidende Rolle. Wurden Vesikel *in vitro* durch die Zugabe von ATP angesäuert, konnte ein Quenching des pH-sensitiven Farbstoffes ACMA beobachtet werden (MacDiarmid *et al.*, 2002).

Des Weiteren konnte der Transport von Nickelionen gegen einen Protonengradienten in die Vakuole von *S. cerevisiae* demonstriert werden. Wurde die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase deletiert, neigten die Hefezellen zu einer höheren Sensitivität gegenüber Ni(II) (Nishimura *et al.*, 1998). In Pflanzen konnte der Mn(II)-Transport durch CDF-Proteine beschrieben werden, der einem Mn(II)/H<sup>+</sup>-Antiportmechanismus folgte (Clarkson, 1988; Pittman, 2005). In Säugetieren wurde der Transport von Zn(II) durch die ZnT-Proteine charakterisiert. Es wurde beschrieben, dass Zn(II) in synaptische Vesikel durch ZnT-3 transportiert wird (Palmiter *et al.*, 1996; Palmiter und Huang, 2004). Aus der Ratte wurde ein Protein der ZnT-Reihe gereinigt, in Proteoliposomen rekonstituiert und funktionell charakterisiert. Dabei konnte der Zn(II)-Transport in Anwesenheit unterschiedlich aufgebauter pH-Gradienten gezeigt werden (Kumar und Prasad, 2000). Durch die Versuche mit *inside out vesicles* und Proteoliposomen konnte direkt bewiesen werden, dass der Protonengradient die treibende Kraft für den

Schwermetalltransport durch CDF-Proteine zu sein scheint. Jedoch ist der Protonengradient nicht unbedingt essenziell für die Aktivität von CDF-Proteinen. Durch Guffanti *et al.* (2002) wurde der direkte Transport in Abhängigkeit von einem  $H^+$ -Gradienten oder  $K^+$ -Gradienten durch das CDF-Protein CzcD aus *B. subtilis* gezeigt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den Antiporter ZitB aus *E. coli* nachgewiesen (Lee *et al.*, 2002). Bloss *et al.* (2002) demonstrierten, dass nicht alle CDF-Proteine von einem Protonengradienten abhängig sind. Das CDF-Protein AtMTP1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde in Proteoliposomen rekonstituiert und die Zn(II)-Aufnahme untersucht. Es wurde kein Unterschied in der Metall-Aufnahme in Proteoliposomen mit bzw. ohne Protonengradienten gemessen. Die Aufnahme von Zn(II) durch AtMTP1 in die Proteoliposomen wurde demnach nicht durch einen Protonengradienten stimuliert. Wahrscheinlich nutzt AtMTP1 einen Zn(II)-Konzentrationsgradienten als Energiequelle. Außerdem funktioniert AtMTP1 in verschiedenen Organismen als *uptake*-System (Bloss *et al.*, 2002). Deshalb könnte der Kationen-Transport durch CDF-Proteine einem Antiport gegen einen chemiosmotischen Gradienten oder aber einer erleichterten Diffusion gegen einen Konzentrationsgradienten folgen (Nies, 2003).

Anhand kinetischer Daten wurde die Substrataffinität von CzcD gegenüber Zn(II) ermittelt. In energetisierten *inside out vesicles* transportierte CzcD  $^{65}Zn(II)$  mit einem  $K_m$  von 2.2  $\mu M$  und einer  $V_{max}$  von 0.35  $\mu mol Zn/min g Protein$  (Abb. 7A und 7B). Der niedrige  $K_m$ -Wert von CzcD spricht für eine Homöostase-Efflux-Pumpe, die geringfügigen Zn(II)-Überschuss entgiften kann. Ist die Transportkapazität von CzcD überschritten, so wird möglicherweise der CzcCBA-Efflux-Komplex aktiv. Dies würde energetisch sinnvoll sein, da der  $K_m$ -Wert von CzcA für Zn(II) in Proteoliposomen mit 6.6 mM höher ist, als der von CzcD (Goldberg *et al.*, 1999). Ähnlich wie für CzcD spricht der von ZitB ermittelte  $K_m$ -Wert von 1.4  $\mu M$  für ein Homöostase-Efflux-Protein, das in der Lage ist, geringfügigen Zn(II)-Überschuss aus der Zelle zu entgiften (Anton *et al.*, 2004). Jedoch stehen diese Werte im Gegensatz zu einer anderen Publikation. Chao und Fu (2004a) publizierten für ZitB einen  $K_m$  von 104.9  $\mu M$  nach Rekonstitution in Proteoliposomen. Dieser hohe  $K_m$  von ZitB ist verwunderlich, da die physiologische Rolle von ZitB einen niedrigeren  $K_m$ -Wert voraussagt. Wird ähnlich wie für CzcD beschrieben die Transportkapazität von ZitB überschritten, wird *zntA* exprimiert. Der  $K_m$ -Wert von ZntA ist mit 9  $\mu M$  höher, als der von ZitB. ZntA sollte in der Lage sein die Zelle vor Zn(II)-Konzentrationen im millimolaren Bereich zu schützen (Grass *et al.*, 2001). Dies ist sinnvoll, da ZntA große Mengen an Zn(II) unter hohem ATP-Verbrauch transportiert (Anton *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2001; Haney *et al.*, 2005). Wie können jedoch die unterschiedlichen  $K_m$ -Werte von ZitB erklärt werden? Möglicherweise gibt es Faktoren in der

Membran der isolierten Vesikel, die mit ZitB interagieren könnten und die in den Proteoliposomen nicht vorhanden sind (Anton *et al.*, 2004).

Der direkte Transport von Zn(II) durch CzcD in *inside out vesicles*, konnte durch Experimente mit Proteoliposomen bestätigt werden. Wurde Zn(II) durch CzcD in die Proteoliposomen transportiert, wurde eine Fluoreszenzverstärkung beobachtet (Abb. 8A). In *E. coli* wurde ebenfalls der Transport mit Zn(II) und Cd(II) im Austausch mit Protonen durch ZitB in Proteoliposomen nachgewiesen (Chao und Fu, 2004a). Im Fall des Fe(II)-Transporters FieF aus *E. coli* konnte kürzlich auch der Transport von Fe(II) in Proteoliposomen gezeigt werden (Grass *et al.*, 2005). FieF ist somit der erste beschriebene CDF-Transporter in Bakterien, der in der Lage ist Fe(II) aus der Zelle zu entgiften.

CzcD wurde in Veröffentlichungen hauptsächlich als Zn(II)-Transporter charakterisiert (Anton *et al.*, 1999; Anton *et al.*, 2004). Aufgrund der erzielten Ergebnisse von FieF (Grass *et al.*, 2005), wurde auch Fe(II) für CzcD als Substrat untersucht. In Zellen zeigte CzcD eine verminderte Akkumulation von  $^{55}\text{Fe(II)}$ , was auf einen möglichen Fe(II)-Transport hindeutete (Ergebnisse nicht gezeigt). In Proteoliposomen konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Fe(II)-Transport durch CzcD direkt gezeigt werden (Abb. 8B).

Nicht nur in Prokaryoten, sondern auch in Eukaryoten wurden *metal tolerance proteine* gefunden, die im Fe(II)-Transport involviert sind. Auch in Hefezellen wurde der Mechanismus des Eisentransportes in Mitochondrien charakterisiert (Lange *et al.*, 1999). *In vivo* wurde gezeigt, dass die Fe(II)-Aufnahme in den Mitochondrien abhängig von einem Membranpotential war und dieses durch CCCP aufgehoben werden konnte. Für den Fe(II)-Transport in den Mitochondrien wurden die beiden CDF-Proteine MMT1 und MMT2 charakterisiert (Li und Kaplan, 1997). Durch Deletionsmutanten von *mmt1* und *mmt2* konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Fe(II)-Aufnahme unabhängig von diesen beiden Proteinen ist. Der Efflux und die Transportaktivität wurden jedoch in diesen Experimenten nicht vollständig gezeigt (Li und Kaplan, 1997). Vielmehr wurde die Aktivität eisenabhängiger Enzyme wie der Ferrochelatase als Charakteristika der Fe(II)-Aufnahme diskutiert (Lange *et al.*, 1999).

Nicht nur der Protonengradient muss als treibende Kraft des Schwermetalltransportes durch CDF-Proteine diskutiert werden, sondern auch hochkonservierte Aminosäurereste zwischen den einzelnen Vertretern der CDF-Familie (Gaither und Eide, 2001) sind an der Bindung bzw. dem Transport der Schwermetalle beteiligt. Durch Paulsen und Saier (1997) wurde die Bildung von Transportkanälen in den transmembranen Helices (TMH) I, II, V und VI durch die Zytoplasmamembran beschrieben. In denen befinden sich konservierte, negativ geladene

Aminosäurereste. Diese sind wahrscheinlich am Transport beteiligt, da positiv geladene Ionen oder positiv geladene Protonen transportiert werden (Anton *et al.*, 2004). Wie ist jedoch der Efflux der Kationen mit dem Protoneneinstrom koordiniert? Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, könnten vereinzelte Aminosäurereste Aufschluss geben. Besonders die hochkonservierten Aspartat-Reste in den TMHs II, V und VI innerhalb der CDF-Proteine sind dabei von Bedeutung. Geladene bzw. polare Aminosäuren könnten einen Hinweis auf den Efflux der Metallionen und den Import von Protonen geben oder ein mögliches *charge-relais* System formen (Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). Als gut untersuchtes Beispiel muss an dieser Stelle Bakteriorhodopsin genannt werden. Hier gibt es eine Reihe von Glutamat- und Aspartat-Resten, die am Transport von Protonen von der einen Seite der Membran zur anderen beteiligt sind (Lanyi, 1997).

In CzcD gibt es in der TMH I einen konservierten Glutamat-Rest an der Position 31 (Abb. 9). Auffällig ist, dass dieser Glutamat-Rest in den eisentransportierenden CDF-Proteinen FieF aus *E. coli*, MamB aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* und YdbO aus *B. subtilis* nicht vorhanden ist, sondern an dieser Stelle ein Lysin-Rest lokalisiert ist. Im Sequenz-Alignment des Fe(II)-Transporters FieF aus *C. metallidurans* ist charakteristisch, dass weder das Glutamat [Zn(II)-transportierende CDFs] noch das Lysin [Fe(II)-transportierende CDFs] an dieser Stelle vorhanden ist. Vielmehr ist hier ein Glutamin an dieser Position lokalisiert. Auch die beiden CDF-Proteine MMT1 und MMT2 aus *S. cerevisiae* weisen den Lysin-Rest in ihrer Sequenz auf (Li und Kaplan, 1997). Interessant ist, inwieweit diese Aminosäuren an der Substratspezifität und Bindung der Metalle beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Glutamat 31 von CzcD in Aspartat, Asparagin und zusätzlich in Lysin ausgetauscht und untersucht, ob eine mögliche Metallbindung bzw. der Transport verloren gehen (Tab. 7). Die Anwesenheit des CzcD-Glutamat-Derivates CzcD<sub>E31N</sub> konnte in der Zytoplasmamembran nicht nachgewiesen werden, was vermutlich auf Abbau oder ein Faltungsproblem hindeutete. Während CzcD<sub>E31D</sub> noch in der Lage war geringe Zn(II)-Resistenz (Abb. 12A) und Transportaktivität (Ergebnisse nicht gezeigt) zu vermitteln, führte der Lysin-Austausch zum Funktionsverlust von CzcD (Abb. 12A und Tab. 7). Ob dies möglicherweise ein Hinweis ist, dass das Lysin an dieser Stelle die Substratspezifität von CzcD beeinflusst, könnte durch mögliche FieF-Derivate aus *E. coli* geklärt werden. Der Glutamat-Rest an Position 31 scheint nicht nur für den Transport der Kationen wichtig, sondern auch für die Substratspezifität von CzcD. In Anwesenheit von Zn(II) konnte noch Zn(II)-Resistenz vermittelt werden. Zellen mit dem CzcD-Derivat CzcD<sub>E31D</sub>, die mit Co(II) inkubiert wurden, verloren die Fähigkeit Co(II)-Resistenz zu vermitteln (Abb. 12B und Tab.

7). Experimente mit IRT1 aus *A. thaliana* bestätigten, dass die Glutamat-Reste für die Substratspezifität verantwortlich sein können (Rogers *et al.*, 2000). Der Glutamat-Rest an Position 103 zwischen den TMHs II und III in IRT1 ist für den Zn(II)-Transport zuständig, jedoch nicht für den Transport von Fe(II), Mn(II) oder Cd(II) (Rogers *et al.*, 2000).

Neben dem konservierten Glutamat-Rest spielen geladene Aspartat-Reste eine entscheidende Rolle in der Schwermetall-Toleranz. Durch Anton (2001) wurde die Rolle von drei Aspartat-Resten (D53, D158, D181) in CzcD untersucht (Abb. 9). Diese wurden in Asparagin-Reste umgewandelt und der Effekt von  $^{65}\text{Zn(II)}$  in ganzen Zellen von *E. coli* untersucht. Lediglich der Aminosäureaustausch an Position 181 vom Aspartat zum Asparagin zeigte in Akkumulationsexperimenten mit ganzen Zellen einen deutlichen Effekt auf die Transportaktivität von CzcD. Ähnliches konnte für das CzcD-Aspartat-Derivat CzcD<sub>D181E</sub> in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. In diesem Fall konnte in Zellen von *E. coli* eine verstärkte Akkumulation von  $^{65}\text{Zn(II)}$  beobachtet werden (Abb. 15A). In Vesikeln konnte eine stark verminderte Zn(II)-Akkumulation und somit kein Zn(II)-Transport durch CzcD<sub>D158E</sub>, CzcD<sub>D181E</sub> und CzcD<sub>D181N</sub> gezeigt werden (Abb. 15B). In Wachstumsversuchen mit Zn(II) und Co(II) führten die CzcD-Aspartat-Derivate zum vollständigen Funktionsverlust von CzcD und somit zu einem hypersensitiven Phänotyp (Tab. 7). Möglicherweise sind die Aspartate für den Austausch periplasmatischer Protonen gegen Zn(II) aus dem Zytoplasma verantwortlich. Die Hyperakkumulation von Zn(II) durch die Mutanten könnte eine Erklärung für den Prozess des Protonenimports und des Kationen-Efflux liefern. Anstatt Zn(II) aus dem Zytoplasma gegen periplasmatische Protonen zu transportieren, könnte das periplasmatische Zn(II) gebunden, aufgenommen werden (Anton *et al.*, 2004) und somit zur Vergiftung der Zelle führen.

Die Aspartat-Mutationen an den Positionen 53 und 158 zeigten ebenfalls eine höhere Akkumulation im Vergleich zum Wildtypstamm CzcD (Anton, 2001). Jedoch war bei diesen beiden Stämmen die Transportaktivität nicht vollständig ausgeschaltet (Anton, 2001). Auch für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte CzcD-Derivat CzcD<sub>D53E</sub> konnte eine vollständige Transportaktivität in Vesikeln gemessen werden (Abb. 15B), obwohl CzcD<sub>D53E</sub> einen Verlust der Zn(II)- und Co(II)-Resistenz zeigte (Abb. 13A und 13C). Inwieweit änderte sich hier die Schwermetall-Homöostase innerhalb der Zelle? Eine mögliche Erklärung ist, dass Membranvesikel ein artifizielles System darstellen. Durch die Expression in GR362 ( $\Delta\text{zntA}::\text{kan}$ ,  $\Delta\text{zntB}::\text{cat}$ ,  $\Delta\text{zitB}$ ,  $\Delta\text{zupT}$ ,  $\Delta\text{znuABC}$ ) konnten mögliche Interferenzen mit anderen *uptake*- und Efflux-Systemen vermieden werden. *In vivo* hingegen könnten weitere Systeme in der Schwermetall-Homöostase beteiligt sein, die zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt sind. Die Hyperakkumulation von Zn(II) verursacht in der Zelle zusätzlichen

Stress. Die Zelle muss dieser Stresssituation mit einem enormen Kraftaufwand entgegenwirken. Zum Einen muss sie sich vor der erhöhten Zn(II)-Toxizität schützen, zum Anderen müssen Faktoren angeschaltet werden, die innerhalb der Zelle eine Stressantwort geben. Die Expression von CzcD<sub>D53E</sub> konnte in der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden. Jedoch kann hier eine mögliche Falschfaltung bzw. eine nicht korrekte Insertion in der Membran nicht ausgeschlossen werden. Einer möglichen Falschfaltung könnten jedoch Chaperone entgegenwirken. Veränderte Umweltbedingungen bzw. Stress innerhalb der Zelle könnten auf transkriptionaler Ebene mit der Expression von ECF-Sigmafaktoren wie RpoE reguliert werden. Abnormal gefaltete Proteine stehen auch unter der Kontrolle von RpoE-Sigmafaktoren (Yamamoto und Ishihama, 2005). Für Eukaryoten (Palmiter, 2004; Clemens, 2001) und einige Prokaryoten (Liu *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2004) wurde beschrieben, dass überschüssige Metallionen durch Metallothioneine gebunden oder eventuell durch Glutathion entgiftet werden kann. Ob Chelatoren wie z. B. Glutathion im Zytoplasma von *E. coli* bei der Schwermetall-Homöostase des CzcD-Aspartat-Derivates CzcD<sub>D53E</sub> eine Rolle spielen, wurde hier nicht untersucht. Unbekannte Faktoren könnten auch die Durchlässigkeit der Membran ändern. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Aufnahme von Zn(II) über Porine zur Vergiftung der Zelle führt. Oder liegt die Ursache letztendlich alleine in der defekten Efflux-Pumpe CzcD?

Nicht nur für CzcD konnte die Hyperakkumulation von Zn(II) bzw. eine Hypersensitivität von Aspartat-Mutanten charakterisiert werden. Das AtMTP1-Protein aus *A. thaliana* ist in der Lage die Zn(II)-Sensitivität der *zrc1*- und *cot1*-Deletionsmutanten aus Hefe zu komplementieren (Dräger *et al.*, 2004). Der Aspartat-Rest an Position 94 in AtMTP1 ist zwischen den einzelnen Vertretern der CDF-Familie (in CzcD D53) hoch konserviert und befindet sich in der TMH II. Dieser Aspartat-Rest wurde in ein Alanin ausgetauscht und das Mutantenderivat in Hefe überexprimiert. Ähnlich wie für CzcD gezeigt, führte die eingeführte Mutation zur Hypersensitivität des Hefe-Stammes (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005). Für das MTP1-Protein aus *A. halleri* konnten ähnliche Experimente veröffentlicht werden. Auch hier führte eine analoge Mutation zum Verlust der Zn(II)-Sensitivität in *zrc1*- und *cot1*-Deletionsstämmen (MacDiarmid *et al.*, 2000; Dräger *et al.*, 2004).

Die CzcD-Aspartat-Derivate sind nicht nur unfähig Zn(II) zu entgiften, sondern stellen aufgrund ihrer Hypersensitivität eine zusätzliche Stresssituation für die Zelle dar. Basiert diese Tatsache auf einem strukturellen oder katalytischen Effekt? Die Expression der *czcD*-Aspartat-Derivate wurde in der Zytoplasmamembran nachgewiesen. Dabei konnte für CzcD<sub>D181E</sub> eine kleinere Proteinbande im Vergleich zum Wildtyp CzcD detektiert werden



(Abb. 14C). Diese Tatsache deutete wahrscheinlich auf die Instabilität bzw. Abbau des Mutanten-Proteins hin. Möglicherweise könnte CzcD durch die Aspartat-Mutation nicht mehr in der Lage sein, sich korrekt in die Membran zu falten und damit wahrscheinlich den Protonentransportweg blockieren. Durch eine mögliche Falschfaltung könnte es auch zum Abbau des Proteins kommen und dies könnte letztendlich in einer Vergiftung der Zelle durch verminderten Zn(II)-Efflux resultieren (Anton *et al.*, 2004). In diesem Fall kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Hypersensitivität auf Änderung der Transportrichtung des Proteins basiert. Die CzcD-Aspartat-Derivate könnten demnach auch als Zn(II)-Aufnahmesysteme innerhalb der Zelle fungieren. Neben dem katalytischen Effekt von CzcD<sub>D181E</sub> kann ein struktureller Effekt nicht ausgeschlossen werden. Mittels CD-Spektren könnten Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur der Mutanten-Proteine gezogen werden. Außerdem könnte gezeigt werden, inwieweit die Bindung von Metallionen eine strukturelle Änderung des Proteins hervorrufen.

Die Falschfaltung der Mutanten-Proteine in der Zytoplasmamembran könnte ein wichtiges Indiz für die Inhibierung des Schwermetalltransportes sein. In Membranproteinen wurde ein konserviertes Glycin-Zipper-Motiv mit dem Sequenzmuster GXXXG entdeckt, das in der Proteinstruktur und -faltung eine wesentliche Rolle spielt (Kim *et al.*, 2005). Mutationen in diesen Glycin-Zippern führten zum Verlust der Funktion des Membranproteins in vielen Fällen. Dadurch können Ionen nicht mehr transportiert werden und der Ionenhaushalt gerät aus dem Gleichgewicht (Kim *et al.*, 2005). Neben dem Glycin-Zipper-Motiv konnte ein essenzielles Leucin-Zipper-Motiv in dem CDF-Protein PtdMTP1 aus der Pappel charakterisiert werden (Blaudez *et al.*, 2003). Am C-Terminus des Proteins befinden sich vier Leucine 293, 300, 307 und 314, die zwischen den Vertretern der CDF-Proteine aus Pflanzen konserviert sind. Die Substituierung L314 durch ein Alanin-Rest verhinderte die funktionelle Komplementation von  $\Delta zrc1$  Mutanten durch PtdMTP1. Des Weiteren wurden in dieser Veröffentlichung vier Mutationen (D86A, H89A, H89K und D93A) hergestellt. Auch hier konnte ähnlich wie für CzcD die Notwendigkeit aller Aminosäuren für die Zn(II)-Resistenz gezeigt werden (Blaudez *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten in den exponierten transmembranen Bereichen funktionell wichtige Aspartat-Reste in CzcD identifiziert werden. Auch in ZitB aus *E. coli* konnten konservierte Aminosäurereste, die an der Bindung und am Transport von Zn(II) beteiligt sind, durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht und identifiziert werden (Abb. 33). Damit war ZitB ein weiteres Protein, das funktionell aufgeklärt werden konnte (Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). In ZitB wurde gezeigt, dass die zu CzcD homologen Aminosäurereste wie Histidine,

Glutamate und Aspartate ebenfalls essenziell für die Funktion von ZitB sind. Unter Anwesenheit verschiedener Zn(II)-Konzentrationen waren die Mutationen nicht mehr in der Lage die Zn(II)-Sensitivität des *E. coli*-Stammes GG48 ( $\Delta zitB::cat$ ,  $\Delta zntA::kan$ ) zu komplementieren. Der Funktionsverlust der Aminosäureaustausch-Mutanten äußerte sich jedoch nicht in einem hypersensitiven Phänotyp, wie das teilweise bei CzcD der Fall war (Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004).

ZitB	MAHSHSHTSSHLPEINNARRLLYAFGVITAGFMLVEVVGGLSGSLALLADAGHMLTDTAA	60
CzcD	MGAGHSHDHP---GGNERSLKIALALITGIFLIAEVVGGVMIKSLALISDAAHMLTDTIVA	56
	* . *** . . * * * * : : * * * * : : * * * * : : * * * * : * * * * * *	
ZitB	LLFALLAVQFSRRPPTIRHTFGWLRLLITLAAFVNATALVVTITLITWEAIERFRTPRVE	120
CzcD	LALALAAATAIAKRPADKKRTFGYYRFEILAAAFNALILFGVAITYLIEAYLRKSPFQIE	116
	* : * * * : : : * * . : : * * * : * : * * * . * * * : * : * * * * : : * * * : *	
ZitB	GGMMATAVAGLLANILSFWLLHHGSEEKNLNVRAAALHVLGDLIGSVGAIITAAIIIIWT	180
CzcD	STGMFVVAVLGLIINLISMRMLSSG-QSSSLNVKGAYLEWVSDLLIGSVGIAGALIRFT	175
	. * : : * * * * : : * * : * * : . . . * * * : * * * . * * * * * * * * * * * * * * * *	
ZitB	GWTPADPILSILVSLLVLSAWRLIKDSVNELEEGAPVSLDIAELKRRMCREIPEVRNVH	240
CzcD	GVAWVDSAAVAVLIGLWVLPRIWILLKSSLVNLEEGVPDDVDLAEVEKQIL-ATPGVKSFH	234
	** : . * . : : * * : * * * * : *	
ZitB	HVHVWVGE-KPVMITLHVQ-VIPPHDHALDQIQHYLMDHYQIEHATIOMEYQFCHGPD	298
CzcD	DLHIWALTSGKASLIVHVNDAVNPPEMEVLPKQMLADKFDITHVITIQFELAPCFEQAD	294
	. : * * * : . * . : : * * * . : . : * : : : * * * : * * * * * * * * * * * *	
ZitB	C--HLNEG---VSGHSHHHH-	313
CzcD	AAQHFNASPALVGSKSLAAGGN	316
	. * : * . * . : * *	

**Abb. 33: Aminosäure-Sequenz-Alignment der CDF-Proteine CzcD aus *C. metallidurans* und ZitB aus *E. coli***

Die konservierten und durch gerichtete Mutagenese ausgetauschten Aminosäuren wurden für ZitB rot und für CzcD grün dargestellt. Die funktionell wichtigen Aminosäurereste wurden in Transportstudien charakterisiert. Der Sequenzvergleich erfolgte über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Die mit \* bezeichneten Aminosäuren sind zu 100 % konserviert, die mit ■ bezeichneten Aminosäuren sind ähnlich und die mit : bezeichneten Aminosäuren sind nicht konserviert.

Auch Goldberg *et al.* (1999) und Paddock *et al.* (2003) zeigten, dass Aspartat-Reste an der Protonentranslokation von Transportproteinen beteiligt sind. In CzcA wurde ein DDE-Motiv beschrieben, das für den Transport der Kationen bzw. die Weitergabe der Protonen verantwortlich ist (Goldberg *et al.*, 1999).

Der pathogene Organismus *Pseudomonas aeruginosa* besitzt einen Efflux-Komplex MexABM. Dieses Efflux-System ist in der Lage diverse Xenobiotika und Antibiotika zu transportieren. In der TMH IV von MexB befindet sich ein konservierter Aspartat-Rest an Position 408. Wurde dieser Rest in ein Alanin, Asparagin oder Lysin ausgetauscht, so führte dies zum Verlust der Aktivität von MexB (Guan und Nakae, 2001). Substitutionen der Aminosäuren D408 in der TMH IV oder K939 in der TMH X zum Glutamat oder Arginin zeigten ebenfalls signifikante Effekte auf die Funktion. Dies bedeutet, dass die nativen Ladungen an den genannten Positionen für die Funktion essenziell sind (Guan und Nakae,

2001). Die dokumentierten Ergebnisse zeigen ein weiteres Beispiel, dass mehrere konservierte Aminosäuren in den TMHs ein Ladungsnetzwerk bilden, ähnlich wie es für CzcD oder ZitB beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). Jedoch ist noch nicht klar, inwieweit die konservierten Aspartat-Reste in CDF-Proteinen bei der Bindung und im Transport involviert sind.

Es ist möglich, dass die Aminosäuren in den hydrophoben Membrandomänen Interaktionen mit Ionen vermitteln und somit die Spezifität des Transporters beeinflussen. Wurde der Aspartat-Rest an Position 100 in IRT1 aus *A. thaliana* mutiert, so erhöhte sich die Substratspezifität des Transportproteins (Rogers *et al.*, 2000). Es wurde kein Fe(II) und Mn(II) mehr transportiert. Der Transport von Zn(II) und Cd(II) wurde dagegen nicht beeinflusst (Rogers *et al.*, 2000). Auch für CzcD aus *C. metallidurans* könnte der Aspartat-Rest an Position 181 für die selektive Metallbindung im Protein verantwortlich sein. Wurde dieser Aspartat-Rest mutiert, konnte in Wachstumskurven für das CzcD-Derivat CzcD<sub>D181A</sub> noch Zn(II)-Resistenz vermittelt werden (Abb. 14A und Tab. 7), der Co(II)-Transport hingegen war eingeschränkt (Abb. 14B und Tab. 7). Damit scheinen einzelne Aspartat-Reste nicht nur für den Transport der Metallkationen bzw. Protonen notwendig zu sein, sondern auch für die Substratspezifität des Proteins. Das wurde auch am Beispiel der Aspartat-Austausche in FieF aus *E. coli* demonstriert (Wei und Fu, 2005). Mittels Titrations-Kalorimetrie und *stopped-flow spectrofluorometry* wurde die Metallbindung an einem hochkonservierten Aspartat-Rest in FieF untersucht. Wurde das Aspartat an Position 157 gegen ein Alanin substituiert, wurde die Cd(II)- und Zn(II)-Bindung unterdrückt und letztendlich der Transport beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass eine Cystein-Substituierung die Bindung und den Transport von Zn(II) und Cd(II) nicht beeinflusste. Des Weiteren zeigten Titrationsexperimente von Wei und Fu (2005), dass das Aspartat 157 keine Bedeutung in der Fe(II)-Bindung hatte. Damit konnte für FieF gezeigt werden, dass D157 direkt in der Metallbindung und/oder dem Transport involviert ist. In Anlehnung an die Versuche von Wei und Fu (2005) könnte auch für die Aspartate aus CzcD eine direkte Metallbindung und/oder Transportinvolvierung durch Cystein-Austausche gezeigt werden.

Neben der Transportaktivität muss die Metallbindung näher erläutert werden. Für CDF-Proteine wurde eine Vielzahl an Substraten charakterisiert. Wie jedoch erhalten CDF-Proteine ihre Substrate und wie sind sie in der Lage diese zu binden? Sicherlich binden CDF-Proteine ihre Substrate nicht fest bzw. lange, da es sich um Efflux-Systeme handelt, die die Zelle vor toxischen Schwermetallionen schützen sollen. Als eine Möglichkeit wird in der Literatur

diskutiert, dass CDF-Proteine bei der Aktivierung/Deaktivierung von Proteinen involviert sind, deren Funktion wiederum von der An- bzw. Abwesenheit gebundener Substrate abhängig ist (Haney *et al.*, 2005). Diese Daten könnten auch zur These führen, dass einzelne Domänen, wie beispielsweise der N- bzw. C-Terminus der CDF-Proteine, als Interaktionspartner fungieren. Die Interaktion von CDF-Proteinen wurde in Eukaryoten bereits aufgeklärt. Experimente deuteten daraufhin, dass das ZnT-1-Protein aus dem Menschen und das dazu homologe CDF-1-Protein von *Caenorhabditis elegans* bei der Aktivierung von Raf1 involviert sind (Hoyos *et al.*, 2002; Michaud *et al.*, 1995). Neue Daten zeigen, dass die Interaktion über den C- und N-Terminus der CDF-Proteine stattfindet (Jirakulaporn *et al.*, 2004). Einzelne Aminosäuren wurden in diesen Arbeiten jedoch nicht beschrieben. In der Entgiftung von Schwermetallen und der Resistenz spielen organische Säuren und Aminosäuren eine Rolle. In der Bindung von Zn(II) beispielsweise wurden Histidine, Glutamate, Aspartate aber auch Cysteine identifiziert (Rauser, 1999; Clemens, 2001; Karlin und Zhu, 1997).

Um die Beteiligung verschiedener Aminosäuren bei der Bindung zu identifizieren, wählten Anton *et al.* (2004) die chemische Modifikation von Aminosäureresten in CzcD *in vitro* aus. Als mögliche Liganden für die Metallbindung wurden die neun Histidine und das einzige Cystein in Betracht gezogen. Für die chemische Modifikation des Cysteins 290 wurde DTNB gewählt. Spektroskopische Verläufe der Modifikation zeigten jedoch eine geringe bis keine Involvierung des Cysteins an der Metallbindung (Anton *et al.*, 2004). Mittels gerichteter Mutagenese wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Involvierung des Cysteins in der Metallbindung untersucht. Dabei wurde das Cystein gegen ein Serin substituiert. Ähnlich wie für die Aspartat-Mutanten, resultierte die erhöhte Zn(II)-Sensibilität in einem hypersensitiven Phänotyp, sowohl für Zn(II) (Abb. 10A und Tab. 7) als auch für Co(II) (Abb. 10B und Tab. 7). Dies deutete daraufhin, dass das Cystein für die volle Funktion von CzcD notwendig war. Wurde das Cystein an Position 294 in ZitB gegen ein Serin ausgetauscht, verhielten sich Zellen in Wachstumsversuchen wie der Wildtyp. Möglicherweise kompensierte das Cystein an Position 299 die Funktion von C294S in ZitB (Anton *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002). Mittels Cystein-Markierung konnte jedoch auch für FieF aus *E. coli* gezeigt werden, dass das Cystein 287 für Zn(II) und Cd(II) eine mögliche Bindestelle sein kann (Wei und Fu, 2005; Haney *et al.*, 2005). In FieF konnte gezeigt werden, dass Cystein-Reste nicht nur Zn(II) und Cd(II) binden, sondern für den an Position 127 lokalisierten Cystein-Rest konnte außerdem eine Bindung von Quecksilber nachgewiesen werden (Chao und Fu, 2004b). Die Involvierung von Cysteinen bei der Metallbindung konnte auch in anderen Untersuchungen bestätigt werden.

Die Raf-1 Proteinkinase beispielsweise besitzt eine Cystein-reiche Domäne, die in der Lage ist Zn(II) zu binden. Mutationen dieser Domäne mittels UV *Cross-Linker* resultierten in der zunehmenden Aktivität von Raf-1. Das zeigte in diesem Fall die Bedeutung der Zn(II)-Bindung in dieser Domäne (Hoyos *et al.*, 2002; Michaud *et al.*, 1995). Der Cystein-Rest ist in den CDF-Proteinen nicht konserviert. In einigen Fällen, wie z.B. in CzcB aus *Staphylococcus aureus*, befinden sich an dieser Position Histidin-Reste. Dies läßt spekulieren, ob das Cystein wirklich in der Metallbindung involviert ist, möglicherweise dient dieser Rest auch nur der Proteinstabilität. Hier würden Strukturanalysen des Proteins erste wichtige Hinweise liefern.

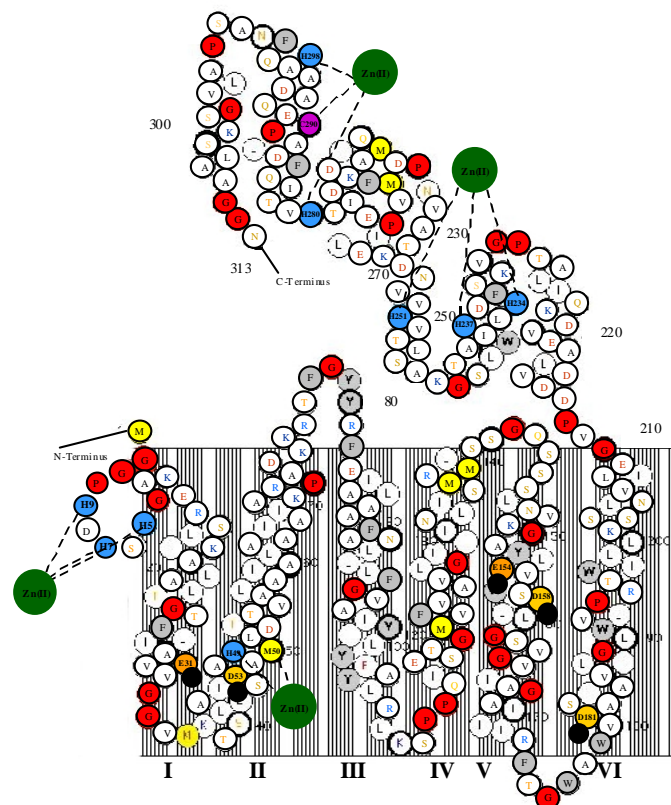
Die Assoziation struktureller Komponenten und die Translokation der Substrate stehen in engem Zusammenhang. Dies schließt die Untersuchung ein, welche Strukturen in der Substratbindung und welche im Transport involviert sind (Haney *et al.*, 2005). Vielen CDF-Proteinen ist die Anhäufung von Histidin-Resten im N- und C-Terminus gemeinsam. Mittels DEPC wurden die Histidine in CzcD chemisch modifiziert und somit inaktiviert (Anton *et al.*, 2004). Nach der Inkubation mit DEPC war CzcD nicht mehr in der Lage an Metall-Chelat-Sepharose zu binden. Die chemische Modifikation konnte jedoch nichts über die Lage der Metallbindestellen im Protein selbst aussagen. Aus diesem Grund wurden Titrationsexperimente mit dem separat gereinigten C-Terminus von CzcD durchgeführt (Anton, 2001). Aus der Proteinsequenz von CzcD lassen sich fünf native Histidine im C-Terminus ableiten. Durch die *EcoRI/NcoI*-Klonierung wurden zusätzlich zwei weitere Histidine in das Protein eingefügt. Es wurde postuliert, dass mindestens zwei der sieben Histidine in der löslichen Domäne bei der Metallbindung involviert sind. Ob es sich dabei um die zusätzlich eingefügten Histidine handelte, konnte in diesen Experimenten letztendlich nicht nachgewiesen werden (Anton, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund durch Einzelmutationen der Einfluss der Histidine auf die Bindung bzw. den Transport untersucht. Die CzcD-Derivate CzcD<sub>H5R</sub> und CzcD<sub>H9R</sub> vermittelten in Wachstumsversuchen die Hälfte der Zn(II)-Resistenz im Vergleich zu CzcD (Abb. 16A und Tab. 7). Dies bedeutet, dass beide Histidin-Reste im N-Terminus alleine für die volle Funktion von CzcD benötigt werden. Während das CzcD-Derivat CzcD<sub>H5R</sub> noch in der Lage war Zn(II)-Resistenz zu vermitteln, konnte in Anwesenheit von Co(II) ein vollständiger Funktionsverlust von CzcD beobachtet werden (Abb. 16B und Tab. 7). Inwieweit dieser Aminosäurerest bei der Substratspezifität von CzcD involviert ist, kann hier nur spekuliert werden, wurden doch die Histidin-reichen Regionen der CDF-Proteine aus Pro- bzw. Eukaryoten hauptsächlich als Zn(II)-bindende Domänen beschrieben (Paulsen und Saier, 1997; Clemens, 2001; Palmiter

und Findley, 1995; Murgia *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). Die Substituierung von H7 durch Arginin zeigte einen vollständigen Funktionsverlust von CzcD in der Schwermetallresistenz (Abb. 16A und Tab. 7). Die Expression von *czcD*<sub>H7R</sub> konnte in der Zytoplasmamembran nicht nachgewiesen werden (Abb. 18), jedoch im Rohextrakt als mögliche Formation von *inclusion bodies* (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies impliziert, dass dieser Histidin-Rest für die korrekte Insertion von CzcD notwendig ist.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Histidin-Reste H237, H251, H280 und H298 im C-Terminus für die Funktion von CzcD wichtig sind. Dabei führte der Austausch zu Arginin-Resten zu keiner Expression der einzelnen Gene *in vivo*. Dies deutete auf eine mögliche Instabilität der Proteine in der Membran hin. Nach Austausch der Histidin-Reste gegen Alanine konnte gezeigt werden, dass CzcD keine Zn(II)-Resistenz in *E. coli* mehr vermitteln konnte (Abb. 17A und Tab. 7). Auch nach Austausch des in der TMH II lokalisierten Histidin-Restes H49, der Teil des konservierten Motivs DaxHMLTD ist, zeigte CzcD verminderte Resistenz (Abb. 17C und Tab. 7). Damit konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die konservierten Histidin-Reste essenziell für die vollständige Funktion und wahrscheinlich an der Zn(II)-Bindung in CzcD beteiligt sind. Ähnliche Ergebnisse konnten in ZitB aus *E. coli* gezeigt werden (Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004; Haney *et al.*, 2005). Die beiden Histidin-Reste H53 (in CzcD H49) und H159 (in CzcD E154) in den TMHs II und V wurden ebenfalls als mögliche Liganden für eine Zn(II)-Bindung postuliert. Ähnlich wie für CzcD beschrieben, sind beide konservierten Histidin-Reste in *E. coli* essenziell für die Funktion von ZitB. Weitere Studien in ZitB zeigten, dass die Deletionen von vier N-terminalen ( $\Delta$ M1-H11) oder fünf C-terminalen ( $\Delta$ C294-H313) Histidinen die Zellen nicht zinksensitiver machte, als solche die nur den Wildtyp *zitB* exprimierten (Lee *et al.*, 2002). Dies zeigte, dass einzelne Histidin-reiche Regionen im N- bzw. C-Terminus essenziell für die Rolle von ZitB sind. Fehlen die Histidine in einer Region, kann die andere Histidin-reiche Region die fehlende kompensieren. Diese Vermutung wird unterstützt, da sich in den TMHs von ZitB die Histidin-Reste H53 und H159 befinden, die möglicherweise auch alleine fähig sind Zn(II) zu binden. Auch für CzcD konnte gezeigt werden, dass der carboxyterminale Teil für die volle Funktion von CzcD benötigt wird. Es ist jedoch durchaus möglich, dass einzelne Aminosäuren wie beispielsweise H49 in den TMHs auch alleine die Bindung bzw. den Transport und somit die Entgiftung vermitteln (Anton *et al.*, 2004). In Vorarbeiten konnte die Metallbindung mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) in CzcD gezeigt werden (Anton *et al.*, 2004). CzcD ist in der Lage drei Moleküle Zn(II) pro Monomer zu binden. Durch den Austausch der Histidine in der vorliegenden Arbeit können

die Bindestellen in CzcD näher eingegrenzt werden. Das H5XH7XH9-Motiv im N-Terminus könnte eine mögliche Bindestelle von Zn(II) sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen außerdem daraufhin, dass zwei weitere Bindestellen in der zytoplasmatischen Domäne von CzcD vorhanden sind. Eine putative Metallbindestelle könnte durch H234, H237 und H251 und die Zweite durch die beiden Histidine an Position 280 und 298 vermittelt werden. Zwischen diesen Histidin-Resten ist das bereits beschriebene Cystein 290 lokalisiert. Möglicherweise interagieren in CzcD die beiden Histidine 280 und 298 mit dem Cystein 290 in dem putativen Bindemotiv H280VTX<sub>7</sub>C290X<sub>7</sub>H298 (Abb. 34).

Der Histidin-Rest H159 in ZitB ist nicht in allen CDF-Proteinen konserviert. In CzcD z.B. befindet sich an dieser Position ein Glutamat-Rest, ein möglicher Ligand für Zn(II) oder Co(II). Dies legt die Vermutung nahe, dass CDF-Proteine eine Kombination aus Histidinen, Glutamaten und/oder Aspartaten nutzen, um die Schwermetallkationen über die Membran zu transportieren, wobei die Glutamate und/oder die Aspartate bei der Protonentranslokation über die Membran involviert sind. Möglicherweise sind bei diesem Prozess auch Cysteine involviert, wie es für CzcD in der vorliegenden Arbeit (Abb. 34) und für FieF (Wei und Fu, 2005; Haney *et al.*, 2005) gezeigt wurde.



**Abb. 34: Putative Metallbindestellen im CzcD-Protein**

Im N-Terminus könnte sich eine der möglichen Bindestellen für Zn(II) vermuten lassen, die durch H5, H7 und H9 vermittelt wird. Im C-Terminus lassen sich zwei putative Bindestellen vermuten. Die Erste könnte durch H234, H237 und H251 koordiniert werden und die Zweite durch H280 und H298, mit einer möglichen Interaktion von C290. Eine zusätzliche Bindestelle könnte sich in der TMH II befinden, die durch H49 und M50 vermittelt wird. E31 in der TMH I, D53 in der TMH II, E154, D158 in der TMH IV und D181 in der TMH VI könnten für den Transport der Metalle verantwortlich sein.

### 4.3. Die Struktur von CzcD

Einschätzungen zufolge sind ein Drittel aller Proteine integrale Membranproteine, die in der Membran-Doppelschicht eingebettet sind (Smith *et al.*, 2001). Es existieren zwei Hauptklassen von integralen Membranproteinen. Die  $\alpha$ -helikalen Membranproteine sind in zellulären Membranen oder Membranen von Organellen lokalisiert. Die  $\beta$ -Barrel-gefalteten Membranproteine beinhalten Porine, die in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, sowie in Mitochondrien- und Chloroplastenmembran zu finden sind (Smith *et al.*, 2001).

Mittels *lacZ*- und *phoA*-Fusionen konnte die Topologie von CzcD analysiert werden (Anton *et al.*, 1999). CzcD ist ein integrales Membranprotein, das in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist (Nies, 1992; Anton *et al.*, 1999). Dabei befinden sich N- und C-Terminus des Proteins im Zytoplasma. In diesen Versuchen konnten nur vier TMHs für CzcD gezeigt werden (Anton *et al.*, 1999), wobei für CDF-Proteine sechs TMHs postuliert wurden (Paulsen und Saier, 1997). Die Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektren beschrieb CzcD eindeutig als  $\alpha$ -helikales Protein, das für CDF-Proteine ein charakteristisches Merkmal ist (Anton, 2001).

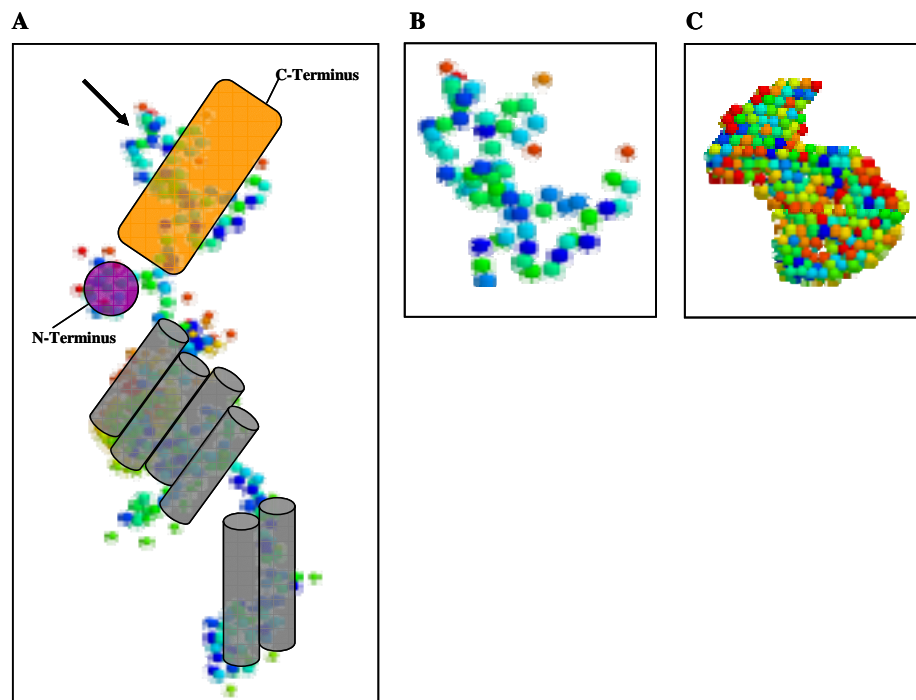
In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur von CzcD biochemisch untersucht werden. Bereits durch Anton (2001) wurde versucht, CzcD zu kristallisieren. Dazu wurden als Präzipitantien verschiedene Polyethylenglykole (PEG) verwendet. Bei 19 und 20 % (w/v) PEG6000 konnte eine potenziell kristallähnliche Struktur erhalten werden. Jedoch konnte dabei nie genau geklärt werden, ob es sich wirklich um einen Kristall handelte, da dieser zerfiel. Diese Tatsache deutete daraufhin, dass es sich hierbei möglicherweise um einen Salzkristall handelte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese Vermutung. Während der Kristallisationsversuche durch Anton (2001) wurde der native Zustand des CzcD-Proteins nicht beachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der native Charakter von CzcD näher untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass CzcD als heterogenes Protein gereinigt wurde und somit nicht für eine erfolgreiche Kristallisation eingesetzt werden konnte. Erfolgreiche Reinigungsexperimente mit dem Membranprotein CzcA aus *C. metallidurans* zeigten, dass der Aggregatbildung mittels Salz- und SDS-Behandlung entgegengewirkt werden konnte (J. Covés und D. Cannella, persönliche Mitteilung). In Anlehnung daran wurden für CzcD verschiedene Reinigungsprotokolle etabliert, um die Aggregatbildung zu verhindern. Jedoch führten Puffer mit NaCl, EDTA oder SDS ebenfalls zu einem nicht homogenen CzcD-Protein. Dies lässt den Schluss zu, dass es während der CzcD-Reinigung zu einer sehr starken Aggregatbildung kommt, die möglicherweise auf hydrophoben



Wechselwirkungen basiert. Da CzcD nach bzw. während der Solubilisierung aggregierte kann ein Einfluss von DDM auf die Aggregation von CzcD nicht ausgeschlossen werden. Die Detergenz-Protein-Interaktion während der Solubilisierung und der Reinigung spielt eine zentrale Rolle für den nativen Zustand des Proteins nach der Extraktion aus der Membran. Nicht nur der chemische und physiologische Charakter von Detergenzien ist von Bedeutung, sondern auch die Anwesenheit von Lipiden und anderen Proteinen sind von immenser Bedeutung (Garavito und Ferguson-Miller, 2001). FieF und ZitB beispielsweise wurden mit einem nicht-ionischen Detergenz bis zur Homogenität gereinigt (Wei *et al.*, 2004). Wei *et al.* (2004) zeigten die Erhöhung der Bindefähigkeit vom Maltosid-Detergenz mit Zunahme der Alkylgruppe, d.h. ein Maltosid-Detergenz mit einer längeren Alkylgruppe bindet besser an der hydrophoben Oberfläche eines Membranproteins. Dadurch wird das molare Bindungsverhältnis und die Löslichkeit des zu solubilisierenden Membranproteins erhöht. Außerdem steht das molare Bindungsverhältnis des Maltosid-Detergenz mit der Stabilität des Proteins in Verbindung. Um den oligomeren Zustand von FieF näher zu charakterisieren, wurden drei verschiedene Maltosid-Detergenzien verwendet, die sich in der Länge ihrer Alkyl-Kette unterschieden. Dabei wurde das DDM gegen drei andere Maltosid-Detergenzien ausgetauscht. Nach Austausch konnte keine Proteinaggregation von FieF beobachtet werden. Nach dem Austausch wurden die molekularen Massen der Detergenz-Protein-Lipid-Mizellen untersucht. Die molekulare Masse des FieF-Oligomers von 68 kDa in den unterschiedlichen Detergenz-Lipid-Mizellen korrespondierte mit der Größe eines Dimers (Wei *et al.*, 2004).

In Anwesenheit von DDM wurde CzcD in einem aggregierten Zustand gereinigt. Aus diesem Grund wurde ein zwitterionisches Detergenz, Fos-Choline 14, für die Solubilisierung verwendet. Das Membranprotein CzcA wurde damit in einem homogeneren Zustand gereinigt (J. Covés, persönliche Mitteilung). Mit Fos-Choline 14 wurde CzcD in einer dissoziierten Form gereinigt. Die Bande bei 70 kDa verschwand teilweise (Abb. 26), die in den meisten Fällen nach der Reinigung von CzcD auftrat. Die Aggregatbildung konnte jedoch nicht vollständig beseitigt werden. Der oligomere Zustand von CDF-Proteinen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht gut untersucht und zur Struktur ist nur wenig bekannt. Mittels chemischer Vernetzer wurde versucht die Bildung des potenziellen Dimers von CzcD zu zeigen (Anton, 2001). Jedoch wurde dabei auch in der uninkubierten Probe eine Bande detektiert, so dass nicht genau gezeigt wurde, dass das CzcD-Protein als Dimer vorliegt (Anton, 2001). Mittels *light diffusion scattering* konnte in der vorliegenden Arbeit der oligomere Zustand von CzcD zwischen Monomer und Dimer bestimmt werden. In Western-Blot-Analysen mit spezifischem CzcD-Antikörper konnten die Banden bei 70 kDa ebenfalls detektiert werden, was für eine

mögliche Oligomerisierung des Proteins spricht (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnte jedoch nicht exakt bewiesen werden, ob es sich bei der Bande bei 70 kDa, um das potenzielle Dimer von CzcD oder um Aggregate handelt. Versuche mit Röntgenkleinwinkelstreuung zeigten immer wieder, dass CzcD in einem aggregierten Zustand vorlag. Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung können Gestalt bzw. Form der Proteine in Lösung untersucht werden. Jedoch können nicht wie bei der Kristallisation einzelne Aminosäuren bzw. Domänen detektiert werden. Durch die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung konnten König und Koch (1995) erstmalig den dimeren Charakter des Enzyms Transketolase nachweisen. Aufgrund der Aggregation konnte für CzcD nicht eindeutig gezeigt werden, ob es sich um ein Monomer oder Dimer handelte. Abhängig von der Proteinkonzentration konnten beide Formen detektiert werden. Mit Hilfe der gemessenen Daten konnte für CzcD ein Modell erstellt werden, dass auf einem flachen, langgestreckten und zylindrischen Modell basiert (Abb. 29). Eine Möglichkeit die erhaltene Struktur des Gesamtproteins CzcD zu interpretieren, kann mit Hilfe der Sekundärstruktur von CzcD vorgenommen werden (Abb. 35).



**Abb. 35: Aus den Röntgenkleinwinkelstreuungen erhaltene Modelle für das Gesamtprotein CzcD und der zytoplasmatischen Domäne von CzcD**

**A:** Die Sekundärstruktur von CzcD wurde in das durch Röntgenkleinwinkelstreuung erhaltene Modell vom Gesamtprotein CzcD angepasst. Dargestellt sind der N-Terminus (violett), die sechs TMHs (grau) und der C-Terminus (gelb). **B:** Ausschnitt des Modells vom Gesamtprotein CzcD. Dargestellt ist nur die potenziell lösliche zytoplasmatische Domäne (Pfeil im Gesamtprotein CzcD; Abbildung A). **C:** Das durch Röntgenkleinwinkelstreuung erhaltene Modell der zytoplasmatischen Domäne von CzcD. Dieses Modell kann als kompakte Struktur definiert werden und lässt sich als C-Terminus im Gesamtprotein CzcD (Modell A und B) wiederfinden. Aus den Kugelmodellen können keine Aminosäuren abgeleitet werden. Die Kugelmodelle können als vereinfachte Oberflächenstruktur der Proteine betrachtet werden, wobei die Farben der einzelnen Kugeln zufällig gewählt sind.

Auch für den zytoplasmatischen Teil von CzcD konnte ein Modell definiert werden (Abb. 31 und 35C). Als Modellform kann dem zytoplasmatischen Teil von CzcD eine kompakte Kugelform zugeordnet werden, die auch im Modell vom Gesamtprotein CzcD wiederzufinden ist (Abb. 35A und 35B). Ähnliche Ergebnisse konnten durch Strukturvorhersagen mittels ExPasy gezeigt werden. Der zytoplasmatische Teil von CzcD ist demnach eine starre und nicht sehr bewegliche Domäne, die möglicherweise in einer kompakten Form vorliegt. Mittels der Röntgenkleinwinkelstreuung konnten für den zytoplasmatischen Teil molekulare Massen zwischen 14-20 kDa erhalten werden, die in diesem Fall von der Proteinkonzentration abhängig schienen (Tab. 8). Womöglich ist diese Tatsache durch Messfehler in der Methode zu begründen bzw. die Streuung der zytoplasmatischen Domäne von CzcD scheint aufgrund der kleinen Größe des Proteins (S. König, persönliche Mitteilung) nicht optimal zu sein. Die theoretisch errechneten Molmassen der zytoplasmatischen Domäne korrespondierten mit der von ExPASy ermittelten Molmasse von 15 kDa und somit mit einem Monomer.

Für einige CDF-Proteine konnte die Quartärstruktur näher charakterisiert werden. Die CDF-Proteine der ZnT-Reihe können als Dimer aber auch als Trimer vorkommen (Michalczyk *et al.*, 2002). ZAT aus *A. thaliana* und das CDF Protein PtdMTP aus der Pappel wurden als Dimer beschrieben (Bloss *et al.*, 2002; Blaudez *et al.*, 2003). *In vitro* wurde die Bildung von Homooligomeren durch PtdMTP beobachtet, die durch DTT zerstört werden konnten. Dabei müssen Disulfid-Brücken bei der Bildung der oligomeren Struktur verantwortlich sein (Blaudez *et al.*, 2003). Auch für CzcD wurde mittels DTT versucht die oligomere Struktur aufzulösen, jedoch ohne Erfolg (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um die strukturelle Grundlage des Zn(II)-Transportes durch CDF-Proteine zu verstehen, ist es notwendig die Quartärstruktur der CDF-Proteine aufzuklären. Die erste Quartärstruktur eines Metalltransporters der CDF-Familie wurde für FieF aus *E. coli* beschrieben (Wei *et al.*, 2004). Mittels *laser light scattering*, Elektronenmikroskopie und *cross-linking*-Experimenten mit EDC konnte der oligomere Zustand von FieF aufgeklärt werden. Abhängig von der EDC-Konzentration konnte dabei die Entstehung eines Dimers beobachtet werden. Über Größenausschluss mittels HPLC konnte FieF als homogenes Protein gereinigt und charakterisiert werden. Das gereinigte FieF-Protein wurde mittels polarer Lipide rekonstituiert und das Entstehen von 2-D-Kristallen in der Lipid-Doppelschicht der Membran konnte beobachtet werden. Dabei konnten zwei Typen von Kristallformen analysiert werden: tubuläre Formen und einzelne stufenförmige *sheets*. Die tubulären Strukturen zeigten die helikale Symmetrie von FieF. Diese Experimente zeigten, dass FieF als Homodimer in der Membran vorlag. Vergleiche von FieF mit Kristallstrukturen anderer Transporter zeigten die Möglichkeit, dass

zwei Monomere von FieF sich funktionell zu einem Dimer zusammenlagern und somit eine Struktur für den Transport der Metalle bilden. Somit wäre der Weg der Ionentranslokation mit einer Dimerisierung des Proteins verbunden (Wei *et al.*, 2004). Wenn CzcD ebenfalls eine dimere Struktur ausbildet, würden durch die TMHs II, V und VI zwei Transportkanäle ausgebildet. Hierbei könnte die Untersuchung der einzelnen Monomere Aufschluss über ihre Funktion geben. Die Anordnung einzelner Untereinheiten während der Oligomerisierung eines Proteins muss als ein wichtiger struktureller Parameter diskutiert werden, um die Aktivitäten der transmembranen Domänen zu verstehen. Die Oligomerisierung könnte zur molekularen Architektur von transmembranen Kanälen und der Weitergabe von Ionen beitragen und somit eine strukturelle Grundlage für die Funktion der einzelnen Domänen eines Proteins sein. Für den ABC-Transporter MsbA beispielsweise wurde gezeigt, dass die dimere Struktur für die Substrattranslokation von Bedeutung ist (Chang und Roth, 2001). Da viele CDF-Proteine an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind, ist es umso wichtiger erste dreidimensionale Strukturen zu erhalten. Durch die 2-D-Kristallisation von FieF konnte hier ein erster Grundstein gelegt werden (Wei *et al.*, 2004).

#### 4.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung funktionell wichtiger konservierter Aminosäuren in CzcD gezeigt werden, die an der Bindung und im Transport der Schwermetalle bzw. Protonen beteiligt sind. In CzcD sind Histidin-Reste speziell für die Bindung zuständig. Anton *et al.* (2004) zeigten durch AAS, dass CzcD 2-3 Zinkatome bindet. Es konnte jedoch nicht demonstriert werden, wo mögliche Bindestellen im Protein sind, da für die Versuche das Gesamtprotein CzcD verwendet wurde. Hier wäre interessant zu wissen, wo genau die Bindestellen liegen. Da die Histidine sich hauptsächlich auf den C-Terminus konzentrieren, sollte man mit diesem Teil von CzcD mittels AAS Metallbindung nachweisen. Jedoch sollte vermieden werden, dass Protein über *Strep-tag II*<sup>®</sup> zu reinigen, da die zusätzlich klonierten Histidine möglicherweise Metall binden, jedoch nicht zum nativen Protein gehören. Die Substratspezifität einzelner wichtiger CzcD-Aminosäureaustausch-Mutanten könnte mittels  $K_m$  und  $V_{max}$  näher untersucht werden. Auch für CzcD sollten  $K_m$  und  $V_{max}$  für die Schwermetalle Co(II) und Cd(II) bestimmt werden. Mittels Proteoliposomen könnten die Bindestellen wichtiger Aminosäureaustausch-Derivate von CzcD näher untersucht werden. Das Zusammenspiel von CDF-Proteinen mit RND-Efflux-Systemen konnte durch Munkelt *et al.* (2004) gezeigt werden. Auch ist bekannt, dass CzcD die intrazelluläre Schwermetallkonzentration in *C. metallidurans* niedrig halten kann und durch Aktivierung

von CzcCBA können die Schwermetalle letztendlich entgiftet werden. In der vorliegenden Dissertation wurde der Transport in Vesikeln für DmeF und FieF untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Jedoch waren die gemessenen Werte nicht reproduzierbar. Versuche mit Vesikeln bzw. Proteoliposomen sollten hier fortgeführt werden. Des Weiteren stellt sich die Frage, warum *C. metallidurans* drei CDF-Proteine besitzt? Warum sind DmeF und FieF auf dem Chromosom und CzcD auf dem Plasmid lokalisiert? Eine Erklärung ist sicherlich die Nutzung unterschiedlicher Substrate, wie es auch für ZRC1 und COT1 aus der Hefe beschrieben wurde. Die Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  würden Hinweise zur Substratspezifität von DmeF und FieF liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den oligomeren Zustand des Proteins näher zu charakterisieren. Wenn das Protein CzcD erfolgreich kristallisiert werden soll, ist es unbedingt erforderlich die Heterogenität des Proteins zu unterbinden. Dabei muss die Frage geklärt werden, ob die Ursache der Aggregation hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen sind? Unterschiedliche Bedingungen, wie der Einfluss von Detergenzien und Salze sollten weiter untersucht werden. Des Weiteren könnte versucht werden, das Protein in Anwesenheit von L-Arginin zu reinigen. L-Arginin kann Proteinaggregation verhindern (E. Wahle, persönliche Mitteilung). Für CzcD sollte in Folgearbeiten der pH-Wert, die Temperatur und mögliche Komponenten wie Schwermetalle, die das Protein während der Reinigung stabilisieren, untersucht werden. Wenn die Probleme der Heterogenität von CzcD gelöst sind, könnten funktionelle Untersuchungen von CzcD wichtig sein. Die Ergebnisse von Anton (2001) deuteten auf einen dimeren Zustand von CzcD hin, konnten jedoch nie zweifelsfrei bewiesen werden. Mittels analytischer Ultrazentrifugation könnte man genau untersuchen, ob CzcD ein Monomer oder ein Dimer ist. Befindet sich das Protein letztendlich in einem homogenen Zustand, können die Kristallisationsexperimente unter verschiedenen Bedingungen fortgeführt werden.

## **5. Zusammenfassung**

Das *cation diffusion facilitator*-Protein CzcD gehört zur Schwermetall-Resistenzdeterminante Czc in *Cupriavidus metallidurans*. CzcD ist in der Lage, Resistenz in schwermetallsensitiven *Escherichia coli*-Stämmen zu vermitteln. Mittels gezielter Aminosäureaustauschmutationen konnte die Funktion einzelner an der Bindung bzw. dem Transport beteiligter Aminosäuren in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden. Außerdem konnte CzcD auf Proteinebene näher charakterisiert werden und erste Strukturmodelle mittels Röntgenkleinwinkelstreuung erstellt werden.

Durch *real-time*-RT-PCR wurde gezeigt, dass das *czcD*-Gen in den *C. metallidurans*-Stämmen AE128(pMOL30), DN178(pMOL30-10,  $\Delta czcR$ ) und DN179(pMOL30-11,  $\Delta czcS$ ) durch Zn(II) induzierbar ist, während *lacZ*-Reportergenfusionen diesem Ergebnis teilweise widersprachen.

Das Membranprotein CzcD konnte gereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Der Zn(II)-Transport durch CzcD in Proteoliposomen konnte nachgewiesen werden. Außerdem konnte *in vitro* das Substratspektrum um Eisen erweitert und der Fe(II)-Transport in Proteoliposomen gezeigt werden.

In energetisierten *inside out vesicles* konnte ein Transport von Zn(II), Co(II) und Cd(II) durch CzcD gezeigt werden. Dabei konnte für den Zn(II)-Transport ein  $K_m$ -Wert von 2.2  $\mu\text{M}$  ermittelt werden.

Die drei Histidin-Reste im N-Terminus, die fünf Histidin-Reste im C-Terminus, der in der TMH II lokalisierte Histidin-Rest und der einzig vorhandene Cystein-Rest sind für die Funktion von CzcD wichtig.

Durch Transportexperimente wurde gezeigt, dass die Glutamat-Reste E31, E154 und die Aspartat-Reste D53, D158 und D181 im Transport der Schwermetallkationen involviert sind. Außerdem sind der Glutamat-Rest an Position 31 und der Aspartat-Rest an Position 181 für die Substratspezifität von CzcD verantwortlich.

CzcD konnte mittels *Strep-tag II*<sup>®</sup>-System als heterogenes Protein gereinigt werden. Durch Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente konnte für CzcD ein flaches, langgestrecktes und zylindrisches Modell definiert werden. Der zytoplasmatischen Domäne von CzcD konnte ein kugelförmiges Modell zu Grunde gelegt werden.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and Psi-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Amster-Choder, O., and A. Wright.** 1990. Regulation of activity of a transcriptional antiterminator in *E. coli* by phosphorylation in vivo. *Science* **249**: 540-542.
- Anton, A., C. Große, J. Reißmann, T. Pribyl, and D. H. Nies.** 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. Strain CH34. *J Bacteriol* **181(22)**: 6876-6881.
- Anton, A.** 2001. Genetische und biochemische Charakterisierung von CzcD und anderen Regulatoren der *czc*-vermittelten Schwermetallresistenz in *Ralstonia metallidurans*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Anton, A., A. Weltrowski, C. J. Haney, S. Franke, G. Grass, C. Rensing, and D. H. Nies.** 2004. Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 7499-7507.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1993. Current protocols in molecular biology. Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Bensadown, A., and D. Weinstein.** 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**: 241-250.
- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russel-Jones, and E. C. Gottschlich.** 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal Biochem* **136**: 175-179.
- Blaudez, D., A. Kohler, F. Martin, D. Sanders, and M. Chalot.** 2003. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* **15**: 2911-2928.
- Bloss, T., S. Clemens, and D. H. Nies.** 2002. Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214(5)**: 783-791.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Brim, H., M. Heyndrickx, P. de Vos, A. Wilmotte, D. Springael, H. G. Schlegel, and M. Mergeay.** 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterization of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* **22(2)**: 258-268.
- Bruinsma, J. J., T. Jirakulaporn, A. J. Muslin, and K. Kornfeld.** 2002. Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling. *Dev Cell* **2(5)**: 567-578.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short.** 1987. XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**: 376-378.
- Bush, A. I.** 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **26(4)**: 207-214
- Chang, G., and C. B. Roth.** 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293(5536)**: 1793-1800.
- Chao, Y., and D. Fu.** 2004a. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* **279**: 12043-12050.
- Chao, Y., and D. Fu.** 2004b. Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the *Escherichia coli* zinc transporter YiiP. *J Biol Chem* **279**: 17173-17180.
- Chausmer, A. B.** 1998. Zinc, Insulin and Diabetes. *J Am Coll Nutr* **17(2)**: 109-115.
- Chimienti, F., A. Favier, and M. Seve.** 2005. ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *BioMetals* **18**: 313-317.
- Clarkson, D. T.** 1988. The uptake and translocation of manganese by plant roots. In: Graham R. D., Hannam R. J., Uren N. C. eds. *Manganese in soils and plants*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 101-111.
- Clemens, S.** 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486.
- Clemens, S., T. Bloss, C. Vess, D. Neumann, D. H. Nies, and U. zu Nieden.** 2002. A Transporter in the Endoplasmic Reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* Cells Mediates Zinc Storage and Differentially Affects Transition Metal Tolerance. *J Biol Chem* **277(20)**: 18215-18221.
- Conklin, D. S., M. R. Culbertson, and C. Kung.** 1994. Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **244(3)**: 303-311.



- Delhaize, E., T. Kataoka, D. M. Hebb, R. G. White, and P. R. Ryan.** 2003. Genes Encoding Proteins of the Cation Diffusion Facilitator Family That Confer Manganese Tolerance. *Plant Cell* **15**: 1131-1142.
- Desbrosses-Fonrouge, A.-G., K. Voigt, A. Schröder, S. Arrivault, S. Thomine, and U. Krämer.** 2005. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Letters* **579**: 4165-4174.
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay, and 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.
- Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16(13)**: 6127-6145.
- Dräger, D. B., A.-G. Desbrosses-Fonrouge, C. Krach, A. N. Chardonens, R. C. Meyer, P. Saumitou-Laprade, and U. Krämer.** 2004. Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MPT1 transcript level. *Plant Journal* **39**: 425-439.
- Egler, M.** 2000. Das regulatorische Zweikomponentensystem CzcRS aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Eide, D. J., J. T. Bridgham, Z. Zhao, and J. R. Mattoon.** 1993. The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol Gen Genet* **241**: 447-456.
- Ellis, C. D., F. Wang, C. W. MacDiarmid, S. Clark, T. Lyons, and D. J. Eide.** 2004. Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol* **166(3)**: 325-335.
- Friedrich, S.** 2004. Charakterisierung neuer *extracytoplasmic function* (ECF)-Sigmafaktoren aus *Cupriavidus metallidurans*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Gaither, L. A., and D. J. Eide.** 2000. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem* **275**: 5560-5564.
- Gaither, L. A., and D. J. Eide.** 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* **0**: 1-20.
- Garavito, R. M., and S. Ferguson-Miller.** 2001. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J Bacteriol* **276(35)**: 32403-32406.

- Gatti, D., B. Mitra, and B. P. Rosen.** 2000. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J Biol Chem* **275(44)**: 34009-34012.
- Gitan, R. S., H. Lou, J. Rodgers, M. Broderius, and D. Eide.** 1998. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**: 28617-28624.
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke, and D. H. Nies.** 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem* **274(37)**: 26065-26070.
- Grass, G., C. Große, and D. H. Nies.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. Strain CH34. *J Bacteriol* **182(5)**: 1390-1398.
- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies, and C. Rensing.** 2001. 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., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith, and C. Rensing.** 2002. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184(3)**: 864-866.
- Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. Kucharski, M. E. Maguire, and C. Rensing.** 2005. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**: 1604-1611.
- Grass, G., M. Otto, B. Fricke, C. J. Haney, C. Rensing, D. H. Nies, and D. Munkelt.** 2005. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**: 9-18.
- Große, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. Navarrette-Santos, B. Lawley, N. L. Brown, and D. H. Nies.** 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **181(8)**: 2385-2393.
- Große, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder, and D. H. Nies.** 2004. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Arch Microbiol* **182**: 109-118.
- Grotz, N., T. Fox, E. Connolly, W. Park, M. L. Guerinot, and D. Eide.** 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7220-7224.
- Grünberg, K., C. Wawer, B. M. Tebo, and D. Schüler.** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4573-4582.

- Guffanti, A. A., Y. Wei, S. V. Rood, and T. A. Krulwich.** 2002. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for  $K^+$  and  $H^+$ . *Mol Microbiol* **45**: 145-153.
- Guan, L., and T. Nakae.** 2001. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183(5)**: 1734-1739.
- Hambidge, M.** 2000. Human Zinc Deficiency. *J Nutrition* **130**: 1344-1349
- Haney, C. J., G. Grass, S. Franke, and C. Rensing.** 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 215-226.
- Harada, E., E. von Roepenack-Lahaye, and S. Clemens.** 2004. A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to  $\gamma$ -glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochem* **65(24)**: 3179-3185.
- Henkin, T. M.** 1996. Control of transcription termination in prokaryotes. *Annu Rev Genet* **30**: 35-57.
- Hess, H. H., and J. E. Lees.** 1987. Water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal Biochem* **85**: 295-300.
- Hoyos, B., A. Imam, I. Korichneva, E. Levi, R. Chua, and U. Hammerling.** 2002. Activation of c-Raf kinase by ultraviolet light. Regulation by retinoids. *J Biol Chem* **277**: 23949-23957.
- Huang, L., C. P. Kirschke, and J. Gitschier.** 2002. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem* **277**: 26389-26395.
- Jerpseth, B., A. Greener, J. M. Short, J. Viola, and P. L. Kretz.** 1992. XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: McrA<sup>-</sup>, McrCB<sup>-</sup>, McrF<sup>-</sup>, Mrr<sup>-</sup>, HsdR<sup>-</sup> derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**: 81-83.
- Jirakulaporn, T., and A. J. Muslin.** 2004. Cation Diffusion Facilitator Proteins Modulate Raf-1 Activity. *J Biol Chem* **279**: 27807-27815.
- Johnson, J. L.** 1981. Genetic characterization. In: Gerhardt, P. (Ed.) Manual of methods of general bacteriology. American Society of Microbiology. Washington. USA: 540-472.
- Juhnke, S., N. Peitzsch, N. Hübener, C. Große, and D. H. Nies.** 2002. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol* **179**: 15-25.

- Kambe, T., H. Narita, Y. Yamaguchi-Iwai, J. Hirose, T. Amano, N. Sugiura, R. Sasaki, K. Mori, T. Iwanaga, and M. Nagao.** 2002. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **277**: 19049-19055.
- Kamizono, M. N., M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata, and 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, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 6212-6219.
- Karlin, S., and Z.-Y. Zhu.** 1997. Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Chemistry* **94**: 14231-14236.
- Kim, B. E., F. Wang, J. Dufner-Beattie, G. K. Andrews, D. J. Eide, and M. J. Petris.** 2003. Zn<sup>2+</sup>-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane. *J Biol Chem* **279**: 4523-4530.
- Kim, D., J. L. Gustin, B. Lahner, M. W. Persans, D. Baek, D.-J. Yun, and D. E. Salt.** 2004. The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Journal* **39**: 237-251.
- Kim, S., T.-J. Jeon, A. Oberai, D. Yang, J. J. Schmidt, and J. U. Bowie.** 2005. Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *PNAS* **102(40)**: 14278-14283.
- Kirschke, C. P., and L. Huang.** 2003. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **278(6)**: 4096-4102.
- Kobae, Y., T. Uemura, M. H. Sato, M. Ohnishi, T. Mimura, T. Nakagawa, and M. Maeshima.** 2004. Zinc Transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is Localized to Vacuolar Membranes and Implicated in Zinc Homeostasis. *Plant Cell Physiol* **45(12)**: 1749-1758.
- Koch, M. H. J., P. Vachette, and D. I. Svergun.** 2003. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Reviews Biophysics* **36**: 147-227.
- König, S., and M. H. J. Koch.** 1995. The quaternary structure of the enzyme transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* in solution of high protein concentration studied by small-angle X-ray solution scattering. *Hasylab Jahresbericht 1995*, 839-840.

- Kumarevel, T., H. Mizuno, and P. K. R. Kumar.** 2005. Structural basis of HutP-mediated anti-termination and roles of the Mg<sup>2+</sup> ion and L-histidine ligand. *Nature* **434**: 183-191.
- Küry, S., B. Dreno, S. Bezieau, S. Giraudet, M. Kharfi, R. Kamoun, and J.-P. Moisan.** 2002. Identification of SLC39A4, a gene involved in *acrodermatitis enteropathica*. *Nature Genetics* **31**: 239-240.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange, H., G. Kispal, and R. Lill.** 1999. Mechanism of Iron Transport to the Site of Heme Synthesis inside Yeast Mitochondria. *J Biol Chem* **274(27)**: 18989-18996.
- Lanyi, J. K.** 1997. Mechanism of ion transport across membranes. Bacteriorhodopsin as prototype for proton pumps. *J Biol Chem* **272**: 31209-31212.
- Lee, S. M., G. Grass, C. J. Haney, B. Fan, B. P. Rosen, A. Anton, D. H. Nies, and C. Rensing.** 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 273-278.
- Legatzki, A., G. Grass, A. Anton, C. Rensing, and D. H. Nies.** 2003. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol* **185**: 4354-4361.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Dervedde, M. Eitinger, and B. Friedrich.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* **176(14)**: 4385-4393.
- Li, L., and 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.** 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.
- Liesegang, H., K. Lempke, R. A. Siddiqui, and H. G. Schlegel.** 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **175(3)**: 767-778.
- Liu, T., S. Nakashima, K. Hirose, Y. Uemura, M. Shibasaki, M. Katsuhara, and K. Kasamo.** 2003. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett* **542(1-3)**: 159-163.
- Lomovskaya, O., H. I. Zgurskaya, and H. Nikaido.** 2002. It takes three to tango. *Nat Biotechnol* **20**: 1210-1212.
- Lowry, O. H., A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

- MacDiarmid, C. W., L. A. Gaither, and D. J. Eide.** 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* **19(12)**: 2845-2855.
- MacDiarmid, C. W., M. A. Milanick, and D. J. Eide.** 2002. Biochemical Properties of Vacuolar Zinc Transport Systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277(42)**: 39187-39194.
- Mandel, M., and A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Mäser, P., S. Thomine, J. I. Schroeder, J. M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I. N. Talke, A. Amtmann, F. J. M. Maathuis, D. Sanders, J. F. Harper, J. Tchieu, M. Gribskov, M. W. Persans, D. E. Salt, S. A. Kim, and M. L. Guerinot.** 2001. Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 1646-1667.
- McMahon, R. J., and R. J. Cousins.** 1998. Mammalian zinc transporters. *J Nutr* **128**: 667-670.
- Mendoza-Cózatl, D. G., and R. Moreno-Sánchez.** 2005. Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1706**: 88-97.
- Mergeay, M., C. Houba, and J. Gerits.** 1978. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch Int Physiol Biochem* **86**: 440-442.
- Mergeay, M., D. H. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, and F. van Gijsegem.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a fakultativ chemolithotroph with plasmid bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* **162**: 328-334.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie, and R. Wattiez.** 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 385-410.
- Michaud, N. R., J. R. Fabian, K. D. Mathes, and D. K. Morrison.** 1995. 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3-independent and Ras-independent manner. *Mol Cell Biol* **15**: 3390-3397.
- Michalczyk, A. A., J. Allen, R. C. Blomeley, and M. L. Ackland.** 2002. Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells. *Biochem J* **364(Pt1)**: 105-113.
- Middlemiss, J. K., and K. Poole.** 2004. Differential Impact of MexB Mutations on Substrate Selectivity of the MexAB-OprM Multidrug Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186(5)**: 1258-1269.

- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Miyabe, S., S. Izawa, and Y. Inoue.** 2001. The Zrc1 is involved in zinc transport systems between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282(1)**: 79-83.
- Munkelt, D., G. Grass, and D. H. Nies.** 2004. The Chromosomally Encoded Cation Diffusion Facilitator Proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 Are Transporters of Broad Metal Specificity. *J Bacteriol* **186(23)**: 8036-8043.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**: 587-593.
- Murgia, C., I. Vespignani, J. Cerase, F. Nobili, and G. Perozzi.** 1999. Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am J Physiol* **277**: G1231-1239.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley, and S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28(3)**: 239-242.
- Nies, D. H., M. Mergeay, B. Friedrich, and H. G. Schlegel.** 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **169(10)**: 4865-4868.
- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu, and S. Silver.** 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86(19)**: 7351-7355.
- Nies, D. H., and S. Silver.** 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171(2)**: 896-900.
- Nies, D. H.** 1992. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **174**: 8102-8110.
- Nies, D. H., and S. Silver.** 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistance. *J Indust Microbiol* **14**: 186-199.
- Nies, D. H.** 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 2707-2712.
- Nies, D. H., and N. Brown.** 1998. Two-component systems in regulation of heavy metal resistance. Metal ions in gene regulation. Ed. S. Silver, W. Walden. Chapman & Hall, London, England: p. 77-103.

- Nies, D. H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51(6)**: 730-750.
- Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313-339.
- Nikaido, H., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg.** 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those *beta*-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol* **180**: 4686-4692.
- Nikaido, H., and H. I. Zgurskaya.** 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 215-218.
- Nishimura, K., K. Igarashi, and Y. Kakinuma.** 1998. Proton Gradient-Driven Nickel uptake by Vacuolar Membrane Vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **180(7)**: 1962-1964.
- Paddock, M. L., G. Feher, and M. Y. Okamura.** 2003. Proton transfer pathways and mechanism in bacterial reaction centers. *FEBS Letters* **555**: 45-50.
- Palmiter, R. D., and S. D. Findley.** 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* **14**: 639-649.
- Palmiter, R. D., T. B. Cole, and S. D. Findley.** 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J* **15**: 1784-1791.
- Palmiter, R. D., and L. Huang.** 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Eur J Physiol* **447**: 744-751.
- Palmiter, R. D.** 2004. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *PNAS* **101(14)**: 4918-4923.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60(4)**: 575-608.
- Paulsen, I. T., and M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **156**: 99-103.
- Perkins, S. J.** 2001. X-Ray and neutron scattering analyses of hydration shells: a molecular interpretation based on sequence predictions and modelling fits. *Biophysical Chem* **93**: 129-139.
- Persans, M. W., K. Nieman, and D. E. Salt.** 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *PNAS* **98(17)**: 9995-10000.
- Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. N., a new species of Rhodospirillaceae. *Arch Microbiol* **100**: 197-206.



- Pittman, J. K.** 2005. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytologist* **167**: 733-742.
- Rabilloud, T., G. Carpentier, and P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9(6)**: 288-291.
- Ramsay, L. M., and 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 Letters* **152**: 293-298.
- Rausser, W. E.** 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31(1)**: 19-48.
- Rehbein, G.** 2003. Charakterisierung neuer Transporter der RND-Familie von *Ralstonia metallidurans* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Rensing, C., T. Pribyl, and D. H. Nies.** 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol.* **179(22)**: 6871-6879.
- Rensing, C., M. Ghosh, and B. P. Rosen.** 1999. Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. *J Bacteriol* **181(19)**: 5891-5897.
- Rensing, C., and G. Grass.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 197-213.
- Rosen, B. P.** 1986. Recent advances in bacterial ion transport. *Annu Rev Microbiol* **40**: 263-286.
- Rogers, E. E., D. J. Eide, and M. L. Guerinot.** 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *PNAS* **97(22)**: 12356-12360.
- Rost, B., and C. Sander.** 1994. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* **19(1)**: 55-72.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11(5)**: 841-847.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and 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, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

- Schorge, S., S. Elenes, and D. Colquhoun.** 2005. Maximum likelihood fitting of single channel NMDA activity with a mechanism composed of independent dimers of subunits. *J Physiol* **569**: 395-418.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and 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, and P. Bork.** 2000. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucl Acids Res* **28**: 231-234.
- Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch Microbiol* **181**: 1-7.
- Schwuchow, T.** 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Seve, M., F. Chimienti, S. Devergnas, and A. Favier.** 2004. *In silico* identification and expression of *SLC30* family genes: An expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics* **5(32)**: 1-9.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Smith, W. L., R. M. Garavito, and S. Ferguson-Miller.** 2001. Membrane Protein Structural Biology Minireview Series. *J Bacteriol* **276(35)**: 32393-32394.
- Stein, W. D.** 1990. Channels, carriers and pumps: an introduction to membrane transport: *Academic Press*; San Diego; Calif.
- Steinmetz, M., D. Le Coq, and S. Aymerich.** 1989. Induction of saccharolytic enzymes by sucrose in *Bacillus subtilis*: evidence for two partially interchangeable regulatory pathways. *J Bacteriol* **171**: 1519-1523.
- Svergun, D. I., S. Richard, M. H. J. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, and G. Zaccai.** 1998. Protein hydration in solution: Experimental observation by x-ray and neutron scattering. *PNAS* **95(5)**: 2267-2272.
- Taghavi, S., M. Mergeay, D. H. Nies, and D. van der Lelie.** 1997. Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature induced mutagenesis and mortality (TIMM). *Plasmid* **37**: 22-34.
- Tartof, K. D., and C. A. Hobbs.** 1987. Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Res Lab Focus* **9**: 2.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22(22)**: 4673-4680.
- Ullmann, A.** 1984. One-Step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene* **29**: 27-31.
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay, and D. H. Nies.** 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* **23(3)**: 493-503.
- van der Zaal, B. J., L. W. Neuteboom, J. E. Pinas, A. N. Chardonens, H. Schat, J. A. C. Verkleij, and 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
- Vandamme, P., and T. Coenye.** 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54(Pt6)**: 2285-2289.
- Vanechoutte, M., P. Kampfer, T. De Baere, E. Falsen, and G. Verschraegen.** 2004. *Wautersia* gen. Nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.*, 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54(Pt2)**: 317-327.
- Vogelstein, B., and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 615-619.
- Wang, F., J. Dufner-Beattie, B. E. Kim, M. J. Petris, G. Andrews, and D. J. Eide.** 2004. Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters. *J Biol Chem* **279**: 24631-24639.
- Wang, K., B. Zhou, Y.-M. Kuo, J. Zemansky, and J. Gitschier.** 2002. A Novel Member of a Zinc Transporter Family Is Defective in *Acrodermatitis Enteropathica*. *Am J Hum Genet* **71(1)**: 66-73.
- Wang, W., A. A. Guffanti, Y. Wei, M. Ito, and T. 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.
- Weber, K., and M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412.
- Wei, Y., H. Li, and D. Fu.** 2004. Oligomeric state of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *J Biol Chem* **279**: 39251-39259.

- Wei, Y., and D. Fu.** 2005. Selective Metal Binding to a Membrane-embedded Aspartate in the *Escherichia coli* Metal Transporter YiiP (FieF). *J Biol Chem* **280(40)**: 33716-33724.
- Wiemann, S., T. Rupp, J. Zimmermann, H. Voss, C. Schwager, and W. Ansorge.** 1995. Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7 DNA polymerase and internal labeling with fluorescein-15-dATP. *Biotechniques* **18(4)**: 688-697.
- Williams, L. E., J. K. Pittman, and J. L. Hall.** 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 104-126.
- Woolhouse, H. W.** 1983. (O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegler, Eds.), Encyclopedia of Plant Physiology: Responses to the Chemical and Biological Environment, Vol. SNew Series Vol. 12 C, Springer Verlag, Berlin.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33(1)**: 103-119.
- Yamamoto, K., and A. Ishihama.** 2005. Transcriptional Response of *Escherichia coli* to External Zinc. *J Bacteriol* **187(18)**: 6333-6340.
- Yoder, J. H., H. Chong, K. Guan, and M. Han.** 2004. Modulation of KSR activity in *Caenorhabditis elegans* by Zn ions, PAR-1 kinase and PP2A phosphatase. *EMBO Journal* **23**: 111-119.
- Zhao, H., and D. Eide.** 1996a. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2454-2458.
- Zhao, H., and D. Eide.** 1996b. The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 23203-23219.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. D. H. Nies. Ich danke ihm für die Überlassung des CzcD-Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen und die ständige Diskussionsbereitschaft. Außerdem danke ich ihm, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, neue Methoden und Erfahrungen auf dem Gebiet der Proteinbiochemie in Grenoble zu sammeln. Der Aufenthalt dort hat einen großen Fortschritt für diese Doktorarbeit gebracht.

Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen möchte ich für die Möglichkeit danken, an seinem Institut zu arbeiten und für die hilfreichen Diskussionen im Montagseminar.

Die Arbeit wurde durch die DFG finanziell gefördert und dafür möchte ich danken.

Ich möchte mich herzlich bei PD Dr. Stephan König für die Durchführung der Röntgenkleinwinkelstreuung und so manch guten Hinweis bedanken, wenn es um CzcD ging.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Institut de Biologie Structurale in Grenoble, gilt mein besonderer Dank Dr. Jacques Covés und Dominique Cannella. Ich danke für die fruchtbaren Diskussionen, wenn es um Kristallisation, Aggregation und „I have a problem“ (ihr wisst was ich meine) ging. Merci beaucoup!

Ein Dank geht an Gregor für die konstruktive Kritik an meiner Arbeit.

Ich danke Ede "meinem Herrn und Meister" für seine ständigen Nachfragen zum Fortgang des Projektes.

Einen ganz lieben Dank an Grit für das nette Arbeitsklima im Labor, für deine helfende Hand und dafür, dass du immer ein liebes Wort übrig hattest. Es ist gut, dass es dich gibt!

Ein großes Dankeschön, geht an Markus "Otti" Otto, der mich in die Kunst des Präparierens von Vesikeln und Proteoliposomen eingewiesen hat und dem ich mit meinen Computerproblemen auf den Geist gehen durfte.

Kerstin möchte ich für die gute Zusammenarbeit in Grenoble und für die hilfreichen Diskussionen rund um Membranproteine danken. Wir haben uns von der biologischen Artenvielfalt (ich sage nur "puce") in France nicht unterkriegen lassen ☺!

Ein großer Dank geht an alle fleissigen Korrekturleser.

Allen Mitgliedern (Naddle, Judi, Kerstin, Susi, Grit, Doreen, Markus, André, Daniel und Torsten) der Arbeitsgruppe Nies und den Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie danke ich für das nette Arbeitsklima. Für die Sequenzierungsarbeiten möchte ich Ute Lindenstrauß herzlich danken.

Ich möchte mich ganz besonders bei Conny bedanken. Du hast versucht mir immer genug Kraft und Motivation zu geben, damit ich durchhalte. Du hast mich immer wieder auf den Gipfel hochgeschuppt, wenn ich drohte runterzufallen. Ich danke dir für deine fachlichen Ratschläge und für deine hilfreiche Kritik. Deine Tipps und Anmerkungen haben einen großen Anteil am Gelingen dieser Promotionsarbeit.

Ich danke allen meinen Freunden. Der Taudten möchte ich für die vielen aufmunternden Worte danken. Besonders danke ich Katharina für die hilfreiche Unterstützung während des Zusammenschreibens und für die lustigen Proseccoabende, die so manches vergessen liessen.

Ich danke meiner Familie, die mich unterstützt und an mich geglaubt hat. Ein besonderer Dank gilt dabei meiner Schwester Doreen. Wir haben E-Plus zu einem reichen Unternehmen gemacht!

Socri, du bist der Beste!

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Ich erkläre außerdem, dass ich mich bisher nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Halle, den 06.06.06

Annett Weltrowski

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Annett Weltrowski  
Geburtsdatum/-ort: 23. März 1977 in Burg  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

09/1983-07/1991 Gesamtschule Erich Weinert in Burg  
09/1991-05/1995 Besuch des Gymnasiums in Burg  
Abschluss: Abitur

### **Studium**

10/1995-06/2001 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie, Genetik, Zoologie  
Diplomthema: „Heterologe Expression von Schwermetall-Transportern und Sigma-Faktoren aus *Pseudomonas aeruginosa* in *Ralstonia metallidurans*“  
Abschluss: Diplom

seit 07/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, 06.06.06

Annett Weltrowski