

**Charakterisierung zweier CP_x-Typ ATPasen und
deren Zusammenwirken mit anderen
Metall-Effluxsystemen in
*Ralstonia 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 Antje Legatzki
geb. am 05.03.1975 in Brehna

Gutachter:

1. Prof. Dr. D.H. Nies
2. Prof. Dr. C. Rensing
3. Prof. Dr. K. Hantke

Halle/Saale, den 16.12.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006023

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006023>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	7
2.2. Kultivierungsbedingungen	10
2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien	10
2.2.2. Anzucht und Zellernte	12
2.2.3. Stammhaltung	13
2.2.4. Reinheitskontrolle	14
2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	14
2.3.1. Isolierung von DNA	14
2.3.1.1. Isolation von Gesamt-DNA nach Marmur	14
2.3.1.2. Mikroplasmidpräparation	15
2.3.1.3. Plasmidisolation mittels <i>Spin</i> Säulen	15
2.3.1.4. Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen	16
2.3.2. DNA-Techniken	16
2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	16
2.3.2.2. DNA-Größenstandard	17
2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung	17
2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	17
2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA	17
2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	18
2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	18
2.3.3.1. Auswahl der Primer	18
2.3.3.2. Standard Polymerase-Ketten-Reaktion	22
2.3.3.3. Reinigung von PCR-Produkten	23
2.3.4. DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone	23
2.3.4.1. Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	23
2.3.4.2. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	24
2.3.4.3. Plasmidtransfer durch Konjugation	24
2.3.4.4. Selektion von Rekombinanten und Doppelaustausch-Rekombinanten	24
2.3.5. DNA-Sequenzierung	25
2.3.5.1. Sequenzierung unter Verwendung des <i>dRhodamine Termination Cycle</i> <i>Sequencing-Kits</i>	25
2.3.5.2. Das Sequenziergel	26
2.3.5.3. Auswertung der Sequenzdaten	27
2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	27

2.4.1. Herstellung der Sonden.....	27
2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards.....	28
2.4.3. DNA:DNA-Hybridisierung.....	28
2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA- <i>Blotting</i>	28
2.4.3.2. Hybridisierung.....	29
2.4.4. Chemilumineszenz-Nachweis.....	29
2.5. Zellwachstumsversuche.....	30
2.5.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien.....	30
2.5.1.1. Messung der Zelltrübung.....	30
2.5.1.2. Zellanzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen.....	30
2.5.1.3. Zellanzucht von <i>R. metallidurans</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen.....	30
2.5.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegen Schwermetallionen ...	31
2.6. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	31
2.7. Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.7.1. Protein-Expression und –Reinigung über das <i>Strep</i> -tag II [®] <i>Protein Purification System</i>	32
2.7.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte.....	33
2.7.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt.....	33
2.7.1.3. Native Proteinreinigung mittels <i>Strep</i> Tactin-Chromatographie.....	34
2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	34
2.7.2.1. Proteinbestimmung von Membranproteinen.....	34
2.7.2.2. BCA-Test.....	35
2.7.2.3. Bradford-Proteinbestimmung.....	35
2.7.3. Konzentrieren von Proteinlösungen.....	36
2.7.3.1. TCA-Fällung.....	36
2.7.3.2. Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen.....	36
2.7.4. Elektrophoretische Methoden.....	36
2.7.4.1. Probenvorbereitung.....	36
2.7.4.2. Proteinmarker.....	37
2.7.4.3. Lineare SDS-PAGE.....	37
2.7.4.4. Gradienten-SDS-PAGE.....	38
2.7.4.5. Saure SDS-PAGE-Gelelektrophorese bei pH 2.4.....	39
2.7.4.6. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot).....	39
2.7.4.7. Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation auf PVDF-Membranen.....	40
2.7.4.8. <i>Strep</i> -tag II [®] Detektionssystem.....	41
2.7.5. Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	42
2.7.5.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau.....	42
2.7.5.2. Silberfärbung.....	42
2.7.5.3. Trocknung von Polyacrylamid-Gelen.....	42
2.7.6. Phosphorylierungsversuche mit [γ^{32} P]-ATP.....	43
2.7.6.1. Zellanzucht und Membranpräparation.....	43
2.7.6.2. Phosphorylierungsassay mit [γ^{32} P]-ATP.....	43
2.7.7. <i>In vitro</i> Bindung von Proteinen an Metall-Chelat-Sepharose.....	44
2.7.8. <i>In vivo</i> Vernetzungsexperimente mit Formaldehyd.....	44
2.8. Transportstudien mit radioaktiven Metallisotopen.....	45
2.8.1. Aufnahmeexperimente an <i>E. coli</i> -Zellen mit radioaktiven Metallen.....	45

2.8.2. Aufnahme radioaktiver Metalle durch <i>R. metallidurans</i>	45
3. ERGEBNISSE	47
3.1. Heterologe Expression der CPx-Typ ATPasen <i>zntA</i> und <i>cadA</i> aus <i>Ralstonia metallidurans</i> in <i>Escherichia coli</i>	47
3.1.1. ZntA und CadA vermitteln im metallsensitiven <i>E. coli</i> -Stamm GG48 Resistenz gegenüber Zink und Cadmium	47
3.1.2. Die durch ZntA bzw. CadA vermittelte Schwermetallresistenz in <i>E. coli</i> beruht auf verminderter Akkumulation	50
3.2. Funktionen von ZntA und CadA in <i>R. metallidurans</i> AE104	51
3.2.1. Die Deletion von <i>zntA</i> und <i>cadA</i> führen zu erhöhter Zink- und Cadmiumsensitivität in <i>R. metallidurans</i> AE104	51
3.2.2. Die <i>zntA/cadA</i> -Doppelmutante zeichnet sich durch erhöhte Cadmium- Akkumulation aus.....	56
3.2.3. Induktionsuntersuchungen von <i>zntA</i> und <i>cadA</i> mit Hilfe einer β -Galaktosidase- Transkriptionsfusion	57
3.2.3.1. Das Gen <i>zntA</i> ist durch geringe Zink- und Cadmiumkonzentrationen induzierbar .	58
3.2.3.2. Das Gen <i>cadA</i> ist durch Cadmium und bei Deletion von <i>zntA</i> auch durch Zink induzierbar	60
3.2.3.3. Induzierbarkeit von <i>zntA</i> und <i>cadA</i> durch andere Schwermetallionen	61
3.3. Untersuchungen von einem putativen Regulator stromaufwärts von <i>cadA</i>	62
3.4. Die Rolle von ZntA und CadA in der Zink- bzw. Cadmiumresistenz in Beziehung zu anderen Effluxsystemen	65
3.4.1. Die Effluxtransporter CzcCBA und CzcD sind <i>in trans</i> nicht in der Lage die Cadmiumsensitivität der <i>zntA/cadA</i> -Doppelmutante vollständig zu komplementieren...	65
3.4.2. Einfluss von CzcCBA und CzcD auf die Induzierbarkeit von <i>zntA</i> und <i>cadA</i> durch Zink oder Cadmium.....	68
3.4.3. Einfluss von pMOL30 auf die Induzierbarkeit von <i>zntA</i> und <i>cadA</i>	72
3.5. Biochemische Charakterisierung der CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA aus <i>R. metallidurans</i>	74
3.5.1. Reinigung von ZntA und CadA als <i>Strep</i> -tag II [®] -Fusion aus <i>E. coli</i>	74
3.5.2. Bindung von Schwermetallionen an ZntA und CadA.....	75
3.6. [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP-Markierung von ZntA bzw. CadA	76
3.7. Untersuchungen am CzcCBA-Transportsystem in <i>R. metallidurans</i>	78
3.7.1. Reinigung von CzcA als <i>Strep</i> -tag II [®] -Fusion aus <i>R. metallidurans</i>	78
3.7.2. <i>In vivo</i> Vernetzungsexperimente in <i>R. metallidurans</i> führen zum Nachweis der Interaktion zwischen CzcA und CzcB	80
4. DISKUSSION	82
4.1. CPx-Typ ATPasen ZntA _{Rm} und CadA _{Rm} aus <i>R. metallidurans</i>	83
4.1.1. Expression von <i>zntA</i> _{Rm} oder <i>cadA</i> _{Rm} in metallsensitiven Stämmen von <i>E. coli</i>	87
4.1.2. Die Substratspezifität von ZntA _{Rm} oder CadA _{Rm} in <i>R. metallidurans</i>	90
4.1.3. Zusammenspiel von Zn(II)/Cd(II)-Effluxsystemen aus <i>R. metallidurans</i> CH34.....	98

4.1.4. Biochemische Untersuchungen zur Schwermetall-Bindung und Phosphorylierung von ZntA _{Rm} und CadA _{Rm}	105
4.2. Der RND-Proteinkomplex CzcCBA	109
4.3. Ausblick	111
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	113
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	114
Anhang	128

Abkürzungsverzeichnis

A/a	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP- <i>binding cassette</i> -Transporter
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest	doppelt destiliert (Reinstwasser)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C/c	Cytosin
ca	circa
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i> (Proteinfamilie)
cm	Chloramphenicol
cpm	<i>counts per million</i>
CSPD	Disodium3-(4-methoxyspiro-{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7] decan}-4-yl) phenyl phosphate
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxyterminus
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DSG	Disuccinimidylglutarat
DSP	Dithiobis-(succinimidylpropionat) (auch Lomant's Reagenz genannt)
ECF	<i>extracellular function</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

G/g	Guanin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylic acid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
MFP	<i>membrane fusion protein</i> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
NRAMP	<i>natural-resistance-associated macrophage protein</i>
nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus
NA	Nähragar
NB	Nährbouillon
OD	optische Dichte
OMF	<i>outer membrane factor</i> (Proteinfamilie)
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pers.	persönlich
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
RBS	Ribosomenbindestelle
R _m	<i>Ralstonia metallidurans</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RND	<i>resistance, nodulation, cell division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
T/t	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TB	<i>terrific broth</i> (Nährmedium)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TMH	Transmembrane Helix
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
Vers.	Version
VIS	<i>visible</i> (sichtbares Licht)
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZIP	ZRT, IRT-ähnliche Proteine
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

1. EINLEITUNG

Zink ist neben Eisen das wichtigste Spurenelement in Prokaryoten (Hantke, 2001). Zinkionen wurden in Vertretern aus allen sechs großen Enzymklassen (Vallee und Auld, 1990) als Kofaktoren oder Strukturkomponenten und in einigen Klassen von Regulatoren (Berg und Shi, 1996; Coleman, 1998) gefunden. Eine Studie zum Metallgehalt von *Escherichia coli*-Zellen zeigte, dass Zink innerhalb der Zellen im Vergleich zum Außenmedium um ein Vielfaches konzentriert war. Zellen, die in einem Mineralsalzmedium mit $\sim 100 \text{ nM Zn}^{2+}$ angezogen wurden, wiesen bis zu 2×10^5 Atome Zink / Zelle auf (Outten und O'Halloran, 2001). Das entsprach einer Konzentration von $\sim 200 \text{ }\mu\text{M}$. Die Menge an Zinkionen war in den Zellen 2000mal größer als im Medium. Da die „frei“ in den *E. coli*-Zellen vorkommende Zinkionenkonzentration nur im femtomolaren Bereich liegt (Outten und O'Halloran, 2001), muss ein sehr großer Teil der Ionen in gebundener Form vorliegen, z.B. als Strukturkomponente oder Kofaktor von Proteinen. Zink hat spezifische Eigenschaften, wodurch es prädestiniert ist, eine Rolle als Metallkofaktor von Proteinen zu übernehmen. Zn(II), eine Lewissäure, steht bei der Einteilung zwischen harter und weicher Lewissäure (Hughes und Poole, 1991) und kann mit verschiedenen Ligandentypen, wie dem Schwefel vom Cystein, dem Stickstoff vom Histidin, dem Sauerstoff der Glutaminsäure oder Asparaginsäure und Wasser eine starke Bindung eingehen. Zink ist nicht redoxaktiv und im kinetischen Sinne relativ labil, so dass es verhältnismäßig schnell Austauschreaktionen mit anderen Liganden unterliegt (Berg und Shi, 1996). All diese Eigenschaften führen zu der großen Bedeutung in Metalloproteinen als Ligand oder Kofaktor.

Zink kann allerdings auch toxisch wirken, wenn es in mikro- oder millimolaren Konzentrationen im Medium angeboten wird. Gründe dafür sind einerseits die Fähigkeit der Bindung an Sulfhydryl- und Imidazolgruppen sowie die Konkurrenz mit anderen Metallionen um den Einbau in aktive Zentren von Proteinen (Gatti *et al.*, 2000). Durch unspezifische Bindung kann es dann zur Inaktivierung von Proteinen kommen (Nies, 1999). Daher ist es wichtig die Konzentration an Zinkionen, und dies gilt für alle Spurenelemente, innerhalb der Zellen aufrechtzuerhalten, in der die Ionen essentiell, aber nicht toxisch sind. Dies funktioniert über ein komplexes Zusammenspiel zwischen Zinkaufnahme und verschiedenen Entgiftungsmechanismen, wie z.B. Bindung an Metallothionein oder Export aus dem Zellinneren.

Aufnahmesysteme für Zink und andere Übergangsmetalle müssen zwischen den sich strukturell sehr ähnlichen Ionen unterscheiden. Das betrifft die Metallionen, die eine zweiwertige positive Ladung besitzen und einen ionischen Durchmesser von 138-160 pm haben (z.B. Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) (Weast *et al.*, 1984). Die meisten Prokaryoten verfügen über zwei Typen von Aufnahmesystemen, über Systeme mit einer hohen Substratspezifität, welche unter Mangelbedingungen ausgebildet werden und über

unspezifische (konstitutiv) exprimierte Systeme, die gewöhnlich über einen chemoosmotischen Gradienten getrieben werden (Nies, 1999).

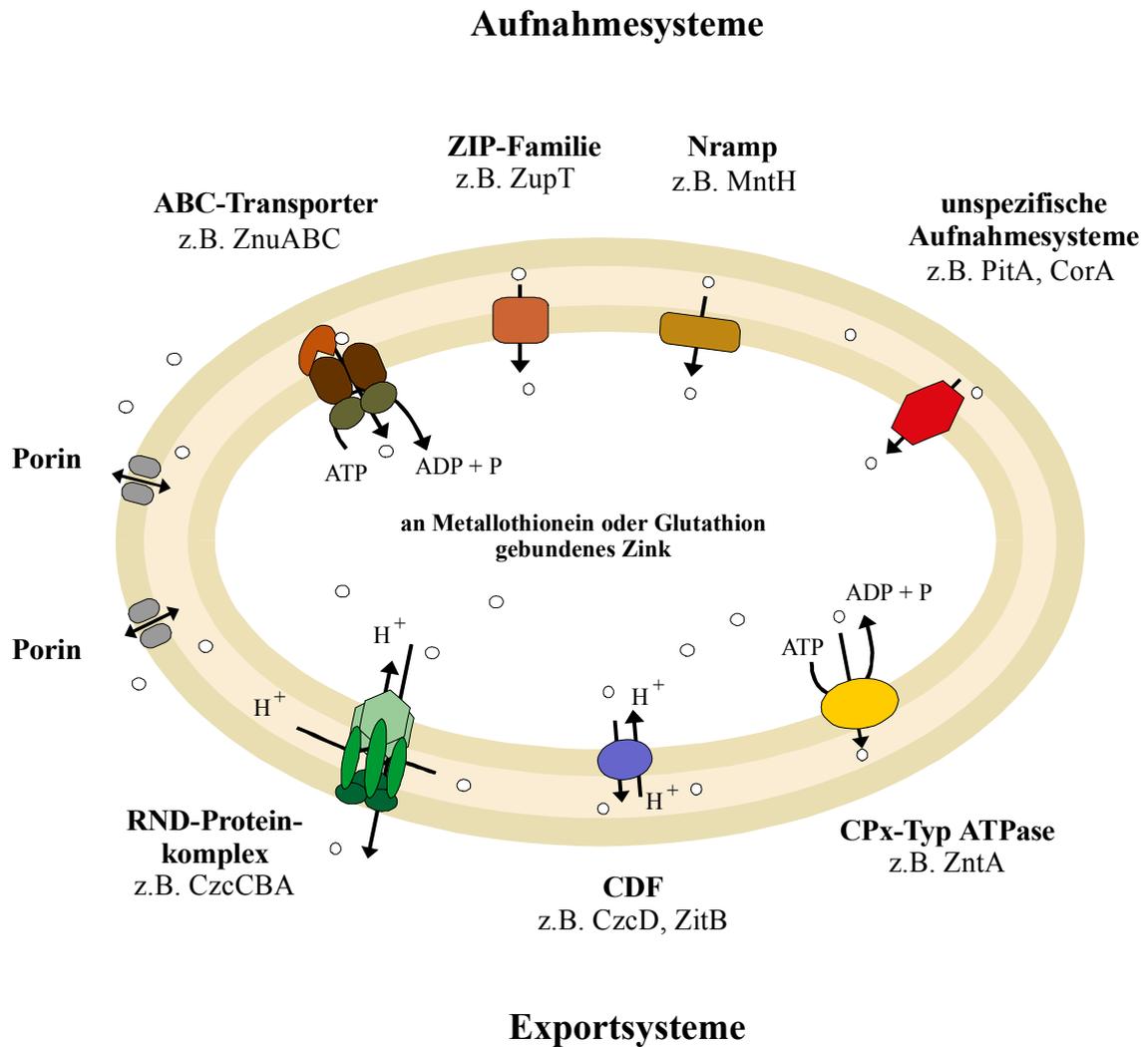


Abb. 1: Proteinfamilien, die in Prokaryoten in den Zink-Import oder –Export involviert sein können

In Gram-negativen Prokaryoten gelangen die Zinkionen (○) über unspezifische Porine in und auch aus dem periplasmatischen Raum. Von dort werden die Ionen über spezifische oder unspezifische Transportsysteme ins Cytoplasma gebracht. Es wird angenommen, dass Zink (II) dort durch Glutathion oder Metallothioneine gebunden wird. Aus dem Cytoplasma werden die Ionen über spezialisierte Transportsysteme ins Periplasma und von dort oder über *Transenvelope*-Transport direkt aus dem Zellinneren ins Außenmedium geschafft.

Ein hochaffines Zink-Aufnahmesystem in Prokaryoten ist das aus drei Protein-Komponenten bestehende ZnuABC-System aus *E. coli* (Patzer und Hantke, 1998; Patzer und Hantke, 2000) (Abb. 1), welches zu den ABC-Transportern (ATP-binding-cassette-Transporter) gehört. Die Energie für die Zinkaufnahme wird durch die Spaltung von ATP bereitgestellt. Die Regulation dieses Systems erfolgt über ZurR und die Innenkonzentration an Zinkionen (Patzer und Hantke, 1998). Homologe Znu-Permease-Systeme wurden auch in *Listeria monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999), *Haemophilus influenzae* (Lu *et al.*, 1997) und *Neisseria gonorrhoeae* (Chen und Morse, 2001) gefunden.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Zink-Aufnahme spielt die ZIP-Familie (ZRT, IRT-ähnliche Proteine), die zuerst in Eukaryoten identifiziert wurde (Eng *et al.*, 1998; Gaither und Eide, 2001; Guerinot, 2000). Der erste charakterisierte Vertreter der Prokaryoten ist ZupT aus *E. coli* (Grass *et al.*, 2002). ZupT scheint neben Zn^{2+} auch Cu^{2+} und Cd^{2+} zu transportieren, außerdem Co^{2+} , Fe^{2+} und Mn^{2+} (Grass, pers. Mitteilung).

Zu den Zink-Transportern, die die Aufnahme über einen elektrochemischen Protonengradienten realisieren (Gunshin *et al.*, 1997) gehören Nramp-Homologe (natural-resistance-associated macrophage-protein) (Kehres *et al.*, 2000). MntH aus *E. coli* (Makui *et al.*, 2000) ist ein protonenabhängiger Kationentransporter, der Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} und Cu^{2+} in die Zelle transportieren kann. Reguliert wird er über die Proteine FurR und MntR (Patzer und Hantke, 2001) sowie über die externe Verfügbarkeit von Metallionen.

Zu den Metalltransportern mit einem breiten Substratspektrum für divalente Kationen gehören die Magnesium-Importsysteme. Das konstitutive Mg(II)-Transportprotein CorA (Nelson und Kennedy, 1971; Jasper und Silver, 1997; Agranoff und Krishna, 1998) vermittelt den Transport von Mg^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} (Snively *et al.*, 1989a). In *Ralstonia metallidurans* wurde auch die Aufnahme von Zinkionen über CorA nachgewiesen (Nies und Silver, 1989a). Für CorA aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium konnte die Zinkaufnahme nicht beobachtet werden (Snively *et al.*, 1989a). *S. enterica* serovar Typhimurium scheint aber in der Lage zu sein, bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen im Medium die CorA-Aktivität herunterzuregulieren, eventuell um einen Influx toxischer Metallionen zu umgehen (Chamngopol und Groisman, 2002).

Das durch Magnesium regulierte Aufnahmesystem MgtA von *S. enterica* serovar Typhimurium (Hmiel *et al.*, 1989; Snively *et al.*, 1989a; Snively *et al.*, 1989b; Snively *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 1998), ein Vertreter der P-Typ ATPasen, ist in der Lage neben Mg^{2+} auch Zn^{2+} zu transportieren (Snively *et al.*, 1989a; Snively *et al.*, 1989b). Die Energetisierung erfolgt über die Spaltung von ATP. Ein weiterer Magnesiumtransporter ist MgtE aus *Bacillus firmus* OF4. Er vermittelt die Aufnahme von Mg^{2+} , Co^{2+} und auch Zn^{2+} (Smith *et al.*, 1995). Homologe Proteine von MgtE wurden sonst nur in einigen Gram-negativen Bakterien gefunden, z.B. in *Providencia stuartii* (Townsend *et al.*, 1995).

Eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Aufnahme von Schwermetallionen spielt das ubiquitär verbreitete, konstitutiv exprimierte Phosphataufnahmesystem (phosphate inorganic

transport system = Pit). Das am besten untersuchte System aus *E. coli* ist in der Lage Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} als neutrale $MeHPO_4$ -Komplexe zu transportieren (van Veen *et al.*, 1994; Beard *et al.*, 2000).

Den Aufnahmesystemen stehen verschiedene Mechanismen gegenüber, die die Zellen vor zu hohen Zink-Konzentrationen sowie weiterer Schwermetallionen im Cytoplasma schützen. Dies kann u.a. durch Bindung an Polypeptide wie Glutathion (Hultberg, 1998; Jamieson, 2002) oder Metallothionein erfolgen (Hamer, 1986; Higham *et al.*, 1986; Daniels *et al.*, 1998; Blindauer *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 1993). Metallothioneine wurden in verschiedenen Prokaryoten gefunden (Blindauer *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Da in Prokaryoten die Kapazität der Zelle zur Speicherung von z.B. Glutathion-Metall-Komplexen begrenzt und der Energieaufwand zur Synthese von Metallothioneinen sehr hoch ist (Nies, 1999; Nies, 2000), basiert ihre Resistenz gegenüber Schwermetallen hauptsächlich auf dem Export aus der Zelle. Für den Efflux von Zinkionen in Prokaryoten sind drei weit verbreitete Systeme bekannt.

Dazu gehören Vertreter der schwermetalltransportierenden RND-Familie (*resistance, nodulation, cell division*) (Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996; Saier, 2000b). Diese Transporter werden über einen Protonengradienten angetrieben (Saier *et al.*, 1994; Goldberg *et al.*, 1999; Zgurskaya und Nikaido, 2000b). In einem membrangebundenen Protein-Komplex mit einem MFP (*membrane fusion protein*) (Dinh *et al.*, 1994; Kawabe *et al.*, 2000; Zgurskaya und Nikaido, 2000a) und einem OMF (*outer membrane factor*) (Johnson und Church, 1999) vermitteln sie Resistenz gegenüber verschiedenen Schwermetallionen. Einer der ersten identifizierten Vertreter dieser Efflux-Komplexe war das CzcCBA-System aus *R. metallidurans* CH34 (Nies *et al.*, 1987; Nies und Silver, 1989b). Es vermittelt Resistenz gegenüber Co^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} . Weitere Vertreter der RND-Proteine sind z.B. CnrA aus *R. metallidurans* CH34 (Siddiqui *et al.*, 1988; Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993) und CzrA aus *Pseudomonas aeruginosa* (Hassan *et al.*, 1999). Laut Saier *et al.* (1994) erfolgt der Efflux der Schwermetallionen durch diese Komplexe über *Transenvelope*-Transport direkt aus dem Cytoplasma ins Außenmedium. Es gibt aber auch Hinweise auf einen Transport der Schwermetallionen aus dem Periplasma ins Außenmedium (Nikaido *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2002).

Eine andere Effluxfamilie für Schwermetallionen stellen die CDF-Proteine (*cation diffusion facilitator*) dar (Nies und Silver, 1995; Paulsen und Saier, 1997). Vertreter dieser ubiquitär verbreiteten Proteinfamilie verleihen Resistenz gegenüber Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} bzw. Mn^{2+} . CzcD aus *R. metallidurans* CH34 (Anton *et al.*, 1999) und CzcD aus *Bacillus subtilis* (Sturr *et al.*, 1997) erhöhen die Resistenz gegen Zn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} , CzrB aus *Thermus thermophilus* gegen Zn^{2+} und Cd^{2+} (Spada *et al.*, 2002) und ZitB aus *E. coli* gegen Zn^{2+} (Grass *et al.*, 2001). Für CzcD aus *B. subtilis* und ZitB aus *E. coli* wurde die Energetisierung dieses Prozesses über einen Protonen- bzw. Kaliumgradienten nachgewiesen (Guffanti *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

Eine dritte wichtige Klasse der Zinkexportproteine gehört in die Gruppe der Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden CPx-Typ ATPasen (Solioz und Vulpe, 1996; Rensing *et al.*, 1999; Gatti *et al.*, 2000). Der Transport der Schwermetallionen erfolgt wie bei den CDF-Proteinen vom Cytoplasma ins Periplasma, wird aber durch die Spaltung von ATP angetrieben (Tsai *et al.*, 1992). Die Regulation erfolgt in der Regel über die zelluläre Substratkonzentration, die über Regulatorproteine vermittelt wird (Brocklehurst *et al.*, 1999; Binet und Poole, 2000). Vertreter dieser Gruppe sind ubiquitär verbreitet. Dazu gehören z.B. ZntA aus *E. coli* (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997a), CadA aus *S. enterica* serovar Typhimurium (Nucifora *et al.*, 1989) und ZiaA aus *Synechocystis* PCC 6803 (Thelwell *et al.*, 1998).

In *S. enterica* serovar Typhimurium wurde vor kurzem ein weiteres Zink-Exportsystem identifiziert, ZntB (Worlock und Smith, 2002). Es besitzt Homologien zu dem Magnesiumtransporter CorA. Seine Rolle im Zinkhaushalt muss allerdings noch aufgeklärt werden.

Durch die Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen in den jeweiligen Lebensräumen sind die Prokaryoten mit unterschiedlichen Systemen zur Schwermetallionen-Aufnahme und -Export ausgestattet. Ein an extreme Schwermetallionen-Konzentrationen angepasster prokaryotischer Organismus ist das Gram-negative Wasser- und Bodenbakterium *R. metallidurans* CH34 (früher *Alcaligenes eutrophus* CH34) (Brim *et al.*, 1999; Goris *et al.*, 2001). Es wurde 1974 aus einer Zinkhütte in Belgien isoliert (Mergeay *et al.*, 1978). Für die Aufnahme von Zinkionen wurde in *R. metallidurans* CH34 bis jetzt nur deren unspezifischer Transport über das CorA-System nachgewiesen (Nies und Silver, 1989a). Um einem zu hohen Influx von Schwermetallionen, nicht nur von Zinkionen, entgegenzuwirken, verfügt *R. metallidurans* CH34 über verschiedene Schwermetallresistenzdeterminanten, von denen bis jetzt 11 näher untersucht sind. Die unterschiedlichen Determinanten sind auf dem Bakterienchromosom oder auf einem der beiden Megaplasmide pMOL30 (240 kb) (Mergeay *et al.*, 1985) bzw. pMOL28 (180 kb) (Taghavi *et al.*, 1997) lokalisiert.

Auf dem kleineren der beiden Megaplasmide pMOL28 befindet sich die *chr*-Determinante für die Chromat-Resistenz (Nies *et al.*, 1989a; Nies *et al.*, 1990; Peitzsch *et al.*, 1998; Juhnke *et al.*, 2002). Stromaufwärts davon ist das *cnr*-Operon (Siddiqui *et al.*, 1988; Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993; Tibazarwa *et al.*, 2000; Grass *et al.*, 2000) lokalisiert, welches Resistenz gegenüber Kobalt und Nickel vermittelt. Außerdem befindet sich eine Quecksilber-Resistenz *mer* (Diels *et al.*, 1985) auf pMOL28. Auf dem Megaplasmid pMOL30 sind neben einer weiteren Quecksilber-Resistenz (Diels *et al.*, 1985) die Resistenzdeterminante für Blei *pbr* (Borremans *et al.*, 2001) und für Kupfer *cop* (Dressler *et al.*, 1991) zu finden. Die *czc*-Determinante (Nies *et al.*, 1987; Nies und Silver, 1989b), die Resistenz gegenüber Kobalt, Zink und Cadmium mit Hilfe des CDF-Proteins CzcD (Anton *et al.*, 1999) und des RND-Transportkomplexes CzcCBA (Nies, 1995) vermittelt, befindet sich ebenfalls auf dem Megaplasmid pMOL30.

Auf dem Chromosom befinden sich eine dritte Quecksilber-Resistenz (Diels *et al.*, 1985), eine weitere Chromat-Resistenz *chr2* (Juhnke *et al.*, 2002) sowie zwei CPx-Typ ATPasen des Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-Typs (Anton, 2001). Zusätzlich konnten durch die Zugänglichkeit der vollständigen Genomsequenz von *R. metallidurans* CH34 (http://www.genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html) weitere potentielle Resistenzdeterminanten identifiziert werden (Mergeay *et al.*, 2003).

Diese Vielzahl an charakterisierten Resistenz-Systemen in *R. metallidurans* CH34 verdeutlicht die extremen Schwermetallbelastungen durch z.B. Zink oder Cadmium, denen der Organismus an seinem natürlichen Standort ausgesetzt sein muss (Mergeay *et al.*, 1978; Brim *et al.*, 1999). Um die Zinkkonzentration innerhalb der Zelle auf einem nichttoxischen Level zu halten, besitzt *R. metallidurans* CH34 vier bekannte Efflux-Transporter aus drei Proteinfamilien. Dazu gehören u. a. der RND-Proteinkomplex CzcCBA, der in diesem Organismus den Haupteffluxkomplex darstellt (Rensing *et al.*, 1997b; Legatzki *et al.*, 2003a) und das CDF-Protein CzcD (Anton *et al.*, 1999). Beide Transportsysteme werden durch die Gene der *czc*-Determinante auf pMOL30 kodiert. Außerdem gehören dazu zwei weitere chromosomal kodierte CPx-Typ ATPasen (Anton, 2001). Substrat dieser Effluxtransporter ist auch das Schwermetallion Cadmium. Cadmium ist Zink sehr ähnlich und tritt in natürlichen Zinkvorkommen immer als Verunreinigung mit auf. Der Anteil beträgt 0.1 – 5 % (Nies, 1991). Cadmium gehört nicht zu den Elementen, die eine Zelle benötigt, es ist als sehr toxisch einzustufen.

In der vorliegenden Arbeit sollten die beiden chromosomalen CPx-Typ ATPasen, die zum Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-Typ gehören, näher charakterisiert werden und das Zusammenspiel mit anderen Zn²⁺/Cd²⁺-Efflux-Transportern untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

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

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Ralstonia metallidurans</i>			
AE104	plasmidfrei		Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN438	plasmidfrei	$\Delta cadA$	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN439	plasmidfrei	$\Delta zntA$	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN440	plasmidfrei	$\Delta cadA$, Insertion von pECD734 in <i>zntA</i>	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN441	plasmidfrei	$\Delta zntA$, Insertion von pECD733 in <i>cadA</i>	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN442	plasmidfrei	<i>cadA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD796)	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN443	plasmidfrei	$\Delta zntA$, <i>cadA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD796)	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN444	plasmidfrei	<i>zntA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD795)	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN445	plasmidfrei	$\Delta cadA$, <i>zntA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD795)	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
DN448	plasmidfrei	<i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion mit Gen6854 (<i>contig691</i>), Insertion von pECD801	diese Arbeit
DN449	plasmidfrei	<i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion mit Gen6854 (<i>contig691</i>), Insertion von pECD801 in DN439	diese Arbeit
DN450	plasmidfrei	Destruktion von Gen6854 (<i>contig691</i>) durch Insertion von pECD802	diese Arbeit
DN451	plasmidfrei	Destruktion von Gen6854 (<i>contig691</i>) in DN439 durch Insertion von pECD802	diese Arbeit
AE128	pMOL30	<i>czc</i> , <i>mer</i> , <i>cop</i> , <i>pbr</i>	Mergeay <i>et al.</i> , 1985

Fortsetzung Tab. 1:

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
DN446	pMOL30	<i>cadA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD796)	diese Arbeit
DN447	pMOL30	<i>zntA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD795)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>			
JM83		<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>rpsL</i> (Str ^r), $\phi 80$, <i>lacZ</i> $\Delta M15$	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BL21	pLys3	<i>F dcm</i> , <i>omp</i> , <i>hdsS</i> , (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>lon⁻</i> , <i>galλ</i> , DE3, (pLysS, cm ^r), Überexpressionsstamm für <i>Strep</i> -tag <i>II</i> [®] -System	Stratagene Europe, Amsterdam
S17/1		<i>pro</i> , Tra ⁺ <i>recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
W3110		Wildtyp	Mosteller und Goldstein, 1975
GG48		<i>zntA::kan</i> Δ <i>zitB::cm</i>	Grass <i>et al.</i> , 2001
DW3110		<i>copA::kan</i>	Rensing <i>et al.</i> , 2000
	pLO2	<i>Suicid</i> -Rekombinationsvektor für <i>R. metallidurans</i> , <i>sacB</i> , (kan ^r)	Lenz <i>et al.</i> , 1994
	pECD733	pLO2-Konstrukt für <i>cadA</i> -Destruktion	Anton, 2001
	pECD734	pLO2-Konstrukt für <i>zntA</i> -Destruktion	Anton, 2001
ECA060	pECD794	pLO2:: <i>lacZ</i> für <i>lacZ</i> -Transkriptions- fusion	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
ECA061	pECD795	<i>zntA'</i> in pECD794	diese Arbeit
ECA062	pECD796	<i>cadA'</i> in pECD794	diese Arbeit
ECA063	pECD797	pLO2-Konstrukt für <i>cadA</i> -Deletion	diese Arbeit
ECA064	pECD798	pLO2-Konstrukt für <i>zntA</i> -Deletion	diese Arbeit
	pASK-IBA3	Expressionsvektor mit <i>Strep</i> -tag <i>II</i> [®] (C-terminal), amp ^r	IBA-GmbH, Göttingen
ECA069	pECD799	<i>cadA-Strep</i> -tag <i>II</i> [®] in pASK-IBA3	diese Arbeit
ECA070	pECD800	<i>zntA-Strep</i> -tag <i>II</i> [®] in pASK-IBA3	diese Arbeit
ECA071	pECD801	pECD794-Konstrukt für <i>lacZ</i> -Fusion mit Gen6854 (<i>contig691</i>)	diese Arbeit
ECA072	pECD802	pLO2-Konstrukt für Destruktion von Gen6854 (<i>contig691</i>)	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1::

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/Herkunft
	pVDZ'2	tet ^r IncP1 lacZ' Mob ⁺ Tra ⁻	Deretic <i>et al.</i> , 1987
	pDNA176	<i>czcD</i> in pVDZ'2	Anton <i>et al.</i> , 1999
	pDNA130	<i>czcCBAD'</i> in pVDZ'2	Nies <i>et al.</i> , 1989b
	pDNA324	<i>czcCB</i> in pVDZ'2	Grass, 2000
	pDNA385	<i>czcCBADRS'</i> in pVDZ'2	Legatzki <i>et al.</i> , 2003b
	pDNA386	<i>czcCA-Strep-tag II</i> [®] in pVDZ'2	diese Arbeit
	pDNA387	<i>czcCBA-Strep-tag II</i> [®] in pVDZ'2	diese Arbeit
	pGEM [®] -T Easy	<i>lacPOZ'</i> , Klonierungsvektor für PCR-Produkte (amp ^r)	Promega, Madison (USA)
	pUC18		Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

2.2. Kultivierungsbedingungen

2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien

A) Nährbouillon I (SIFIN GmbH, Berlin)

25 g Nährbouillon I

ad 1 l H₂O_{bidest}

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

B) Nähragar (SIFIN GmbH, Berlin)

36.5 g Nähragar I bzw. 26 g Nähragar II

ad 1 l H₂O_{bidest}

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

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

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g Natriumchlorid

NaOH ad pH 7.0

ad 1 l H₂O_{bidest}

Zur Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium 1.5 % (w/v) *Bacto*[®]-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt. Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

D) LB broth, Lennox (Difco, Augsburg)

20 g Lennox-Medium

ad 1 l H₂O_{bidest}

Dieses Komplexmedium diente hauptsächlich der Anzucht von *E. coli*-Stämmen für Wachstumsexperimente.

E) Terrific Broth (TB-Medium) (Tartof und Hobbs, 1987)

12 g Bacto-Trypton

24 g Hefeextrakt

4 ml Glyzerin

ad 900 ml H₂O_{bidest}

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

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

900 ml H₂O_{bidest}

0.1 g ZnSO₄ x 7 H₂O

0.03 g MnCl₂ x 4 H₂O

0.3 g H₃BO₃

0.2 g CoCl₂ x 6 H₂O

0.01 g CuCl₂ x 2 H₂O

0.188 g NiCl₂ x 6 H₂O

0.03 g Na₂Mo₄ x 2 H₂O ad 1 l H₂O_{bidest}

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

Komponente A (20 fach):

800 ml H₂O_{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 NH₄Cl

4.0 g MgCl₂ x 6 H₂O

0.60 g CaCl₂ x 2 H₂O

0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat

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

ad 1 l H₂O_{bidest}

Komponente B (20 fach):

900 ml H₂O_{bidest}

19.5 g Na₂SO₄ x 10 H₂O

4.6 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

ad 1 l H₂O_{bidest}

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

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

I) Medienzusätze

Schwermetallsalze

Es wurden 1 M bzw. 0.1 M wässrige Stammlösungen der Schwermetallsalze ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂, Pb(NO₃)₂ und CdCl₂ verwendet. Die Lösungen wurden in sterilem Medium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

Antibiotika

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

Tab. 2: Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 g/l H ₂ O _{bidest}	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H ₂ O _{bidest}	25 mg/l (<i>E. coli</i>) 1 g/l für Flüssigkulturen bzw. 1.5 g/l für Agarplatten (<i>R. metallidurans</i>)
Tetracyclin	12.5 g/l 50 % Ethanol	12.5 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l Ethanol (96 %)	20 mg/l
Streptomycin	10 g/l H ₂ O _{bidest}	10 mg/l

Weitere Medienzusätze

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

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

2.2.2. Anzucht und Zellernte

A) *R. metallidurans*

Die Anzucht von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Minimalmedium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 0.2 % (w/v) 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 von Schwermetallsalzen erfolgte in den beschriebenen Konzentrationen. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C (Brutraum) auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 150 rpm angezogen. Für Wachstumsversuche erfolgte die Zellanzucht in einem Wasserbadschüttler (Gyrotory G76, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey) bei 30°C und 250 rpm. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung mit einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., USA) in Klett-Einheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Die Zellernte erfolgte entweder durch

Zentrifugation in der Universal 30 RF-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) für 15 min, 5 000 rpm bei 4°C; in der Sigma-Laborzentrifuge (Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei 4°C, 10 min und 12 000 rpm oder durch 10 min Zentrifugation in der Sigma Tischzentrifuge (12 000 rpm).

Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 30°C für 1-5 Tage inkubiert.

B) *E. coli*

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

Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3. Stammhaltung

Die Kultivierung von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agar-Platten, wobei den megaplasmidtragenden Stämmen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt wurden. Bei der Insertion von Antibiotika-Resistenzkassetten in das bakterielle Genom wurde das entsprechende Antibiotikum zur Selektion eingesetzt. 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 sterilem Glycerin (Endkonzentration 25 % [v/v]) versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.4. Reinheitskontrolle

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

2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.3.1. Isolierung von DNA

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

2.3.1.1. Isolation von Gesamt-DNA nach Marmur (Johnson, 1981)

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

7.5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 15 min bei 4°C und 4 500 rpm zentrifugiert (Hettich, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde in 7.5 ml Phosphatpuffer (10 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, pH 6.8) gewaschen und erneut wie angegeben zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 0.85 ml eiskalter Saccharose-Lösung (250 g/l Saccharose, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) resuspendiert und dann auf Eis gelagert. Nach vorsichtigem Einmischen von 0.1 ml Lysozym-Lösung (10 g/l Lysozym in 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) verblieb der Ansatz für 15 min bei 30°C im Wasserbad. Es wurden 1.25 ml Saccharose-Lösung, 0.1 ml Proteinase-K-Lösung (2.5 g/l Proteinase K in 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) und 1.25 ml SDS-Lösung (15 g/l) zugegeben, für 3 h bei 37°C und anschließend 15 min bei 55°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden folgende Chemikalien nach dem jeweiligen Hinzupipettieren für 10-15 min durch kräftiges Schwenken eingemischt: 0.94 ml Natriumperchlorat-Lösung (5 M in sterilem H₂O_{bidest}), 1.25 ml Phenol/NaCl und 1.25 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:1). Nach Zentrifugation bei 4 500 rpm und 20°C für 20 min (Hettich Universal 30, RF, Tuttlingen) wurde die Oberphase abgenommen und in ein neues steriles Greinerröhrchen überführt. Die stark viskose Lösung wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol von Phenolresten befreit, indem kräftig aus dem Handgelenk

geschüttelt wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 500 rpm und 20°C für 10 min wurde die wässrige Oberphase abgenommen und in ein neues steriles Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe von 120 µl 10 %iger steriler Essigsäure zur Neutralisation der DNA. Es schloss sich die Extraktion mit 6 ml Diethylether an, indem wieder aus dem Handgelenk geschwenkt wurde, bis ein homogenes Gemisch entstand. Nach Zentrifugation (4 500 rpm, 4°C, 10 min) wurde die Unterphase in ein neues steriles Röhrchen überführt und zum Abdampfen der Diethyletherreste bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 6 ml Ethanol (96 %) bei -20°C über Nacht.

Es wurde bei 4 500 rpm und 4°C für 30 min in der Hettich-Zentrifuge zentrifugiert, das erhaltene Pellet in 500 µl sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert und in ein steriles 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es schloss sich eine zweite Fällung nach Zugabe von 10 µl steriler 5 M NaCl-Lösung und 1 ml Ethanol (96 %) für 2 h bei -20°C an. Es wurde für 1 h bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sigma Laborzentrifuge) und das dabei erhaltene Pellet im Vakuum (Speed Vac SVC 100, Savant) getrocknet. Danach wurde die DNA in 250 µl sterilem H₂O_{bidest} bei 50°C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

Diese Methode diente der Isolation genomischer DNA von *R. metallidurans*, die als Template für PCR-Reaktionen und für Southern-Hybridisierungsexperimente eingesetzt wurden.

2.3.1.2. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnte so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach überprüft werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) sowie 10 µl Stopp-Mix (40 % Glycerin [v/v], 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l Bromphenolblau [BPB]) zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2TM, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) für 10 s und Zentrifugation für 3 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei 12 000 rpm wurden ca. 25 µl des wässrigen Überstandes im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.3.1.3. Plasmidisolation mittels *Spin Säulen*

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H₂O_{bidest} eluiert.

Es wurden 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 12 000 rpm pelletiert (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte unter Verwendung des *QIAprep Plasmid Spin Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) bzw. den *CONCERTTM Rapid Plasmid Purification Miniprep System* (GIBCO BRL,

Eggenstein) entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

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

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

2.3.2. DNA-Techniken

2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (Easy Cast™ Elektrophoresis System). Dabei variierte die Gelkonzentration von 6 g/l bei großen Fragmenten bis zu 20 g/l 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, in der Mikrowelle (Bosch Hausgeräte) gelöst. Dann wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid (0.5 g/l) zugesetzt und das Gel gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Volumen Stopp-Lösung (40 % [v/v] Glycerin, 0.1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, \pm 2.5 g/l BPB) versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-10 μl (analytische Gele) bzw. 20-50 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 (UV-Transilluminator, Appligene, Illkirch), die Dokumentation mittels Image-Master (Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.3.2.2. DNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe *EcoRI/BamHI* geschnittener Plasmid-DNA pES1 (deren 11 Fragmente bei ca. 4 000, 2 500, 1 700, 1 300, 800, 660, 600, 510, 375, 230 und 140 bp liegen), dem *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* (MBI) (14 Fragmente der Größen 3 000, 2 000, 1 500, 1 200, 1 031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp) und dem *Gene Ruler* 1 kb DNA *Ladder* (MBI) (14 Fragmente der Größen 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 und 250 bp).

2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

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

2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0.1 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die zehnfach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes 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 durch Ausheizen (10 min bei 70°C) inaktiviert oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purifikation Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) entfernt.

2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Reinigung der DNA erfolgte über den *QIAquick PCR Purifikation Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) oder *CONCERT™ Rapid PCR Purification Kit* (GIBCO BRL, Eggenstein). Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silika-Gel-Membran, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift, erfolgte die Elution der DNA mittels sterilem H₂O_{bidest} (niedrige Salzkonzentration).

Es wurde nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers vorgegangen und die DNA mit 50 µl sterilem H₂O_{bidest} eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment rasch aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung der Protokolle des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) bzw. *CONCERT™ Rapid Gele Extraction Kit* (GIBCO BRL, Eggenstein) konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:3. Bei der Ligation in den *low copy* Vektor pVDZ'2 betrug das Verhältnis 1:5. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem H₂O_{bidest} versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2-3 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Für die Ligation von PCR-Produkten in pGEM[®]-T Easy wurden 0.5 µl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison, Wi) verwendet. Die Ligation wurde über Nacht (pGEM[®]-T Easy) bzw. für 2-3 Tage (alle anderen Vektoren) bei 4°C inkubiert.

2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.3.1. Auswahl der Primer

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

Die Oligonukleotid-Primer (Tab. 3) wurden von kommerziellen Anbietern (Gibco BRL, Eggenstein; Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H₂O_{bidest} gelöst, und auf eine Endkonzentration von ca. 10 pmol/µl verdünnt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Name/ Orientierung \leftarrow/\rightarrow	5' \rightarrow 3'-Sequenz ^{a)}	Beschreibung
<i>czc</i>-Primer		
<i>CzcC EcoRI</i>	\rightarrow TCTCGCC <u>GAATTCT</u> CCTGGT	stromaufwärts von <i>czcC</i> mit natürlicher <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
Δ <i>CzcCB 3'KpnI</i>	\leftarrow AAAG <u>G</u> TACCGGCAGCCTTTTGTTCGA	Übergang zwischen <i>czcC</i> und <i>czcB</i> , <i>KpnI</i> -Schnittstelle
Δ <i>CzcBA 5'KpnI</i>	\rightarrow AAAG <u>G</u> TACCGAACACGGCCATTGATACGGG	Übergang <i>czcB</i> und <i>czcA</i> , <i>KpnI</i> -Schnittstelle
<i>CzcA BamHI</i>	\leftarrow ACGG <u>G</u> ATCCAGGCTGGCGGCCTTGATCCGG	fügt vor dem Stoppkodon von <i>czcA</i> eine <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein
CPx-Typ ATPase-Primer		
<u>Expressionsprimer für pASK-IBA3</u>		
<i>Znt691 5'BamHI</i>	\rightarrow AAAG <u>G</u> ATCCGTTGCTTCCTATAAAAACTTGACTCT	fügt nach dem Startkodon von <i>CadA</i> eine <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein
<i>Znt691 3'XhoI</i>	\leftarrow AAAC <u>T</u> CGAGTGCCGCCTTGAACCTCAG	fügt vor dem Stoppkodon von <i>CadA</i> eine <i>XhoI</i> -Schnittstelle ein
<i>Znt649 5'EcoRI</i>	\rightarrow AAAGAAT <u>T</u> CGAATTTGACATGGCTCGCACC	fügt nach dem Startkodon von <i>ZntA</i> eine <i>EcoRI</i> -Schnittstelle ein
<i>Znt649 3'BamHI</i>	\leftarrow AAAG <u>G</u> ATTC AACGGCCTTGCGCGTCA	fügt vor dem Stoppkodon von <i>ZntA</i> eine <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein

Fortsetzung Tab. 3

<u>Deletionsprimer</u>		
Znt691 oo <i>NdeI</i>	→ AAAC <u>CATATG</u> CGGGCTCGGCCAAGCTGT	bindet ca. 300 bp stromaufwärts vom vorhergesagten ATG _{cadA} , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
Znt691 ou <i>MunI</i>	← AAACA <u>ATTGGGAAGCA</u> ACCATGATGCGGATC	bindet direkt am ATG _{cadA} , <i>MunI</i> -Schnittstelle
Znt691 uo <i>MunI</i>	→ AAACA <u>ATTGAAGGCGGC</u> ATGAACAATGGAT	bindet direkt am TGA _{cadA} , <i>MunI</i> -Schnittstelle
Znt691 uu <i>NdeI</i>	← AAAC <u>CATATGGGCCTTCCG</u> TTTTGCGCA	bindet ca. 300 bp stromabwärts vom TGA _{cadA} , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
Znt649 oo <i>NdeI</i>	→ AAAC <u>CATATGGAGCTTGGCC</u> GATTTGCTGTC	bindet ca. 300 bp stromaufwärts vom ATG _{zntA} , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
Znt649 ou <i>MunI</i>	← AA <u>CAATTGGTCAA</u> ATTCCATTGATTCTTGTTC	bindet direkt am ATG _{zntA} , <i>MunI</i> -Schnittstelle
Znt649 uo <i>MunI</i>	→ AAACA <u>ATTGAAGGCCGTTT</u> GACGGCCTG	bindet direct am TGA _{zntA} , <i>MunI</i> -Schnittstelle
Znt649 uu <i>NdeI</i>	← AAAC <u>CATATGTCGACGAGCTGAT</u> CGGTGTGG	bindet ca. 300 bp stromabwärts vom TGA _{zntA} , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
<u>Primer für lacZ-Konstrukte</u>		
ZntA649 5' <i>SphI</i>	→ AAAG <u>CATGCGGC</u> ATGGTCGGTGACGGTATC	bindet ca. 300 bp vorm TGA _{zntA} , <i>SphI</i> -Schnittstelle
ZntA649 3' <i>SalI</i>	← AAAG <u>TCGACACAGGCCG</u> TCAAACGGCC	bindet direkt am TGA _{zntA} , <i>SalI</i> -Schnittstelle
CadA691 5' <i>PstI</i>	→ AAAC <u>TGCAGGTGGGC</u> ATGGTGGGCGAC	bindet ca. 300 bp vorm TGA _{cadA} , <i>PstI</i> -Schnittstelle

Fortsetzung Tab. 3

CadA691 3'*SalI* ← AAAGTCGACCCATTGTTTCATGCCGCCTTGA bindet direkt am TGA_{cadA}, *SalI*-Schnittstelle

Gen6854 (*contig691*)-Primer

Knockout-Primer

CadR *SalI* 5' → GGTGAACGCGCTGGTTCGTACGCTCATATCGCGCAA GTG bindet in Gen6854 zerstörte *SalI*-Schnittstelle

CadR *SalI* 3' ← CACTTGCGCGATATGAGCGTACGACGAGCGCGTTC ACC bindet in Gen6854 zerstörte *SalI*-Schnittstelle

CadR *NdeI* tga 5' → AACATATGTGAGCGCTTTTACGAGTCAGAACGC bindet ca. 60 bp nach ATG_{Gen6854} *NdeI*-Schnittstelle

CadR 3' ← AAACATATGAATGCCGCACTCGCGC bindet ca. 370 bp in Gen6854 *NdeI*-Schnittstelle

Primer für *lacZ*-Konstrukte

CadR-*lacZ* 5'*XbaI* → AAATCTAGAGCTTCAGGCGGGCTCGG bindet am TGA_{Gen6854}, *XbaI*-Schnittstelle

CadR-*lacZ* 3'*PstI* ← AAACTGCAGGGTGAACTGGGCAAGAAGGCA bindet ca. 300 bp vor TGA_{Gen6854}, *PstI*-Schnittstelle

Sequenzier- und Vektorprimer

pGEM fwd → GCGAAAGGGGGATGTGCTGC *forward* Sequenzierprimer (ABI) für pGEM-T Easy-Konstrukte

pGEM rev ← ATATGGTCGACCTGCAGGCG *reverser* Sequenzierprimer (ABI) für pGEM-T Easy-Konstrukte

Fortsetzung Tab. 3

pLO2-X	← TCAGCAACACCTTCTTCACGA	bindet in pLO2, Nähe der <i>Xho</i> I-Schnittstelle
pLO2-N	→ AACATCAAAGGCAAGAAAACATC	bindet in pLO2 vor <i>Nde</i> I-Schnittstelle
<i>Strep</i> Tag down	→ GGCGCCGAGACCGCTTTGAACGTATCATT	Sequenzierprimer für pASK-IBA3-Konstrukte
<i>Strep</i> Tag up	← ATTTTTCGAACTGCGGGTGGC	Sequenzierprimer für pASK-IBA3-Konstrukte

^{a)}für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet. **Fett** dargestellte Basen wurden in die Sequenz eingefügt.

2.3.3.2. Standard Polymerase-Ketten-Reaktion (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*TM *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 Agaroberfläche in steriles H₂O_{bidest} überführt. Nach Erhitzung für 2 min auf 96°C und anschließender Zentrifugation konnte der Überstand als Template eingesetzt werden und ersetzte im Ansatz das zuzufügende Wasser.

Reaktionsansatz:

5 µl	10 x PCR Puffer
3-5 µl	Mg ²⁺ -Stammlösung (2.5 mM)
1 µl	20 mM dNTP-Mix
1 µl	Primer 1 (10 pmol)
1 µl	Primer 2 (10 pmol)
1 µl	Template-DNA (ca.100 ng/µl)
ad 50 µl	steriles H ₂ O _{bidest}

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.	20 s	96°C	Denaturierung
3.	20 s	x°C	<i>Annealing</i>
4.	1 min/kb	68/72°C	<i>Extension (Pwo/Taq)</i>
	Schritt 2-4:	25-30 Zyklen	
5.	5 min	68/72°C	Nachsynthese (<i>Pwo/Taq</i>)
6.	Pause	4°C	

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

2.3.3.3. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem "*QIAquick PCR Purification Protocol*" (QIAGEN GmbH, Hilden) oder dem Protokoll des *CONCERT™ Rapid PCR Purification Kit* (GIBCO BRL, Eggenstein).

2.3.4. DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone

2.3.4.1. Transformation nach der CaCl₂-Methode

A) Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Kalziumchlorid-Methode (Mandel und 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 frischem 50 ml LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 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 5 000 rpm und 4°C in der Universal RF (Hettich GmbH,

Tuttlingen). Das Pellet wurde vorsichtig in ca. 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis gestellt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin (Endkonzentration 25 % [v/v]) versetzt und bei -80°C gelagert.

B) Transformation

Je 100-200 µl CaCl₂-kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der DNA (z.B. Ligationsansatz) vorsichtig gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock von 90 s bei 42°C im Wasserbad wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0.4-0.8 ml NB- oder LB-Medium und Inkubation für 45 min schüttelnd bei 37°C wurde ein Teil des Ansatzes auf Selektionsagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4.2. Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Transformanten wurden auf Nähragar-Platten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ausplattiert. Bei rekombinanten Klonen, die durch Test auf α-Komplementation identifiziert werden konnten, wurde den Selektionsplatten IPTG und X-Gal zugegeben. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α-Komplementation der β-Galaktosidase durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal (weiße Kolonien) zugrunde.

2.3.4.3. Plasmidtransfer durch Konjugation

Der konjugative Plasmidtransfer (von pVDZ'2 bzw. pLO2) wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) und *R. metallidurans*-Zellen aus NB- oder LB-Übernachtskulturen durchgeführt. Je 200 µl der konjugierenden Stämme wurden auf einer NA- oder LB-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 (pVDZ'2-Derivate) bzw. mit 1.5 mg/ml Kanamycin (pLO2-Derivate) ausgestrichen. Ein Wachstum von *E. coli*-Zellen auf diesen Medien wurde aufgrund von Auxotrophien bzw. zu hohen Konzentrationen an Antibiotikum verhindert.

2.3.4.4. Selektion von Rekombinanten und Doppelaustausch-Rekombinanten

Hierzu wurde eine Methode von Lenz *et al.* (1994) in leicht veränderter Form eingesetzt. Der auszutauschende DNA-Bereich wurde dazu in den Vektor pLO2 umkloniert, der in *R. metallidurans* nicht repliziert. Entscheidend ist dabei, dass sich von diesem DNA-Bereich

eine homologe Kopie in *R. metallidurans* finden lässt. Der Vektor pLO2 trägt zum einen eine Kanamycin-Kassette und zum anderen das Gen für die Levansucrase (*sacB*). Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E.coli*-Stamm (S17/1) mit *R. metallidurans* konjugiert werden. Es kommt zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, die durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden können. Bei dem Ziel der Herstellung von Insertionsmutanten durch die Integration des Vektors in den zentralen Teil eines Gens war es nicht notwendig, einen zweiten Rekombinationsschritt anzuschließen. Die Genstruktur war durch die Insertion zerstört.

Zur vollständigen Deletion von Genen wurde nach dem folgendem Protokoll fortgefahren. Die Zellen wurden zwei Tage in Tris-Minimalmedium angezogen, wobei die Cointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten und es dabei zur Plasmid-*Excision* kam. Die Kulturen wurden dann in ein Medium mit 15 % (w/v) Rohrzucker überführt. Das Genprodukt von *sacB* synthetisiert aus der Saccharose ein Levan-Polymer, dieses Polymer das Periplasma der Zellen verstopft und zu deren Absterben führt. Die gewünschten Doppel-Rekombinanten konnten durch negative Selektion auf Kanamycin identifiziert werden. Dieser letzte Schritt war wichtig, da sich gezeigt hat, dass nicht alle Cointegrate durch Saccharose-Zugabe abstarben. Zur zusätzlichen Überprüfung wurde eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment und eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

2.3.5. DNA-Sequenzierung

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

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

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

Plasmid-DNA (0.5 µg)	1-6 µl
Primer (4 pM)	2 µl
ABI- <i>Sequencing-Mix</i>	2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

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

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

Nach Ablauf des Programms wurde die wässrige Unterphase abgenommen und restliches Mineralöl durch Adhäsion an einen schräg gelegten Streifen Parafilm entfernt. Die DNA wurde anschließend zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl 96 %iger Ethanol zugegeben wurden. Nach 20minütiger Zentrifugation bei RT und 12 000 rpm in der Tischzentrifuge und anschließendem 5 min Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und war bei -20°C bis zur Sequenzierung stabil. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 4 µl Gelpuffer (Gemisch aus 5 Vol. Formamid und 1 Vol. 25 mM EDTA [pH 8.0]) aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert.

2.3.5.2. Das Sequenziergel

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

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

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

Vor der Auftragung auf das Gel (nach Vorlauf) wurden die Proben 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

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

2.3.5.3. Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Programms *Chromas*. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen *Clone 4* (*Clone Manager*-Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, USA) und *Sequencher™ 4.0* ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Internet-Programm *Basic Logic Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm *ClustalW* vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen, Hydrophathieprofilen nach Kyte und Doolittle (1982) und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen *Simple Modula Architecture Research* (SMART, Schultz *et al.*, 1998, Schultz *et al.*, 2000), TMHMM 1.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998), *Scan Prosite*, *Profile Scan* und *Compute pI/Mw ExPASy* des *ExPASy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

2.4.1. Herstellung der Sonden (DIG DNA Labeling Kit, Roche, Mannheim)

Durch PCR wurden ca. 300 bp-Fragmente aus genomischer DNA von *R. metallidurans* AE104 amplifiziert, die als Sonden für den Nachweis von Nukleinsäuren dienen sollten.

Die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des *DIG DNA Labeling and Detection Kit* (Roche, Mannheim) durch *Random Priming* mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Je 1 µg PCR-Produkt wurde in 15 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und 10 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 2 µl Hexanukleotid-Mix (10 x) und dNTP-Labeling-Mix (10 x) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) beendet.

2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards

Zur Größenbestimmung der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente wurde ein Digoxigenin-markierter Größenstandard (Roche, Mannheim) eingesetzt. Für die Southern-Experimente kam der DIG-Marker VII (17 DNA-Fragmente mit folgenden Größen: 8 576, 7 427, 6 106, 4 899, 3 639, 2 799, 1 953, 1 882, 1 515, 1 482, 1 164, 992, 718, 710, 492, 359 und 81 bp) zum Einsatz. Der Marker wurde ebenfalls im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht. Als nachteilig bei dieser Methode ist allerdings die Instabilität der Markierung anzusehen.

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

2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA-Blotting

Genomische DNA der zu untersuchenden Derivate von *R. metallidurans* AE104 wurde nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen in 0.8 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für mindestens 2 h in 1 x TAE-Puffer. Das Agarosegel wurde unter leichtem Schwenken (auf einer Laborwippe) wie folgt für den DNA-Transfer auf die Membran vorbereitet:

Depurinierung: 5 min in 0.25 N HCl
Denaturierung: 20 min in Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)
Neutralisierung: 20 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris [pH 7.5], 1.5 M NaCl)
Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit H₂O_{bidest} gespült.

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) auf Gelgröße zugeschnitten und für 20 min in sterilem H₂O_{bidest} und anschließend in 10 x SSC (0.15 M Na-Citrat [pH 7.0], 1.5 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Agarose-Gel auf die Membran erfolgte mittels Vacuum-Blotter (Appligene). In der Blotting-Apparatur wurde die vorbereitete Membran auf mit 10 x SSC benetztes Filterpapier gelegt, darüber die Maske und schließlich das Gel. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über 3 h bei ca. 60 mbar.

Anschließend wurde die Position des Geles auf der Membran markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch dreiminütige Bestrahlung mit UV-Licht (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und zwischen Filterpapier bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.4.3.2. Hybridisierung

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

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

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

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

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

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

Die Membran wurde zuerst 5 min in Waschpuffer (Puffer 1 [0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl {pH 7.5}] mit 0.3 % (v/v) Tween 20) inkubiert. Es schloss sich eine Inkubation über 30 min in Puffer 2 (Puffer 1 mit 1 % [v/v] Blocking-Reagenz) an. Danach wurde für weitere 30 min mit Anti-DIG-AP-Konjugat (Verdünnung 1:20 000 in Puffer 2) behandelt. Anschließend wurde 2 mal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min in Puffer 3 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl [pH 9.5]) equilibriert, vorsichtig abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt. Dann wurde sie gleichmäßig mit der verdünnten Substratlösung (CSPD in Puffer 3 1:100) benetzt, mit einer zweiten Folie abgedeckt und 5 min inkubiert. Die Membran wurde auf sauberem Filterpapier soweit abgetrocknet, dass keine überschüssige Flüssigkeit mehr vorhanden war und luftblasenfrei in eine neue Folie eingeschweißt. Zum besseren Start des Substratumsatzes wurde sie 15 min bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde in einer Röntgenkassette für 15 min bis 3 h auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch 3 min Inkubation in Entwicklerlösung. Entwicklerreste wurden durch kurzes Spülen im Wasserbad entfernt. Die Fixierung des Filmes erfolgte 10 min in Fixierlösung. Danach wurde der Film 10 min in Wasser gespült.

2.5. Zellwachstumsversuche

2.5.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien

2.5.1.1. Messung der Zelltrübung

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

Neben der kontinuierlichen Messung des Zellwachstums wurde auch die Zelldichte nach einer definierten Wachstumszeit (16 h) bestimmt. Dazu wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd., England) gemessen.

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

Die Zelltrübungsmessungen wurden in Lennox-Medium mit Metallionen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte eine einheitliche, in Lennox-Medium bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase angezogene Vorkultur des jeweiligen Stammes. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm kultiviert und nach 9 h entnommen. Den Stämmen, die Plasmidkonstrukte enthielten, wurde in der Vorkultur das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben. Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten Kulturröhrchen. Für die Bestimmung des Zellwachstums nach 16 h wurden 3 ml LB-Medium mit ZnCl₂ oder CdCl₂ 0.01 %ig aus der Vorkultur beimpft und die Optische Dichte bei 600 nm nach 16 h schüttelnder Inkubation bei 37°C vermessen.

2.5.1.3. Zellanzucht von *R. metallidurans*-Stämmen in Wachstumsversuchen

Die Bestimmung des Zellwachstums von *R. metallidurans* mit verschiedenen CdCl₂-Konzentrationen wurde in Tris-Minimalmedium durchgeführt. Aus einer Vorkultur in Tris-Minimalmedium, die aus einer Einzelkolonie angeimpft wurde (Wachstum 48 h bei 30°C), wurde die Mittelkultur beimpft. Diese wurde 24 h schüttelnd bei 30°C angezogen. Die

Hauptkultur wurde in 16 ml Reagenzgläsern (17 mm Durchmesser) mit 2.5 ml Tris-Minimalmedium 3 %ig aus der Mittelkultur angeimpft. Stämme, die pLO2-Derivate ins Genom inseriert hatten, wurde Kanamycin in die Vor- und Mittelkultur gegeben. Als Anzuchtgefäße für die Vor- und Mittelkulturen dienten 100 ml Kolben. Die Hauptkulturen wurden bei 30°C auf einem Inkubationsschüttler (175 rpm) angezogen. Nach 24 h wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

2.5.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegen Schwermetallionen

Die Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) erfolgte auf Lennox- oder Tris-Minimalmedium-Agar. Es wurden Platten mit steigenden Konzentrationen des entsprechenden Schwermetallsalzes gegossen.

Für Komplementationsexperimente in *E. coli* mit pASK-IBA3-Derivaten enthielten die LB-Agar-Platten außerdem den Induktor Anhydrotetracyclin (AHT 50 µg/l) zur Induktion der Genexpression. Aus den Vorkulturen wurden die Stämme in Sektoren auf den Platten ausgestrichen und über Nacht (16 h) bei 37°C inkubiert.

Die Bestimmung der MIC verschiedener *R. metallidurans*-Stämme gegenüber Schwermetallsalzen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Platten. Die Vorkulturen wurden in Tris-Minimalmedium schüttelnd bei 30°C angezogen (48 h). Die Inkubation der Platten erfolgte für 3-5 Tage bei 30°C. Als Minimale Inhibitor Konzentration wird die Metallkonzentration bezeichnet, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen.

2.6. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Ullmann, 1984)

Die für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *R. metallidurans* wurden in Tris-Minimalmedium angezogen.

Aus einer 48 h-Vorkultur in Tris-Minimalmedium wurde eine Zwischenkultur in Tris-Minimalmedium angeimpft. Am folgenden Tag wurden Hauptkulturen auf 30 KE angeimpft und unter Schütteln 4-6 h bei 30°C inkubiert. Nach Verdoppelung der Kulturen wurde eine Probe von 0.2 ml genommen, dann erfolgte eine Aufteilung der Kulturen und die Inkubation mit verschiedenen Metallkonzentrationen für 3 h bei 30°C. Nach dieser Zeit wurden je 0.2 ml Kultur in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (10 min, 12 000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Parallel zu den

Probeentnahmen wurde die Zelldichte der Kulturen unter Verwendung des Klett-Summerson-Colorimeters bestimmt.

Das Zellpellet wurde in 950 µl Z-Puffer (0.6 M Na₂HPO₄, 0.4 M NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.5 M β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50 µl Permeabilisierungspuffer (2.5 g/l CTAB, 5 g/l Natriumdesoxycholat) permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 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 β-Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Die Natriumcarbonatlösung erhöhte den pH-Wert des Reaktionsansatzes auf 11, wodurch die β-Galaktosidase inaktiviert wurde. Die Ansätze wurden 5 min bei 12 000 rpm zentrifugiert (Sigma-Tischzentrifuge), die Überstände in Küvetten überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Mit Hilfe der Extinktion (E_{420}) und der Reaktionszeit (= Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion) konnte die β-Galaktosidase-Aktivität 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 β-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. Protein-Expression und -Reinigung über das *Strep-tag II*[®] *Protein Purification System* (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Mittels des *Strep-tag II*[®] Überexpressionssystems konnten exprimierte Proteine in einer Einschnitt-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Reinigung des *Target*-Proteins wird N- oder C-terminal ein *tag* eingefügt, der aus 8 AS (WSHPQFEK) besteht. Dieser *Strep-tag II*[®] bindet spezifisch an *StrepTactin*, das als Säulenmaterial verwendet wurde. Weiterhin beeinflusst dieser kurze *tag* normalerweise weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Die Induktion der Expression erfolgte mittels AHT (Anhydrotetracyclin), da der zu exprimierende ORF hinter einen *tetA*-Promotor kloniert wurde.

Unspezifisch bindende Proteine konnten während eines Waschschrattes 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 2 %ig in frisches LB- oder TB-Medium überführt. Die Hauptkulturen in LB- oder TB-Medien zur Überexpression wurden schüttelnd bei 30°C inkubiert, bis sie eine Optische Dichte von $OD_{600} = 1.0$ erreicht hatten. Die Expression der Proteine 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 8 000 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 Rohextrakt

A) Ultraschall

Das Zellpellet wurde in 5 ml (pro 50 ml Kultur) Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], ±1 mM EDTA) mit 1 mM Proteaseinhibitor PMSF und 10 µg/ml DNase I resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 10 min bei Intervalleinstellung 50 % bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 5 000 rpm in der Hettich-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert.

B) French-Press

Das Zellpellet wurde in 30 ml (pro Liter Kultur) Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], ± 1 mM EDTA) resuspendiert und 1 mM PMSF versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer *French-Press* (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2 000 psi (140 kg/cm²) in mehreren Durchgängen aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend 30 min mit 10 µg/ml DNase I und 1 mM MgCl₂ auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor 13 000 rpm, 20 min, 4°C) in der Sorvall wurde der Überstand auf Eis gelagert.

C) Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand einer Ultrazentrifugation bei 100 000 x g in der Beckmann-Ultrazentrifuge (TY65-Rotor 40 000 rpm, 1.5 h, 4°C) unterzogen. Das so gewonnene Membranpellet wurde in Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], ± 1 mM EDTA) aufgenommen und eine modifizierte Membranproteinbestimmung

nach Lowry (1951) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde dann auf 10 mg/ml eingestellt. Die so gewonnene Membranfraktion wurde mit Detergenz (z.B. n-Dodecyl- β -D-Maltosid) für 30 min auf Eis solubilisiert, wobei ein Verhältnis von 1.5 mg Detergenz/mg Membranprotein eingestellt wurde. Nach erfolgter Solubilisierung wurden ungelöste Membranreste durch eine weitere Ultrazentrifugation (30 min, 4°C) pelletiert. Die 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, Hilden) wurde mit 1-5 ml Säulenmaterial (*StrepTactin*) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], \pm 1 mM EDTA) equilibriert. Die Zellextrakte, welche das gewünschte *Strep*-tag II[®]-Fusionsprotein enthielten, wurden auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 10 Vol. Puffer W mit 1 mM NaCl und 5 Vol. Puffer W (ohne NaCl) entfernt. Das Target-Protein wurde mittels 3–4 Vol. Puffer E (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], \pm 1 mM EDTA, 2.5 mM Desthiobiotin) eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch Spülen mit 10 Vol. Puffer R (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM HABA) regeneriert.

Für die Reinigung von Membranproteinen enthielten alle verwendeten Puffer 0.05 % des zum Solubilisieren verwendeten Detergenz (n-Dodecyl- β -D-Maltosid).

2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.7.2.1. Proteinbestimmung von Membranproteinen (Lowry *et al.*, 1951, modifiziert)

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

1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (frisch hergestellt)
240 mg/ml Trichloressigsäure (TCA)
0.8 M NaOH

Reagenz A: 0.2 g Dinatrium-Tartrat
 10 g Na₂CO₃
 68 ml 0.8 M NaOH
 ad 100 ml H₂O_{bidest}

Reagenz B:	2 g Dinatrium-Tartrat 1 g CuSO ₄ 12.5 ml 0.8 M NaOH ad 100 ml H ₂ O _{bidest} (lichtgeschützt aufbewahrt)
Mix:	25 Vol. Reagenz A und 2 Vol. Reagenz B
Reagenz C:	1 Vol. Folin Ciocalteu Reagenz mit 2 Vol. H ₂ O _{bidest}

Der Reagenzmix und Reagenz C wurden jeweils vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Die Proben wurden mit Puffer auf 600 µl verdünnt, mit 10 µl 1 %iger (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und nach dem Durchmischen 15 min bei RT inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 200 µl 240 mg/ml TCA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation 7 min, 12 000 rpm in einer Sigma-Tischzentrifuge wurden die Überstände sorgfältig entfernt und das Pellet mit 450 µl Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente resuspendiert waren, wurde 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.

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

Das Prinzip des BCA-Testes ist ähnlich dem der Lowry-Methode. Die BCA-Arbeitslösung wird aus 50 Teilen Reagenz A (vom Hersteller: bestehend aus Bicinchonic Acid, Natriumcarbonat, Natriumtartrat und Natriumbicarbonat in 0.1 N NaOH, pH 11.25) und 1 Teil Reagenz B (4 % [w/v] Kupfer(II)sulfatpentahydrat) hergestellt. Zu 50 µl Proteinlösung wurden 1 ml BCA-Arbeitslösung 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.

2.7.2.3. 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 durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde. Die Herstellung der Bradford-Lösung erfolgte, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96 %igen Ethanol 1 h gerührt und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85 %ige o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei RT im Dunkeln.

2.7.3. Konzentrieren von Proteinlösungen

2.7.3.1. TCA-Fällung

Zur Proteinlösung wurde $\frac{1}{4}$ Vol. eiskalter 50 %iger Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Dann wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 7 min in der Sigma-Tischzentrifuge bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet konnte nach Entfernung der TCA-Reste im gewünschten Puffervolumen aufgenommen werden.

2.7.3.2. Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Proteinlösungen konnten mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert oder in andere Lösungen umpuffert werden. Vor dem Benutzen wurden die Vivaspin-Röhrchen einmal mit dem zuverwendenden Puffer gespült (5 000 rpm, 5 min, 4°C, Hettich-Zentrifuge). Anschließend wurde die einzuengende Proteinlösung in die Röhrchen gegeben und erneut bei 5 000 rpm, 4°C zentrifugiert bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war. Beim Umpuffern wurde der neue Puffer mindestens dreimal über die Säule gegeben. Zur Lagerung wurde die Säule 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 (Fa. Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Dabei wurden Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm verwendet. Die Größe der Gele betrug 8.5 x 7.5 x 0.1 cm.

2.7.4.1. 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] β -Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau [BPB]) gemischt und 5 min bei 96°C denaturiert. Bei der Auftragung von Membranproteinen wurden die in Probenpuffer verdünnten Proben für 10 min bei 40°C inkubiert, um die Proteinbanden stärker zu fokussieren. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufs Gel.

2.7.4.2. Proteinmarker

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

Dabei wurden die New England Biolabs-Marker (NEB GmbH, Schwalbach i. Taunus): der *Prestained Protein Marker, Broad Range* (#7708S) mit acht Proteinen der Größen 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5 und 6.5 kDa und der *Protein Marker, Broad Range* (#7702) mit 13 Proteinen von 212, 158, 116, 97.2, 66.4, 55.6, 42.7, 36.5, 26.6, 20, 14.3, 6.5, 3.4 und 2.3 kDa verwendet. Außerdem kam der *Strep-tag Protein-Marker* von IBA GmbH, Göttingen mit Proteinbanden der Größen 100, 60, 45, 30, 23.5 und 16 kDa zum Einsatz.

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 7.5, 10 oder 12.5 %ige Gele zum Einsatz.

Trenngel:	7.5 %	10 %	12.5 %
30 % Acrylamid,			
0.8 % Bisacrylamid			
Stammlösung	1.5 ml	2.0 ml	2.5 ml
1.88 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
5 g/l SDS	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
H ₂ O _{bidest}	2.1 ml	1.6 ml	1.1 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
APS (10 %ig)	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 ₂ O _{bidest}	0.87 ml
	TEMED	2 µl
	APS (10 %ig)	10 µl

Der Elektrodenpuffer (2 mM Tris [pH 8.3], 0.2 M Glycin, 10 g/l SDS) wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben. Das Gel wurde (ohne *Spacer*) mittels Klemmen an der Kammer befestigt und der Kamm unter Puffer entnommen. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung durchgeführt. Dabei lag zuerst eine Stromstärke von 10 mA pro 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. Gradienten-SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Gradienten-Gele zeichneten sich durch eine kontinuierliche Zunahme der Polyacrylamidgel-Konzentration vom Sammelgel bis zum Ende des Trenngeles aus. So wurde sichergestellt, dass kleinere Proteine nicht aus dem Gel und sehr große Proteine zumindest ins Trenngel liefen. Mit Gradienten-Gelen konnte die gesamte Bandbreite eines Proteinspektrums aufgetrennt und dargestellt werden.

Trenngele (leichte und schwere Lösung):	leicht	schwer
	4 %	10 %
30 % (w/v) Acrylamid,		
0.8 % (w/v) Bisacrylamid		
Stammlösung	0.53 ml	1.33 ml
1.88 M Tris-HCl (pH 8.8)	0.8 ml	0.8 ml
H ₂ O _{bidest}	1.87 ml	1.06 ml
0.5 % (w/v) SDS	0.8 ml	0.8 ml
TEMED	3.3 µl	3.3 µl
10 % (w/v) APS	20 µl	20 µl

Die beiden Gellösungen (je 4 ml, ohne APS und TEMED) wurden in die Kammern eines Gradientenmischers gegeben, wobei die vordere Kammer mit 10 %iger Gellösung befüllt wurde. Vorher war der Verbindungskanal mit der 4 %igen Gellösung geflutet worden. Nach

Zugabe von je 3.3 μl TEMED und 20 μl 10 % (w/v) APS wurde der Kanal geöffnet und das Gelmaterial unter Rühren mittels einer Miniperistaltikpumpe (2232 Microperpex S, LKB Bromma [Pharmacia, Freiburg]) mit Stufe 21 zwischen die präparierten Glasplatten gepumpt. Es wurde hierbei ohne Sammelgel gearbeitet. Der Kamm zur Formung der Geltaschen wurde direkt eingesetzt. Das weitere Vorgehen entsprach 2.7.4.3.

2.7.4.5. Saure SDS-PAGE-Gelelektrophorese bei pH 2.4 (nach Fairbanks und Avruch, 1972)

In diesem System können alkalilabile Proteine (z. B. Acylphosphat-Phosphoproteine) unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer relativen Molmasse aufgetrennt werden. Es wurden 8 %ige Gele verwendet.

40 % Acrylamid,	
1.33 % Bisacrylamid	
Stammlösung	2 ml
50 mM H_3PO_4 -NaOH (pH 2.4) mit	
0.5 % SDS	8 ml
0.625 M Ascorbinsäure-KOH (pH 7.0)	10 μl
30 % H_2O_2	20 μl
20 mM FeSO_4	10 μl

Die Gellösung wurde luftblasenfrei zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Formung von Geltaschen eingesetzt. Als Probenpuffer wurde der 2 x SDS-Probenpuffer (2.7.4.1.) 1:1 mit 50 mM H_3PO_4 -NaOH, pH 2.4 gemischt. Der Laufpuffer wurde 50 mM H_3PO_4 -NaOH (pH 2.4), 0.5 % SDS in Anoden- und Kathodenkammer gegossen. Das Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Proteine bei einer Stromstärke von 15 mA 3-4 h bei Raumtemperatur aufgetrennt.

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

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

Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 10 min in Anodenpuffer II (25 mM Tris [pH 10.4], 10 % Methanol) geschwenkt. Sechs Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und drei Lagen mit Kathodenpuffer (25 mM Tris [pH 9.4], 40 mM Glycin, 10 % [v/v] Methanol), zwei mit Anodenpuffer I (0.3 mM Tris [pH 10.4], 10 % Methanol) und eine mit Anodenpuffer II getränkt. Das Gel wurde nach

Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung beim Transfer störender Salze 10 min in Kathoden-Puffer geschwenkt. In der Blotapparatur (Biometra Göttingen) wurden zwei Lagen Whatman-Papier (getränkt in Anodenpuffer I), eine Lage Whatman-Papier (getränkt in Anodenpuffer II), die Membran (in Anodenpuffer II), das Proteingel und noch einmal drei Lagen Whatman-Papier (getränkt in Kathodenpuffer) luftblasenfrei übereinandergelegt, die Apparatur verschlossen und Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (2.5 mA/cm² Gelfläche) über 45 min. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt und die Membran luftgetrocknet.

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

Der Proteinnachweis mittels Doppelimmunpräzipitation beruht auf der Kreuzreaktion eines primären Antikörpers (IgG) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Mit Hilfe eines an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzyms (z.B. Peroxidase) erfolgt der Nachweis der gebildeten Protein/IgG/Anti-IgG-Komplexe über eine Farbreaktion bzw. Lichtreaktion, d.h. Schwärzung eines Röntgenfilms durch Lichtemission.

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei Raumtemperatur in sauberen Plastikschalen und unter Schütteln durchgeführt. Die PVDF-Membran mit den darauf transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in Blockierungspuffer (PBS [4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl] + 5 % Magermilchpulver + 0.5 % Tween20) inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Membran für 3 x 5 min mit PBS-Tween (PBS mit 0.1 % Tween20 [v/v]). Danach wurde die Membran in PBS-Tween mit dem gegen das nachzuweisende Antigen-Protein gerichteten ersten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich die Konzentration des Antikörpers nach dessen Spezifität richtete. Es wurden Verdünnungen zwischen 1:5 000-1:50 000 eingesetzt (Tab. 4). Der ersten Antikörper-Inkubation folgte ein 3 x 15-minütiges Waschen der Membran in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurde die Membran mit einem Anti-IgG-Antikörper für 1 h inkubiert, der in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den darauf folgenden Waschsritten (3 x 15 min in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunkomplexe an.

Bei der ECL-Nachweisreaktion (Lichtreaktion) wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 15 ml Detektionslösung I (1.5 ml 1 M Tris-HCl [pH 8.5] und 8.16 µl H₂O₂ ad 15 ml H₂O_{bidest}) und Detektionslösung II (1.5 ml 1 M Tris-HCl [pH 8.5], 168 µl 250 mM Luminol [gelöst in DMSO], 66 µl 30 mM p-Cumarsäure [gelöst in DMSO] ad 15 ml H₂O_{bidest}) gegeben, durch Schwenken gemischt und 1 min inkubiert. Anschließend wurde die

Reaktionslösung abgegossen, die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und ein Röntgenfilm (Lumifilm, Amersham, Little Chalfont, England) 30 s bis 10 min exponiert.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper (AK) und ihre Verdünnungen

Bezeichnung	AK-Typ	Antigen	Verdünnung
Primärer AK			
Anti-CzcA-AK	Kaninchen-IgG	CzcA	1:10 000
Anti-CzcB-AK	Kaninchen-IgG	CzcB	1:15 000
Anti-CzcD-AK	Kaninchen-IgG	CzcD	1:5 000
Sekundärer AK			
Anti-Kaninchen-IgG-AK (Meerrettich-Peroxidase-Konjugat)	Maus-IgG	Kaninchen-IgG	1:50 000

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

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

Die Blot-Membran (81 cm²) wurde in 15 ml Inkubationspuffer SI (vom Hersteller) 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Alternativ konnte für den SI-Puffer auch 1 x PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl) mit 3 % BSA (w/v) und 0.5 % Tween20 verwendet werden. Es wurden 3.7 µl *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat in den Ansatz gegeben und weitere 30 min bei RT geschüttelt. Die Membran wurde mit H₂O_{bidest} gespült und dann 2 x 2 min in Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8.0]) und anschließend 2 min in H₂O_{bidest} gewaschen. Anschließend wurden 15 ml Peroxidase-Reaktionspuffer ER (IBA, Göttingen; alternativ konnte auch 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 verwendet werden) auf die Membran gegeben und 0.1 ml 3 % (w/v) 4-Chlornaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol) sowie 15 µl Peroxidase-Substrat (30 % H₂O₂) hinzupipettiert und bis zu 30 min zur Färbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O_{bidest} abgestoppt und die Membran luftgetrocknet.

2.7.5. Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.7.5.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (nach Weber und Osborn, 1969)

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung (2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0.5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O_{bidest}) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärbelösung (40 % Ethanol, 7.5 % Essigsäure). Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O_{bidest} aufbewahrt.

Zur Färbung von Markerspuren auf PVDF-Membranen wurden diese 1 min in Färbelösung (2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 400 ml Methanol, 75 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O_{bidest}) inkubiert, anschließend ebenfalls unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt und luftgetrocknet.

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

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 100 ml Fixierlösung (50 % [v/v] Methanol, 12 % [v/v] Ethanol in H₂O_{bidest}) für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gel für eine Minute in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und für zwei Minuten in 100 ml Vorbehandlungslösung (40 mg Natriumthiosulfat in H₂O_{bidest}) inkubiert. Bevor das Gel für 20 min imprägniert wurde (200 mg Silbernitrat und 50 µl 37 % Formaldehyd in 100 ml H₂O_{bidest}), wurde es dreimal 20 s in H₂O_{bidest} gewaschen. An einen erneuten kurzen Waschschrift mit H₂O_{bidest} schloss sich die Entwicklung (6 g Na₂CO₃, 1 mg Na₂S₂O₃ und 70 µl Formaldehyd in 100 ml H₂O_{bidest}) an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem nacheinander zweimal zwei Minuten mit H₂O_{bidest}, einem Methanol (50 % [v/v])-Essigsäure (12 % [v/v])-Gemisch und 100 ml 50 % Methanol (v/v) in H₂O_{bidest} gewaschen wurde. Anschließend konnte das Gel in H₂O_{bidest} aufbewahrt oder getrocknet werden.

2.7.5.3. Trocknung von Polyacrylamid-Gelen

Um die PAGE-Gele haltbar zu machen, wurden sie mittels Vakuumvorrichtung getrocknet. Die Gele wurden 15 min in Geltrocknungslösung (3 % [v/v] Glycerin, 10 % [v/v] Methanol) inkubiert. Für die Trocknung wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Geltrocknungslösung benetzte Folien gelegt. Nach Anlegen des Vakuums wurde der Geltrockner (Gel Slab Drier GSD-4, Pharmacia, Freiburg i. Breisgau) 75 min getrocknet. Die Gele verblieben danach noch bis zur vollständigen Abkühlung unter Vakuum.

2.7.6. Phosphorylierungsversuche mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP

2.7.6.1. Zellanzucht und Membranpräparation

Der *E. coli*-Stamm GG48 wurde mit verschiedenen Plasmidkonstrukten (pASK-IBA3-Derivate mit CPx-Typ ATPase-Genen) transformiert. Aus einer Vorkultur, die über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, wurden 200 ml frisches LB-Medium 2 %ig beimpft. Die Hauptkulturen wurden schüttelnd bei 30°C inkubiert, bis sie eine Optische Dichte von $\text{OD}_{600}=0.8$ erreicht hatten. Die Expression der Proteine (CPx-Typ ATPasen) wurde durch die Zugabe von 200 $\mu\text{g/l}$ AHT induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 8 000 rpm und 4°C (Sorvall, Tuttingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

Die Zellpellets wurden in 25 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF resuspendiert und mittels zweimaliger Passage durch die *French* Presse (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2 000 psi (140 kg/cm^2) aufgeschlossen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 mM MgCl_2 und 10 $\mu\text{g/l}$ DNase 30 min auf Eis inkubiert. In der Sorvall wurden die Zelltrümmer entfernt (15 min, 13 000 rpm, SS34 Rotor, 4°C). Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 100 000 $\times g$ in der Beckmann-Zentrifuge zur Separation der Membranen (TY65-Rotor, 40 000 rpm, 4°C, 1.5 h). Die Membranen wurden in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 % Glycerol, 1 mM PMSF gewaschen und erneut mittels Ultrazentrifugation abzentrifugiert (TY65-Rotor, 40 000 rpm, 4°C, 1.5 h). Das Membranpellet wurde in 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 % Glycerol, 1 mM PMSF aufgenommen und nach erfolgter Proteinbestimmung mittels BCA-Kit (2.7.2.2.) auf Eis bzw. bei -20°C gelagert.

2.7.6.2. Phosphorylierungsassay mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (nach Okkeri und Haltia, 1999)

40 μg Membranprotein wurden zu 140 μl Reaktionspuffer 20 mM Bis-Tris-propan (pH 6.0), 200 mM KCl, 10 μM EDTA gegeben. es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Dann wurden je 7.5 μl einer 1 mM Metalllösung (Endkonzentration 50 μM) bzw. 7.5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 5 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP zugegeben und die Reaktion durch Gabe von 1.2 μl 1 M MgCl_2 gestartet. Nach 2 min wurden die Membranproteine durch Trichloressigsäure gefällt (2.7.3.2.). Das Pellet wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und dann mit 50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaOH}$ (pH 2.4) gewaschen. Das in 20 μl saurem Probenpuffer (1 Vol SDS-Probenpuffer [2.7.4.1.] und 1 Vol. 50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaOH}$ [pH 2.4], 2 % SDS) aufgenommene Membranpellet wurde auf ein saures SDS-Gel (2.7.4.5.) aufgetragen und bei 15 mA aufgetrennt. Bei Verdrängungsexperimenten wurden nach den 2 min Reaktionszeit vor der Fällung der Proteine 2 μM unmarkiertes ATP zum Reaktionsansatz zugegeben und dieser weitere 2 min inkubiert. Dann wurde wie mit den

anderen Proben weiterverfahren. Zur Größenbestimmung wurde zusätzlich gereinigtes Protein (CPx-Typ ATPase) oder NEB *Protein Marker, Broad Range* auf das Gel aufgetragen. Die nichtradioaktiven Markerspuren wurden nach dem Lauf abgeschnitten und Coomassie-gefärbt (2.7.5.1.). Das restliche Gel wurde mittels Gelrockner getrocknet (2.7.5.3.) und dann auf einen Phosphoscreen (Fujifilm, BAS Cassette 2325) zwischen 12-24 h exponiert. Die Auswertung erfolgte mittels des Phosphoimagers Storm (Pharmacia, Freiburg) und dem Scan-Programm. Die Signale auf dem Phosphoscreen wurde durch den Eraser (Pharmacia, Freiburg) wieder entfernt.

2.7.7. *In vitro* Bindung von Proteinen an Metall-Chelat-Sepharose (verändert nach Pharmacia)

Um die Bindung von Transportproteinen an verschiedene Metalle *in vitro* zu untersuchen, wurde die Metall-Affinitäts-Chromatographie genutzt. 200 µl des Säulenmaterials (*Metal chelating sepharose*, Pharmacia) wurden mit 2 ml H₂O_{bidest} gewaschen, anschließend mit 2 ml 100 mM Metalllösung (ZnCl₂, NiCl₂, CdCl₂, CuCl₂) inkubiert. Daraufhin wurden die *Beads* mit 3 ml Bindungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl [pH 7.2], 0.05 % n-Dodecyl-β-D-Maltosid) gewaschen. 60 µg Protein, gelöst in 150 µl Bindungspuffer, wurden mit 50-100 µl metallbeladenen *Beads* 1 h bei Raumtemperatur im 1.5 ml Eppendorf-Tube leicht geschüttelt. Die *Beads* wurden kurz anzentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und die *Beads* mit 2 ml Bindungspuffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein abzuwaschen. Eluiert wurde mit 1.5 ml Bindungspuffer mit 10 mM EDTA. Die 1.5 ml Elution wurde einer TCA-Fällung (2.7.3.1) unterzogen und in 50 µl Bindungspuffer aufgenommen. Davon wurden 25 µl in einem SDS-Laemmli-Gel analysiert.

2.7.8. *In vivo* Vernetzungsexperimente mit Formaldehyd

Je 1 ml *R. metallidurans*-Zellen, von denen die Zelldichte mittels Klett-Summerson-Colorimeter bestimmt wurde, wurden zum Ende der spätexponentiellen Phase geerntet. Mittels der Eichkurve nach Schwuchow, 1995 konnte anhand der gemessenen Zelldichte das Trockengewicht ermittelt werden. Das Pellet wurde in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.2) gewaschen und anschließend in 1 ml desselben aufgenommen. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit 0.25 % (v/v) Formaldehyd für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Proben abzentrifugiert (10 min, 12 000 rpm, Tischzentrifuge) und das Pellet zum Abstoppen der Crosslink-Reaktion in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) aufgenommen, so dass die Zellen in einer Konzentration von 10 µg Trockengewicht/µl vorlagen. Anschließend wurden die Proben (je 80 µg Trockengewicht) in 4-10 %igen Polyacrylamidgradientengelen (2.7.4.4.) aufgetrennt und nach dem Lauf auf eine PVDF-Membran mittels Semi-Dry-blot

übertragen. Die Membran wurde dann einer Doppelimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen CzcA bzw. CzcB unterzogen.

2.8. Transportstudien mit radioaktiven Metallisotopen

2.8.1. Aufnahmeexperimente an *E. coli*-Zellen mit radioaktiven Metallen

(Rosen, 1986, Nies und Silver, 1989b)

Für jede Expression wurde der *E. coli*-Stamm GG48 erneut mit den verschiedenen pASK3-IBA3-Derivaten transformiert. Nach einer Vorkultur in LB-Medium bei 37°C, 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 CPx-Typ ATPasen durch die Zugabe von 200 µg/l AHT induziert und die Zellen weitere 3 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach dem Erreichen der frühstationären Wachstumsphase wurden die Zellen bei ca. 150 KE 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 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ oder $^{109}\text{Cd}^{2+}$ -Lösung (2 mM, Du Pont, Bad Homburg) gestartet. Nach definierten Zeiten wurden 400 µl Proben entnommen und filtriert (NC 45, Schleicher und Schüll, Dassel). Um unspezifisch gebundenes Metall zu entfernen, wurden die Filter zweimal mit 3 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.0], 10 mM MgCl_2) gewaschen und in ein Mini-Poly-Q-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready SafeTM wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt. 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 vermessen.

2.8.2. Aufnahme radioaktiver Metalle durch *R. metallidurans*

15 ml Tris-Minimalmedium wurden mit einer 48 h Vorkultur auf 30 KE angeimpft und schüttelnd bei 30°C inkubiert. Nach Verdopplung der Zellen wurden mit einem Klett-Summerson-Colorimeter die Klett-Einheiten (KE) zur Bestimmung des Trockengewichts gemessen. Die Aufnahmemessungen erfolgten in 100 ml Seitenarmkolben bei 30°C und 140 rpm im Wasserschüttelbad (Gyrotorry). Es wurden 15 ml Zellen vorgelegt. Durch Zugabe

von 1 μM (Endkonzentration) einer radioaktiven Metall-Stammlösung von $^{109}\text{CdCl}_2$ (Du Pont, Bad Homburg) wurde die Reaktion gestartet. Nach definierten Zeiten wurden Proben (400 μl) entnommen und filtriert (Membranfilter NC45). Die Filter wurden 2 x mit 3 ml Waschpuffer (10 mM Tris [pH 7.0], 10 mM MgCl_2) gewaschen und in ein Mini-Poly-Q Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe[™] wurde die Radioaktivität von Cadmium im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 4 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 400 μl Probe entnommen und direkt mit 4 ml Ready Safe[™] gemischt und gemessen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Heterologe Expression der CPx-Typ ATPasen *zntA* und *cadA* aus *Ralstonia metallidurans* in *Escherichia coli*

3.1.1. ZntA und CadA vermitteln im metallsensitiven *E. coli*-Stamm GG48 Resistenz gegenüber Zink und Cadmium

In *R. metallidurans* CH34 vermittelt das *czc*-System auf dem Megaplasmid pMOL30 am effektivsten Resistenz gegen die Schwermetallkationen Cobalt, Zink und Cadmium. Im megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm AE104 ist gegenüber Zink- und Cadmiumionen noch eine Restresistenz vorhanden. Die Vermutung liegt nahe, dass es noch weitere chromosomal kodierte Effluxtransporter für diese Ionen gibt. Tatsächlich zeigten PCR-Analysen, die aufgrund der vollständigen Sequenzierung des *R. metallidurans*-Genoms (http://www.genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html) durchgeführt werden konnten, dass zwei putative Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierende CPx-Typ ATPasen (Gen4648 auf *contig649* und Gen6751 auf *contig691*)¹ auf dem Chromosom lokalisiert sind (Anton, 2001).

Um die Transporteigenschaften der putativen Genprodukte zu untersuchen, wurden die Gene in den verschiedenen *E. coli*-Stämmen DW3110 und GG48 exprimiert. Der Stamm GG48 zeichnet sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zink und Cadmium aus. Diese beruht auf der Mutation der Gene für zwei native Metalleffluxtransporter, *zntA* und *zitB*. ZntA ist eine Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierende CPx-Typ ATPase und ZitB stellt eines der beiden nativen CDF-Proteine (*cation diffusion facilitator*) aus *E. coli* dar (Grass *et al.*, 2001). Im Stamm DW3110 ist das Gen für die Cu²⁺-transportierende CPx-Typ ATPase CopA durch Insertion einer Kanamycinkassette zerstört, was zu einer erhöhten Kupfersensitivität führt (Rensing *et al.*, 2000).

Beide putative Gene wurden über PCR (Primer Znt649 5'*EcoRI* und Znt649 3'*BamHI* für Gen4648 / Primer Znt691 5'*BamHI* und Znt691 3'*XbaI* für Gen6751) aus chromosomaler DNA des megaplasmidfreien *R. metallidurans*-Stammes AE104 amplifiziert und nach Zwischenklonierung in pGEM-T Easy in pASK-IBA3 umkloniert. Die entstandenen Plasmide pECD800 (Gen4648) und pECD799 (Gen6751) wurden zur Kontrolle ansequenziert. Die *E. coli* Stämme DW3110 und GG48 wurden mit den Plasmiden transformiert.

¹ Die in dieser Arbeit verwendeten Gen- und *contig*-Nummern stammen aus der Annotation August 2002 (Siehe Anhang).

Die Transkription der Fragmente (Gen4648 und Gen6751) in pASK-IBA3 stand unter Kontrolle des *tetA*-Promotors. Die Expression konnte somit gezielt durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) induziert werden.

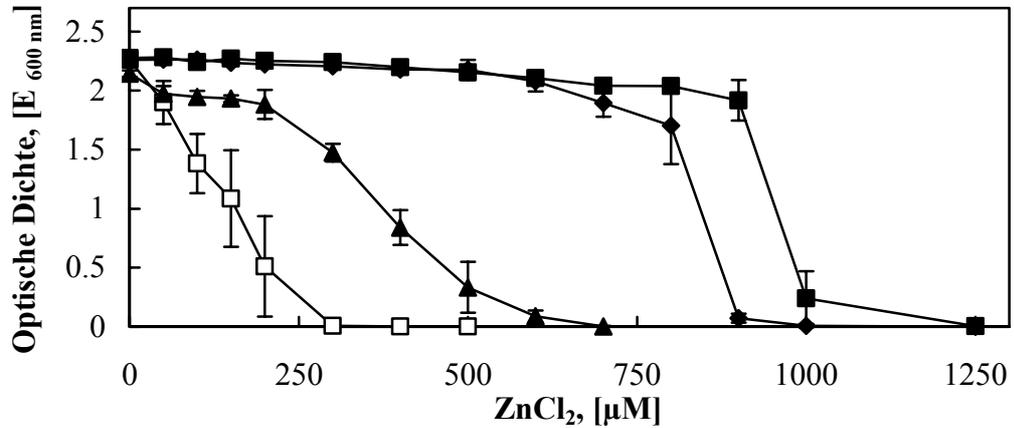
In Wachstumsversuchen des Stammes DW3110(*copA::kan*) mit pECD800(Gen4648) oder mit pECD799(Gen6751) in LB-Medium mit verschiedenen Kupferkonzentrationen konnte keine Erhöhung der Kupferresistenz gegenüber dem Kontrollstamm DW3110 mit pASK-IBA3 beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Die *E. coli*-Stämme GG48(*zntA::kan, ΔzitB::cm*) mit pECD800(Gen4648) und GG48 mit pECD799(Gen6751) zeichneten sich durch ein besseres Wachstum gegenüber dem sensitiven Kontrollstamm GG48 mit pASK-IBA3 in LB-Medium mit verschiedenen Zink- oder Cadmiumkonzentrationen aus (Abb. 2). Bei dem sensitiven *E. coli*-Stamm GG48 führte die Inkubation mit 200 μM ZnCl₂ oder 50 μM CdCl₂ zu einer 50 %igen Inhibierung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle ohne Metall. Der Wildtyp *E. coli*-Stamm W3110, in dem *zntA* und *zitB* vorhanden waren, zeigte erst bei der Inkubation mit 950 μM ZnCl₂ bzw. 600 μM CdCl₂ eine 50 %ige Inhibierung des Wachstums. Die *in trans*-Komplementation des sensitiven *E. coli*-Stammes GG48(*zntA::kan, ΔzitB::cm*) mit Gen4648 führte zur fast vollständigen Wiederherstellung des Phänotyps des *E. coli* Wildtyp-Stammes W3110 gegenüber Zink, aber nur zu einem leicht erhöhtem Anstieg der Cadmiumresistenz (50 % Inhibierung des Wachstums bei 800 μM ZnCl₂ bzw. 100 μM CdCl₂). Aus diesem Grund wurde das Gen4648 *zntA* benannt (*znt* für Zn²⁺-Transporter). Durch die Anwesenheit von Gen6751 erhöhte sich die Resistenz gegenüber Zink bzw. Cadmium auf dieselben Konzentrationen (50 %ige Inhibierung des Wachstums bei 350 μM ZnCl₂ und CdCl₂). Dies führte zu einem höheren Anstieg der Cadmium- als der Zinkresistenz in Bezug auf den sensitiven GG48-Kontrollstamm. Daher wurde das Gen *cadA* (*cad* für Cadmium-Transporter) genannt.

Bei Untersuchungen der Stämme mit verschiedenen Pb(NO₃)₂-Konzentrationen auf LB-Agar-Platten (mit 50 μg/l AHT als Induktor) zeigte der *E. coli*-Stamm GG48 mit pECD800 durch die Expression von *zntA* (1.5 mM) eine erhöhte Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) gegenüber der Negativkontrolle GG48 mit pASK-IBA3 (1 mM). Das Wildtypniveau von W3110 mit pASK-IBA3 von 2 mM konnte allerdings nicht erreicht werden. Die Expression von *cadA* hatte in GG48 mit pECD799 keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Blei (MIC von 1 mM).

Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei den CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA aus *R. metallidurans* um Zink- und Cadmium-transportierende Proteine handelte (im Fall von ZntA möglicherweise auch um ein Bleiionen-transportierendes System).

a)



b)

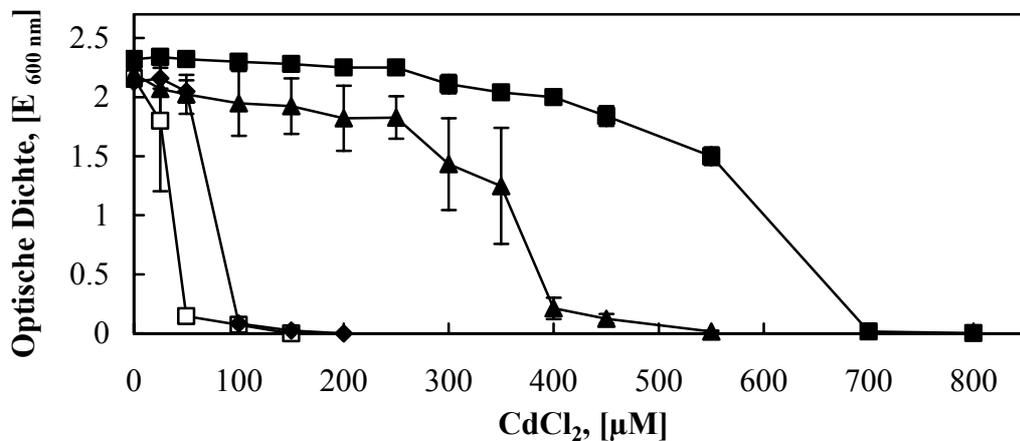


Abb. 2: Wachstumsverhalten von *E. coli* GG48(*zntA*::kan, Δ *zitB*::cm) mit pASK-IBA3 [□], mit pECD799(*cadA*) [▲] oder mit pECD800(*zntA*) [◆] und Wildtyp W3110(pASK-IBA3) [■] unter a) Zink- und b) Cadmiumstress

Die Hauptkulturen wurden aus einer neunstündigen Vorkultur 1:200 in frischem LB-Medium mit 50 µg/l AHT und verschiedenen Metallionenkonzentrationen verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt und gegen die eingesetzten Metallionenkonzentrationen aufgetragen. Als Kontrollstämme dienen der *E. coli* Wildtyp-Stamm W3110 mit pASK-IBA3 und der metallsensitive Stamm GG48 mit pASK-IBA3. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Messungen und deren Standardabweichungen.

3.1.2. Die durch ZntA bzw. CadA vermittelte Schwermetallresistenz in *E. coli* beruht auf verminderter Akkumulation

In Wachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Resistenz gegenüber Zink und Cadmium im *E. coli*-Stamm GG48(*zntA*::kan, Δ *zitB*::cm) mit den Genen für ZntA bzw. CadA aus *R. metallidurans in trans* erhöhte. Mit Hilfe von Transportmessungen an frühstationären Zellen mit den Isotopen Zink ($^{65}\text{Zn}^{2+}$) und Cadmium ($^{109}\text{Cd}^{2+}$) sollte untersucht werden, inwieweit sich die Akkumulation dieser Metalle in den *E. coli*-Zellen durch die Expression von *zntA* bzw. *cadA* änderte. Bei der bestimmten Metallaufnahme in μmol Metallion/g Trockengewicht (TG) ging fest an die Zellmembran gebundenes Metall in die Werte mit ein.

Die *E. coli* Stämme GG48 mit pASK-IBA3, GG48 mit pECD800(*zntA*) und GG48 mit pECD799(*cadA*) wurden in Tris-Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen und nach Erreichen einer Optischen Dichte von 75-100 Klett-Einheiten mit 200 $\mu\text{g/l}$ AHT für 3 h inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in Tris-Puffer aufgenommen und die Akkumulationsexperimente nach der Filtrationsmethode durchgeführt. Die aufgenommene Zink- bzw. Cadmiummenge wurde im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt. Bei einer Außenkonzentration von 10 μM Zn^{2+} stieg die Menge dieses Schwermetallions im metallsensitiven Kontrollstamm GG48(pASK-IBA3) innerhalb der ersten 20 min schnell auf 4.4 μmol $^{65}\text{Zn}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht an, während weiterer 20 min war nur noch ein leichter Anstieg bis auf 5.3 μmol $^{65}\text{Zn}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht zu verzeichnen (Abb. 3a). Der Stamm GG48 mit pECD800(*zntA*) hatte bereits nach 1 min eine maximale Metallmenge von 1.4 μmol $^{65}\text{Zn}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht akkumuliert, die bis 40 min stabil blieb. Der Stamm GG48 mit pECD799(*cadA*) hatte nach 1 min 1 μmol $^{65}\text{Zn}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht aufgenommen, die Menge erhöhte sich bis zum Ende der Messung nicht mehr. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Akkumulationsexperimenten mit radioaktivem Cadmium erhalten. Der Kontrollstamm GG48(pASK-IBA3) besaß nach 20 min eine Cadmiummenge von 7.5 μmol $^{109}\text{Cd}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht, innerhalb der nächsten 20 min stieg die Metallmenge bis auf 7.7 μmol $^{109}\text{Cd}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht an (Abb. 3b). Durch die zusätzliche Expression von *zntA* bzw. *cadA* aus *R. metallidurans* war die Akkumulation von Cadmium stark herabgesetzt. Die Stämme GG48 mit pECD800(*zntA*) und GG48 mit pECD799(*cadA*) verfügten beide nach 40 min über eine Menge von rund 0.9 μmol $^{109}\text{Cd}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht. Bereits nach 1 min waren in beiden Stämmen Werte in dieser Größenordnung erreicht, die bis zu 40 min stabil blieben.

Die Daten zeigten, dass durch die Anwesenheit von ZntA bzw. CadA aus *R. metallidurans* im metallsensitiven *E. coli*-Stamm GG48(*zntA*::kan, Δ *zitB*::cm) die Zink- und Cadmiumakkumulation dieses Stammes bei einer Metallaußenkonzentration von 10 μM deutlich herabgesetzt wurde.

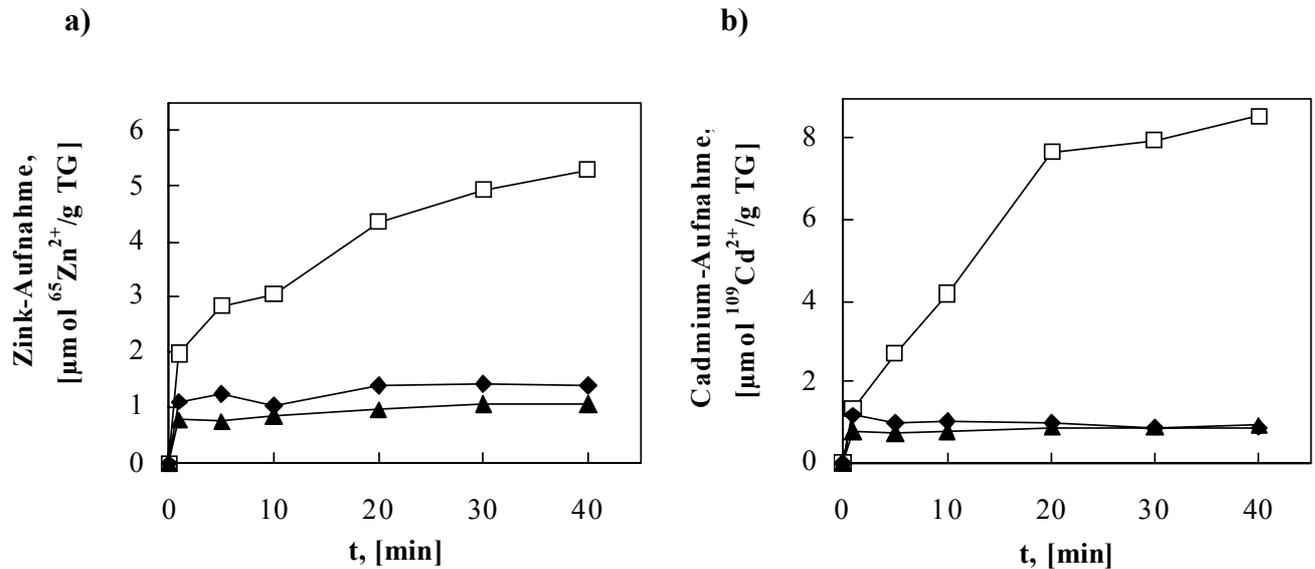


Abb. 3: Aufnahmemessungen mit a) $^{65}\text{Zn}^{2+}$ und b) $^{109}\text{Cd}^{2+}$ in *E. coli* GG48-Derivaten

Die Aufnahme von 10 μM radioaktivem a) $^{65}\text{Zn}^{2+}$ und b) $^{109}\text{Cd}^{2+}$ wurde an frühstationären Zellen von GG48(*zntA*::kan, Δ *zitB*::cm) mit pECD800(*zntA*) [◆], GG48 mit pECD799(*cadA*) [▲] und der Negativkontrolle GG48 mit pASK-IBA3 [□] über einen Zeitraum von 40 min bestimmt. Die Mittelwerte aus je zwei unabhängigen Experimenten wurden gegen die Zeit aufgetragen.

3.2. Funktionen von ZntA und CadA in *R. metallidurans* AE104

3.2.1. Die Deletionen von *zntA* und *cadA* führen zu erhöhter Zink- und Cadmiumsensitivität in *R. metallidurans* AE104

Um den Einfluss der Gene *zntA* und *cadA* auf das Resistenzverhalten gegenüber Schwermetallen in *R. metallidurans* zu untersuchen, wurden von diesem Stamm Einzeldelentionsmutanten und Doppelmutanten erzeugt. Es wurde mit dem plasmidlosen Stamm AE104 gearbeitet. Die Deletionen der Gene wurden mit Hilfe des Vektors pLO2 eingeführt. Nach der Deletion blieben 9 bp vom 5'Ende und 9 bp vom 3'Ende des jeweiligen offenen Leserahmens erhalten. Zusätzlich wurden zwischen den beiden Enden 6 bp durch eine für die Klonierung notwendige *MunI*-Schnittstelle eingeführt. Dadurch entstand anstelle des alten offenen Leserahmens ein neuer von 8 AS, dessen Genprodukt keine Aktivität mehr aufweisen sollte. Die Deletionen wurden *in frame* eingefügt, so dass die Mutation des gewünschten putativen Gens keinen Einfluss auf die Expression von stromabwärtsliegenden Genen hatte. Um die einzelnen Gene zu deletieren, wurden je zwei Genbereiche von ca.

300 bp stromauf- und stromabwärts von *zntA* bzw. *cadA* mit den Primern Znt649 oo *NdeI* + Znt649 ou *MunI* bzw. Znt691 oo *NdeI* + Znt691 ou *MunI* sowie mit den Primern Znt649 uo *MunI* + Znt649 uu *NdeI* und Znt691 uo *MunI* + Znt691 uu *NdeI* amplifiziert. An die PCR-Produkte wurden zusätzlich eine *MunI*- und eine *NdeI*-Schnittstelle angefügt. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Fragmente *MunI* geschnitten und über eine „Drei-Fragment-Ligation“ in den Vektor pGEM-T Easy gebracht. Die erhaltenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert und die verkürzten Genfragmente nach Restriktion mit *NdeI* in pLO2 umklontiert. Dieser Vektor trägt eine Kanamycin-Resistenzkassette sowie das Gen der Levansucrase (*sacB*), außerdem ist er nicht in der Lage in *R. metallidurans* zu replizieren. Er kann nur aufgrund der homologen Bereiche zum *R. metallidurans*-Genom, die in den Vektor über Ligation eingebracht wurden, in die DNA eingebaut werden. Die Rekombinanten wurden auf Tris-Minimal-Agar-Platten mit 1500 mg/l Kanamycin selektiert. Durch die anschließende Doppelaustausch-Rekombination wurden die Stämme DN439($\Delta zntA$) und DN438($\Delta cadA$) erzeugt. Mittels PCR wurden die Deletionsmutanten überprüft.

Zusätzlich wurde genomische DNA isoliert und die Deletionen mittels Southern Hybridisierung nachgewiesen. Dabei wurde für die Überprüfung von *zntA* die genomische DNA mit *ApaI* und für *cadA* mit *PstI* geschnitten. Als Sonde diente das PCR-Produkt der Primer Znt649 oo *NdeI* + Znt649 ou *MunI* für *zntA* und der Primer Znt691 oo *NdeI* + Znt691 ou *MunI* für *cadA*. Diese ca. 300 bp großen PCR-Produkte lagen stromaufwärts von *zntA* bzw. *cadA* (Abb. 4a, b). Im Southernblot und dem anschließenden Nachweis wurden die folgenden Fragmente erwartet: bei der Restriktion mit *ApaI* in chromosomaler DNA des Stammes AE104 (Kontrolle) ein 3 748 kb-Fragment. Durch die Deletion von *zntA* (Δ 2 361 kb) verkürzte sich das Fragment auf 1 387 kb (Abb. 4a, c). Bei der Restriktion mit *PstI* zur Überprüfung der Deletion von *cadA* entstand ein 2 835 kb Fragment in der chromosomalen DNA des *R. metallidurans*-Stammes AE104 (Kontrolle), durch die Deletion von *cadA* wurden zwei *PstI*-Schnittstellen entfernt, wodurch das im Southern-Nachweis zu erwartende Fragment eine Größe von 4 985 kb hatte (Abb. 4b, d).

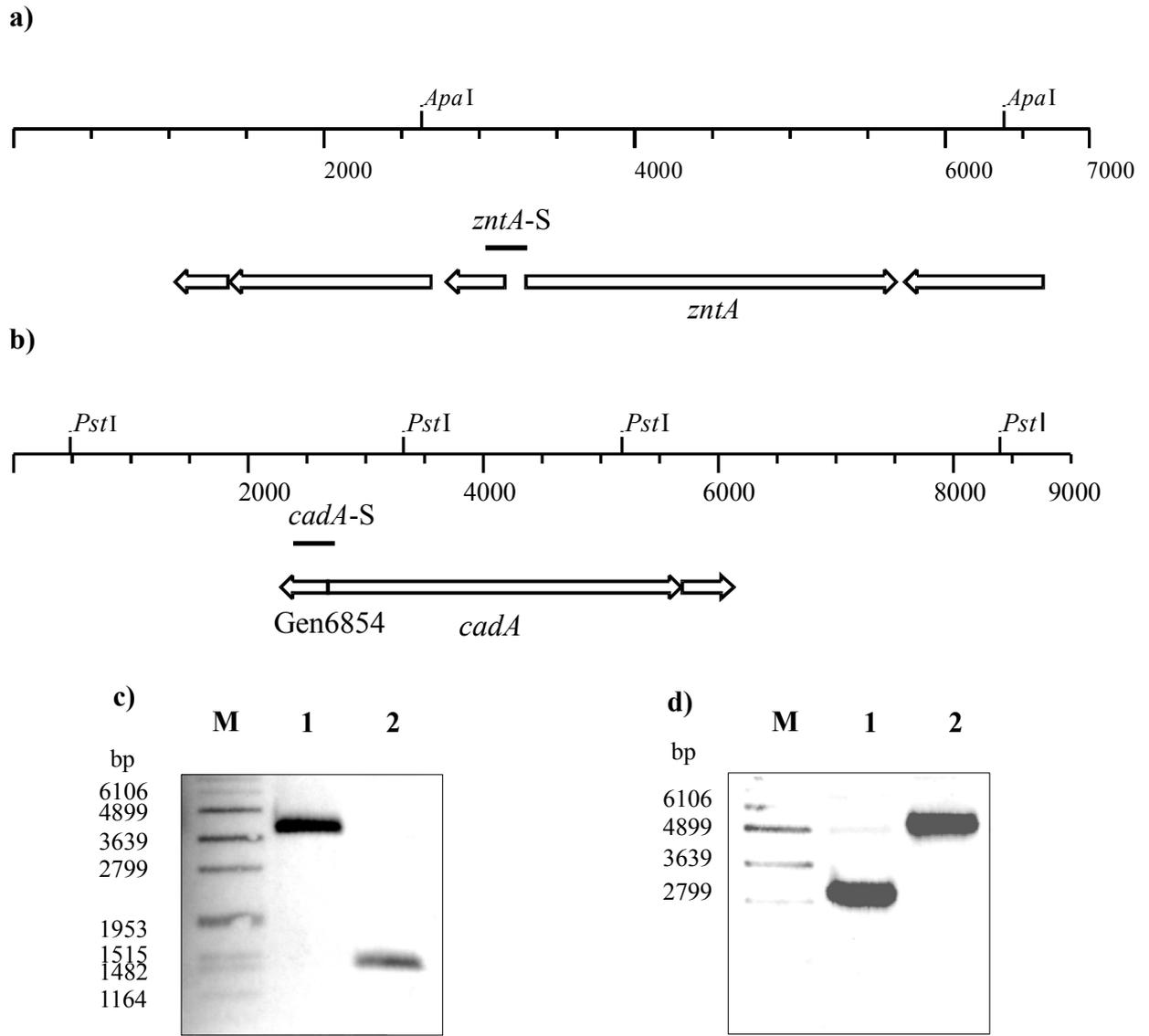


Abb. 4: Nachweis der Deletion von *zntA* bzw. *cadA* in Derivaten des *R. metallidurans*-Stammes AE104 mittels Southern DNA:DNA-Hybridisierung

- a) *zntA*-Genregion, eingezeichnet sind die für den Southern-Nachweis relevanten *ApaI*-Restriktionsschnittstellen sowie die Lage der Sonde *zntA-S*
- b) *cadA*-Genregion, eingezeichnet sind die für den Southern-Nachweis relevanten *PstI*-Restriktionsschnittstellen und die Lage der Sonde *cadA-S*
- c-d) Mit dem jeweiligem Restriktionsenzym geschnittene genomische DNA wurde in einem 0,8 %igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung mit den Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonden erfolgte über Nacht bei 68°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz. Als Marker (M) wurde Digoxigenin-markierter DNA *molecular weight marker VII* verwendet.
- c) Genomische DNA von AE104 (Spur 1) und DN439($\Delta zntA$) (Spur 2) wurde mit *ApaI* verdaut und der Sonde *zntA-S* hybridisiert; M (Markerspur)
- d) Genomische DNA von AE104 (Spur 1) und DN438($\Delta cadA$) (Spur 2) wurde mit *PstI* verdaut und der Sonde *cadA-S* hybridisiert; M (Markerspur)

Für die Konstruktion von *zntA/cadA*-Doppelmutanten wurde versucht, auf die beschriebene Methode der Doppelaustausch-Rekombination zurückzugreifen, wobei auf die Einzelmutanten aufgebaut wurde. Es war jedoch nicht möglich eine Doppelmutante zu erhalten. Daraufhin kam ein anderes Verfahren zum Einsatz. Das durch Anton (2001) konstruierte Kanamycin-Plasmid pECD733 (pLO2-Derivat) enthielt ein ca. 900 bp großes Mittelstück von *cadA*. Das Suizid-Plasmid pECD733 wurde über Konjugation in DN439($\Delta zntA$) gebracht. Über die homologen Bereiche zu *cadA* kam es zur Rekombination. Selektiert wurden die Rekombinanten auf Tris-Minimalmedium mit 1 500 mg/l Kanamycin. Durch die Insertion von pECD733 entstand der Stamm DN441($\Delta zntA$, *cadA*::pLO2), dieser war neben der Deletion von *zntA* nicht mehr in der Lage ein intaktes *cadA* zu exprimieren (Abb. 5). Der Stamm DN440($\Delta cadA$, *zntA*::pLO2) wurde durch das gleiche Verfahren erzeugt. Hierbei erfolgte die homologe Rekombination von Plasmid pECD734 (pLO2::*zntA*') in den Stamm DN438($\Delta cadA$).

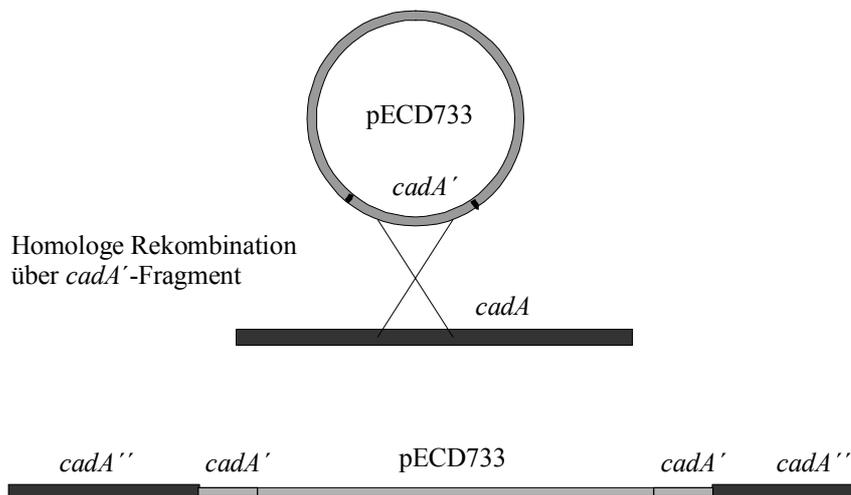


Abb. 5: Insertion des pLO2-Derivates pECD733 in *cadA*

Durch homologe Rekombination des Plasmids pECD733 ins bakterielle Chromosom von *R. metallidurans*-Derivaten wurde das *cadA*-Gen inaktiviert, so dass kein intaktes CadA-Protein mehr gebildet werden konnte.

Die Deletion von *zntA* im *R. metallidurans*-Stamm DN439 hatte einen deutlichen Effekt auf die Zinkresistenz im Vergleich zu *R. metallidurans* AE104 und einen leichten Effekt auf die Cadmiumresistenz (Tab. 5). Die Deletion von *cadA* im Stamm DN438 führte ebenfalls zu einer Verringerung der Cadmium- und Zinkresistenz im Vergleich zum plasmidlosen Wildtypstamm AE104 (Tab. 5). *ZntA* hatte im Vergleich zu *CadA* einen größeren Einfluss auf die Zinkresistenz und im entgegengesetzten Fall *CadA* auf die Cadmiumresistenz. Die Doppelmutantenstämme DN441($\Delta zntA$, *cadA*::pLO2) und DN440($\Delta cadA$, *zntA*::pLO2) zeigten dasselbe Verhalten gegenüber Zink- und Cadmiumionen. Die Sensitivität gegenüber

diesen Ionen stieg in den Doppelmutantenstämmen stark an (Tab. 5, Abb. 6). Die Resistenz gegenüber Zinkionen sank im Vergleich zum Wildtypstamm AE104 auf ~17 %. Die Cadmiumresistenz fiel auf ~0.3 % herab im Vergleich zum Stamm AE104. Dies wurde auch in Wachstumsversuchen in Flüssigmedium deutlich (Abb. 7). Die Resistenz gegenüber Blei war in den Einzel- und Doppelmutantenstämmen nicht beeinflusst (Ergebnis nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass ZntA und CadA zusammen im plasmidfreien *R. metallidurans*-Stamm AE104 die Hauptkomponenten für die Cadmiumresistenz sind, ebenso haben sie einen starken Einfluss auf die Zinkresistenz.

Tab. 5: Minimale Inhibitor Konzentration von Zink und Cadmium in *R. metallidurans*-Derivaten

Stamm	Relevanter Genotyp	Minimale Inhibitor Konzentration ^{a)}	
		ZnCl ₂ , [µM]	CdCl ₂ , [µM]
AE104	plasmidfreier Wildtyp	300	350
DN438	$\Delta cadA$	250	250
DN439	$\Delta zntA$	150	300
DN440	$\Delta cadA, zntA::pLO2$	50	1
DN441	$\Delta zntA, cadA::pLO2$	50	1

a) Die Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 30°C auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten nach 3 Tagen zu sehen war. Die Bestimmungen wurden zweimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

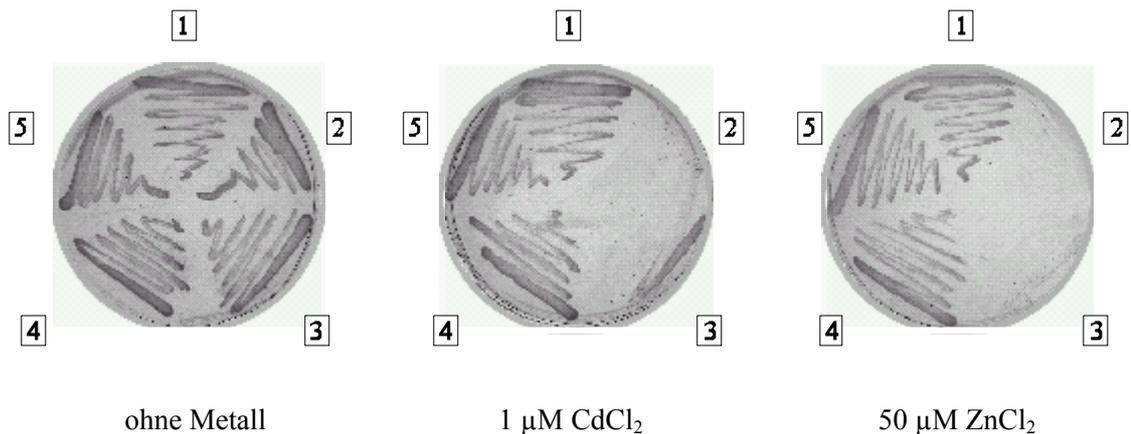


Abb. 6: Wachstum der *R. metallidurans*-Stämme AE104, DN441($\Delta zntA, cadA::pLO2$), DN440($\Delta cadA, zntA::pLO2$), DN438($\Delta cadA$) und DN439($\Delta zntA$), auf Festmedium unter Schwermetallionen-Einfluss

Aus einer 48 h Vorkultur wurden die Stämme AE104 (1), DN441 (2), DN440 (3), DN438 (4) und DN439 (5) auf Tris-Minimalmedium-Platten ohne Metall, mit 1 µM CdCl₂ bzw. mit 50 µM ZnCl₂ ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

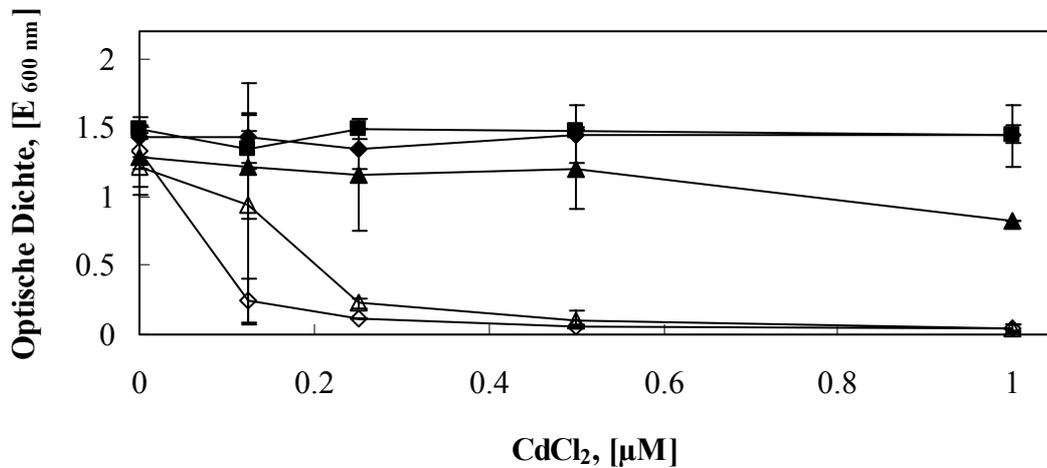


Abb. 7: Wachstum verschiedener *R. metallidurans*-Stämme in Flüssigmedium unter Cadmiumstress

Aus einer 48 h Vorkultur wurden Hauptkulturen der Stämme AE104 (■), DN438($\Delta cadA$) (▲), DN439($\Delta zntA$) (◆), DN440($\Delta cadA$, $zntA::pLO2$) (Δ) und DN441($\Delta zntA$, $cadA::pLO2$) (\diamond) 3 %ig in 2.5 ml frischem Tris-Minimalmedium mit verschiedenen Cadmiumkonzentrationen (0-1 μM) angeimpft und 24 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde bestimmt und gegen die eingesetzten Cadmium-Konzentrationen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen und deren Standardabweichung.

3.2.2. Die *zntA/cadA*-Doppelmutante zeichnet sich durch erhöhte Cadmium-Akkumulation aus

Um zu untersuchen, wie sich das Fehlen der CPx-Typ ATPasen ZntA bzw. CadA im plasmidlosen *R. metallidurans* auf das Akkumulationsverhalten gegenüber $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ($^{65}\text{Zn}^{2+}$ war in Deutschland nicht mehr verfügbar) auswirkt, wurden Cadmium-Aufnahme-Experimente mit *R. metallidurans*-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden 15 ml Tris-Minimalmedium mit einer 48 h Vorkultur auf 30 Klett angeimpft. Nach Verdopplung der Zellen wurden 7.5 μl 2 mM radioaktive $^{109}\text{CdCl}_2$ -Lösung (Endkonzentration 1 μM) zu 15 ml Kultur gegeben. Über einen Zeitraum von 120 min wurden zu definierten Zeitpunkten 400 μl Proben entnommen und die von den Zellen aufgenommene Metallionen-Konzentration über die Radioaktivität bestimmt.

DN441($\Delta zntA$, $cadA::pLO2$) akkumulierte über einen Zeitraum von 120 min mehr Cadmium als der Kontrollstamm AE104 und als die beiden Einzeldelentionsstämme DN438($\Delta cadA$) und DN439($\Delta zntA$) (Abb. 8). Das gleiche Verhalten zeigte auch der reziproke Doppelmutationsstamm DN440($\Delta cadA$, $zntA::pLO2$) (Ergebnis nicht gezeigt). Der

R. metallidurans-Stamm DN441($\Delta zntA$, $cadA::pLO2$) wies nach 120 min bei einer Cadmiumkonzentration von 1 μM im Medium 431 nmol $^{109}\text{Cd}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht auf (Abb. 8), die Einzeldelentionsmutanten DN438($\Delta cadA$) und DN439($\Delta zntA$) sowie der Stamm AE104 im Vergleich dazu zwischen 104–145 nmol $^{109}\text{Cd}^{2+}/\text{g}$ Trockengewicht. In Tris-Minimalmedium mit 1 μM Cadmium unterschieden sich die Einzeldelentionsmutanten im Aufnahmeverhalten nicht vom Wildtypstamm AE104. In den Stämmen DN438($\Delta cadA$) und DN439($\Delta zntA$) waren entweder ZntA oder CadA bei der gewählten Cadmiumkonzentration in der Lage, den Verlust der deletierten CPx-Typ ATPase zu kompensieren. Durch den Verlust beider CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA in *R. metallidurans* waren die Zellen nicht mehr in der Lage der Cadmiumaufnahme der Zellen entgegenzuwirken. Damit entsprach dieses Ergebnis im nativen Organismus den bereits im heterologen *E. coli*-System gewonnenen Daten.

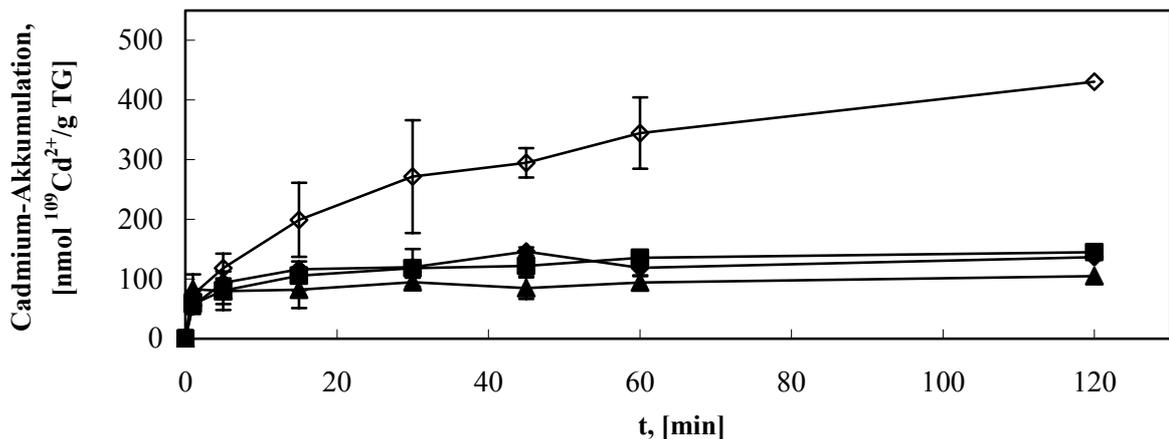


Abb. 8: Cadmiumakkumulation verschiedener *R. metallidurans*-Stämme

Aufnahme von 1 μM $^{109}\text{Cd}^{2+}$ in Zellen der *R. metallidurans*-Stämme AE104 (■), DN438($\Delta cadA$) (▲), DN439($\Delta zntA$) (◆) und DN441($\Delta zntA, cadA::pLO2$) (◇). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und deren Standardabweichungen.

3.2.3. Induktionsuntersuchungen von *zntA* und *cadA* mit Hilfe einer β -Galaktosidase-Transkriptionsfusion

Die Untersuchungen zum Substratspektrum von ZntA und CadA machten deutlich, dass sich dieses in Bezug auf Zink und Cadmium überschneidet, aber dass es auch einige Unterschiede zwischen den beiden CPx-Typ ATPasen hinsichtlich der Affinität gegenüber diesen Metallionen geben muss. Das deutete auf verschiedene Funktionen der CPx-Typ ATPasen

innerhalb von *R. metallidurans* hin. Diese Unterschiede sollten sich auch im Expressionsprofil von *zntA* und *cadA* widerspiegeln. Die Induktion in *R. metallidurans* wurde mit Hilfe einer Operonfusion von *zntA* bzw. *cadA* mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen (Gen für die β -Galaktosidase) untersucht. Durch die Konstruktion entstand eine Transkriptionsfusion zwischen dem CPx-Typ ATPase-Gen und *lacZ*. Die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase, die mit Hilfe eines Enzymtestes ermittelt werden konnte, war ein Maß für die Expression des jeweiligen CPx-Typ ATPase-Gens, da die Transkription von CPx-Typ ATPase-Gen und *lacZ* durch die Bildung einer mRNA, initiiert durch denselben Promotor, gekoppelt war.

Ausgangspunkt für die Konstruktion dieser Transkriptionsfusionen war der Vektor pECD794. Dieses pLO2-Derivat trägt stromabwärts der *multi-cloning-site* ein promotorloses *lacZ*-Gen. Mit den Primern Znt649 5'*SphI* + ZntA649 3'*SalI* sowie CadA691 5'*PstI* + CadA691 3'*SalI* wurden je ~ 350 bp stromaufwärts des Stopp-Kodons von *zntA* bzw. *cadA* bis 8 bzw. 7 bp nach dem tga-Stopp-Kodon der Gene amplifiziert. Die Fragmente wurden nach der Klonierung in pGEM-T Easy und deren Sequenzierung *SphI/SalI* (*zntA*-Fragment) bzw. *PstI/SalI* (*cadA*-Fragment) ausgeschnitten und gerichtet in das Plasmid pECD794 kloniert. Die resultierenden Plasmide, pECD795 und pECD796, trugen ein ~ 350 bp-Fragment vom *zntA*- bzw. *cadA*-Ende und stromabwärts davon das Gen *lacZ*. Über homologe Rekombination wurden diese Plasmide in das Genom verschiedener *R. metallidurans*-Stämme gebracht und auf Kanamycin selektiert. Die Plasmide selbst konnten in *R. metallidurans* nicht replizieren. In den resultierenden Stämmen DN444(*zntA-lacZ*), DN442(*cadA-lacZ*), DN443($\Delta zntA$, *cadA-lacZ*) und DN445($\Delta cadA$, *zntA-lacZ*) war *lacZ* mit dem jeweiligen CPx-Typ ATPase-Gen auf der Transkriptionsebene fusioniert.

Für die Induktionsversuche wurden die Stämme DN444(*zntA-lacZ*), DN442(*cadA-lacZ*), DN443($\Delta zntA$, *cadA-lacZ*) und DN445($\Delta cadA$, *zntA-lacZ*) in der exponentiellen Wachstumsphase mit verschiedenen Schwermetallkationen über 3 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden je 200 μ l Probe entnommen und die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

3.2.3.1. Das Gen *zntA* ist durch geringe Zink- und Cadmiumkonzentrationen induzierbar

Die Induktion von *zntA-lacZ* durch Zink und Cadmium wurde über eine Konzentrationsspanne von 0-300 μ M untersucht. Um einen möglichen Einfluss von CadA auf die Induzierbarkeit von *zntA* zu analysieren, wurden die Stämme DN444(*zntA-lacZ*) und DN445($\Delta cadA$, *zntA-lacZ*) miteinander verglichen. Die Basisaktivität der β -Galaktosidase ohne zusätzliches Metall im Tris-Minimalmedium betrug bei beiden Stämmen 20-30 U/mg Trockengewicht (TG) (Abb. 9). Eine deutliche Induktion durch Zink war ab einer

Konzentration von 10 μM zu erkennen. Das Induktionsoptimum lag zwischen 50–100 μM bei beiden Stämmen. Cd^{2+} induzierte in beiden Stämmen bereits ab einer Konzentration von 0.5 μM im Medium. Auch hier lag das Induktionsoptimum bei 50–100 μM . Bei höheren Konzentrationen als 100 μM Zink oder Cadmium kam es zu keiner weiteren Steigerung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität, im Gegenteil es kam zur Verminderung der Aktivität (Ergebnis nicht gezeigt). Möglicherweise kam es durch die zugegebene Schwermetallionen-Konzentrationen, die nahe an der MIC lagen zu toxischen Effekten in den Zellen. Aus diesem Grund konnte keine Bestimmung der halbmaximalen Induktion durchgeführt werden. Die Deletion von *cadA* im Stamm DN445(ΔcadA , *zntA-lacZ*) hatte keinen Einfluß auf die Induzierbarkeit von *zntA-lacZ* durch Zink oder Cadmium.

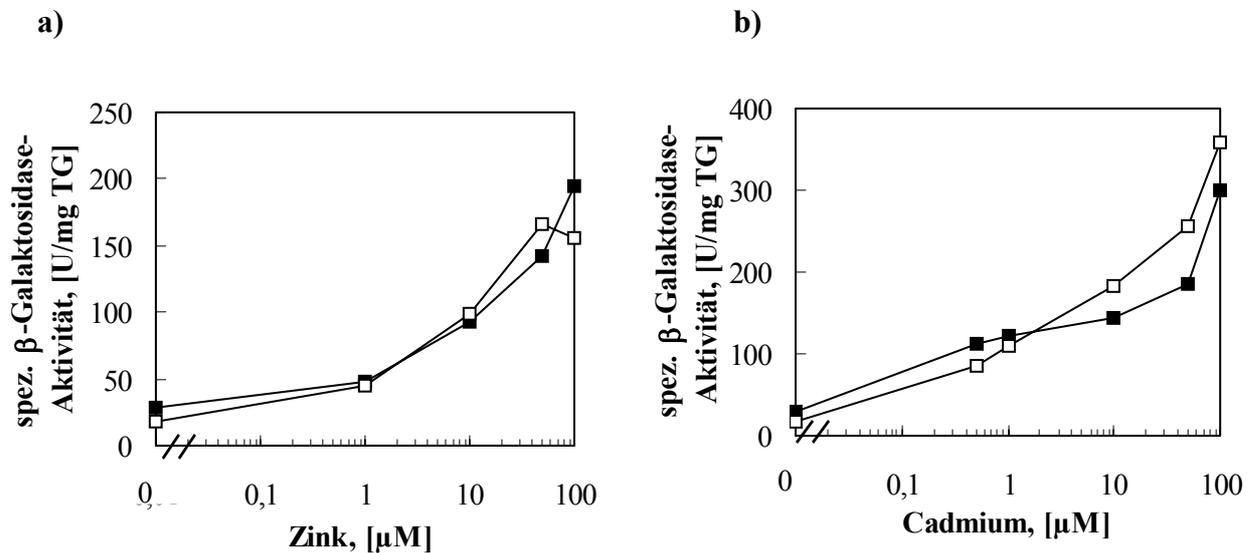


Abb. 9: Induktion einer *zntA-lacZ*-Operonfusion durch a) ZnCl_2 und b) CdCl_2 in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen

Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme DN444(*zntA-lacZ*) (■) und DN445(ΔcadA , *zntA-lacZ*) (□) mit verschiedenen Konzentrationen a) ZnCl_2 und b) CdCl_2 inkubiert. Nach 3 h wurden 200 μl Proben entnommen, die spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und gegen die eingesetzten Metallkonzentrationen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

3.2.3.2. Das Gen *cadA* ist durch Cadmium und bei Deletion von *zntA* auch durch Zink induzierbar

In den *R. metallidurans*-Stämmen DN442(*cadA-lacZ*) und in DN443(Δ *zntA*, *cadA-lacZ*) wurde die Induzierbarkeit von Zink oder Cadmium im Bereich zwischen 0–300 μ M getestet. In DN442 konnte *cadA-lacZ* nicht durch Zinkionen induziert werden (Abb. 10a). Im Gegensatz dazu ließ sich *cadA-lacZ* im *zntA*-Deletionsstamm DN443 durch Zink induzieren, ab 1 μ M Zink war eine Steigerung der spezifischen β -Galaktosidase zu erkennen. Zwischen 50–100 μ M Zink war das Optimum erreicht. Cadmiumionen induzierten *cadA-lacZ* in beiden Stämmen, sowohl in DN442(*cadA-lacZ*) als auch in DN443(Δ *zntA*, *cadA-lacZ*) (Abb. 10b). Aber auch hier hatte das Vorhandensein von *zntA* einen inhibierenden Einfluss auf die Induzierbarkeit von *cadA-lacZ*. In DN442 war ein deutlicher Anstieg der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität von 7 U/mg TG auf 54 U/mg TG bei einer Konzentration von 10 μ M Cadmium zu erkennen. Das Maximum der Induktion wurde bei 100 μ M Cd^{2+} (233 U/mg TG) erreicht. Im Stamm DN443(Δ *zntA*, *cadA-lacZ*) war bereits ab 0.5 μ M Cd^{2+} eine erhöhte Induktion zu sehen. Das Maximum verschob sich auf 50 μ M Cd^{2+} (323 U/mg TG). Auch bei den *cadA-lacZ*-Konstrukten verringerte sich die β -Galaktosidase-Aktivität bei der Inkubation mit Zink- oder Cadmiumkonzentrationen über 100 μ M (Ergebnis nicht gezeigt), was möglicherweise auf die Toxizität der Metalle auf die Stämme zurückzuführen ist.

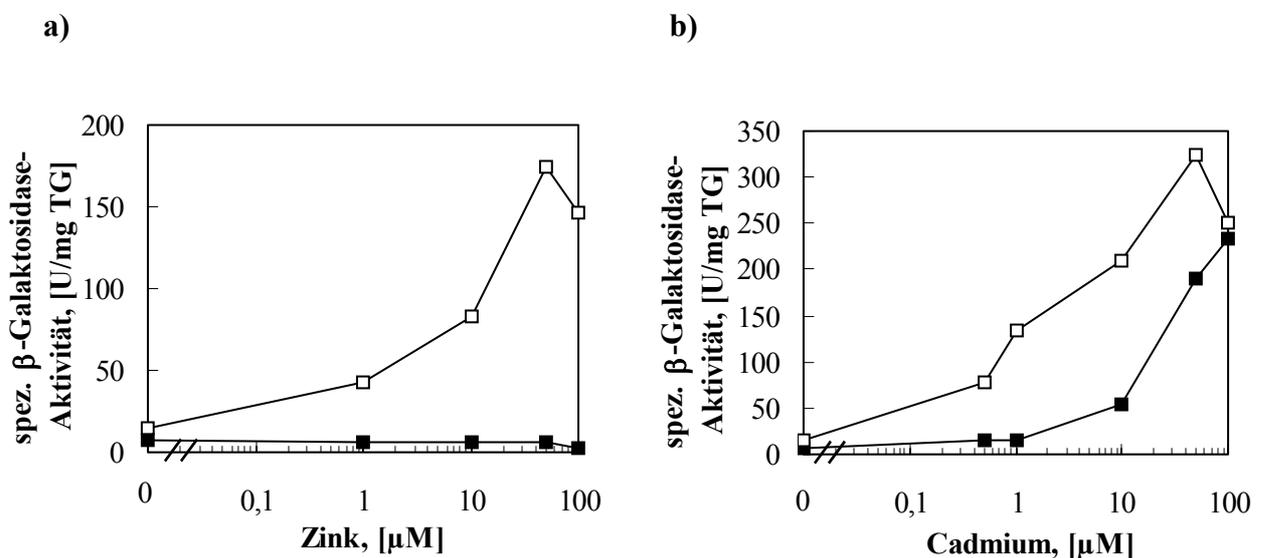


Abb. 10: Induktion einer *cadA-lacZ*-Operonfusion durch a) ZnCl_2 und b) CdCl_2 in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen

Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme DN442(*cadA-lacZ*) (■) und DN443(Δ *zntA*, *cadA-lacZ*) (\square) mit verschiedenen Konzentrationen an a) ZnCl_2 und b) CdCl_2 inkubiert. Nach 3 h wurden 200 μ l Proben entnommen, die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und gegen die eingesetzten Metallkonzentrationen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

3.2.3.3. Induzierbarkeit von *zntA* und *cadA* durch andere Schwermetallionen

In den Stämmen DN443($\Delta zntA$, *cadA-lacZ*) und DN445($\Delta cadA$, *zntA-lacZ*) wurde die Induzierbarkeit der Gene der CPx-Typ ATPasen (ZntA und CadA) durch verschiedene Schwermetallkationen (100 $\mu\text{M Ni}^{2+}$, 100 $\mu\text{M Co}^{2+}$ und 250 $\mu\text{M Pb}^{2+}$) untersucht. Es wurden diese Stämme gewählt, um die Hintergrundaktivität der zweiten CPx-Typ ATPase auszuschließen.

Sowohl *zntA-lacZ* in DN445($\Delta cadA$, *zntA-lacZ*) als auch *cadA-lacZ* in DN443($\Delta zntA$, *cadA-lacZ*) wurden durch 50 μM Cadmium oder Zink eindeutig induziert (Tab. 6). Bei den anderen gewählten Metallen war kein Effekt zu beobachten, lediglich die Inkubation von DN445($\Delta cadA$, *zntA-lacZ*) mit 100 $\mu\text{M Ni}^{2+}$ führte zu einer leichten Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität auf das zweifache gegenüber der Nullkontrolle (Tab. 6). Resistenzuntersuchungen gegenüber Nickel in dem $\Delta zntA$ -Stamm bzw. den CPx-Typ ATPase-Doppelmutanten-Stämmen zeigten keine Effekte (Ergebnis nicht gezeigt). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Spezifität von ZntA und CadA gegenüber Zink und Cadmium in *R. metallidurans*.

Tab. 6: Darstellung des Induktionsniveaus^{a)} der β -Galaktosidase in den Stämmen DN443 und DN445 nach 3 h Inkubation mit unterschiedlichen Schwermetallionen

Metall	Stamm	
	DN443 ($\Delta zntA$, <i>cadA-lacZ</i>)	DN445 ($\Delta cadA$, <i>zntA-lacZ</i>)
Cd²⁺ [50 μM]	22.0 \pm 5.4	11.3 \pm 5
Zn²⁺ [50 μM]	16.7 \pm 8	7 \pm 2.2
Ni²⁺ [100 μM]	1.6 \pm 0.6	1.9 \pm 0.1
Co²⁺ [100 μM]	0.76 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2
Pb²⁺ [250 μM]	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.4

Zellen, die sich in der exponentiellen Phase (75-90 Klett) befanden wurden mit den Metallkationen versetzt, nach 3 h Inkubation Proben entnommen und die spezif. β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen des Induktionsniveaus aus drei unabhängigen Messungen.

^{a)} Induktionsniveau = $\frac{\text{spez. } \beta\text{-Galaktosidase-Aktivität der } R. \textit{metallidurans}\text{-Derivate nach Metallinkubation}}{\text{spez. } \beta\text{-Galaktosidase-Aktivität des ohne Metall inkubierten Kontrollstammes}}$

3.3. Untersuchungen von einem putativen Regulator stromaufwärts von *cadA*

Stromaufwärts des Gens *cadA* befindet sich ein offener Leserahmen von 132 Aminosäuren (Gen6854 auf *contig691*). Die Transkription des putativen Gens ist in Gegenrichtung zu *cadA* angeordnet (Abb. 4b). Die Proteinsequenz weist Homologien zu MerR-ähnlichen Proteinen auf (z.B. N-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv, konservierte Cysteine im C-Terminus), die in der Regulation anderer Schwermetall-transportierender CPx-Typ ATPasen involviert sind. Diese Proteine können bei Vorhandensein der Substrate aktivierend auf die Transkription der für CPx-Typ ATPasen kodierenden Gene wirken.

Mit Hilfe einer β -Galaktosidase-Transkriptionsfusion sollte untersucht werden, ob dieses putative Gen metallabhängig transkribiert wird. Mit den Primern *CadR-lacZ* 5'*Xba*I und *CadR-lacZ* 3'*Pst*I wurde ein 369 bp-Fragment vom 3'Ende von Gen6854 amplifiziert. Dieses Fragment wurde nach der Klonierung in pGEM-T Easy sequenziert und anschließend gerichtet in den Vektor pECD794 (pLO2::*lacZ*) kloniert. Das resultierende Plasmid pECD801 wurde über homologe Rekombination in das Chromosom von AE104 und DN439(Δ *zntA*) gebracht, dadurch wurde in diesen Stämmen eine Gen6854-*lacZ*-Transkriptionsfusion gebildet. Exponentielle Zellen der resultierenden Stämme wurden für 3 h mit Zink bzw. Cadmium (10–100 μ M) inkubiert. Dann wurden 200 μ l Proben genommen und die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (Abb. 11). In den Stämmen DN448(Gen6854-*lacZ*) und DN449(Δ *zntA*, Gen6854-*lacZ*) wurde die Fusion Gen6854-*lacZ* konstitutiv transkribiert. Mit den gewählten Schwermetallionen und den Konzentrationen kam es zu keiner Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität. Allerdings wies die β -Galaktosidase ein mittleres Expressionsniveau auf, was auf eine konstitutive Transkription der Gen6854-*lacZ*-Struktur in Tris-Minimalmedium schließen ließ.

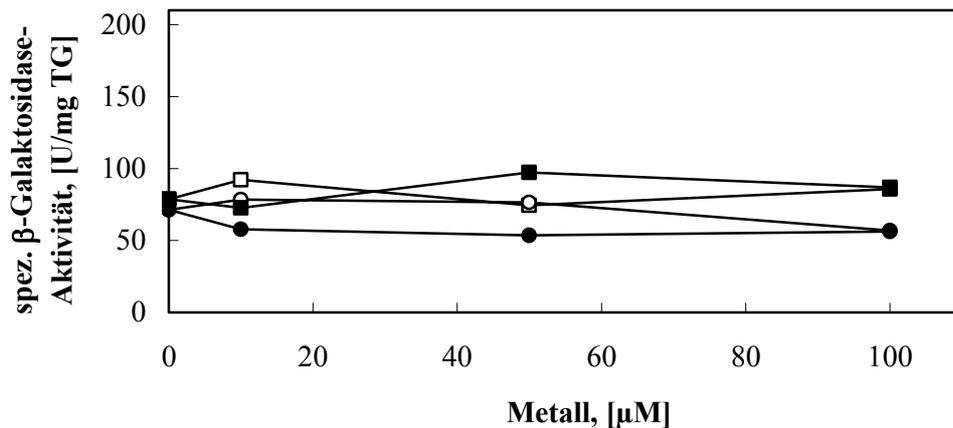


Abb. 11: Induktion einer Gen6854-*lacZ*-Operonfusion durch Zink- und Cadmiumionen in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen

Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme DN448(Gen6854-*lacZ*) mit ZnCl₂ (■) bzw. mit CdCl₂ (□) und DN449(Δ*zntA*, Gen6854-*lacZ*) mit ZnCl₂ (○) bzw. CdCl₂ (●) 3 h inkubiert. Die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität wurde bestimmt und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen gegen die eingesetzten Metallkonzentrationen aufgetragen.

Um zu untersuchen, ob das stromaufwärts von *cadA* lokalisierte Gen6854 in *R. metallidurans* einen Einfluss auf die durch CadA-vermittelte Schwermetallresistenz hat, sollte es durch Insertion mutiert werden. Eine besondere Schwierigkeit der Mutation war die geringe Größe des *orfs*. Mit Hilfe der PCR-Primer CadR 3' und CadR *SalI* 5' wurde ein 100 bp-Fragment von der in der Sequenz liegenden *SalI*-Schnittstelle bis ~ 50 bp vor dem *orf*-Ende amplifiziert. Das zweite Fragment wurde mit den Primern CadR *NdeI* tga und CadR *SalI* 3' amplifiziert. Dieses Stück beinhaltete ~ 200 bp des *orfs* vor der *SalI*-Schnittstelle. In beide Fragmente wurde durch die Primer eine zusätzliche Base in die *SalI*-Schnittstelle gebracht und diese damit zerstört. Die PCR-Produkte wurden in einer *Overlap-PCR* eingesetzt, wobei die beiden äußeren Primer verwendet wurden (Abb. 12). Das so entstandene 300 bp-Fragment begann mit einem tga-Stopp-Kodon und wies außerdem eine zusätzliche Base an der *SalI*-Schnittstelle auf. Nach der Zwischenklonierung und Sequenzierung in pGEM-T Easy wurde es mit Hilfe der durch die PCR eingeführten *NdeI*-Schnittstellen in pLO2 umkloniert. Das entstandene Plasmid pECD802 wurde über Konjugation in AE104 und DN439(Δ*zntA*) gebracht. Das Suizidplasmid konnte über das eingebrachte Fragment ins *R. metallidurans*-Genom homolog rekombinieren. Die entstandenen Klone wurden mittels PCR verifiziert. Durch die Insertion entstand einerseits ein Fragment von Gen6854, das an bp-Position 253 einen *frame shift* trägt und das zweite Fragment beginnt mit einem tga-Stopp-Kodon in der Sequenz und besitzt kein Helix-Turn-Helix-Motiv. In den Stämmen DN450(Gen6854::pLO2) und DN451(Δ*zntA*, Gen6854::pLO2) wurden das Resistenzverhalten gegen Zink- und Cadmiumionen auf Festmedium untersucht. Es konnte kein Unterschied zu AE104 oder

DN439($\Delta zntA$) festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die Mutation von Gen6854 in den Stämmen DN450 und DN451 hatte somit keinen negativen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Zink oder Cadmium.

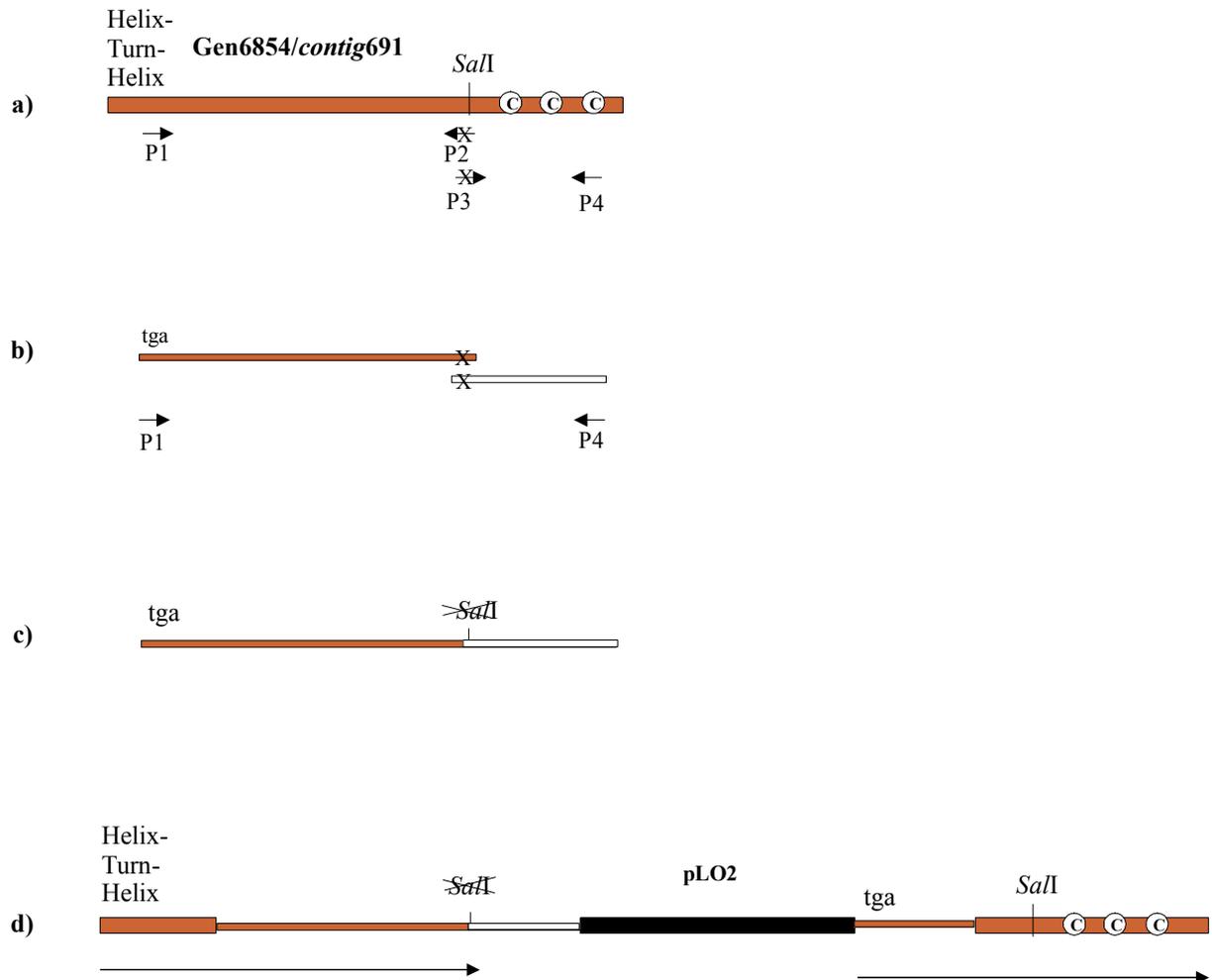


Abb. 12: Mutations-Schema von Gen6854

- a) Das putative Genprodukt von Gen6854 besitzt Homologien zu MerR-ähnlichen Proteinen mit Helix-Turn-Helix-Motiv für die DNA-Bindung und 3 konservierten Cysteinen. Über PCR wurden zwei Fragmente amplifiziert und an der *SalI*-Schnittstelle eine zusätzliche Base eingefügt.
- | | | | |
|----|----------------------|----|---------------------|
| P1 | CadR <i>NdeI</i> tga | P2 | CadR <i>SalI</i> 3' |
| P3 | CadR <i>SalI</i> 5' | P3 | CadR 3' |
- b) *Overlap*-PCR mit den Außenprimern und beiden PCR-Fragmenten
- c) PCR-Produkt mit *NdeI*-Schnittstellen an den Enden und einem *frame shift* an der *SalI*-Schnittstelle wurde in pLO2 kloniert (weißes Teilstück kennzeichnet *frame shift*-Bereich)
- d) Durch die Konjugation von pECD802 (pLO2::Gen6854) ins *R. metallidurans*-Genom entstehen zwei unvollständige Genfragmente (nach der *SalI*-Schnittstelle einen *frame shift* bzw. ohne Helix-Turn-Helix-Motiv).

3.4. Die Rolle von ZntA und CadA in der Zink- bzw. Cadmiumresistenz in Beziehung zu anderen Effluxsystemen

Um das Zusammenspiel aller in *R. metallidurans* bekannten Zn^{2+}/Cd^{2+} -Effluxsysteme bei der Schwermetallhomöostase zu untersuchen, wurde der Einfluss des RND-Proteinkomplexes (*resistance, nodulation, cell division*) CzcCBA und des CDF-Proteins (*cation diffusion facilitator*) CzcD allein und zusammen auf die Resistenz in den Stämmen der CPx-Typ ATPase-Mutanten untersucht. Die verschiedenen CPx-Typ ATPase-Mutanten wurden in dem megaplasmidfreien *R. metallidurans*-Stamm AE104 konstruiert. Derivate des Vektors pVDZ'2 mit den Genen für die Effluxtransportersysteme (CzcCBA und CzcD) wurden in diese Stämme gebracht und die Veränderung der Resistenz gegenüber Zink- und Cadmiumionen sowie der Einfluss auf die Induzierbarkeit von *zntA-lacZ* bzw. *cadA-lacZ* untersucht. Die Plasmide pDNA130(pVDZ'2::*czcCBAD'*) und pDNA176(pVDZ'2::*czcD*) existierten bereits in der Arbeitsgruppe. In dem Plasmid pDNA130 war nur ein unvollständiges Fragment von *czcD* enthalten. Für die Konstruktion des Plasmids pDN385 lag das *EcoRI*-Fragment der *czc*-Determinante mit den Genen *czcCBADRS'* in pUC18 kloniert vor. Über die *EcoRI*-Schnittstellen wurde es in pVDZ'2 unter Kontrolle des in *R. metallidurans* konstitutiven *lac*-Promotors ligiert. Die richtige Orientierung des Fragmentes wurde mittels PCR überprüft. Das 3'-Ende des *czc*-Fragmentes enthält Teile der Gene des Zwei-Komponentensystems CzcRS. Das Gen für CzcS befindet sich nicht vollständig auf dem Fragment, wodurch es auch zu keiner Interferenz der natürlichen Regulation des Systems (durch u.a. das Zweikomponentensystem) und der konstitutiven Transkription durch den Vektorpromotor kommen sollte. Damit war auch gewährleistet, dass die *czc*-Expression immer auf demselben Niveau blieb.

3.4.1. Die Effluxtransporter CzcCBA und CzcD sind *in trans* nicht in der Lage die Cadmiumsensitivität der *zntA/cadA*-Doppelmutante vollständig zu komplementieren

Die Plasmide pDNA385(*czcCBADRS'*), pDNA130(*czcCBAD'*) oder pDNA176(*czcD*) wurden über Konjugation in die *R. metallidurans*-Stämme AE104, DN439($\Delta zntA$), DN438($\Delta cadA$) sowie in die Doppelmutantenstämme DN441($\Delta zntA, cadA::pLO2$) und DN440($\Delta cadA, zntA::pLO2$) gebracht. Durch immunologischen Nachweis von CzcA und CzcD wurde in den entstandenen Stämmen mit pDNA385(*czcCBADRS'*) die Expression der Effluxtransporter überprüft (Abb. 13). Die Bestimmung der Resistenz auf Festmedium gegenüber Zink- und Cadmiumionen wurde mit Hilfe von Tris-Minimalmedium-Agar-Platten mit unterschiedlichen Schwermetallionen-Konzentrationen durchgeführt. Durch das

Vorhandensein der beiden Zn^{2+}/Cd^{2+} -transportierenden CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA sowie den Transportsystemen CzcCBA und CzcD erhöhte sich die Zinkresistenz im Vergleich zu den Stämmen, in denen keines der genannten Transportsysteme vorhanden war, auf das 240fache (MIC 12 mM) und die Cadmiumresistenz auf das 3000fache (MIC 3 mM) (Tab. 7). In den Stämmen DN438(*zntA*, Δ *cadA*) und DN439(*cadA*, Δ *zntA*), in denen eine der beiden CPx-Typ ATPasen exprimiert wurde, konnte mit pDNA385 durch CzcCBA/D die MIC von ebenfalls 12 mM Zink bzw. 3 mM Cadmium erreicht werden. In den Stämmen DN441(Δ *zntA*, *cadA*::pLO2) und DN440(Δ *cadA*, *zntA*::pLO2) mit pDN385(*czcCBADRS'*), in denen nur *czcCBA/D* exprimiert wurden, stieg die Resistenz gegenüber Zink auch auf das 240fache an, gegenüber Cadmium aber nur auf das 50fache. Die *in trans*-Komplementation mit pDNA130(*czcCBAD'*) führte zu denselben Wachstums-Effekten auf Festmedium in den Einzeldelentions- und Doppelmutanten wie mit pDNA385(*czcCBADRS'*) (Ergebnis nicht gezeigt). Auch hier war die Zinkresistenz, durch CzcCBA-vermittelt, unabhängig vom Vorhandensein von *zntA* oder *cadA*. Mit dem Plasmid pDNA130(*czcCBAD'*) lag die MIC für Cadmiumionen in den Doppelmutanten ebenfalls bei 50 μ M. Für die durch CzcCBA-vermittelte Cadmiumresistenz schien das Vorhandensein von ZntA oder CadA eine entscheidende Rolle zu spielen. CzcD schien keinen essentiellen Einfluss auf die durch pDNA385(*czcCBADRS'*) vermittelte Schwermetallresistenz zu haben, da durch das Vorhandensein von CzcD keine Änderung im Wachstumsverhalten im Vergleich zu den *R. metallidurans*-Stämmen mit pDNA130(*czcCBAD'*) erfolgte. In den Doppelmutantenstämmen DN441(Δ *zntA*, *cadA*::pLO2) und DN440(Δ *cadA*, *zntA*::pLO2) mit pDNA176(*czcD*) änderte sich die MIC gegenüber Cadmium nicht, sie betrug 1 μ M. Die Zinkresistenz hingegen erhöhte sich leicht auf 75 μ M.

Die Zinkresistenz, die durch CzcCBA vermittelt wurde, schien unabhängig von dem Vorhandensein der CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA zu sein. Im Gegensatz dazu benötigte *R. metallidurans* für eine effektive Cd^{2+} -Entgiftung beide Systeme sowohl CzcCBA als auch mindestens eine der beiden CPx-Typ ATPasen.

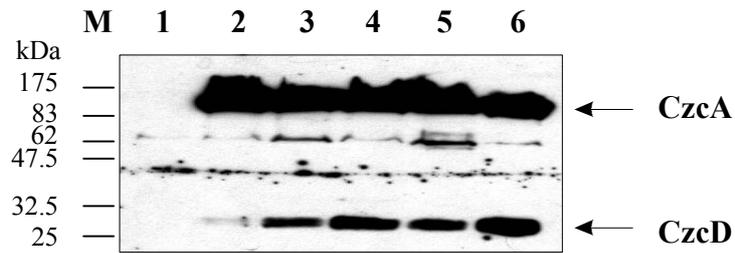


Abb. 13: Nachweis der konstitutiven Expression von *czcA* und *czcD* in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen mit pDNA385(*czcCBADRS'*) mittels Doppelimmunpräzipitation

65 µg Zelltrockengewicht der Stämme AE104 (Wildtyp) (Spur 1) ohne pECD385(*czcCBADRS'*) sowie der Stämme AE104 mit pECD385 (Spur 2), DN439(Δ *zntA*) mit pECD385 (Spur 3), DN438(Δ *cadA*) mit pECD385 (Spur 4), DN441(Δ *zntA*, *cadA*::pLO2) mit pECD385 (Spur 5) und DN440(Δ *cadA*, *zntA*::pLO2) mit pECD385 (Spur 6) wurden auf ein 12.5 %iges SDS-Laemmli-Gel aufgetragen und nach dem elektrophoretischen Lauf auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von CzcA und CzcD erfolgte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern. M kennzeichnet die Markerbanden des *Prestained Protein Markers*.

Tab. 7: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) von Zink und Cadmium verschiedener *R. metallidurans*-Derivate mit pDNA385(*czcCBADRS'*)

Stamm	Plasmid	vorhandene Gene von Zn ²⁺ /Cd ²⁺ -Metall-transportern	Minimale Inhibitor Konzentration ^{a)}	
			ZnCl ₂ , [µM]	CdCl ₂ , [µM]
DN440	pVDZ'2	/	50	1
DN441	pVDZ'2	/	50	1
AE104	pDNA385	<i>zntA</i> , <i>cadA</i> , <i>czcCBA</i> , <i>czcD</i>	12 000	3 000
DN440	pDNA385	<i>czcCBA</i> , <i>czcD</i>	12 000	50
DN441	pDNA385	<i>czcCBA</i> , <i>czcD</i>	12 000	50
DN438	pDNA385	<i>zntA</i> , <i>czcCBA</i> , <i>czcD</i>	12 000	3 000
DN439	pDNA385	<i>cadA</i> , <i>czcCBA</i> , <i>czcD</i>	12 000	3 000

^{a)} Die Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 30°C auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten nach 3 Tagen zu sehen war.

3.4.2. Einfluss von CzcCBA und CzcD auf die Induzierbarkeit von *zntA* und *cadA* durch Zink oder Cadmium

Um den Einfluss der Expression von CzcCBA und CzcD auf die Induktion der *zntA-lacZ*- bzw. *cadA-lacZ*-Konstrukte durch Zink und Cadmium zu untersuchen, wurden die Vektoren pDNA385(*czcCBADRS'*), pDNA130(*czcCBAD'*) und pDNA176(*czcD*) in die Stämme DN444(*zntA-lacZ*), DN445(Δ *cadA*, *zntA-lacZ*), DN442(*cadA-lacZ*) und DN443(Δ *zntA*, *cadA-lacZ*) konjugiert.

Die konstitutive Expression von *czcA* in den Konstrukten mit pDNA130(*czcCBAD'*) sowie die Expression von *czcD* in den Stämmen mit pDNA176(*czcD*) wurde mit Hilfe des immunologischen Nachweises beider Proteine mittels polyklonaler Antikörper überprüft (Abb. 14). Die konstitutive Expression der Transportsysteme in pDNA385(*czcCBADRS*) wurde in anderen Stämmen bereits überprüft (Abb. 13).

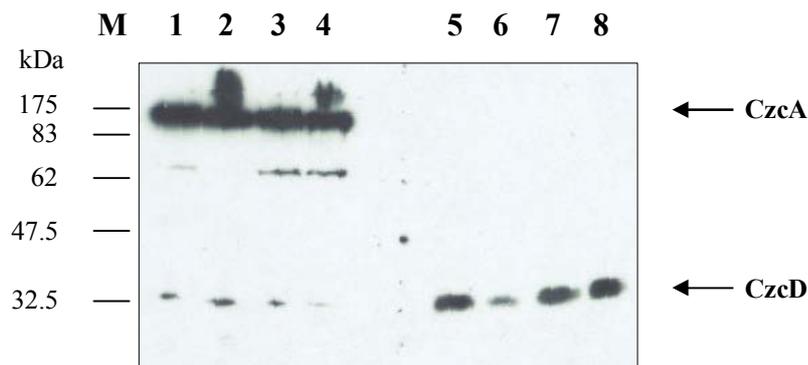


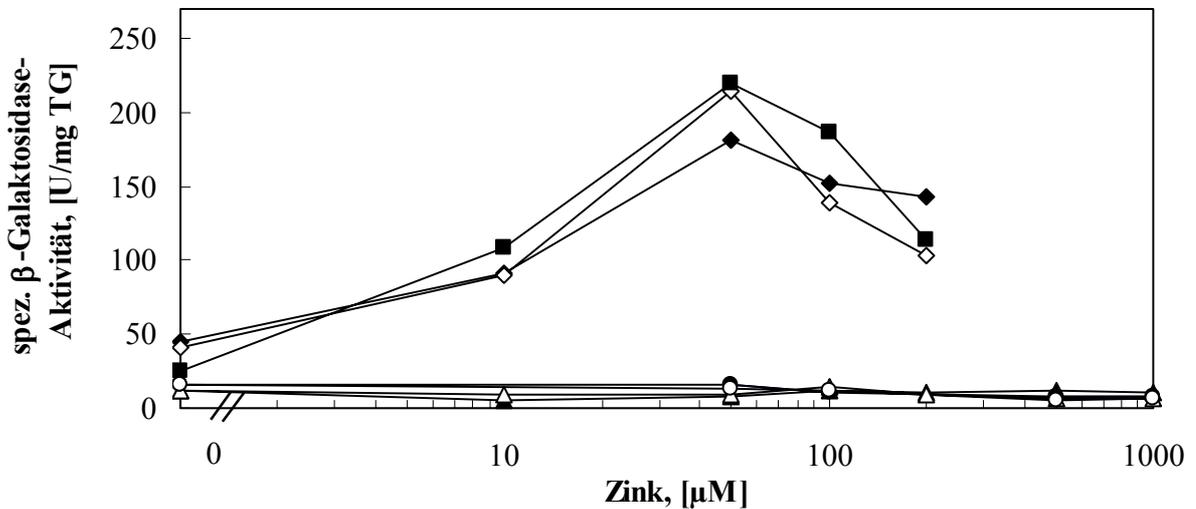
Abb. 14: Immunologischer Nachweis der Proteine nach konstitutiver Expression von *czcA* durch pDNA130(*czcCBAD'*) und *czcD* durch pDNA176(*czcD*) mit polyklonalen Antikörpern

Aufgetragen auf ein 12.5 %iges SDS-Laemmli-Gel sind je 50 μ g Zelltrockengewicht von DN444(*zntA-lacZ*) (Spur 1), DN442(*cadA-lacZ*) (Spur 2), DN443(Δ *cadA*, *zntA-lacZ*) (Spur 3) und DN445(Δ *zntA*, *cadA-lacZ*) (Spur 4) mit pDNA130 (*czcCBA*), sowie in der selben Reihenfolge mit pDNA176 (*czcD*) (Spur 5-8). Nach dem Westernblot auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit polyklonalen Antikörpern gegen CzcA (Spur 1-4) und gegen CzcD (Spur 5-8). M zeigt die Proteinbanden des *Prestained Protein Markers*.

Für die Expressionsnachweise der CPx-Typ ATPase-Gene mit Hilfe des β -Galaktosidase-Assays wurden die *R. metallidurans*-Stämme mit verschiedenen Konzentrationen von Zink- oder Cadmiumionen für 3 h inkubiert. Weder *zntA-lacZ* noch *cadA-lacZ* (im $\Delta zntA$ -Stamm) konnten durch Zink in Anwesenheit von pDNA385(*czcCBADRS*) induziert werden. Auch eine Erhöhung der Induktorkonzentration auf 1 mM Zink führte zu keinem Anstieg der spez. β -Galaktosidase-Aktivität (Abb. 15a, 16a). Dasselbe Bild zeigte sich bei der *in trans* Komplementation mit pDNA130(*czcCBAD*). Die Anwesenheit von CzcCBA führte ebenfalls dazu, dass sich *zntA-lacZ* und *cadA-lacZ* (im *zntA*-Deletionsstamm) durch Zink nicht induzieren ließen (Abb. 15a, 16a). Bei der Inkubation dieser Stämme mit verschiedenen Cadmiumkonzentrationen wurde eine verminderte Induktion von *zntA-lacZ* und *cadA-lacZ* im Vergleich zu den Kontrollstämmen ohne *czcCBA* \pm *czcD* festgestellt. Bei Konzentrationen von 50 und 100 μ M Cadmium, den besten Induktorkonzentrationen für *zntA-lacZ* und *cadA-lacZ* in AE104, war z.B. die Aktivität der β -Galaktosidase in den Stämmen DN444(*zntA-lacZ*) und DN442(*cadA-lacZ*) mit *czcCBA* \pm *czcD* auf ~ 25 % im Vergleich zum Kontrollstamm herabgesetzt (Abb. 15b, 16b). Die Expression von *czcD* alleine hatte keine Auswirkung auf die Induzierbarkeit von *zntA-lacZ* oder *cadA-lacZ*, weder mit Zink- noch mit Cadmiumionen als Induktor (Abb. 15, 16). Die Stämme verhielten sich wie der Kontrollstamm mit dem Plasmid pVDZ'2 ohne Insert (Abb. 15, 16).

Der Transporterkomplex CzcCBA schien die Zinkionenkonzentration im Cytoplasma so weit herabzusetzen, dass sie unter der Schwellenkonzentration für die Induktion von *zntA-lacZ* und *cadA-lacZ* blieb. Bei Cadmium war die cytoplasmatische Konzentration durch CzcCBA wahrscheinlich ebenfalls stark vermindert, so dass auch hier keine volle Induktion von *zntA* und *cadA* erfolgte.

a)



b)

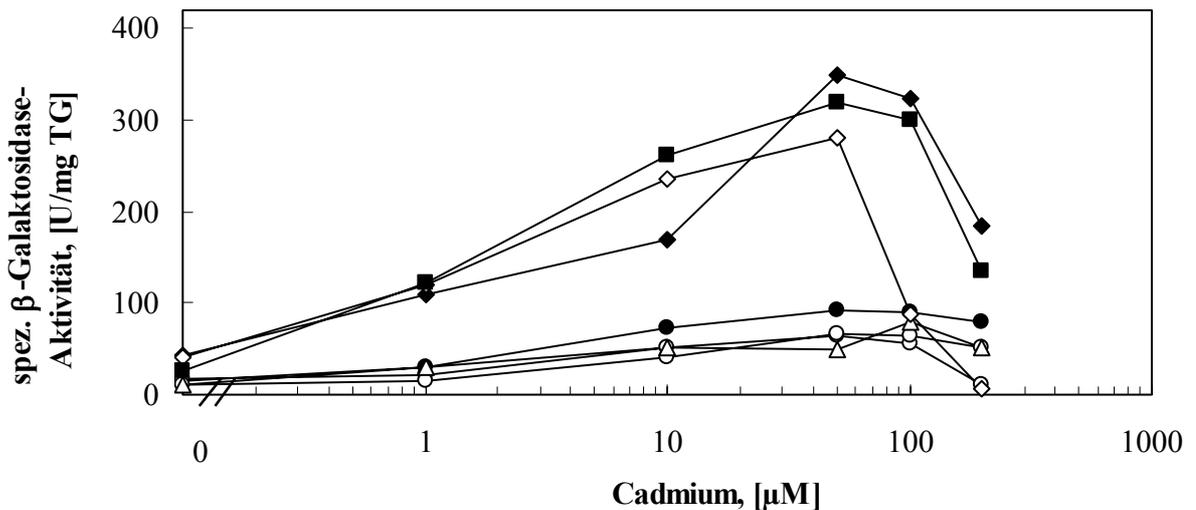
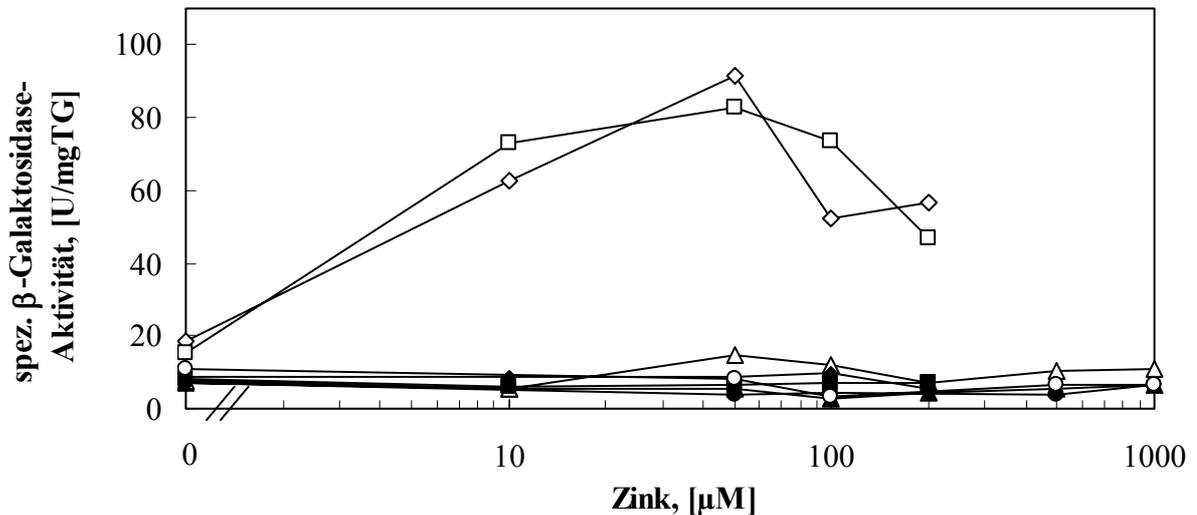


Abb. 15: Induktion einer *zntA-lacZ*-Operon-Fusion durch a) $ZnCl_2$ oder b) $CdCl_2$ in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen

Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme DN444(*zntA-lacZ*) (ausgefüllte Symbole) und DN445(Δ *cadA*, *zntA-lacZ*) (offene Symbole) mit pDNA385(*czcCBADRS'*) (●,○), pDNA130(*czcCBAD'*) (▲,△) oder pDNA176(*czcD*) (◆,◇) *in trans* mit verschiedenen a) Zink- und b) Cadmiumkonzentrationen inkubiert. Nach 3 h wurden 200 µl Proben entnommen, die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und die Mittelwerte aus drei Messungen gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Die Vektorkontrolle mit pVDZ'2 in DN441(*zntA-lacZ*) ist mit aufgetragen (■).

a)



b)

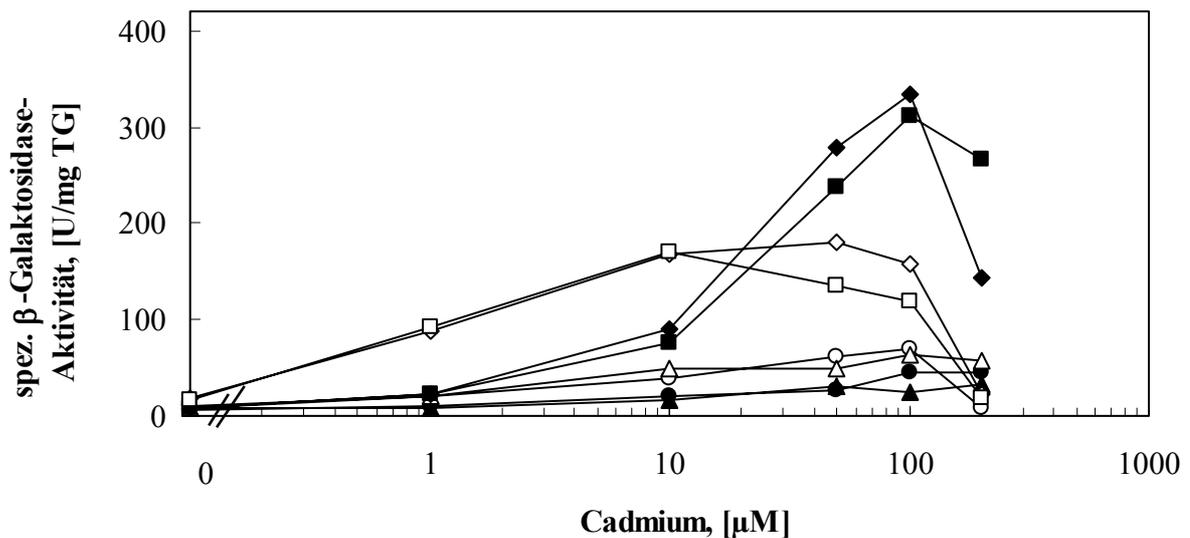


Abb. 16: Induktion einer *cadA-lacZ*-Operon-Fusion durch a) ZnCl_2 und b) CdCl_2 in verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen

Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme DN442(*cadA-lacZ*) (ausgefüllte Symbole) und DN443($\Delta zntA$, *cadA-lacZ*) (offene Symbole) mit pDNA385(*czcCBADRS'*) (\bullet , \circ), pDNA130(*czcCBAD'*) (\blacktriangle , \triangle) oder pDNA176(*czcD*) (\blacklozenge , \lozenge) *in trans* mit verschiedenen a) Zink- und b) Cadmiumkonzentrationen inkubiert. Nach 3 h wurden 200 μl Proben entnommen, die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und die Mittelwerte aus drei Messungen gegen die eingesetzten Metallkonzentrationen aufgetragen. Die Vektorkontrollen mit pVDZ'2 in den Stämmen DN442 und DN443 sind mit aufgetragen (\blacksquare , \square).

3.4.3. Einfluss von pMOL30 auf die Induzierbarkeit von *zntA* und *cadA*

Bei konstitutiver Expression der *czc*-Transportkomponenten unter Kontrolle des *lac*-Promotors des Plasmids pVDZ'2 inhibierte CzcCBA die Expression von *zntA-lacZ* oder *cadA-lacZ*. Um diese Wechselwirkung im Wildtyp-Stamm zu untersuchen, wurden die Plasmide pECD795(pLO2::*zntA-lacZ*) und pECD796(pLO2::*cadA-lacZ*) in den *R. metallidurans*-Stamm AE128 konjugiert. Dieser Stamm enthält das Megaplasmid pMOL30, auf dem das *czc*-Operon lokalisiert ist. Die entstandenen Stämme DN447(*zntA-lacZ*, pMOL30) und DN446(*cadA-lacZ*, pMOL30) besaßen alle vier bekannten Zn^{2+}/Cd^{2+} -Resistenzkomponenten aus *R. metallidurans*. Die Expression von *czcCBA* und *czcD* war nicht konstitutiv, sie konnte durch die Schwermetallionen Kobalt, Zink und Cadmium induziert werden (Grosse *et al.*, 1999). Die Stämme wurden mit 50 oder 100 μM $ZnCl_2$ bzw. $CdCl_2$ inkubiert und die Expression der CPx-Typ ATPase-Gene indirekt mit Hilfe der Messung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Ein Teil der Kulturen wurde während des Wachstums der Mittelkultur und der Hauptkultur mit 400 μM $CoCl_2$ inkubiert, um *czcCBA* schon vor der Inkubation mit $Zn(II)$ - oder $Cd(II)$ zu exprimieren. Es sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Expression von *zntA* bzw. *cadA* gibt, wenn *czcCBA* schon vorhanden war im Vergleich zur Situation, wenn *czcCBA* auch erst nach der Zn^{2+} - oder Cd^{2+} -Gabe exprimiert wurde. Bei den mit Kobaltionen inkubierten Kulturen wurde *czcCBA* schon vor der Zugabe von 50 oder 100 μM $ZnCl_2$ bzw. $CdCl_2$ exprimiert. CzcA konnte in den Kulturen mittels Antikörper-Nachweis detektiert werden (Abb. 17). Die CPx-Typ ATPase-Gene *zntA* bzw. *cadA* wurden nicht durch 100 μM Co^{2+} induziert (Tab. 6). Bei den Kulturen, die ohne Kobalt angezogen wurden, kam es erst nach der Inkubation mit Zink- oder Cadmiumionen zur verstärkten Expression von *czcA* (Abb. 17). Die Transkription von *zntA-lacZ* und *cadA-lacZ* war in AE128 (im Wildtyp-System) wie bei der konstitutiven Expression von *czcCBA* (\pm *czcD*) reprimiert. Mit 50 und 100 μM Zink (in AE104 beste Induktorkonzentration) kam es zu keinem Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität (Tab. 8), sowohl bei mit Kobalt vorinkubierten Zellen als auch ohne Kobalt. Bei 50 und 100 μM Cadmium kam es zu einem leichten Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität auf ~ 67 – 82 U/mg TG (Tab. 8), was bei einem Vergleich mit den Absolutwerten des künstlichen Systems, im selben Bereich lag (Abb. 15, 16). Bei den mit Kobalt vorinkubierten Zellen kam es in Bezug auf Cadmium nochmals zu einer leichten Reprimierung der *zntA-lacZ*- und *cadA-lacZ*-Induzierbarkeit.

Auch im natürlichen System schien die Expression der Transportkomponenten *czcCBA* eine starke Induktion von *zntA-lacZ* bzw. *cadA-lacZ* durch Zink- oder Cadmiumionen zu verhindern. Wie nach konstitutiver Expression schien die Zinkkonzentration durch den Transporter CzcCBA soweit herabgesetzt zu sein, dass die Schwellenwerte für die Induktion *zntA-lacZ* bzw. *cadA-lacZ* nicht erreicht wurden. Durch die ausgewählten Cadmiumionen-Konzentrationen ließen sich *zntA-lacZ* und *cadA-lacZ* nur schwach induzieren. Durch die

kobaltabhängige erhöhte Expression der *czc*-Strukturkomponenten kam es zu einer nochmaligen leichten Inhibierung der *zntA-lacZ*- bzw. *cadA-lacZ*-Transkription nach Inkubation mit Cd^{2+} . Möglicherweise wurden durch die schon vor der Cadmiuminkubation exprimierten Transportkomponenten CzcCBA und CzcD noch weniger Cadmiumionen in die *R. metallidurans*-Zellen aufgenommen, was zu dieser nochmals verringerten Induktion von *zntA-lacZ* bzw. *cadA-lacZ* führte.

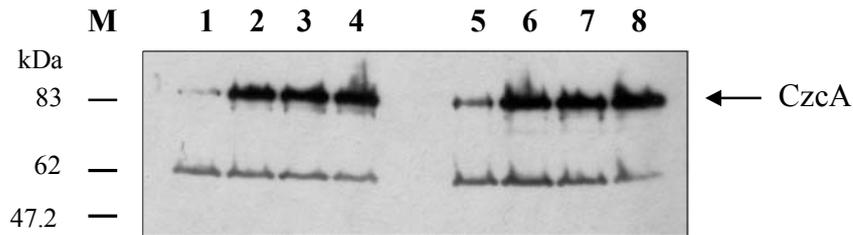


Abb. 17: Immunologischer Nachweis von CzcA in *R. metallidurans* AE128-Derivaten

Auf ein 10 %iges SDS-Laemmli-Gel wurden je 80 μg Trockengewicht von DN447(*zntA-lacZ*, pMOL30) (Spur 1-4) und von DN446(*cadA-lacZ*, pMOL30) (Spur 5-8) aufgetragen. In Spur 1-2 und 5-6 sind Proben vor der Inkubation (Spur 1 und 5) bzw. nach 3 h Inkubation mit 100 μM Cadmium aufgetragen (Spur 2 und 8). In Spur 3, 4, 7 und 8 sind Proben der mit 400 μM Kobalt angezogenen Kulturen vor der Inkubation (Spur 3 und 7) und nach 3 h Inkubation mit 100 μM Cadmium (Spur 4 und 8) aufgetragen. Nach dem elektrophoretischen Lauf wurde das Gel geblottet und CzcA mit spezifischen polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. M kennzeichnet die *Prestained Protein Marker*-Spur. Die Bande bei ~ 60 kDa ist eine unspezifisches Signal, deren Stärke ein Indiz für die Gleichverteilung der Proteinmengen in den einzelnen Spuren war.

Tab. 8: Bestimmung der spez. β -Galaktosidase-Aktivität [U/mg TG] nach Expression von *cadA-lacZ* oder *zntA-lacZ* in AE128, Vergleich von Stämmen die mit 400 μM CoCl_2 vorinkubiert wurden (zur Expression von *czcCBA*) mit uninkubierten Stämmen

Metall \ Stamm	DN446 (<i>cadA-lacZ</i>)	DN446 (<i>cadA-lacZ</i>) vorinkubiert	DN447 (<i>zntA-lacZ</i>)	DN447 (<i>zntA-lacZ</i>) vorinkubiert
ohne Metall	6.7 \pm 5.8	3.9 \pm 1.4	8.7 \pm 2	5 \pm 1.3
50 μM Zink	12.8 \pm 13.3	5.8 \pm 3.3	18.1 \pm 7.7	12.3 \pm 3
100 μM Zink	4.8 \pm 3.1	4.9 \pm 1.8	8.1 \pm 2.3	9.6 \pm 5
50 μM Cadmium	66.5 \pm 17.4	23.7 \pm 10.8	82 \pm 7.6	45.8 \pm 10.5
100 μM Cadmium	77.8 \pm 21.7	26.8 \pm 9.2	72.6 \pm 10	46.7 \pm 12.5

Alle Enzymaktivitäten sind in U/mg Zelltrockengewicht angegeben.

Bei den vorinkubierten Proben wurden den Zellen 400 μM CoCl_2 zum Wachstum zugesetzt. Bei einer Zelldichte von ~ 75 Klett wurden verschiedene Konzentrationen ZnCl_2 oder CdCl_2 zugegeben. Die spez. β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach 3 h bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

3.5. Biochemische Charakterisierung der CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA aus *R. metallidurans*

3.5.1. Reinigung von ZntA und CadA als *Strep-tag II*[®]-Fusion aus *E. coli*

Die Gene *zntA* und *cadA* sollten heterolog in *E. coli* überexprimiert und anschließend gereinigt werden, um darauf weitere Experimente aufbauen zu können. Mit Hilfe des *Strep-tag II*[®]-Systems (IBA-GmbH, Göttingen) können Proteine in einer Ein-Schritt-Affinitätschromatographie über die Bindung des fusionierten *Strep-tag II*[®]-Peptides (NH₂-WSHPQFEK-COOH) an das Säulenmaterial *StrepTactin*-Sephrose gereinigt werden. Sowohl ZntA als auch CadA wurden als C-terminales Fusionsprotein mit dem *Strep-tag II*[®]-Epitop gebildet. Für die verschiedenen Komplementationsexperimente der metallsensitiven *E. coli*-Stämme lagen *zntA* und *cadA* bereits in dem Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert vor (pECD800 bzw. pECD799) (3.3.). Es konnte gezeigt werden, dass die CPx-Typ ATPasen funktionell in *E. coli* synthetisiert wurden und Schwermetallresistenz vermittelten (Abb. 2, 3). Durch die Klonierung wurden an das Genprodukt von *zntA* N-terminal zusätzlich 8 Aminosäuren (AS) und C-terminal 23 AS (inklusive 8 AS des *Strep-tag II*[®]-Peptides) angehängt. An das Genprodukt von *cadA* wurden 15 AS N-terminal und 21 AS C-terminal angefügt. In beiden Fällen befand sich das *Strep-tag II*[®]-Peptid am C-Terminus. Die in pASK-IBA3 klonierten Gene lagen unter Kontrolle des *tetA*-Promotors, so dass die Expression durch Zugabe von 200 µg/l AHT induziert werden konnte. Beide Konstrukte wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21 überexprimiert und dann gereinigt (Abb. 18a, b). Dazu wurden die Proteine ZntA und CadA nach der Überexpression aus den Membranen mit 1.5 mg n-Dodecyl-β-D-Maltosid/mg Membranprotein solubilisiert. Aus 100 mg Membranprotein konnten ca. 0.5 mg Fusionsprotein ZntA- oder CadA-*Strep-tag II*[®] gereinigt werden.

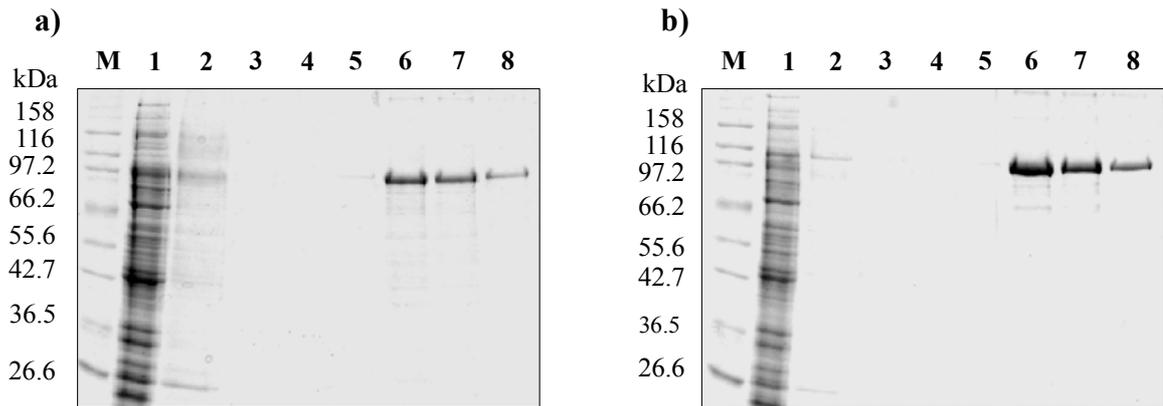


Abb. 18: Reinigung von a) ZntA und b) CadA als *Strep-tag-II*[®]-Fusionen nach Überexpression in BL21

ZntA bzw. CadA wurden als C-terminale Fusion mit dem *Strep-tag II*[®]-Peptid gereinigt. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte mit 1.5 mg n-Dodecyl- β -D-Maltosid/mg Membranprotein. Aufgetragen auf 10 %ige SDS-Laemmli-Gele sind je 3 μ l der Säulendurchläufe (Spur 1), der Waschfraktionen 1-2 (Spur 2-3), je 15 μ l der Waschfraktion 3 (Spur 4) und je 15 μ l der Elutionsfraktionen 1-4 (Spur 5-8). In Spur M ist der *Protein Marker, Broad Range* aufgetragen. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie gefärbt.

3.5.2. Bindung von Schwermetallionen an ZntA und CadA

Durch Wachstumsversuche konnte die *in vivo* Substratspezifität der CPx-Typ ATPasen festgestellt werden. Mittels Metall-Chelat-Sepharose sollte die *in vitro*-Bindung von Schwermetallionen an die gereinigten Proteine ZntA und CadA untersucht werden.

Dazu wurden 2 ml 100 mM Lösung, der Metallkationen: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} oder Ni^{2+} an 200 μ l Metall-Chelat-Sepharose immobilisiert. 60 μ g Protein (ZntA oder CadA), in 150 μ l Bindungspuffer gelöst, wurden zu 100 μ l metallbeladener Gelmatrix gegeben. Nach dem Waschen der Säule, um ungebundenes Protein zu entfernen, wurde das gebundene Protein durch die Zugabe von 10 mM EDTA gelöst. Nach der Fällung der Elutionen mit Trichloressigsäure wurden die Pellets in Bindungspuffer aufgenommen. Die Elutionen wurden auf ein 10 %iges SDS-Laemmli-Gel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung einer Silberfärbung unterzogen. ZntA war in der Lage an Cd^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} zu binden. Zu der mit Nickelionen und der nur mit Bindungspuffer equilibrierten Metall-Chelat-Sepharose konnte keine Affinität festgestellt werden (Abb. 19a). Auch CadA zeigte die Bindung an Cd^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} . Es war keine Affinität zu dem unbeladen und nickelbeladenen Säulenmaterial vorhanden (Abb. 19b).

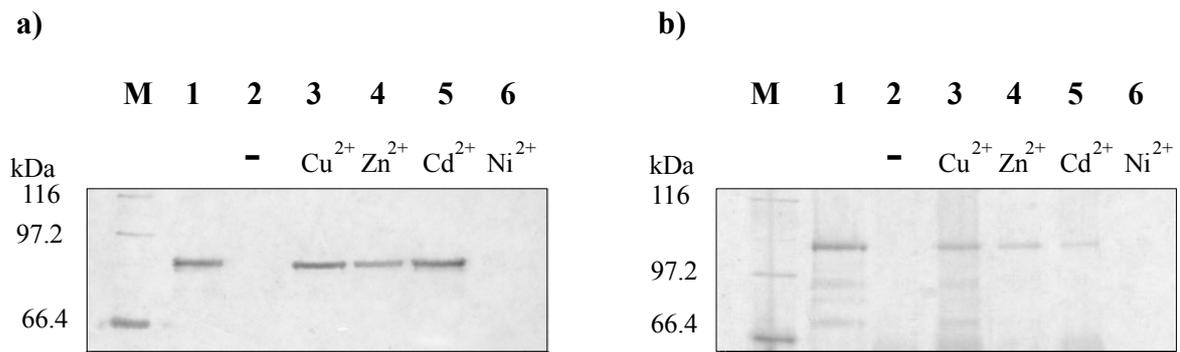


Abb. 19: Elutionsfraktionen der Metall-Chelat-Sepharose-Säulen mit gereinigtem a) ZntA und b) CadA

Die Bindung der gereinigten CPx-Typ ATPasen erfolgte an Metall-Chelat-Sepharose. Je 60 µg Protein wurde zum Säulenmaterial gegeben. Gebundenes Protein wurde nach dem Waschen mit 10 mM EDTA eluiert. Auf ein 10 %iges SDS-Laemmli-Gel wurden gereinigtes Protein in Spur 1 [a) ZntA; b) CadA], Elutionen in Spur 2-6 (Spur 2: unbeladenes Säulenmaterial; Spur 3: Cu²⁺-beladenes Säulenmaterial; Spur 4: Zn²⁺-beladenes Säulenmaterial; Spur 5: Cd²⁺-beladenes Säulenmaterial, Spur 6: Ni²⁺-beladenes Säulenmaterial) aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen. M kennzeichnet die Banden des *Protein Markers, Broad Range*.

3.6. [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP-Markierung von ZntA bzw. CadA

Der Transport von Schwermetallionen durch CPx-Typ ATPasen wird durch ATP-Spaltung energetisiert. Innerhalb dieses Prozesses wird ATP gebunden und es kommt zur reversiblen Phosphorylierung der CPx-Typ ATPasen. Um die Bindung von ATP bzw. Phosphat an ZntA bzw. CadA nachzuweisen wurde ein Assay mit radioaktivem [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP durchgeführt.

Von mit 200 µg/l AHT inkubierten *E. coli*-Zellen GG48 mit pECD800(*zntA*), GG48 mit pECD799(*cadA*) sowie dem Kontrollstamm GG48 mit pASK-IBA3 wurden Membranen isoliert und diese in einem Phosphorylierungsversuch eingesetzt. Der Nachweis der Bildung der *Strep*-tag II[®]-Fusionsproteine ZntA und CadA erfolgte über Detektion des *Strep*-tag II[®]-Peptides (Abb. 20). In den durchgeführten Phosphorylierungsexperimenten wurden 40 µg mit verschiedenen Schwermetallionen (Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺ oder Ni²⁺) vorbehandeltes Membranprotein mit MgCl₂ und 5 µCi [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (1 nm) eingesetzt.

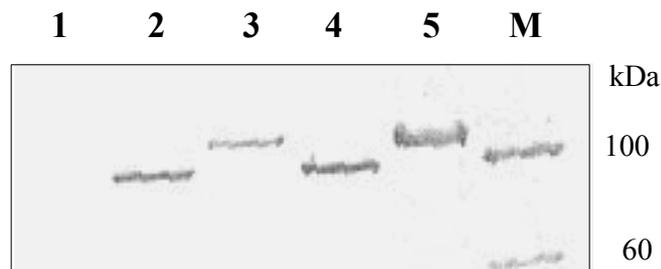


Abb. 20: Strep-tag II[®]-Nachweis von ZntA und CadA in Membranen des *E. coli*-Stammes GG48

Nach der Expression der Strep-tag II[®]-Fusionsproteine durch Zugabe von 200 µg/l AHT wurden Membranproben von *E. coli* GG48 mit pASK-IBA3 (Negativkontrolle) (Spur 1 = 1 µl Membranen), mit pECD800(*zntA*) (Spur 2 = 1 µl Membranen; Spur 4 = 3 µl Membranen) bzw. mit pECD799(*cadA*) (Spur 3 = 1 µl Membranen; Spur 5 = 3 µl Membranen) in einem 12.5 %igem SDS-Laemmli-Gel aufgetrennt. Nach dem Blot auf eine PVDF-Membran wurden die Strep-tag II[®]-Fusionsproteine mit Hilfe des Strep-tag II[®]-Peroxidase-Konjugates und anschließendem Farbnachweis detektiert. In Spur M ist der Strep-tag-Marker aufgetragen.

In Membranen des Stammes GG48 mit pECD800(*zntA*) wurde ohne Zusatz von Schwermetallionen eine [$\gamma^{32}\text{P}$]-markierte Proteinbande detektiert (Abb. 21a). Zum Größenvergleich wurde gereinigtes Protein (ZntA) auf das Gel aufgetragen. Die markierte Proteinbande lief auf der Höhe des gereinigten Proteins. Die Inkubation mit Zn^{2+} -, Cd^{2+} -, Pb^{2+} -, Cu^{2+} - oder Ni^{2+} -Ionen hatten keinen steigernden Einfluss auf die Phosphorylierung dieser Proteinbande. Im Vergleich dazu aufgetragene Membranen des Stammes GG48(pASK-IBA3) (Negativkontrolle), die mit 50 µM Zn^{2+} vorinkubiert wurden, zeigten keine phosphorylierte Proteinbande dieser Größe (Abb. 21a, Spur1). Bei Membranen des Stammes GG48 mit pECD799(*cadA*) konnte im Phosphorylierungsansatz ohne Schwermetallionen keine markierte Bande detektiert werden (Abb. 21b). Auf der Höhe des gereinigten CadA konnte durch Zugabe von Zn^{2+} , Pb^{2+} oder Cu^{2+} ein radioaktives Signal erhalten werden, gegenüber Cd^{2+} und Ni^{2+} wurde ein schwaches Signal detektiert.

Nach der Markierung mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP der *E. coli*-Membranen mit ZntA bzw. CadA kam es durch den Zusatz von 2 µM nichtradioaktivem ATP zur Verdrängung des radioaktiven ATP durch den Überschuss an unmarkiertem ATP (Abb. 21a, b). In beiden Fällen konnte eine Kompensation der Phosphorylierung durch Zugabe von nichtradioaktivem ATP im Überschuss erreicht werden.

In den Membranansätzen von GG48 mit pECD800(*zntA*) und GG48 mit pECD799(*cadA*) war eine durch [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierte Proteinbande erkennbar, die ZntA bzw. CadA zugeordnet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle mit Membranen von GG48 mit pASK-IBA3 kein Phosphorylierungssignal.

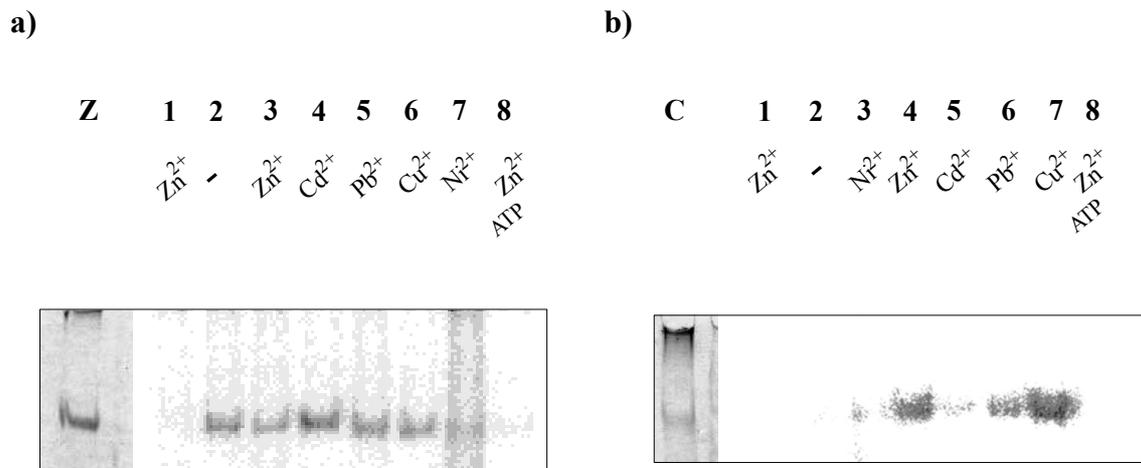


Abb. 21: Phosphorylierung von Membranen verschiedener *E. coli* GG48-Derivate mit je 5 μCi $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
 Pro Phosphorylierungsansatz wurden 40 μg Membranprotein mit je 50 μM Metall [ZnCl_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , NiCl_2] oder ohne Metall inkubiert und die Reaktion mit 5 μCi $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ gestartet.

- a) Aufgetragen sind Membranen von GG48 mit pASK-IBA3 mit 50 μM Zn^{2+} (Spur 1) und Membranen von GG48 mit pECD800(*zntA*) (Spur 2-8) mit verschiedenen Metallionen inkubiert. Zum Ansatz in Spur 8 wurden zusätzlich 2 μM unmarkiertes ATP gegeben. In Spur Z ist gereinigtes ZntA-Protein aufgetragen.
- b) Aufgetragen sind Membranen von GG48 mit pASK-IBA3 mit 50 μM Zn^{2+} (Spur 1) und Membranen von GG48 mit pECD799(*cadA*) (Spur 2-8) mit verschiedenen Metallionen inkubiert. Zum Ansatz in Spur 8 wurden zusätzlich 2 μM unmarkiertes ATP gegeben. In Spur C ist gereinigtes CadA-Protein aufgetragen.

3.7. Untersuchungen am CzcCBA-Transportsystem in *R. metallidurans*

3.7.1. Reinigung von CzcA als *Strep*-tag II[®]-Fusion aus *R. metallidurans*

Das Haupteffluxsystem für Kobalt, Zink und Cadmium in *R. metallidurans* CH34 ist das CzcCBA-System auf dem Megaplasmid pMOL30. Der Transporter CzcA bildet zusammen mit den Proteinen CzcB und CzcC den funktionierenden Efflux-Komplex. Experimentelle Daten zum Nachweis der Interaktion zwischen den einzelnen Komponenten des CzcCBA-Komplexes fehlen bislang. Pribyl (2001) konnte in Vernetzungsexperimenten eine Multimerisierung von CzcB beobachten. Für weiterführende Experimente zur Isolierung möglicher CzcCBA-Komplexe wurde versucht, ein Proteinexpressionssystem in *R. metallidurans* mit Hilfe des *Strep*-tag II[®]-Peptides und des Weitwirtsbereichsvektors pVDZ'2 aufzubauen. Das *Strep*-tag II[®]-System (IBA GmbH, Göttingen) mit den

entsprechenden Expressionsvektoren ist speziell für *E. coli* entwickelt. Durch die Fusion des *Strep*-tag II[®] mit einem zu exprimierenden Gen kann das gebildete Fusionsprotein anschließenden über die Bindung an *Strep*Tactin-Sepharose in einer Ein-Schritt-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Ausgegangen wurde von dem Plasmid pECD674, welches von Pribyl (2001) konstruiert wurde. In dem Vektor pT7-5 lagen die Gene *czcCBA* kloniert vor, wobei *czcA* mit der *Strep*-tag II[®]-Sequenz fusioniert war. Das Fragment *czcCBA*-*Strep*-tag II[®] wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI/*Hind*III ausgeschnitten und in den Vektor pVDZ'2 kloniert. Im entstandenen Plasmid pDNA387 wurden die Gene *czcCBA* unter Kontrolle des in *R. metallidurans* konstitutiven *lac*-Promotors transkribiert. Nach der Konjugation des Plasmids in *R. metallidurans* AE104 wurde untersucht, inwieweit sich der *Strep*-tag II[®] störend auf die durch *CzcCBA* vermittelte Zinkresistenz auswirkt. Zwischen den AE104-Stämmen mit pDNA130 (pVDZ'2::*czcCBAD'*) oder pDNA387 (pVDZ'2::*czcCBA*-*Strep*-tag II[®]) konnte kein Unterschied beim Wachstum auf Festmedium festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Der C-terminale *tag* aus acht zusätzlichen Aminosäuren schien keinen negativen Effekt auf die Proteinfunktion zu haben. Für die Reinigung von *CzcA*-*Strep*-tag II[®] aus *R. metallidurans* wurde AE104 mit pDNA387 in 200 ml LB-Medium mit Tetracyclin und 1 mM Zink bis zu einer Optischen Dichte (600 nm) von 1.8 angezogen. Nach der Zellernte wurden das Pellet in 5 ml Puffer W aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Membranpräparation wurden diese mit 2 mg n-Dodecyl-β-D-Maltosid/mg Membranprotein und 3.5 mg/ml Phospholipiden solubilisiert. *CzcA* aus *R. metallidurans* wurde über eine *Strep*Tactin-Sepharose-Säule gereinigt (Abb. 22).

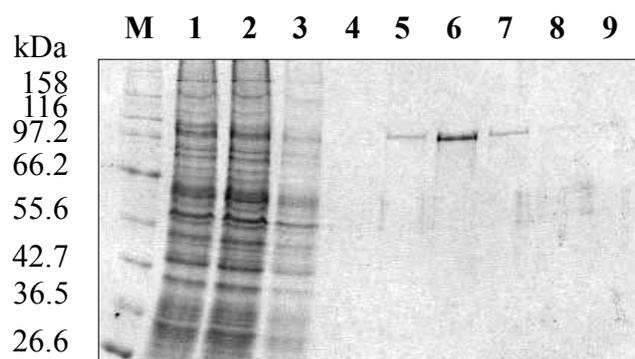


Abb. 22: Reinigung von *CzcA* als *Strep*-tag II[®]-Fusionsprotein aus *R. metallidurans*

Auf ein 10 %iges SDS-Laemmli-Gel wurden je 5 µl vom Solubilisat (Spur 1), vom Durchlauf (Spur 2), von der Waschfraktion 1 (Spur 3), 10 µl der vierten Waschfraktion (Spur 4) und je 17 µl der Elutionsfraktionen 1-5 (Spur 5-9) aufgetragen. In Spur 5 sind 0.7 µg, Spur 6 1.7 µg und in Spur 7 0.6 µg Protein aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. In der Spur M ist der *Protein Marker, Broad Range*, aufgetragen.

3.7.2. *In vivo* Vernetzungsexperimente in *R. metallidurans* führen zum Nachweis der Interaktion zwischen CzcA und CzcB

Mit Hilfe von *in vivo* Vernetzungsexperimenten der Strukturproteine (CzcC, CzcB und CzcA) des *czc*-Effluxkomplexes in *R. metallidurans* sollte nach Hinweisen auf die Interaktion dieser Komponenten miteinander gesucht werden. Durch Pribyl (2001) konnte mit Hilfe von Formaldehyd *in vivo* eine Multimerisierung des Membranfusionsproteins CzcB nach heterologer Expression in *E. coli* nachgewiesen werden. Die Detektion der Czc-Komponenten erfolgte mit Hilfe des immunologischen Nachweises von CzcA und CzcB. Auf CzcC wird nicht weiter eingegangen, da die vorhandenen Antikörpern gegen dieses Protein zu unspezifisch reagierten.

Die Vernetzungsexperimente mit Formaldehyd wurden mit *R. metallidurans* AE104 und verschiedenen pVDZ'2-Derivaten durchgeführt. Zum Einsatz kamen die pVDZ'2-Konstrukte *czcCBA-Strep-tag II*[®], *czcCB* und *czcCB'A-Strep-tag II*[®].

Die Plasmide pDNA387(*czcCBA-Strep-tag II*[®]) und pDNA324(*czcCB*) lagen bereits vor. Für die Konstruktion des *czcCB'A*-Fragmentes wurden 2 Fragmente aus *R. metallidurans* CH34-DNA amplifiziert, mit den Primern CzcC-*EcoRI* und Δ CzcCB 3'*KpnI* von *czcC* bis zum Anfang von *czcB*, sowie mit den Primern Δ CzcBA 5'*KpnI* und CzcA *BamHI* vom Ende von *czcB* bis zum Ende von *czcA*. Nacheinander wurden die Fragmente *czcCB'* und *czcB'A* in pUC18 ligiert, dadurch entstand die Genstruktur *czcCB'A*. Von CzcB waren insgesamt noch 17 AS vorhanden. Das entstandene Plasmid wurde *SphI/HindIII* geschnitten, ebenso das Plasmid pECD674 (pT7-5::*czcCBA-Strep-tag II*[®]). Anschließend wurde das *czcA'-Strep-tag II*[®]-Fragment mit pUC18::*czcCB'A* ligiert. Das resultierende Plasmid pUC18::*czcCB'A-Strep-tag II*[®] wurde *EcoRI/HindIII* geschnitten und das *czcCB'A-Strep-tag II*[®]-Fragment in pVDZ'2 kloniert, dadurch entstand das Plasmid pDNA386.

Die Vernetzungsexperimente wurden mit Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase mit 0.25 % (v/v) Formaldehyd durchgeführt. Die Detektion der CzcB- und CzcA-Komplexe erfolgte mit Hilfe des immunologischen Nachweises mit CzcB- und CzcA-spezifischen polyklonalen Antikörpern.

Bei dem Vernetzungsexperiment von AE104 mit pDNA387(*czcCBA-Strep-tag II*[®]) konnten im Nachweis mit CzcA-Antikörpern neben der CzcA-Bande von ~ 116 kDa eine zweite Bande detektiert werden, die deutlich größer als 212 kDa war (Abb. 23 [a]). Bei dem Nachweis mit CzcB-Antikörpern wurde ebenfalls eine Bande in dieser Größe markiert. Dies deutete daraufhin, das sowohl CzcB als auch CzcA in diesem Proteinkomplex vorhanden waren. Beim Nachweis mit CzcB-Antikörpern waren weitere Banden neben dem CzcB-Monomer (56 kDa) detektierbar (Abb. 23). Die Signale wiesen Größen von ~ 160 kDa (d), ~ 180 kDa (c) und \geq 212 kDa (b) auf (Abb. 23). Dies könnten unter anderem Multimere von CzcB darstellen. Diese Banden waren auch in AE104 mit dem *czcCB*-Konstrukt sichtbar. Die

>212 kDa Bande war nur bei Expression von *czcB* und *czcA* detektierbar. Ohne *czcB* im *czcCB'A*-Konstrukt war diese Bande nicht sichtbar. Sowohl in mit Zink, als auch ohne Zink angezogenen Zellen mit pDNA387(*czcCBA*-*Strep*-tag II[®]) war die Bande nachweisbar (Ergebnis nicht gezeigt), was dafür spricht, dass in diesem Versuchsansatz die Interaktion zwischen *CzcA* und *CzcB* unabhängig vom transportierten Metall war.

Mittels Vernetzungsexperimenten mit Formaldehyd konnte eine Interaktion zwischen *CzcA* und *CzcB* nachgewiesen werden.

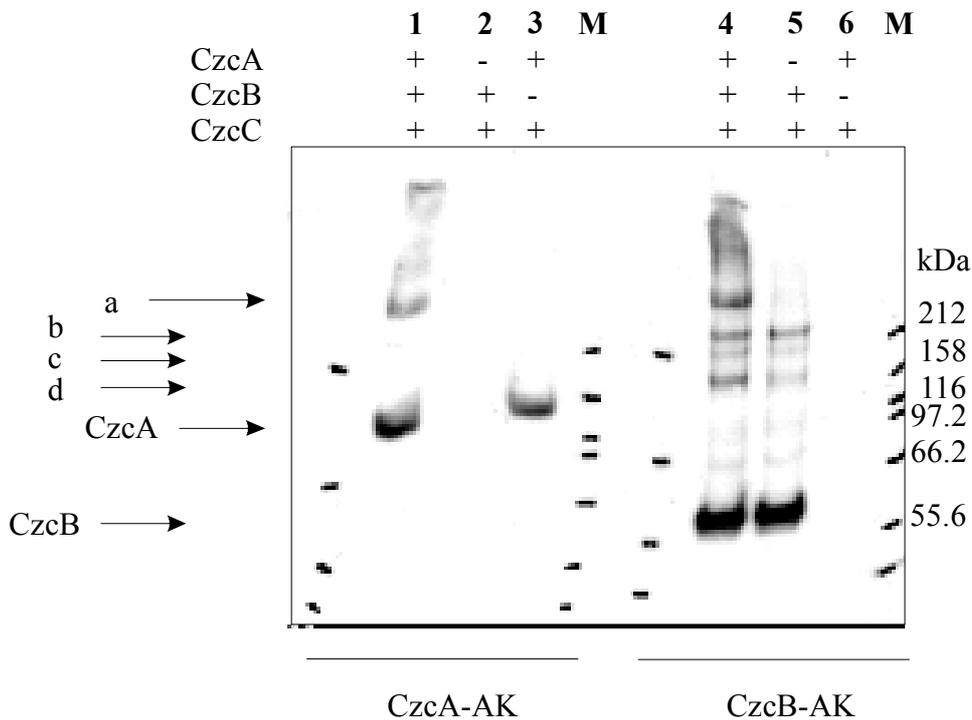


Abb. 23: Nachweis von *CzcA*- bzw. *CzcB*-haltigen Proteinkomplexen nach Vernetzung mit 0.25 % (v/v) Formaldehyd

Rohextrakte von *R. metallidurans*-Stämmen wurden nach *in vivo* Vernetzung (30 min, 0.25 % HCHO, 37°C) präpariert, in einem SDS-Laemmli-Gel (4-10 %) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit polyklonalen *CzcA*- bzw. *CzcB*-Antikörpern (AK) nachgewiesen. Die *CzcA*- und *CzcB*-Monomere sind als solche gekennzeichnet. Die Pfeile a-d stellen neuentstandene Proteinkomplexe dar. Auftragen sind in Spur 1 und 4 AE104 mit pDNA387 (*CzcCBA*-*Strep*-tag II[®]), in Spur 2 und 5 AE104 mit pDNA324 (*czcCB*), in Spur 3 und 6 AE104 mit pDNA386 (*czcCB'A*-*Strep*-tag II[®]). Die Spuren 1-3 wurden dem Nachweis mit *CzcA*-Antikörpern und die Spuren 4-6 mit *CzcB*-Antikörpern unterzogen. M kennzeichnet die Banden des *Protein Markers, Broad Range*.

4. DISKUSSION

Resistenz gegenüber den Schwermetallionen Zink und Cadmium kann innerhalb der Prokaryoten unter anderem durch Efflux der Ionen über drei verschiedene Transportfamilien vermittelt werden (Nies, 2003). Dies sind zum einen Vertreter der RND-Proteinfamilie (*resistance, nodulation, cell division*) (T.C.2.A.6.1.1 (Saier, 2000a)]; <http://tcdb.ucsd.edu/tcdb/tcclass.php>), zum anderen der CDF-Familie (*cation diffusion facilitator*) (T.C.2.A.4.1.1-2) und der CPx-Typ ATPasen (T.C.3.A.3). RND-getriebene Efflux-Komplexe bestehen aus drei Protein-Komponenten, der eigentlichen Pumpe, dem RND-Transporter (Tseng *et al.*, 1999), einem Membranfusionsprotein (MFP) (Dinh *et al.*, 1994; Saier *et al.*, 1994; Johnson und Church, 1999) und einem *outer membrane factor* (OMF) (Paulsen *et al.*, 1997; Johnson und Church, 1999). Der Proteinkomplex ist in der Lage die komplette Zellwand der Gram-negativen Bakterien zu überbrücken und die Schwermetallionen direkt ins Außenmedium zu transportieren (Saier *et al.*, 1994). Im Unterschied dazu pumpen die CDF-Proteine bzw. die CPx-Typ ATPasen ihre Substrate nur vom Cyto- ins Periplasma bzw. über nur eine biologische Membran. Die CDF-Proteine werden vom chemoosmotischen Gradienten, der durch Protonen oder Kaliumionen gebildet wird, angetrieben (Guffanti *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Die CPx-Typ ATPasen werden durch die Hydrolyse von ATP energetisiert (Tsai *et al.*, 1992; Rensing *et al.*, 1997a).

Im Laufe der Evolution haben sich die Organismen an ihre jeweiligen Lebensräume angepasst. Ein Beispiel hierfür ist die Ausstattung mit unterschiedlichen Effluxsystemen in Reaktion auf die Zink- und Cadmiumionenkonzentrationen an dem jeweiligen Standort. Anhand der Sequenzen von 64 Prokaryotengenomen konnte eine Analyse über das Vorkommen der drei Proteinfamilien, die Zn^{2+}/Cd^{2+} -Efflux vermitteln, vorgenommen werden (Nies, 2003), am häufigsten sind die CPx-Typ ATPasen und die CDF-Proteine zu finden. Sie kommen bei Organismen vor, die in der Regel keinen extrem hohen Zink- oder Cadmiumionenkonzentrationen ausgesetzt sind (Nies, 2003). Vertreter der RND-Familie, die Zn^{2+}/Cd^{2+} -Efflux vermitteln, wurden nur in einem geringen Teil der analysierten Bakteriengenome gefunden (in sechs Organismen) und auch nur in Kombination mit einem CDF-Protein (ein Vertreter), einer Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden CPx-Typ ATPase (zwei Vertreter) oder beiden (drei Vertreter) (Nies, 2003). Die RND-Proteinkomplexe vermitteln Resistenz in Organismen, die an ihrem Standort extremen Schwermetallbelastungen, hervorgerufen durch z.B. anthropogene Einflüsse, ausgesetzt sein können. RND-Transporter findet man unter anderem in den Wasser- und Bodenbakterien *R. metallidurans* CH34 (Nies *et al.*, 1989b) oder *P. aeruginosa* (Hassan *et al.*, 1999).

Die drei einzelnen Proteinfamilien (RND, CDF und CPx-Typ ATPasen) sind gut untersucht (Tseng *et al.*, 1999; Gaither und Eide, 2001; Gatti *et al.*, 2000; Blencowe und Morby, 2003) aber es ist wenig über Beziehungen der Systeme untereinander bekannt bei der

Aufrechterhaltung der Schwermetallhomöostase, wenn sie gemeinsam vorkommen. Im β -Proteobakterium *R. metallidurans* CH34 kommen Vertreter aus allen drei Protein-Familien vor, die Zink- oder Cadmiumionen transportieren können (Mergeay *et al.*, 2003; Nies, 2003). Dieser Organismus ist daher sehr gut geeignet, um das Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Metallpumpen zu untersuchen. Der Wildtypstamm *R. metallidurans* CH34 besitzt zwei Megaplasme auf denen verschiedene Metallresistenz-Determinanten lokalisiert sind. Die *czc*-Determinante auf dem Megaplasmid pMOL30 vermittelt Resistenz gegenüber Co(II), Zn(II) und Cd(II) (Nies *et al.*, 1987). Sie trägt die Gene für den RND-Transportkomplex CzcCBA. Er ist zusammengesetzt aus dem RND-Protein CzcA, dem MFP CzcB und dem OMF CzcC (Nies *et al.*, 1989b; Nies, 1995; Rensing *et al.*, 1997b). Ein zweiter Effluxtransporter, der von der *czc*-Determinante kodiert wird, ist das CDF-Protein CzcD (van der Lelie *et al.*, 1997; Anton *et al.*, 1999). Es transportiert ebenfalls Schwermetallionen und ist an der Regulation von *czcCBA* beteiligt (Anton *et al.*, 1999, Anton, 2001). Mit dem Verlust des Megaplasmid pMOL30 (mit der *czc*-Determinante), sinkt die Cd(II), Zn(II), Co(II)-Resistenz vom millimolaren Bereich (5-20 mM) in den mikromolaren Bereich ($\sim 200 \mu\text{M}$) im megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm AE104 (Mergeay *et al.*, 1985). Durch Anton (2001) konnten zwei CPx-Typ ATPasen in *R. metallidurans* identifiziert werden, die Resistenz gegen Zn(II) und Cd(II) vermitteln.

4.1. CPx-Typ ATPasen ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} aus *R. metallidurans*¹

Die CPx-Typ ATPasen (Solioz und Vulpe, 1996), auch *soft-metal* transportierende P-Typ ATPasen genannt (Rensing *et al.*, 1999), bilden eine Untergruppe (IB) der P-Typ ATPasen. Die Familie der P-Typ ATPasen ist ubiquitär verbreitet. Mehr als 250 Vertreter wurden innerhalb der Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeen identifiziert (<http://biobase.dk/~axe/Patbase.html>). Sie stellen Effluxpumpen dar, die geladene Substrate wie K⁺, Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu⁺, Ag⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Co²⁺ oder Phospholipide über biologische Membranen gegen ihren Konzentrationsgradienten transportieren. Die P-Typ ATPasen bestehen aus einer oder in selteneren Fällen aus mehreren Untereinheiten (Palmgren und Axelsen, 1998). Der Transport des Substrates wird durch die Hydrolyse von ATP energetisiert. Bei der ATP-Spaltung wird das Protein kovalent phosphoryliert (Moller *et al.*, 1996), daher auch P-Typ ATPase. Das unterscheidet sie von anderen ATPasen, wie V-Typ oder F-Typ ATPasen (Lutsenko und Kaplan, 1995). Die P-Typ ATPasen durchlaufen während des Transportzyklusses größere Konformationsänderungen (Toyoshima und Nomura, 2002). Sie bilden dabei verschiedene Strukturen aus, die sich außerdem durch eine hohe Affinität zum Substrat (E₁) bzw. eine geringe Affinität (E₂) unterscheiden (Toyoshima

¹ _{Rm} steht für *R. metallidurans*

und Nomura, 2002). Die P-Typ ATPasen werden von Axelsen und Palmgren (1998) aufgrund ihrer Primärstruktur, ihrer Topologie und der Substratspezifität in fünf Gruppen unterteilt. In die Gruppe I gehören die Schwermetall-transportierenden P-Typ ATPasen (CPx-Typ ATPasen) und K⁺-Pumpen aus Bakterien, in die Gruppe II Ca²⁺-, Na⁺/K⁺-, H⁺/K⁺-Pumpen, in die Gruppe III H⁺- und Mg²⁺-Pumpen, in die Gruppe IV Phospholipidtransporter und in die Gruppe V P-Typ ATPasen mit unbekannter Funktion (Axelsen und Palmgren, 1998).

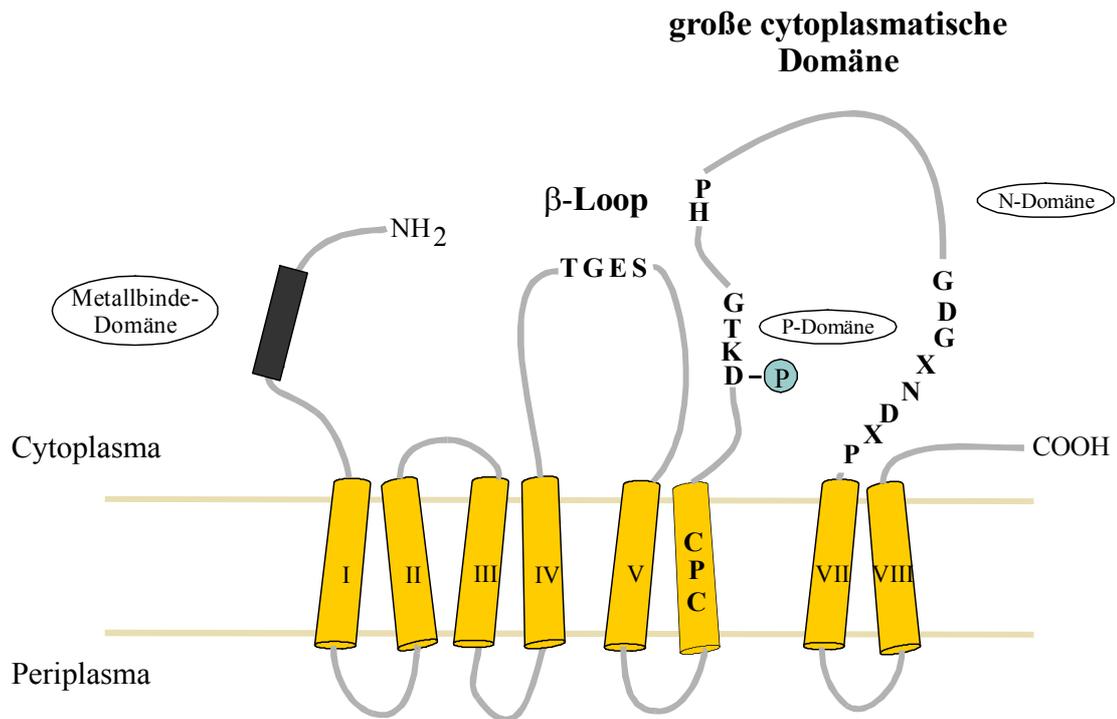


Abb. 24: Topologiemodell einer CPx-Typ ATPase

Dargestellt ist das Modell einer typischen CPx-Typ ATPase mit 8 transmembranen Helices (gelbe Zylinder). Die N-terminale Metallbinde-Domäne mit einem Metallbinde-Motiv (■), die zwei cytoplasmatischen Domänen (β -Loop und große cytoplasmatische Domäne) die Phosphorylierungs- (P) und die Nukleotidbinde-Domäne (N) sowie konservierte Sequenzmotive wurden hervorgehoben. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code dargestellt. $\textcircled{\text{P}}$ kennzeichnet die Phosphorylierungsstelle des Proteins.

Eine typische CPx-Typ ATPase besteht aus acht transmembranen Helices (TMH) und zwei großen cytoplasmatischen Bereichen, dem β -Loop zwischen den TMH IV und V und der großen cytoplasmatischen Domäne zwischen den TMH VI und VII mit der Phosphorylierungs- (P) und der Nukleotidbinde-Domäne (N) (Abb. 24) (Melchers *et al.*, 1996; Bayle *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2002). Im cytoplasmatischen N-Terminus können sich 1-6 Metallbindemotive befinden. Diese können beispielsweise die Form GXXCXXC oder (M/H)XXMDH(S/G)XM aufweisen (Gatti *et al.*, 2000). In der sechsten transmembranen Helix ist das den CPx-Typ ATPasen namensgebende CPX-Motiv zu finden. Dieses stellt die putative Translokationsstelle dar, die Bindestelle des zu transportierenden Substrates auf

seinem Weg über die Membran (Solioz und Vulpe, 1996). In den meisten Fällen wird ein hochkonservierter Prolinrest von zwei Cysteinen flankiert. Es kommen allerdings auch Motive der Form CPH, CPS oder SPC vor. 30-50 Aminosäuren C-terminal zum CPX-Motiv befindet sich eine konservierte Histidin-Prolin-Sequenz. Diese kommt nur in Schwermetall-transportierenden P-Typ ATPasen vor (Solioz und Vulpe, 1996). Die CPx-Typ ATPasen können nach der Art der zu transportierenden Ionen nochmals unterteilt werden in Cu(I)/Ag(I)-transportierende oder Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierende P-Typ ATPasen (Rensing *et al.*, 1999). Zu den Cu(I)/Ag(I)-transportierenden ATPasen gehören unter anderem CopB aus *Enterococcus hirae* (Odermatt *et al.*, 1993), CopA aus *E. coli* (Rensing *et al.*, 2000) ebenso wie die Proteine ATP7A (Vulpe *et al.*, 1993) und ATP7B (Bull *et al.*, 1993) des Menschen. Schädigungen von ATP7A bzw. ATP7B können zu verschiedenen Störungen im Kupferhaushalt der Zellen führen und damit zu Krankheiten, wie dem Menkes bzw. Wilsons Syndrom. Zu den Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden ATPasen gehören unter anderem CadA aus *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al.*, 1989), ZntA aus *E. coli* (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997a) und PbrA aus *R. metallidurans* CH34 (Borremans *et al.*, 2001). CadA aus *Helicobacter pylori* transportiert neben Zink und Cadmium auch Kobalt (Herrmann *et al.*, 1999). Für CoaT aus *Synechocystis* PCC 6803 wurde ebenfalls Kobalt als Substrat nachgewiesen (Rutherford *et al.*, 1999).

Mit der vollständigen Sequenzierung des *R. metallidurans* CH34-Genoms im Jahr 2000 (http://www.genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html) konnten neben PbrA (Borremans *et al.*, 2001) sieben weitere potentielle Gene für CPx-Typ ATPasen identifiziert werden (Mergeay *et al.*, 2003). Von den sieben vollständigen Sequenzen für CPx-Typ ATPasen scheinen drei in die Gruppe der Cu(I)/Ag(I)-transportierenden P-Typ ATPasen und vier in die Gruppe der Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden P-Typ ATPasen zu gehören (Mergeay *et al.*, 2003). Von den CPx-Typ ATPasen, deren Substrate divalente Schwermetallionen zu sein scheinen, liegen das Gen für PbrA und Gen6917/*contig692* auf dem Megaplasmid pMOL30 (Borremans *et al.*, 2001; Anton, 2001). Die Lage von *zntA* (Gen4648/*contig649*), von Mergeay (2003) als *cadA* bezeichnet, wurde mittels PCR-Analysen (Anton, 2001) und Southern-Blot als chromosomal bestimmt. Ebenso konnte *cadA* (Gen6751/*contig691*) mittels PCR-Analysen auf dem Chromosom nachgewiesen werden (Anton, 2001). Dies wurde mit Hilfe eines Southern-Experimentes mit genomischer DNA vom megaplasmidlosem *R. metallidurans*-Stamm AE104 bestätigt. Die Topologievorhersagen für die putativen Proteine ZntA und CadA anhand des Hydropathie-Profiles nach Kyte und Doolittle (1982) wiesen typische Merkmale der CPx-Typ ATPasen auf, wie z.B. acht transmembrane Helices, 2 große cytoplasmatische Bereiche und das CPx-Motiv in der TMH VI (Abb. 25).

Die Gene *zntA* und *cadA* aus *R. metallidurans* und deren Genprodukte werden im folgenden zur Verdeutlichung durch _{Rm} gekennzeichnet (*zntA*_{Rm}, *cadA*_{Rm}, ZntA_{Rm}, CadA_{Rm}).

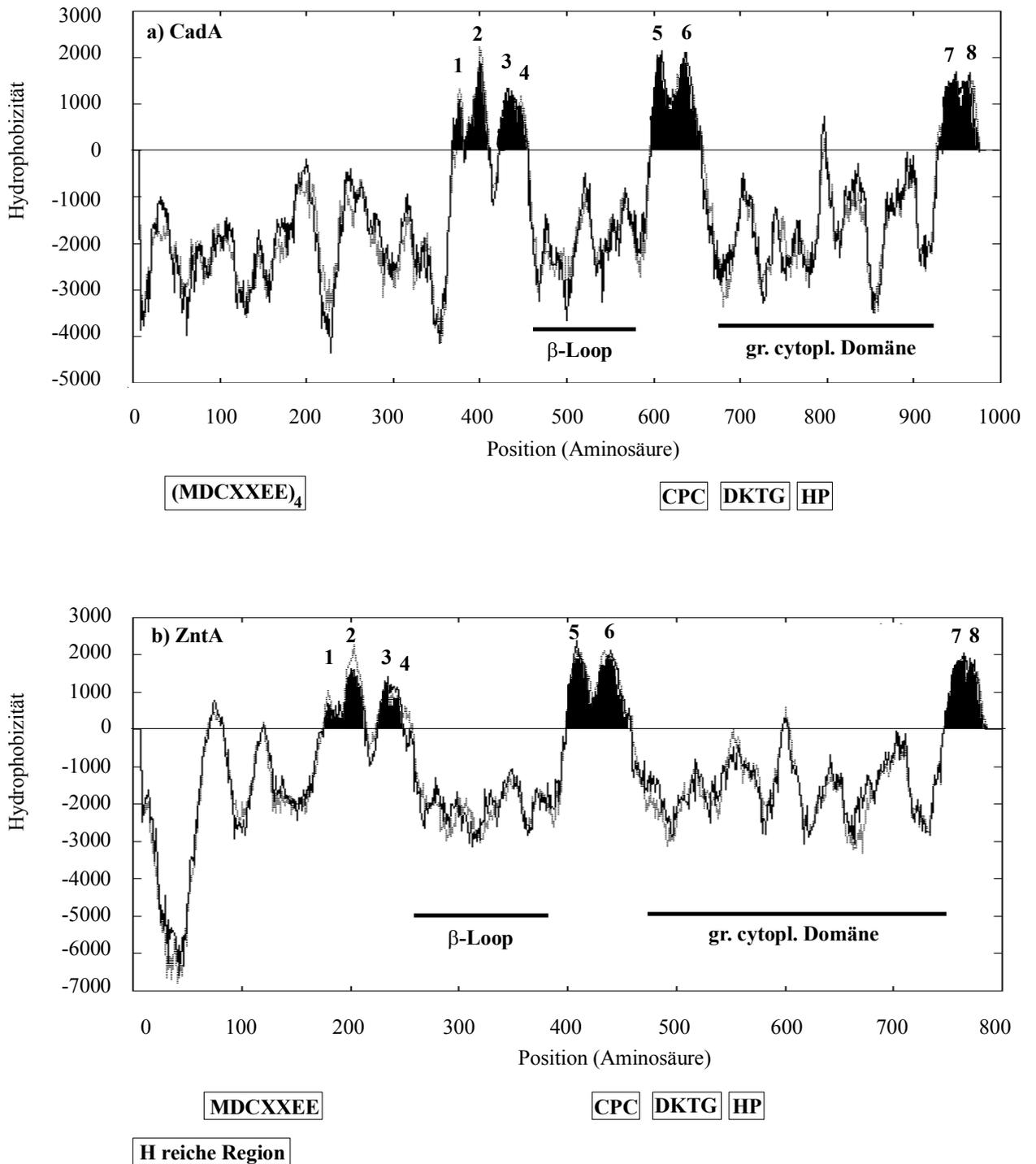


Abb. 25: Hydrophathie-Profil von a) CadA_{Rm} und b) ZntA_{Rm} nach Kyte und Doolittle (1982)

Die Hydrophobizität ist gegen die Aminosäuren (AS) der Proteine aufgetragen. Hydrophobe AS haben positive, hydrophile negative Werte. Die vorhergesagten transmembranen Regionen sind schwarz schattiert. Schwarze Balken kennzeichnen den β -Loop und die große cytoplasmatische Domäne. Die Positionen einiger typischer AS-Motive der CPx-Typ ATPasen sind hervorgehoben.

4.1.1. Expression von $zntA_{Rm}$ oder $cadA_{Rm}$ in metallsensitiven Stämmen von *E. coli*

Anton (2001) konnte zeigen, dass die Zerstörung der Gene für $ZntA_{Rm}$ oder $CadA_{Rm}$ durch Insertionsmutation im megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm AE104 zu einer Verringerung der Zink- bzw. Cadmiumresistenz führten. Zur weiteren Funktionsuntersuchung wurden die Gene $zntA_{Rm}$ bzw. $cadA_{Rm}$ aus *R. metallidurans* im Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-sensitiven *E. coli*-Stamm GG48 ($zntA::kan$, $\Delta zitB::cm$) (Grass *et al.*, 2001) unter Kontrolle des *tetA*-Promotors exprimiert.

Durch die Expression von $zntA_{Rm}$ erhöhte sich die Resistenz des *E. coli*-Stammes GG48 gegenüber Zink um das Vierfache. Dadurch erreichte GG48 fast das Resistenzniveau des *E. coli* Wildtyp-Stammes W3110 (in dem sowohl die *E. coli* CPx-Typ ATPase ZntA als auch das CDF-Protein ZitB gebildet wurden) (Abb. 2). Die Cadmiumresistenz des Stammes erhöhte sich leicht um den Faktor 2. Auf Festmedium erhöhte sich die Bleiresistenz um den Faktor 0.5. Die Expression von $cadA_{Rm}$ hatte ebenfalls eine steigernde Wirkung auf die Zink- (Faktor 1.75) und Cadmiumresistenz (Faktor 7) des *E. coli*-Stammes GG48 (Abb. 2). Es konnten aber Unterschiede in der Resistenzausbildung gegenüber Zink- und Cadmiumionen zwischen den beiden CPx-Typ ATPasen beobachtet werden. Während $ZntA_{Rm}$ nach heterologer Expression im *E. coli*-Stamm GG48 zu einer ausgeprägteren Zinkresistenz führte, war $CadA_{Rm}$ für eine höhere Cadmiumresistenz verantwortlich.

Bei Transportstudien mit radioaktiven Metallisotopen konnte beobachtet werden, dass sich durch die Expression von $zntA_{Rm}$ im *E. coli*-Stamm GG48 ($zntA::kan$, $\Delta zitB::cm$) die akkumulierte Menge an Schwermetallionen um den Faktor 4-5 für Zink und um den Faktor von ca. 7 für Cadmium im Vergleich zur Kontrolle verringerte (Abb. 3). Durch die Expression von $cadA_{Rm}$ in GG48 ergaben sich ähnliche Faktoren. Die CPx-Typ ATPasen $ZntA_{Rm}$ oder $CadA_{Rm}$ verringerten somit die Akkumulation von Zink bzw. Cadmium in dem *E. coli*-Stamm GG48.

Die CPx-Typ ATPasen transportieren im Allgemeinen entweder monovalente oder divalente Kationen. Es gibt aber auch Hinweise auf die Resistenzvermittlung gegen sowohl einwertige als auch zweiwertige Kationen durch eine CPx-Typ ATPase (Riggle und Kumamoto, 2000; Tong *et al.*, 2002). Bxa1 aus dem Cyanobakterium *Oscillatoria brevis* ist der erste identifizierte Vertreter der bakteriellen CPx-Typ ATPasen, der Resistenz sowohl gegen einwertige als auch gegen zweiwertige Schwermetallionen vermittelt (Tong *et al.*, 2002). Durch Transkriptions-Untersuchungen wurde gezeigt, dass die mRNA-Bildung von *bxa1* durch Cu(I), Ag(I), Cd(II) bzw. Zn(II) induziert werden konnte. Nach heterologer Expression im *E. coli*-Stamm TOPO10 vermittelte Bxa1 auch Resistenz gegen diese monovalenten und divalenten Kationen (Tong *et al.*, 2002). Die Möglichkeit des Transportes von einwertigen und zweiwertigen Schwermetallionen durch ein und dieselbe CPx-Typ ATPase wurde bereits für CRD1 aus *Candida albicans* untersucht (Riggle und Kumamoto, 2000). CRD1 vermittelt

Resistenz gegenüber Kupfer-, Silber- und möglicherweise auch gegenüber Cadmiumionen (Riggle und Kumamoto, 2000).

Um zu untersuchen, ob auch $ZntA_{Rm}$ oder $CadA_{Rm}$ aus *R. metallidurans* in der Lage sind sowohl Resistenz gegen zweiwertige als auch gegen einwertige Schwermetallionen zu vermitteln, wurde $zntA_{Rm}$ bzw. $cadA_{Rm}$ im kupfersensitiven *E. coli*-Stamm DW3110 (*copA::kan*) (Rensing *et al.*, 2000) exprimiert. Die Bildung von beiden CPx-Typ ATPasen hatte keinen Einfluss auf die Resistenz des Stammes gegenüber Kupferionen, demzufolge gehören $ZntA_{Rm}$ und $CadA_{Rm}$ zu den typischen Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden CPx-Typ ATPasen, die exklusiv zweiwertige Schwermetallionen transportieren. $ZntA_{Rm}$ und $CadA_{Rm}$ scheinen allerdings mit unterschiedlicher Effizienz Resistenz gegenüber Zink- und Cadmiumionen in *E. coli* zu vermitteln und $ZntA_{Rm}$ zusätzlich noch gegen Bleiionen. Was kann für diese unterschiedliche Effizienz in der Resistenzvermittlung verantwortlich sein?

Innerhalb der Proteine der CPx-Typ ATPasen gibt es zwei nachgewiesene Bereiche, an die die zu transportierenden Substrate binden können, im cytoplasmatischen N-Terminus (Lutsenko *et al.*, 1997; Banci *et al.*, 2002) und am CPX-Motiv in der sechsten transmembranen Helix (Bal *et al.*, 2003). Das CPX-Motiv scheint an der Translokation der Schwermetallionen über die Cytoplasmamembran beteiligt zu sein (Bal *et al.*, 2003). In der Form dieses Motivs unterscheiden sich $ZntA_{Rm}$ und $CadA_{Rm}$ nicht, beide besitzen in der transmembranen Helix VI ein CPX-Motiv der Form CPC.

Im N-Terminus der CPx-Typ ATPasen können sich ein oder mehrere Metallbindemotive befinden. Näher untersucht wurde bisher das (MD)CXXC-Motiv (Arnesano *et al.*, 2002). Man weiß, dass negative Aminosäurereste in der Nähe des CXXC-Motivs die Bindung zweiwertiger Kationen fördern können (Arnesano *et al.*, 2002). Für den N-terminalen Teil der CPx-Typ ATPase *ZntA* aus *E. coli* konnte die Struktur der Bindung vom Zinkion an die MDCAAC-Sequenz mittels Kristallisation aufgeklärt werden (Banci *et al.*, 2002). Die Zinkbindung erfolgt über das Aspartat (D) und die beiden Cysteine (C) dieses Motivs. Den vierten Liganden könnte H_2O oder ein exogener Bindungspartner bilden (Banci *et al.*, 2002).

Beim Vergleich der beiden N-Termini von $ZntA_{Rm}$ und $CadA_{Rm}$ fällt auf, dass sich diese stark unterscheiden. $ZntA_{Rm}$ besitzt eine sehr lange histidinreiche (H) Sequenz und ein putatives Metallbindemotiv der Form MDCXXEE (Abb. 26). $CadA_{Rm}$ hat einen sehr langen N-Terminus (~ 350 AS) mit vier putativen Metallbindemotiven (MDCXXEE). Putative Metallbindemotive dieser Form wurden zuerst für die Blei-transportierende CPx-Typ ATPase *PbrA* aus *R. metallidurans* beschrieben (Borremans *et al.*, 2001), im Unterschied zum MDCXXC-Motiv (Gatti *et al.*, 2000) von z.B. *ZntA* aus *E. coli* (Banci *et al.*, 2002).

Ein histidinreicher Bereich, wie er in $ZntA_{Rm}$ gefunden wurde, ist auch in einigen anderen CPx-Typ ATPasen vorhanden, allerdings meist in nicht ganz so ausgeprägter Form, z.B. in *CadA* aus *P. putida* (Lee *et al.*, 2001), in *Bxa1* aus dem Cyanobakterium *Oscillatoria brevis* (Tong *et al.*, 2002), in der putativen Zink-, Cadmium- und Blei-transportierenden ATPase *ZccA* aus *Bordetella pertussis* (Kidd und Brown, 2003) und in *Z99707*, einer putativen CPx-

Typ ATPase aus *Arabidopsis thaliana* (Williams *et al.*, 2000). Histidinreste sind neben Cystein-, Glutaminsäure-, Asparaginsäureresten bekannt für ihre Fähigkeit Zink zu binden. Die verschiedenen Zink-Bindestellen von Proteinen können in sechs Klassen eingeteilt werden (Karlin und Zhu, 1997). In die Klasse II werden Motive der Form HXH eingeordnet, mit einem dritten Histidin nicht weiter als 20 Aminosäuren von der Sequenz entfernt. Dieses entspricht am ehesten dem histidinreichen Bereich von ZntA_{Rm}. Motive der Form HXHXH wurden auch in anderen Zink-Transportproteinen gefunden, z.B. in Mitgliedern der ZIP-Familie (ZRT, IRT-ähnliche Proteine) (Eng *et al.*, 1998) und der CDF-Familie (Paulsen und Saier, 1997).

ZntA _{Rm}	MEFDMARTTPDNVLPSSSAAHGRGHDHDPHSRDSHSDHSHEHGHGKHDHDAHEAAPE	60
Bxa1	--MQKAKSSDSGCCSHDAHHEHSHENHNHDDHGHGNG-----DFNLKQELIPV	49
CadA _{Rm}	--MVASYKKLDSISTRGFLMMASGENLVN-----EERSMNKE	35
ZntA _{Rm}	AAQPNACCGS-ACGASVSVSTPVAAPAGTRAAAYRIEAMDCPTEE TLIRNKIGGMAGVAA	119
Bxa1	ISVVLFIGGLIFEEKLHNTTPYSIAEYLVFIPAYLLSGWNVLTSAG--RNILRGRVFDEN	107
CadA _{Rm}	PSSPCACSGG-NGQQTACAS----EQASTETTTFHVSNMDCRNEEALVRRRTLEGMPGVER	90
ZntA _{Rm}	LDFNLMQRVLTVHHTLDSLDPVVKAIIDSLGMKAEPLSDSGA-----	160
Bxa1	FLMTVATLGAVAIHKLPEAVGVMLFFKIGELFQEFVGRSRQSIKSLLEIRPD-----	160
CadA _{Rm}	LLFDLPQRLLTISHREVSADALEQALNSVGMKAQAVRDAAVSTTYRIENMDCPSEKLR	150

Abb. 26: Sequenzvergleich von Teilen der N-Termini von ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} aus *R. metallidurans* und Bxa1 aus *Oscillatoria brevis*

Putative metallbindende Aminosäuren wie Histidine (H) und Cysteine (C) sind orange unterlegt, mögliche Metallbindemotive der Form MDCXXEE gelb. Von CadA_{Rm} ist nur ein Teil des N-Terminus dargestellt. Der Vergleich erfolgte über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Möglicherweise spielen bei den Unterschieden im Transportverhalten von ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} die N-Termini der Proteine eine Rolle, eventuell hat bei dem effizienteren Zink-Transport durch ZntA_{Rm} gegenüber CadA_{Rm} dieser histidinreiche Bereich eine wichtige Bedeutung. Der N-terminale Bereich ist allerdings nicht essentiell für den Schwermetallionentransport von CPx-Typ ATPasen (Fan *et al.*, 2001; Mitra und Sharma, 2001). Auch scheint er nicht der bestimmende Faktor, zumindest nicht der alleinige, für die Substratspezifität der CPx-Typ ATPasen zu sein, da sich durch den Austausch des N-Terminus des Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-Transporters ZntA aus *E. coli* gegen den der kupfertransportierenden CPx-Typ ATPase ATP7B das Substratspektrum nicht änderte (Hou *et al.*, 2001). Er scheint aber eine aktivierende Rolle bei der ATP-Hydrolyse zu spielen. Ohne

N-Terminus verringerte sich die maximale Geschwindigkeit (v_{\max}) der ATP-Hydrolyse durch ZntA von *E. coli* (Mitra und Sharma, 2001; Hou *et al.*, 2001). ATP7B, das Wilson Syndrom Protein des Menschen, besitzt sechs Metallbindemotive innerhalb des N-Terminus, davon scheinen die Motive 5 und 6 die Affinität des CPC-Motivs innerhalb der sechsten TMH zu regulieren (Huster und Lutsenko, 2003). Die Autoren schlussfolgern, dass diese Motive in ihrer Apo-Form (ohne gebundenes Metall) durch die freien SH-Gruppen des CXXC-Motivs ATP7B im Stadium der niedrigen Affinität für Kupfer stabilisieren und dass durch die Kupferbindung die Affinität dieser Kupferbindestelle (CPC-Motiv) von ATP7B und die katalytische Aktivität stimuliert wird. Auch Untersuchungen an CadA aus *Listeria monocytogenes* sprechen dafür, dass wenn keine Schwermetallionen an der Metallbinde-Domäne am N-Terminus gebunden sind, dieser Bereich die Aktivität behindert (Bal *et al.*, 2001). Sehr wahrscheinlich scheint also eine regulatorische Rolle des N-Terminus der CPx-Typ ATPasen bei der Aktivität der Proteine zu sein. Inwieweit der Histidinreiche Bereich von ZntA_{Rm} eine bessere Zinkbindung als der Bereich von CadA_{Rm} gewährleisten kann und eventuell somit auch in die Aktivität des Proteins eingreift bleibt zu klären.

4.1.2. Die Substratspezifität von ZntA_{Rm} oder CadA_{Rm} in *R. metallidurans*

Um ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} ohne Einfluss des Co(II)/Zn(II)/Cd(II)-transportierenden Systems *czc* im Wildtypstamm *R. metallidurans* näher zu untersuchen, wurde mit dem megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm AE104 gearbeitet. Durch die Deletion des CPx-Typ ATPase-Genes *zntA_{Rm}* im *R. metallidurans*-Stamm AE104 sank dessen Zink- und Cadmiumresistenz (Tab. 5). Die Deletion von *cadA_{Rm}* hatte eine Verringerung der Cadmiumresistenz und eine leichte Verringerung der Zinkresistenz zur Folge (Tab. 5). Bei der Konstruktion der Deletionsmutante von *cadA_{Rm}* wurde beim Designen der Deletionsprimer das erste Methionin im offenen Leserahmen als Startkodon angenommen. Durch die Deletion von *cadA_{Rm}* wurde dabei auch die putative Promotorsequenz des stromaufwärts liegenden Gens6854, dessen Genprodukt einen Regulator für *cadA_{Rm}* darstellen könnte (darauf wird später eingegangen), zerstört.

Durch die Zerstörung der beiden CPx-Typ ATPase-Gene in *R. metallidurans* AE104 durch Insertionsmutation kam Anton (2001) zu ähnlichen Aussagen. Durch die Mutation von *zntA_{Rm}* verminderte sich die Zinkresistenz deutlich und die Cadmiumresistenz leicht. Durch die Insertionsmutation in *cadA_{Rm}* konnte er eine leichte Verminderung der Cadmiumresistenz feststellen (Anton, 2001).

Die Doppelmutante, die im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurde und in der beide CPx-Typ ATPase-Gene mutiert waren, wies eine extreme Cadmiumsensitivität und eine starke Zinksensitivität auf (Tab. 5). Im Vergleich zum megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm

AE104 sank die Cadmiumresistenz auf ca. 0.3 % und die Zinkresistenz auf ~ 17 %. Eine Änderung der Resistenz gegenüber Blei konnte in der Doppelmutante nicht beobachtet werden.

Valleys konnte durch Insertionsmutation in *zntA_{Rm}* im Stamm *R. metallidurans* AE104 eine Verminderung der Resistenz gegenüber Blei feststellen (Mergeay *et al.*, 2003), auf den Bereich und die Versuchsbedingungen wurde in der Veröffentlichung allerdings nicht eingegangen.

Die Auswirkung des Verlustes beider Gene wurde beim Vergleich der Akkumulation des Isotopes $^{109}\text{Cd}^{2+}$ zwischen der *zntA_{Rm}/cadA_{Rm}*-Doppelmutante und *R. metallidurans* AE104 deutlich (Abb. 8). Die Doppelmutante akkumulierte bei einer Außenkonzentration von 1 μM $^{109}\text{Cd}^{2+}$ drei- bis viermal mehr als AE104. Sie war nicht mehr in der Lage dem Cadmiuminflux entgegenzuwirken. Die Einzelmutanten für *zntA_{Rm}* oder *cadA_{Rm}* unterschieden sich in ihrem Akkumulationsverhalten nicht von AE104 (Abb. 8). Experimente mit dem Isotop $^{65}\text{Zn}^{2+}$ konnten nicht durchgeführt werden, da dieses in Deutschland nicht mehr zu erhalten war. Im megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm AE104 scheinen *ZntA_{Rm}* und *CadA_{Rm}* die beiden Hauptkomponenten für die Zink- und Cadmiumresistenz zu sein. Nicht auszuschließen ist, dass *R. metallidurans* noch einen weiteren chromosomal kodierten Zn(II)-Efflux-Transporter besitzt. Für das chromosomale Gen4596 (*contig647*), das Gen für ein RND-Protein, konnte z.B. die zinkabhängige Transkription nachgewiesen werden (G. Rehbein, pers. Mitteilung). Untersuchungen zum Einfluss auf die Zinkresistenz werden zur Zeit durchgeführt. Auf dem Chromosom sind außerdem zwei CDF-Homologe lokalisiert, Gen38/*contig706* und Gen76/*contig708* (Mergeay *et al.*, 2003). Diese scheinen allerdings keine Resistenz gegenüber Zink zu vermitteln (D. Munkelt, pers. Mitteilung).

Auffällig war die extreme Cadmiumsensitivität der CPx-Typ ATPase-Doppelmutante (*zntA_{Rm}/cadA_{Rm}*). Diese ist bei der Deletion ihrer Effluxtransporter für Cadmium auch in anderen Organismen sichtbar. In *E. coli* sank beispielsweise durch die Deletion von *zntA* die Resistenz gegenüber Zink auf 25 % (von 2 mM auf 0.5 mM) und die Resistenz gegenüber Cadmium auf 2 % (von 1.5 mM auf 0.03 mM) (Rensing *et al.*, 1997a). In *P. putida* sank die Cadmiumresistenz durch die Deletion des CPx-Typ ATPase-Gens *cadA* auf ca. 3 % (von 1.7 mM auf 0.05 mM) (Lee *et al.*, 2001). Dies unterstreicht die extreme Toxizität von Cadmium. Hantke (2001) sieht die Hauptaufgabe der Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden CPx-Typ ATPasen in dem Export sehr toxischer Schwermetalle wie Cadmium oder Blei. Eine biologische Funktion von Cadmium ist bis jetzt nur in einem Fall nachgewiesen worden. Unter Zinkmangel wird in der marinen Kieselalge *Thalassiosira weissflogii* eine Karboanhydrase gebildet, die Cadmium ins aktive Zentrum einbaut (Lane und Morel, 2000). Sonst ist Cadmium eher für seine Toxizität bekannt. Es hat eine hohe Affinität für Protein-Sulfhydrylgruppen und die Bindung an DNA-Basen kann Einzelstrangbrüche nach sich ziehen (McMurray und Tainer, 2003). Neue Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Gordenin (Jin *et al.*, 2003) zur Untersuchung der Wirkung von Cadmium als Mutagen in Hefe ergaben,

dass Cadmium den *Mismatch* Reparatur-Mechanismus inhibieren kann. Cadmium kann wie Zink an Cystein, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Histidin binden (Hughes und Poole, 1991), daher konkurriert es z.B. auch mit Zink um die Bindungsstellen in Proteinen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Cadmium-Resistenzmechanismen.

Untersuchungen zur Induzierbarkeit von *zntA_{Rm}* bzw. *cadA_{Rm}* sollten klären, in wieweit die Substrate Zn^{2+} oder Cd^{2+} die Expression der beiden CPx-Typ ATPase-Gene auslösen und ob weitere Schwermetallionen dazu in der Lage sind. Zur Expressionsuntersuchung von Genen können Reporterfusionen mit verschiedenen Enzymen, wie z.B. der β -Galaktosidase oder der Luziferase genutzt werden (Peitzsch *et al.*, 1998; Anton, 2001). Induktionsuntersuchungen in *R. metallidurans* mit Hilfe einer Transkriptionsfusion des CPx-Typ ATPase-Gens *zntA_{Rm}* oder *cadA_{Rm}* mit dem β -Galaktosidase-Gen zeigten, dass die Expression beider Gene spezifisch durch Cd^{2+} oder Zn^{2+} angeschaltet wurde (Tab. 6). Es wurde auch eine zweifache Induktion vom *zntA_{Rm}*-Promotor durch Nickel beobachtet. Die Deletion von *zntA_{Rm}* hatte aber keinen Einfluss auf die Nickelresistenz. Die Induktion durch Nickel war wahrscheinlich unspezifisch.

Bei der Induktionsuntersuchung des *E. coli* *zntA*-Promotors mit Hilfe eines β -Galaktosidase-Gens, konnte nach Inkubation mit 2 mM Nickel auch eine vierfache Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität beobachtet werden, obwohl die Deletion von *zntA* in *E. coli* auch keinen Einfluss auf die Nickelresistenz hatte (Binet und Poole, 2000).

Mit Pb(II) konnte keine Induktion von *zntA_{Rm}* aus *R. metallidurans* beobachtet werden, obwohl es in *E. coli* durch die Anhydrotetracyclin-induzierte Expression von *zntA_{Rm}* zu einer schwachen Resistenzhöhung gegenüber Pb(II) kam und Valley auch in *R. metallidurans* einen Einfluss von *ZntA_{Rm}* auf die Bleiresistenz beobachtete (Mergeay *et al.*, 2003).

Bei der Untersuchung der Expression von *zntA_{Rm}* und *cadA_{Rm}* in *R. metallidurans* kristallisierten sich Unterschiede im Induktionsverhalten heraus (Abb. 9, 10). Waren beide Gene vorhanden wurde *cadA_{Rm}* durch Cadmium ab einer Konzentration von $\sim 10 \mu M$ (im Gegensatz zu *zntA_{Rm}* ab $0.5 \mu M$) induziert. Durch Zink war in dem getesteten Bereich ($0-300 \mu M$) keine Induktion von *cadA_{Rm}* zu erkennen. Das Gen *zntA_{Rm}* wurde ab $1 \mu M$ Zink exprimiert. Durch die Deletion von *cadA_{Rm}* änderte sich das Induktionsverhalten von *zntA_{Rm}* nicht. Jedoch änderte sich durch die Deletion von *zntA_{Rm}* das Expressionsverhalten von *cadA_{Rm}*. Das Gen *cadA_{Rm}* wurde durch niedrigere Cadmiumkonzentrationen (ab $0.5 \mu M$) als in Gegenwart von *zntA_{Rm}* induziert, zusätzlich konnte eine Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität mit Zink beobachtet werden. Die Induktion von *cadA_{Rm}* erfolgte ab $1 \mu M$ Zink.

Beim Vorhandensein beider CPx-Typ ATPase-Gene wurde die Expression von *zntA_{Rm}* im Vergleich zu *cadA_{Rm}* bei geringeren Substrat-Konzentrationen induziert. In *R. metallidurans* AE104 schien die Expression von *zntA_{Rm}* die Induktion von *cadA_{Rm}* zu reprimieren. Aus der Literatur sind keine weiteren Beispiele zu vergleichenden Untersuchungen zur Induktion von CPx-Typ ATPasen mit gleichem Substratspektrum, die aus einem Organismus stammen, bekannt. In *E. coli* wurde der Einfluss der eigenen CPx-Typ ATPase ZntA auf die Induktion

des *S. aureus cad*-Promotors untersucht (Rensing *et al.*, 1998). Beide CPx-Typ ATPasen, sowohl ZntA aus *E. coli* als auch CadA aus *S. aureus* gehören zu den Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierenden CPx-Typ ATPasen. In *S. aureus* steht das *cadCA*-Operon mit dem CPx-Typ ATPase-Gen *cadA* unter Kontrolle des Regulators CadC (Endo und Silver, 1995). Die Expression, die vom *cad*-Promotor ausging, wurde mit Hilfe einer β -Galaktosidase-Fusion in *E. coli* untersucht. Das Vorhandensein der *E. coli* eigenen CPx-Typ ATPase ZntA hatte einen starken Einfluss auf die Expression, die vom *S. aureus cad*-Promotor ausging (Rensing *et al.*, 1998). So erfolgte z.B. bis 100 μ M Zink keine Induktion vom *cad*-Promotor aus. Die Expression wurde von dem Regulator CadC aus *S. aureus* reprimiert, dessen Gen auch in *E. coli* exprimiert wurde. Nach der Deletion von *zntA* wurde die Expression des β -Galaktosidase-Gens vom *cad*-Promoter ab 0.3 μ M Zink eindeutig induziert. Einen nicht ganz so starken Effekt, aber eine Verschiebung der Induktion vom *cad*-Promotor aus zu niedrigeren Konzentrationen konnte mit Cadmium und Blei festgestellt werden. ZntA aus *E. coli* transportiert wie CadA aus *S. aureus* Zink, Cadmium und Blei (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997a; Rensing *et al.*, 1998; Nucifora *et al.*, 1989). Durch die Expression von *zntA* wurde möglicherweise die intrazelluläre Konzentration von Zink, Cadmium bzw. Blei herabgesetzt, so dass der *cad*-Promotor im Fall von Zink (bis 100 μ M) nicht induziert werden konnte (Rensing *et al.*, 1998). Eine ähnliche Wirkung von ZntA_{Rm} könnte das Verhalten von *cadA*_{Rm}-*lacZ* in *R. metallidurans* erklären. Die Transkription des Gens *zntA*_{Rm} wird bei einer geringeren Konzentration induziert und der Transporter hält die Schwermetallionen-Konzentration der Zelle so gering, dass *cadA*_{Rm} erst bei höheren Außenkonzentrationen induziert wird oder im Fall von Zink in dem getesteten Bereich gar nicht.

Ein anderes Beispiel für die Untersuchung des Expressionsverhaltens zweier Schwermetall-Effluxtransporter aus einem Organismus, die ein ähnliches Substratspektrum haben, kommt ebenfalls aus *R. metallidurans*. Das *cnr*-System befindet sich auf dem Megaplasmid pMOL28 (Liesegang *et al.*, 1993) und das *czc*-System auf dem Megaplasmid pMOL30 (Nies *et al.*, 1987). Die Transporter CnrA und CzcA gehören zur Gruppe der RND-Proteine (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999). Sie sind in der Lage, als Teil eines Multikomponenten-Effluxsystems zusammen mit CnrB und CnrC (Liesegang, 1994) oder CzcB und CzcC (Rensing *et al.*, 1997b) verschiedene Schwermetallkationen aus der Zelle zu transportieren. Ein gemeinsames Substrat beider Systeme ist Kobalt (Liesegang *et al.*, 1993; Nies *et al.*, 1989b). Die Expression der Strukturkomponenten *cnrCBA* oder *czcCBA* der Komplexe wurde mit Hilfe von β -Galaktosidase-Transkriptionsfusionen untersucht (Hoffmann, 2001). In einem *R. metallidurans* CH34-Derivat, in dem sowohl das *cnr*-System auf pMOL28 als auch das *czc*-System auf pMOL30 vorhanden waren, konnte die Expression der Strukturkomponenten von *czc* durch 500 μ M Kobalt nicht induziert werden (Hoffmann, 2001). War das Megaplasmid pMOL28 mit dem *cnr*-System nicht vorhanden, kam es nach Inkubation mit 500 μ M Kobalt zu einer zweifachen Steigerung der Expression von *czcC-lacZ-BA* (Hoffmann, 2001). Die Expression der *czc*-Strukturkomponenten wurde durch das Vorhandensein des *cnr*-

Systems reprimiert. Auf die Expression der *cnr*-Strukturgene durch Kobalt hatte die *czc*-Determinante auf pMOL30 keinen Einfluss (Hoffmann, 2001). Das *cnr*-System wurde durch 500 μ M Kobalt wahrscheinlich besser induziert und konnte die Ionen nach außen transportieren. Die Konzentration innerhalb der Zellen blieb dabei möglicherweise unterhalb des Schwellenwertes, der zur Induktion der *czc*-Strukturgene benötigt wurde (Hoffmann, 2001). Auch hier scheint ein System die Expression des anderen zu reprimieren.

Die Expression von *zntA_{Rm}*- und *cadA_{Rm}*-Homologen anderer Organismen steht unter Kontrolle von Regulatorproteinen der MerR-Familie (Brown *et al.*, 2003) oder der SmtB/ArsR-Familie (Busenlehner *et al.*, 2003). Beispiele für MerR-ähnliche Proteine sind u.a. ZntR aus *E. coli* (Brocklehurst *et al.*, 1999), CadR aus *P. putida* (Lee *et al.*, 2001) oder PbrR aus *R. metallidurans* (Borremans *et al.*, 2001). Zur Gruppe der SmtB/ArsR-Familie gehören z.B. ArsR aus *E. coli* (Hsu und Rosen, 1989) oder CadC aus *S. aureus* (Endo und Silver, 1995). Die SmtB/ArsR-ähnlichen Proteine stellen Repressoren dar. Sie binden an die DNA und blockieren die Transkription der unter ihrer Kontrolle stehenden Gene. Durch die Bindung von Schwermetallionen an den Repressor wird die DNA-Bindung des Repressors stark inhibiert und der Promotor ist nicht mehr blockiert (Busenlehner *et al.*, 2003).

Namensgebend für die Gruppe der MerR-ähnlichen Proteine ist der Regulator der Quecksilberresistenz *mer* in Gram-negativen Bakterien, die auf den transponiblen Elementen Tn21 und Tn501 gefunden wurde (Brown *et al.*, 1983; Barrineau *et al.*, 1984). Die Promotorbereiche, der durch MerR-ähnliche Proteine regulierten Gene, sind ungewöhnlich, da der Abstand zwischen -35 und -10-Region, den Bindestellen für die RNA-Polymerase, nicht optimal 17 bp (deHaseth *et al.*, 1998) sondern länger (19-20 bp) ist (Brown *et al.*, 2003). Aufgrund des Abstandes zwischen -35 und -10-Region, ist die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA erschwert und dies würde zu einer sehr schwachen Transkription führen. Zwischen den beiden Regionen liegt die Bindestelle für den Regulator (symmetrische Sequenz). Der Regulator bindet als Dimer an die Palindromsequenz (Outten *et al.*, 1999). Durch die Bindung des Induktors, z.B. Schwermetallionen, an das Regulatorprotein ändert sich dessen Konformation. Dies führt zur Verdrehung der DNA im Operator-Bereich, wodurch die RNA-Polymerase an den Promotor binden kann und die Transkription initiiert wird (Brown *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 1999). Die MerR-ähnlichen Regulatoren haben eine Größe von bis zu 150 AS. Die N-terminale Region ist untereinander sehr ähnlich. Sie enthält das Helix-Turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung. Im C-Terminus befindet sich die induktorbundene Region (Brown *et al.*, 2003). Wichtige Cysteinreste, die in der Induktorbindung involviert sind, wurden u.a. in ZntR aus *E. coli* (Khan *et al.*, 2002) identifiziert.

Bei der Analyse der unmittelbaren Umgebung der CPx-Typ ATPase-Gene *zntA_{Rm}* und *cadA_{Rm}* konnte stromaufwärts von *cadA_{Rm}* das putative Gen6854 identifiziert werden. Es ist entgegengesetzt der Leserichtung von *cadA_{Rm}* organisiert (Abb. 4b). Das mögliche Genprodukt besteht aus 132 AS, das Homologien zu MerR-ähnlichen Proteinen aufweist

(Abb. 27). Das putative Protein, von Gen6854 kodiert, besitzt ein typisches Helix-Turn-Helix-Motiv und einige unter den metallbindenden MerR-ähnlichen Proteinen konservierte Cysteinreste (Zeng *et al.*, 1998). Ferner befindet sich stromaufwärts von *cadA_{Rm}* eine mögliche Promotorstruktur für eine MerR-abhängige Transkription (Abb. 28) (Mergeay *et al.*, 2003), dies deutete darauf hin, dass die *cadA*-Expression von Gen6584 reguliert werden könnte.

	Helix	Turn	Helix	
Produkt Gen6854	-----MMRIGELGK	KADCLVQTVRFY	SEGLLPEPARSEGNFR	LYDEVHLQRLLFIRRC 54
CadR_PP	-----MKIGELAK	ATDCAVETIRY	YEREQLLPEPARSDG	NYRLYTQAHVERLTFIRNC 53
PbrR_RM	-----MNIQIGELAK	RTACPVV	TIRFYEQEGLLPP	PGRSRGNFRLYGEEHVERLQFIRHC 55
MerR_PA	MENNLENLTIGVFA	KAAAGVNVETIR	FYQRKGLLEPDKPY	GSIRRYGEADVTRVRFVKSA 60
Produkt Gen6854	RAKDMTLDEIRQLLN	NLRDRPELG-CGEV	NALVDAHTAQVRTKM	KELRALERELMDLRRSC 113
CadR_PP	RTLDMTLDEIRSL	LRLRDSDP-DSCGS	VNALIDEHIEHVQAR	IDGLVALQEQLVELRRRC 112
PbrR_RM	RSLDMPLSDVRTL	LSYRKRPDQD-CGE	VNMLLDEHTRQVESR	IGALLELKHHLVELREAC 114
MerR_PA	QRLGFSLDEIAEL	LRLEDG---THCE	EASSLAEHKLKDVRE	KMADLARMEAVLSELVCAC 117
Produkt Gen6854	D-SARTSREC	GILNSLAEPA	-----	132
CadR_PP	N--AQGA-ECA	ILQQL	ETNGAVSVPETEHS	SHVGRSHGH-- 147
PbrR_RM	S-GARPAQSC	GILQGL	SDCV-----	CDTRGTTAHPSD 145
MerR_PA	H-ARRGNVSC	PLIASLQGGAS	-----	LAGSAMP--- 144

Abb. 27: Vergleich vom putativen Genprodukt von Gen6854 mit Vertretern MerR-ähnlicher Proteine

Dargestellt sind neben dem putativen Genprodukt von Gen6854 aus *R. metallidurans*, CadR aus *P. putida* (CadR_PP), PbrR aus *R. metallidurans* (PbrR_RM) und MerR aus *P. aeruginosa* (MerR_PA). Identische Aminosäuren zum Gen6854-Produkt sind gekennzeichnet. Die metallbindenden AS von MerR sind unterstrichen. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt.

Auswirkung auf die vermittelte Schwermetallresistenz nur sehr gering, bei anderen sehr hoch. Der Ausgleich des Verlustes von Regulatorproteinen durch verwandte Proteine wird daher auch für andere Systeme diskutiert. Ähnlich angeordnet zur Gen6854/*cadA*_{Rm}-Struktur sind *cadR*, das Gen für einen potentiellen Aktivator aus der MerR-Familie und *cadA*, das Gen für eine CPx-Typ ATPase aus *P. putida* (Lee *et al.*, 2001). Sie werden ebenfalls in Gegenrichtung zueinander transkribiert. CadA aus *P. putida* vermittelt Resistenz gegenüber Cadmium-, Zink- und fast vernachlässigbar gegen Bleiionen. Die Mutation des Regulator-Gens *cadR* aus *P. putida* durch Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette hatte nur eine schwache Auswirkung auf die durch CadA-vermittelte Schwermetallresistenz. Die Cadmiumresistenz sank von 1.7 mM auf 1.3 mM, im Vergleich dazu verringerte sie sich durch die Mutation der CPx-Typ ATPase von 1.7 mM auf 0.05 mM (Lee *et al.*, 2001). Die Untersuchung des *cadA*-Promotors aus *P. putida* mit Hilfe einer β -Galaktosidase-Transkriptionsfusion zeigte, dass dieser durch Cadmium-, Blei-, Zink- und Quecksilberionen induziert werden konnte. Der mit Abstand beste Induktor war Cadmium (Lee *et al.*, 2001). Nach der Mutation des Aktivators *cadR*, durch Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette in das Gen, war der *cadA*-Promotor ohne Einschränkung weiterhin durch Cadmium induzierbar. Die Mutation von *cadR* hatte keinen Einfluss auf die Induktion des *cadA*-Promotors. Dies wurde unter anderem durch das mögliche Aushelfen eines anderen Regulators, der die CadR-Funktion übernahm, erklärt (Lee *et al.*, 2001).

Überlegungen zur Kreuzreaktion verschiedener Aktivatoren wurden auch bei der Untersuchung der durch CueA-vermittelten Kupferresistenz in *P. putida* (Adaikkalam und Swarup, 2002) aufgeworfen. Durch Transposoninsertion wurde die Transkriptionseinheit der Gene der CPx-Typ ATPase CueA und des MerR-ähnlichen Regulators CueR zerstört. Mit Hilfe einer Transkriptionsfusion mit dem Gen des Grün fluoreszierenden Protein (*gfp*) wurde die Expression des *cueAR*-Promotors untersucht. Die Bildung des GFP wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. CueR und Kupferionen hatten beide eine aktivierende Wirkung auf die Expression von *gfp*. Aber auch ohne CueR kam es in Abhängigkeit von Kupferionen zu einer Erhöhung der Transkription, so dass eventuell ein anderer Regulator die Funktion von CueR in dessen Abwesenheit übernehmen konnte (Adaikkalam und Swarup, 2002).

Im Gegensatz dazu hatte die Insertionsmutation des Regulator-Gens *zntR* aus *E. coli* einen starken Einfluss auf die durch die CPx-Typ ATPase ZntA vermittelte Zinkresistenz (Brocklehurst *et al.*, 1999). Durch die Mutation von *zntR* sank die Resistenz von 2.25 mM Zink auf 0.75 mM. Durch die Mutation von *zntR* war die Transkription vom *zntA*-Promotor in *E. coli* nicht mehr induzierbar (Brocklehurst *et al.*, 1999). ZntR scheint der einzige MerR-ähnliche Regulator zu sein, der die *zntA*-Transkription in *E. coli* kontrolliert.

Die Expressionsuntersuchung des Gens6854 von *R. metallidurans* mit Hilfe einer β -Galaktosidase-Fusion zeigte eine konstitutive Transkription (Abb. 11). Durch Inkubation mit Zink- oder Cadmiumionen kam es zu keiner Steigerung der Transkription. Die

Untersuchung der Induzierbarkeit des *cadR*-Promotors aus *P. putida* zeigte, dass die Transkription durch Inkubation mit Cadmiumionen um das 2.5fache gesteigert werden konnte, durch andere Kationen wie Zink oder Blei allerdings nicht (Lee *et al.*, 2001).

In unmittelbarer Nähe zum Gen *zntA_{Rm}* konnte keine MerR- oder SmtB/ArsR-ähnliche Struktur identifiziert werden. Allerdings ist die räumliche Nähe der Gene von Regulator und CPx-Typ ATPase nicht zwingend notwendig. Beispielsweise befinden sich die Gene *zntA* und *zntR* aus *E. coli* auch nicht in einer Determinante. Auf dem *E. coli*-Chromosom ist *zntA* bei 77.7 min (Sofia *et al.*, 1994) [bp 3 604 082-3 606 280 (Blattner *et al.*, 1997)] und *zntR* (früher *yhdM*) bei 74.1 min (Christie *et al.*, 1994; Brocklehurst *et al.*, 1999) [bp 3 436 767-3 436 342 (Blattner *et al.*, 1997)] lokalisiert. Ungewöhnlich ist die Genstruktur stromaufwärts von *zntA_{Rm}* aus *R. metallidurans* (Mergeay *et al.*, 2003). Sie zeigt Ähnlichkeit zu Teilen der *czc*-Determinante des Megaplasmids pMOL30, die Resistenz gegenüber Kobalt, Zink und Cadmium vermittelt. Stromaufwärts in Gegenrichtung zu *zntA_{Rm}* befindet sich ein offener Leserahmen von 125 AS, der 38 % Identität zu CzcI, einem putativen Regulator der *czc*-Determinante, besitzt. Darauf folgt, in derselben Richtung kodiert, ein offener Leserahmen von 431 AS, der 58 % Identität zu CzcC, dem *outer membrane factor* der *czc*-Determinante, aufweist. In weiterführenden Experimenten sollte überprüft werden, ob dieser DNA-Bereich einen Einfluss auf die Expression von *zntA_{Rm}* ausübt.

4.1.3. Zusammenspiel von Zn(II)/Cd(II)-Effluxsystemen aus *R. metallidurans* CH34

Der Wildtyp-Stamm *R. metallidurans* CH34 besitzt Vertreter aus allen drei Proteinfamilien, die Zn(II)/Cd(II)-Efflux in Gram-negativen Prokaryoten vermitteln können (Nies, 2003). Das sind die CPx-Typ ATPasen *ZntA_{Rm}* und *CadA_{Rm}*, der RND-Proteinkomplex CzcCBA und das CDF-Protein CzcD (Abb. 1). Die Gene für die beiden CPx-Typ ATPasen sind auf dem Chromosom lokalisiert (Anton, 2001; Legatzki *et al.*, 2003b). Die *czc*-Determinante mit u.a. den Genen *czcC*, *czcB*, *czcA* und *czcD* befindet sich auf dem Megaplasmid pMOL30 (Nies *et al.*, 1989b; Anton *et al.*, 1999). Beeinflussen sich die Systeme untereinander bei der Ausbildung der Schwermetallresistenz? Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden die Gene für den RND-Proteinkomplex und/oder das CDF-Protein konstitutiv unter Kontrolle des *lac*-Promotors im *R. metallidurans*-Stamm AE104 und verschiedenen Derivaten exprimiert. Aus vorherigen Untersuchungen war bekannt, dass die konstitutive Expression der Strukturgene *czcCBA* die gleiche Co(II)/Zn(II)/Cd(II)-Resistenz wie die Anwesenheit des kompletten Megaplasmids pMOL30 bewirkt (Nies *et al.*, 1987).

Vergleicht man die Expression der CPx-Typ ATPase-Gene *zntA_{Rm}* und *cadA_{Rm}* in AE104 und seinen Derivaten mit der Situation, wenn gleichzeitig die Gene des Proteinkomplexes CzcCBA (\pm des CDF-Proteins CzcD) konstitutiv exprimiert wurden (Abb. 15, 16), so war

unter den gleichen Induktionsbedingungen (Schwermetallionen-Konzentration) die Expression der CPx-Typ ATPase-Gene herabgesetzt. Die zusätzliche Bildung von CzcD hatte keinen Einfluss. Bei konstitutiver Expression von *czcCBA* erfolgte keine Induktion der Transkription der CPx-Typ ATPase-Gene durch Inkubation mit Zink, auch nicht bei höheren Induktorkonzentrationen bis 1 mM. Auch bei der Inkubation mit Cadmium war die Expression von *zntA_{Rm}* bzw. *cadA_{Rm}* herabgesetzt.

Die Transkription von CPx-Typ ATPase-Genen wird in vielen bekannten Fällen über die zelluläre Konzentration an Schwermetallionen, die über cytoplasmatische Repressoren oder Aktivatoren vermittelt wird, kontrolliert (Busenlehner *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003). Untersuchungen des Regulators ZntR aus *E. coli* sprechen für eine Bildung der CPx-Typ ATPase ZntA nach geringen Konzentrationsänderungen innerhalb der *E. coli*-Zellen. Die *in vitro*-Bestimmung der Sensitivität des Regulators ZntR zeigte, dass die halbmaximale Aktivierung für den *zntA*-Promotor bei einer freien Zn(II)-Innenkonzentration von $11.5 (\pm 1.3) * 10^{-16}$ M liegt, also im femtomolaren Bereich (Outten und O'Halloran, 2001). Davon unabhängige Messungen der Substratbindung für ZntR verdeutlichten auch dessen hohe Affinität für Zink (Hitomi *et al.*, 2001). So können die *E. coli*-Zellen auf einen geringen Anstieg der Schwermetallionen-Konzentration innerhalb des Cytoplasmas mit der Expression von *zntA* reagieren. Unter der Annahme, dass dieser Regulationsmechanismus auch für *zntA_{Rm}* und *cadA_{Rm}* gilt, schien durch die konstitutive Expression von *czcCBA* die zelluläre Zn²⁺- und Cd²⁺-Konzentration auf einem niedrigen Niveau gehalten worden zu sein. Im Fall von Zink wurde der Schwellenwert für die Induktion der CPx-Typ ATPase-Gene möglicherweise nicht überschritten. Für Cadmium schien die Konzentration im Cytoplasma ebenfalls sehr niedrig gehalten worden zu sein, dass nur eine geringe Induktion von *zntA_{Rm}* oder *cadA_{Rm}* erfolgte. Denkbar wäre, dass der RND-Proteinkomplex CzcCBA Zink bzw. Cadmium sehr effizient aus der Zelle transportierte, bevor eine starke Induktion der CPx-Typ ATPase-Gene erfolgen konnte. Wie könnte dieser Transport aussehen?

RND-Proteine wie CzcA sind membrangebundene Transporter von mehr als 1 000 Aminosäuren, die zusammen mit dem MFP und dem OMF als Komplex agieren (Saier *et al.*, 1994; Saier, 2000a; Tseng *et al.*, 1999). Zur RND-Superfamilie gehören Transporter, deren Substrate Lösungsmittel (Ramos *et al.*, 1998), Farbstoffe, Detergenzien, hydrophobe Antibiotika (Ma *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995) oder Kationen (Nies *et al.*, 1987; Hassan *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 2003) sein können. Sie sind protonengetrieben (Goldberg *et al.*, 1999; Zgurskaya und Nikaido, 1999). Die RND-Superfamilie wird in sieben Familien unterteilt (Tseng *et al.*, 1999). CzcA gehört in die HME-Familie (*heavy metal efflux*). Die RND-Proteine bestehen aus 12 transmembranen Helices und zwei großen periplasmatischen Domänen (Goldberg *et al.*, 1999; Gotoh *et al.*, 1999; Fujihira *et al.*, 2002). Die periplasmatischen Domänen befinden sich zwischen der TMH I und II sowie zwischen der TMH VII und VIII. Für RND-Proteinkomplexe wird der Transport der Substrate über zwei verschiedene Wege diskutiert, direkt aus dem Cytoplasma ins Außenmedium, dem

sogenannten *Transenvelope*-Transport (Saier *et al.*, 1994) und der Transport aus dem Periplasma nach außen (Nikaido *et al.*, 1998; Grass und Rensing, 2001b).

Für einen cytoplasmatischen Transport durch CzcCBA spricht, dass durch die alleinige Expression von *czcA* eine geringe Resistenz gegenüber Kobalt und Zink (Rensing *et al.*, 1997b) bzw. auch Cadmium vermittelt werden konnte (Legatzki *et al.*, 2003a). So dass die Ionen möglicherweise vom Cyto- ins Periplasma transportiert wurden, da erst durch die Komplexbildung mit dem MFP und dem OMF eine Verbindung vom RND-Protein bis zur äußeren Membran geschaffen wird (Paulsen *et al.*, 1997). Außerdem konnte nach der Rekonstitution von CzcA in Proteoliposomen der Transport der Schwermetallionen Kobalt, Zink und Cadmium experimentell nachgewiesen werden (Goldberg *et al.*, 1999). Dies würde einem Transport der Ionen über die Cytoplasmamembran entsprechen. Die K_m -Werte lagen für den Versuchsansatz allerdings im millimolaren Bereich (6.6 mM Zn^{2+} , 7.7 mM Cd^{2+} , 18.5 mM Co^{2+}) (Goldberg *et al.*, 1999). Im Vergleich zu dem K_m -Wert der CPx-Typ ATPase ZntA aus *E. coli* für den Transport von Zn^{2+} (9 μ M) (Rensing *et al.*, 1997a) ist der ermittelte K_m -Wert von CzcA um den Faktor $\sim 1\ 000$ größer. In Transportexperimenten mit dem gesamten CzcCBA-Komplex in *inside-out* Vesikeln wurden ähnliche Kinetikparameter bestimmt (Nies, 1995). Die Affinität von CzcA zum Substrat wäre in diesem Fall sehr gering. Dies würde für den cytoplasmatischen Transport durch CzcA bedeuten, dass es die „freien“ Ionen nur effektiv aus dem Cytoplasma transportiert, wenn die Konzentration im Zellinneren in den millimolaren Bereich steigt. Durch Outten und O'Halloran (2001) wurde in *E. coli* bei einer Konzentration von ~ 100 nM Zink im Medium eine zelluläre Konzentration von ~ 200 μ M gemessen. Durch die Analyse der Interaktion von Zink mit regulatorischen Proteinen wurde die „freie“ Zinkionenkonzentration bestimmt. Sie lag im femtomolaren Bereich (Outten und O'Halloran, 2001). Wenn diese Größenordnung für die „freie“ Zinkionenkonzentration auch auf *R. metallidurans* übertragen werden kann, so müsste die Zinkkonzentration im Cytoplasma für eine effiziente Detoxifikation durch CzcCBA bei Schwermetallstress um drei Größenordnungen bis in den millimolaren Bereich steigen. Ein periplasmatischer Transport der Ionen durch den CzcCBA-Komplex als weitere Möglichkeit kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Weder periplasmatische noch cytoplasmatische Metallbindestellen in CzcA konnten bis jetzt identifiziert werden. Im cytoplasmatischem Bereich von CzcA zwischen der TMH IV und V befindet sich ein putatives Metallbindmotiv der Form $CX_5HX_3HHX_9FH$ (Aminosäureposition 417-439), an das Ionen aus dem Cytoplasma binden könnten, um dann über den *Transenvelope*-Transport aus der Zelle gebracht zu werden. Durch Mutationsanalysen dieses Motivs konnten aber bis jetzt keine klaren Aussagen über die Involvierung in die Schwermetallbindung getroffen werden (Juhnke, 1997; Helbig, 2003). Durch die Mutation des Histidins 439 in Argin war zwar der Verlust der Schwermetallresistenz zu beobachten, allerdings wurde hierbei nicht nachgewiesen, dass das veränderte CzcA-Protein auch stabil

exprimiert wurde (Juhnke, 1997). Andere Mehrfachmutationen der Histidine hatten keinen Einfluss auf die Resistenz (Helbig, 2003).

Hinweise für eine direkte periplasmatische Entgiftung von Schwermetallionen durch einen RND-getriebenen Proteinkomplex stammen von genetischen Analysen des Cu(I)/Ag(I)-transportierenden *cus*-Systems aus *E. coli* (Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001b). Das Gen für den RND-Transporter CusA befindet sich innerhalb des chromosomalen CusCFBA-Operons. Außer CusA kodiert es für das MFP CusB, den OMF CusC und ein kleines zusätzliches periplasmatisches Protein CusF (Franke *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2003). Andere Systeme, die ebenfalls in die Kupferresistenz von *E. coli* involviert sind, sind die CPx-Typ ATPase CopA (Rensing *et al.*, 2000) und die periplasmatische Multikupfer-Oxidase CueO (Grass und Rensing, 2001a; Roberts *et al.*, 2003). CopA transportiert Cu(I) vom Cytoplasma ins Periplasma. CueO schützt die Proteine des Periplasmas vor Cu(I)-Schäden (Grass und Rensing, 2001a). In Abwesenheit von CueO spielt das *cus*-System für die Kupferhomöostase eine wichtige Rolle. Es scheint den von CueO vermittelten Schutzmechanismus durch Export der Cu(I) aus dem Periplasma ins Medium zu komplementieren (Grass und Rensing, 2001b, Rensing und Grass, 2003). In CusA konnten außerdem periplasmatisch lokalisierte Methionine identifiziert werden, die eine Rolle in der Kupferbindung spielen könnten. Ihre Mutation hatte einen negativen Einfluss auf die Resistenz gegen Kupfer (Franke *et al.*, 2003).

Eindeutigere Anhaltspunkte für einen periplasmatischen Transport durch RND-Proteine stammen von Transportern organischer Substrate. Der RND-Protein-Komplex AcrAB-TolC aus *E. coli* (Ma *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995) transportiert lipophile und amphiphile Substrate, Farbstoffe, Tetracyclin, Ethidiumbromid und SDS. Er ist in der Lage auch Resistenz gegen Verbindungen zu vermitteln, die nicht ins Cytoplasma transportiert werden (Nikaido *et al.*, 1998). Somit sollte auch eine Substratbindung an der periplasmatischen Seite des RND-Proteins (Zgurskaya und Nikaido, 2000b) und der Transport direkt aus dem Periplasma möglich sein. Die Aufklärung der 3D-Struktur von AcrB zeigte, dass es innerhalb des Proteins Eingänge vom Periplasma aus gibt, sogenannte *Vestibules*, die mit dem Hohlraum im Zentrum des AcrB-Trimers verbunden sind (Abb. 29) (Murakami *et al.*, 2002). Darüber könnte es zu einem Eintritt des Substrates von der periplasmatischen Seite und dem Transport aus dem Periplasma bzw. der äußeren Seite der Cytoplasmamembran kommen (Murakami *et al.*, 2002).

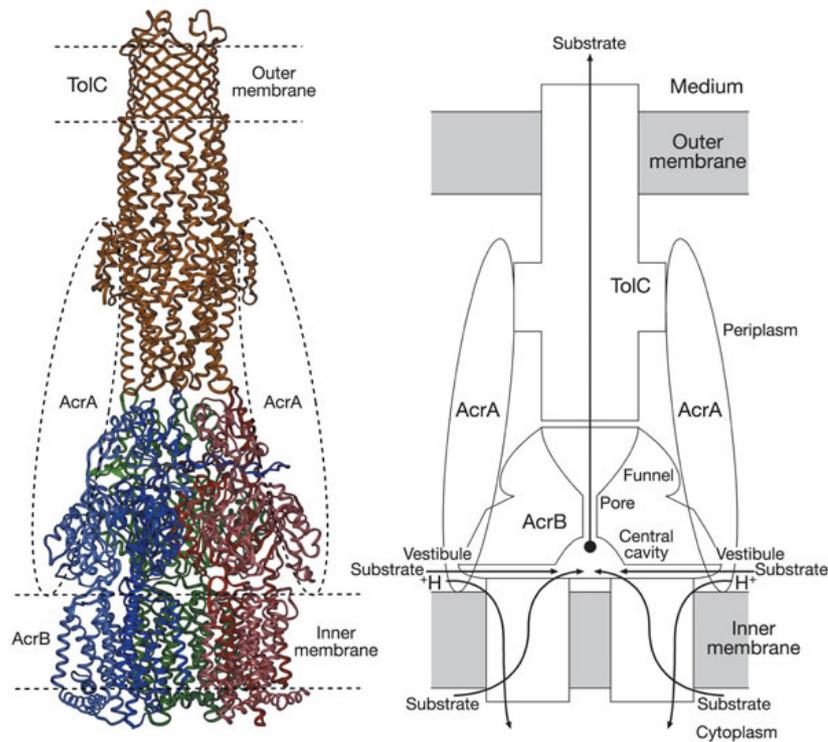


Abb. 29: Darstellung des AcrB-AcrA-TolC-Komplexes (Murakami *et al.* 2002)

Im linken Teil der Abbildung ist die räumliche Struktur des AcrB-Homotrimers (rot, blau, grün) sowie des TolC-Trimers (orange) dargestellt. Rechts sind die Komplexkomponenten inklusive des putativen Effluxmechanismus schematisch abgebildet.

Für verschiedene der RND-Transporter, die Antibiotika transportieren, wurde die Beteiligung der großen periplasmatischen Domänen bei der Ausbildung der Substratspezifität nachgewiesen. Der gezielte Austausch der periplasmatischen Loopstrukturen des RND-Transporters AcrD gegen die von AcrB führte zu einem chimären Protein, das eher die Substratspezifität von AcrB als die von AcrD hatte (Tikhonova *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Chimärenbildung der RND-Transporter AcrB und MexB erhalten (Elkins und Nikaido, 2002). Außerdem konnten in beiden periplasmatischen Domänen von MexD essentielle Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise in die Substraterkennung involviert sind (Mao *et al.*, 2002).

Fast man diese Aussagen zusammen, wäre es durchaus denkbar, dass CzcCBA den Transport der Substrate aus dem Cytoplasma und aus dem Periplasma organisiert. Durch einen periplasmatischen Transport könnten die Ionen, zumindest ein großer Teil, ohne dass sie erst ins Cytoplasma gelangen, wieder nach außen geschafft werden.

Die konstitutive Expression von *czcCBA* in einem *R. metallidurans*-Stamm, in dem keine der beiden CPx-Typ ATPasen ZntA_{Rm} oder CadA_{Rm} gebildet wurde, führte im Fall der

Zinkresistenz zu keiner Beeinflussung (3.4.1.). Es schien so, als ob CzcCBA unabhängig von ZntA_{Rm} oder CadA_{Rm} agierte. Bei der Überprüfung der Cadmiumresistenz ergab sich ein völlig anderes Bild. Ohne die beiden CPx-Typ ATPasen kam es durch CzcCBA nur zu einer geringen Erhöhung der Cadmiumresistenz (3.4.1.). Nur bei Anwesenheit von mindestens einer der beiden CPx-Typ ATPasen ZntA_{Rm} oder CadA_{Rm} konnte die volle Cd(II)-Resistenz im Vergleich zur Kontrolleexpression in AE104 erreicht werden. Wie könnte man den Unterschied bei dem Efflux von Zink und Cadmium durch RND-Proteinkomplexe und CPx-Typ ATPasen erklären?

Ein Unterschied zwischen den CPx-Typ ATPasen und dem RND-Transporter CzcA könnte auch die Form der als Substrat genutzten Schwermetallionen sein. Schwermetallionen können an z.B. thiolhaltige Verbindungen wie Glutathion binden (Perrin und Watt, 1971; Fuhr und Rabenstein, 1973). Die aktivierende Wirkung von Glutathion in Verbindung mit Schwermetallionen als Thiolatkomplexe bei der ATP-Hydrolyse wurde für die CPx-Typ ATPase ZntA von *E. coli* *in vitro* nachgewiesen (Sharma *et al.*, 2000). Die ATP-Hydrolyse durch ZntA stieg im Vergleich zu Versuchen mit „freiem“ Metall. Dies könnte daraufhin deuten, dass *in vivo* Glutathion-Metall-Verbindungen eine Rolle bei der Aktivität von ZntA spielen. Im Gegensatz dazu war der RND-Transporter CzcA nach der Rekonstitution in Proteoliposomen nicht in der Lage Zinkionen in Gegenwart von Glutathion zu transportieren (Nies, pers. Mitteilung). Durch Anton (2001) konnte Glutathion als Verbindung in *R. metallidurans* nachgewiesen werden. Somit könnte die Bindung von Schwermetallionen an Glutathion im Cytoplasma den Transport dieser Substrate durch den RND-Komplex CzcCBA ebenfalls behindern und CzcCBA die Schwermetallionen dieser Komplexe möglicherweise nicht als Substrat nutzen.

Bezieht man die Möglichkeit eines periplasmatischen Transportes durch CzcCBA in die Überlegungen mit ein, wäre folgende Interpretation der Ergebnisse denkbar: bei zusätzlicher Bildung von CzcCBA sollte Zink sehr effizient nach außen transportiert worden sein, so dass auch keine Induktion der CPx-Typ ATPase-Gene erfolgen konnte. Cadmium konnte möglicherweise noch zu einem gewissen Teil ins Cytoplasma gelangen. Die CPx-Typ ATPasen wurden exprimiert und diese transportierten Cadmium ins Periplasma. Von dort könnten die Ionen dann über CzcCBA nach außen gebracht worden sein. Sind keine CPx-Typ ATPasen vorhanden, sammelten sich die Schwermetallionen, an Glutathion gebunden oder ungebunden, im Cytoplasma an. CzcCBA konnte sie nicht als Substrat nutzen, da sie möglicherweise an Glutathion gebunden vorlagen oder weil der Transport für die „freien“ Schwermetallionen aus dem Cytoplasma nicht effizient genug war. Die Resistenz gegenüber Cadmium war so herabgesetzt.

Die alleinige Expression von *czcD*, dem Gen für das Co(II)/Zn(II)/Cd(II)-transportierende CDF-Protein aus *R. metallidurans*, hatte keinen Einfluss auf die Induktion der CPx-Typ ATPase-Gene *zntA*_{Rm} oder *cadA*_{Rm} (Abb. 15, 16). CzcD war vermutlich nicht in der Lage die Schwermetallionen-Konzentration im Cytoplasma in solchem Maß herabzusetzen wie

CzcCBA. Durch die konstitutive Expression von *czcD* in der *zntA_{Rm}/cadA_{Rm}*-Doppelmutante erhöhte sich auf Festmedium nur die Zinkresistenz leicht (Tab. 7). Im Unterschied dazu führte die konstitutive Expression von *czcD* im *R. metallidurans*-Stamm AE104 in Flüssigmedium zur Erhöhung der Kobalt-, Zink- und Cadmiumresistenz (Anton *et al.*, 1999).

Bei zusätzlicher Expression von *czcD* zu *czcCBA* in der *zntA_{Rm}/cadA_{Rm}*-Doppelmutante hatte *czcD* keinen Einfluss auf die Ausbildung der Cadmiumresistenz. CzcD war nicht in der Lage die Deletion von *ZntA_{Rm}* oder *CadA_{Rm}* zu komplementieren.

Zusammengefasst bedeutet das, dass für die effiziente Cadmium-Entgiftung durch CzcCBA in jedem Fall eine der beiden CPx-Typ ATPasen vorhanden sein mußte. Wie die Induktionsdaten andeuten, schien sich ein Teil der Cadmiumionen im Cytoplasma anzusammeln und über die CPx-Typ ATPasen nach außen transportiert zu werden. CzcCBA schien diese Ionen nicht als Substrat nutzen zu können, möglicherweise weil sie in gebundener Form an z.B. Glutathion vorlagen oder weil es sich im Cytoplasma befanden und von dort nicht effizient genug transportiert werden konnten.

In *R. metallidurans* CH34 konnte für die Kobaltresistenz eine interessante Beobachtung gemacht werden. Nach ersten Untersuchungen scheint das CDF-Protein von Gen38 (*contig706*) eine wichtige Rolle bei der Kobaltresistenz zu spielen. Durch die Mutation des chromosomalen Gens war *R. metallidurans* CH34 nicht mehr in der Lage die volle Resistenz gegenüber Kobalt, die u.a. durch die RND-Komplexe CnrCBA (Liesegang *et al.*, 1993) und CzcCBA (Nies *et al.*, 1987; Nies, 1995) vermittelt wird, zu erzeugen (D. Munkelt, pers. Mitteilung). Möglicherweise benötigen die RND-Systeme auch hier einen zusätzlichen cytoplasmatischen Transporter.

Im *R. metallidurans*-Stamm AE128 (mit pMOL30), wenn *czcCBA* und *czcD* nicht konstitutiv exprimiert wurden, konnte nach Inkubation mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Zink oder Cadmium keine Induktion von *zntA_{Rm}* oder *cadA_{Rm}* mit Zink und nur eine leichte mit Cadmium beobachtet werden (Tab. 8). Auch im Wildtyp-System scheint die Expression von *czcCBA* die der CPx-Typ ATPase-Gene zu beeinflussen. Kobalt ist neben Zink und Cadmium ein weiterer Induktor des *czc*-Systems (Grosse *et al.*, 1999). Durch das Wachstum der Zellen in Medium mit Kobalt wurde *czcCBA* schon vor der Inkubation mit Zink oder Cadmium exprimiert (Abb. 17). Die Transkription der CPx-Typ ATPase-Gene konnten durch Co^{2+} nicht induziert werden (Tab. 6). Die Expression der CPx-Typ ATPasen durch Cadmium in den Zellen, die mit Kobalt angezogen wurden, verringerte sich nochmals leicht, im Vergleich zu nicht mit Kobalt vorinkubierten Zellen, was auf die starke Expression von *czcCBA* schon vor der Cadmiuminkubation zurückzuführen sein könnte.

Die Regulation der Strukturgene *czcCBA* in der *czc*-Determinante ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Für die Expression von *czcCBA* konnte kein Haupt-Regulator identifiziert werden. Neben einem klassischen Zwei-Komponenten-Regulationssystem CzcRS (Grosse *et al.*, 1999; Anton, 2001) sind vier weitere Komponenten in die Kontrolle des *czc*-Systems involviert (Grosse *et al.*, 1999). Unter den sechs Proteinen, die in die Regulation eingebunden sind,

befinden sich auch zwei periplasmatisch lokalisierte Proteine, das metallbindende Protein CzcE (Hoffmann, 2001; Grosse *et al.*, in Vorbereitung) und CzcI (Diels *et al.*, 1995). Nies (2000) postulierte eine mögliche Involvierung des periplasmatisch lokalisierten CzcI und des membrangebundenen CzcN als Anti-Sigmafaktor-Komplex in Verbindung mit einem unbekanntem ECF(*extracellular function*)-Sigmafaktor RpoX zur Kontrolle der *czcCBA*-Expression. CzcI besitzt 2 putative Metallbindemotive H₃₆LGHHEHRH und C₆₃GVCH, die möglicherweise auf eine Bindung von Schwermetallionen im Periplasma hinweisen könnten (van der Lelie *et al.*, 1997).

Beispiele in denen ein ECF-Anti-Sigmafaktor-Komplex in die Regulation von RND-Komplexen involviert ist, sind aus dem *ncc*-Resistenzsystem aus *Achromobacter xylosoxidans* (Schmidt und Schlegel, 1994; Grass *et al.*, 2000) oder dem *cnr*-System aus *R. metallidurans* CH34 (Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000) bekannt. Das *cnr*-System vermittelt Resistenz gegenüber Kobalt und Nickel (Liesegang *et al.*, 1993). Durch die Bindung von Substrat (z.B. Nickel) an das Protein CnrX im Periplasma wird der Sigmafaktor CnrH vom membrangebundenen Anti-Sigmafaktor CnrY freigesetzt. Dieser induziert dann die Transkription von *cnrCBA*, den Genen für den RND-Proteinkomplex (Grass *et al.*, 2000). So könnte einer putativen cytoplasmatischen Kontrolle der CPx-Typ ATPasen eine periplasmatische Kontrolle der *czcCBA*-Transkription gegenüberstehen. Durch die Involvierung periplasmatischer Komponenten in die Regulation von *czcCBA* könnte es eventuell zu einer schnelleren Induktion von *czcCBA* gegenüber den CPx-Typ ATPasen kommen, da hier die Schwermetallionen-Konzentration schon im Periplasma gemessen würde. Die Gene *czcCBA* werden exprimiert und die aktiven Komplexe entfernen die Schwermetallionen sofort aus der Zelle. Dies könnte im Wildtyp-System eine Rolle bei der Induktion von *czcCBA* und *zntA_{Rm}* oder *cadA_{Rm}* spielen.

4.1.4. Biochemische Untersuchungen zur Schwermetall-Bindung und Phosphorylierung von ZntA_{Rm} und CadA_{Rm}

Um ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} von *R. metallidurans* biochemisch näher zu charakterisieren, wurden beide Proteine in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Es wurde das Strep-tag II[®]-System von IBA GmbH, Göttingen verwendet, mit dem schon andere Membrantransporter erfolgreich isoliert werden konnten, wie z.B. CzcA aus *R. metallidurans* (Goldberg *et al.*, 1999). ZntA_{Rm} (794 AS) und CadA_{Rm} (1001 AS) konnten gereinigt werden (Abb. 18). ZntA_{Rm} wies im SDS-PAGE-Gel eine Molekulare Masse von ~ 95 kDa auf und wich damit etwas von der theoretischen Proteinmasse ab. Dies ist für Membranproteine nicht ungewöhnlich. So ist es möglich, dass ein Protein mit einer vorhergesagten Masse von 43-47 kDa in einem SDS-PAGE-Gel eine Masse von 28-33 kDa aufweist (Henderson *et al.*, 2000).

Bei Untersuchungen zur *in vitro*-Metallbindung der Proteine mit Hilfe von Metall-Chelat-Sepharose waren sowohl ZntA_{Rm} als auch CadA_{Rm} in der Lage an Zn²⁺, Cd²⁺ aber auch Cu²⁺ zu binden (Abb. 19), weder ZntA_{Rm} noch CadA_{Rm} konnten allerdings Resistenz gegenüber CuCl₂ vermitteln. An unbeladenem oder mit Ni²⁺ beladenem Material erfolgte keine Bindung. Bei der Untersuchung der *in vitro*-Metallbindung des N-Terminus der Kupfer-transportierenden CPx-Typ ATPase ATP7B des Menschen mit Hilfe von Metall-Chelat-Sepharose konnten unterschiedliche Affinitäten zu einzelnen Ionen ermittelt werden. Zu Cu²⁺ war die Bindung am stärksten, dann folgten Zn²⁺>Ni²⁺>Co²⁺ (DiDonato *et al.*, 1997). Eine andere Arbeitsgruppe, die sich auch mit der *in vitro* Bindungskapazität der N-Termini von ATP7B und ATP7A beschäftigte, konnte eine Bindung an Cu²⁺ und auch eine geringe Affinität gegenüber Zn²⁺ feststellen. Nickel (Ni²⁺) wurde in diesen Versuchen nicht getestet, dafür Cd²⁺ und Co²⁺. Zu diesen beiden Ionen zeigten die N-Termini von ATP7A und ATP7B keine Affinität (Lutsenko *et al.*, 1997). Auch bei Affinitätsstudien mit einem synthetisch hergestellten N-terminalen Peptid (1-52 AS) von CopA aus *Helicobacter pylori* wurde neben der Bindung an Cu²⁺-beladene Agarose auch eine schwache Bindung an Zn²⁺ beobachtet. Ebenso konnte durch die Aufnahme eines ESI (*electron spray ionization*)-Spektrums eine Bindung an Ni²⁺ festgestellt werden (Bayle *et al.*, 1997). Auch hier erfolgte die Bindung an Metallionen, die kein Substrat für den Transport waren. Die Proteine CopA, ATP7A und ATP7B transportieren Kupferionen. Die weiteren zweiwertigen Metall-ionen, an die die N-Termini binden konnten, sind keine Substrate der Transporter.

Affinitätsuntersuchungen des gereinigten CDF-Proteins CzcD aus *R. metallidurans* CH34, die mit Metall-Chelat-Sepharose durchgeführt wurden, zeigten eine Bindung an Co²⁺ = Zn²⁺ > Cu²⁺ > Ni²⁺. An Cd²⁺ erfolgte keine Bindung (Anton, 2001). *In vivo* war CzcD in der Lage Kobalt, Zink und Cadmium zu transportieren (Anton *et al.*, 1999). Wie anhand dieser Beispiele zu sehen ist, hat die *in vitro*-Bindung von Metallionen nicht zwingend etwas mit den transportierten Substraten zu tun. So scheinen auch ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} an Cu²⁺ zu binden, obwohl sie keine Resistenz gegen diese Ionen machen. Durch die *in vitro*-Metallbindung des gesamten Proteins konnte keine Eingrenzung der Metall-Bindestellen erfolgen. Mit dieser Methode konnte nur die Metallbindung des Proteins allgemein untersucht werden.

Ein wichtiges Merkmal der P-Typ ATPasen ist die Fähigkeit während des Reaktionszyklusses ein stabiles Phosphointermediat zu bilden (Moller *et al.*, 1996). Ein Modell des katalytischen Mechanismus der P-Typ ATPasen stützt sich auf das E₁-E₂-Schema (de Meis und Vianna, 1979). Die P-Typ ATPasen können demzufolge zwei verschiedene Enzymzustände ausbilden, E₁ mit hoher Affinität für das zu transportierende Substrat und E₂ mit niedriger Substrataffinität. Die sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) des Skelletmuskels des Kaninchens konnte als erste P-Typ ATPase mit und ohne Substrat kristallisiert und die 3D-Struktur aufgeklärt werden (Toyoshima *et al.*, 2000; Toyoshima und Nomura, 2002). Während des Transportzyklusses durchläuft das Protein größere Konformationsänderungen,

die sowohl cytoplasmatische als auch Teile der transmembranen Bereiche betreffen (Toyoshima und Nomura, 2002). Diese Änderungen sind mit der Translokation des Substrates verbunden.

Während des Reaktionszyklusses (Abb. 30) bindet zuerst das Substrat (im Fall der CPx-Typ ATPasen Schwermetallionen) an die P-Typ ATPase, die sich im E_1 -Zustand befindet. Dann erfolgt die ATP-Bindung an die Nukleotidbinde-Domäne (N), innerhalb des konservierten Motivs GDGXNDXP. Das γ -Phosphat vom ATP wird auf den Aspartatrest innerhalb des Sequenzmotivs DKTG der Phosphorylierungs-Domäne (P) übertragen. Dabei wird das stabile Phosphointermediat gebildet. ADP wird entlassen und das Enzym geht vom E_1 -Zustand in den E_2 -Zustand über. Die Affinität zum Substrat ist jetzt gering und es wird auf der anderen Membranseite entlassen. Das Phosphat wird abgespalten. An der Hydrolyse des Phosphointermediates ist wahrscheinlich der β -Loop mit dem TGES-Motiv beteiligt. Die P-Typ ATPase geht vom E_2 -Zustand wieder in den E_1 -Zustand über.

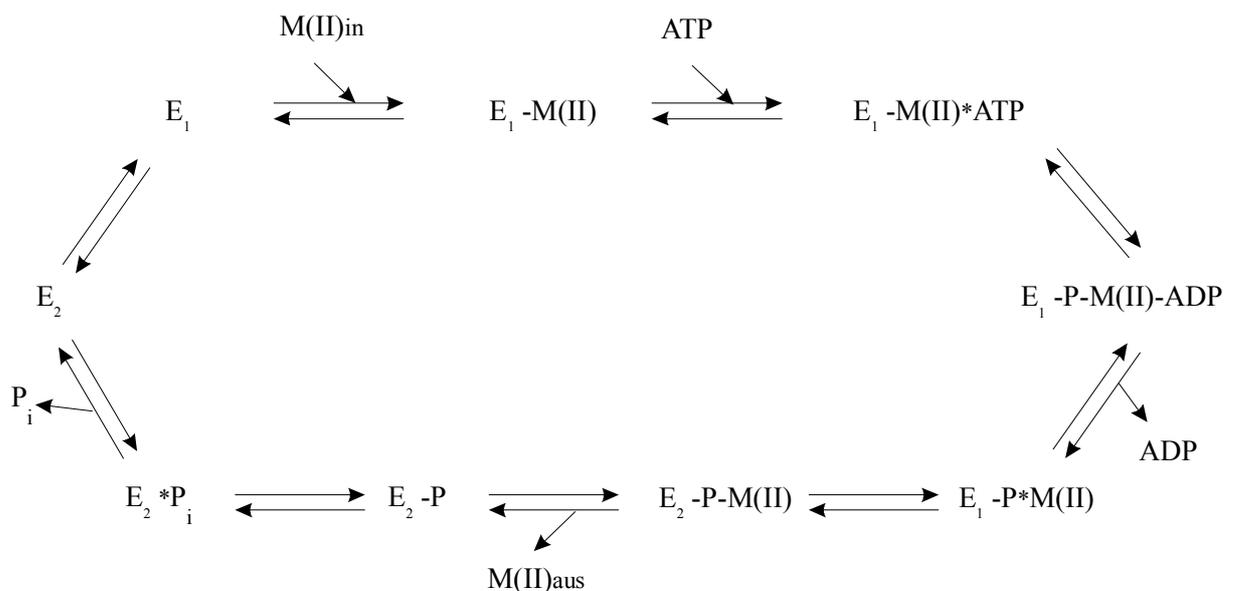


Abb. 30: Schematische Darstellung des Reaktionszyklusses der CPx-Typ ATPasen (Hou und Mitra, 2003)
 E_1 und E_2 stellen die beiden Enzymzustände dar. $M(II)$ bezeichnet das Substrat (Metallionen) und P Phosphat.

Das Phosphointermediat des Enzyms ist säurestabil. Die grundsätzliche Umkehrbarkeit der Reaktion ist eine weitere Eigenschaft der phosphorylierten Zwischenstufe (Tsivkovskii *et al.*, 2002). Die Bildung des Acylphosphatintermediates lässt sich mit radioaktiv markiertem ATP nachweisen (Okkeri und Haltia, 1999). Bei den Phosphorylierungsversuchen mit den Membranen des *E. coli*-Stammes GG48 (*zntA::kan*, Δ *zitB::cm*) in dem *zntA*_{Rm} oder *cadA*_{Rm} exprimiert wurde, konnten radioaktiv markierte Signale erhalten werden, die die Größe des

gereinigten ZntA_{Rm} bzw. CadA_{Rm} hatten (Abb. 21). In Membranen von GG48 ohne zusätzlich überexprimierte CPx-Typ ATPase war keine phosphorylierte Bande detektierbar. Das Signal der Membranen von GG48 mit ZntA_{Rm} war unabhängig vom zugesetzten Substrat, auch ohne Zugabe von Metallionen zum Assay wurde die Bande detektiert. Durch die Zugabe von nichtradioaktiv markiertem ATP im Überschuss verringerte sich die Signalstärke. Es kam zur Verdrängung des radioaktiv markierten ATP. Durch Inkubation der Membran mit verschiedenen Metallkationen (Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺) vor dem ATP-Zusatz kam es zu keiner Verstärkung des Signals.

Die Phosphointermediatbildung der CPx-Typ ATPasen ist in der Regel substratabhängig (Okkeri und Haltia, 1999). Für die Ca²⁺-P-Typ ATPase SERCA1a aus dem Kaninchen konnte gezeigt werden, dass ATP zwar auch an das Enzym binden kann, wenn kein Ca²⁺ gebunden ist, jedoch läuft die Bildung des Phosphointermediates nicht ohne Substratbindung ab (Toyoshima und Nomura, 2002). Bei Experimenten mit der CPx-Typ ATPase CopA aus *Enterococcus hirae*, die bei der Kupferaufnahme eine Rolle spielt (Odermatt *et al.*, 1993), wurde ohne Cu⁺-Zugabe im Phosphorylierungsassay ein Signal des markierten CopA erhalten (Wunderli-Ye und Solioz, 2001). Auch bei Versuchen zur Acylphosphatbildung einer zweiten CPx-Typ ATPase aus *E. hirae* CopB, die den Efflux von Kupfer gewährleistet (Odermatt *et al.*, 1993), war im Assay-Puffer kein zusätzliches Metall vorhanden (Bissig *et al.*, 2001). Tsivkovskii *et al.* (2002) zeigten, dass bei der Phosphorylierung von ATP7B der Teil an Cu(I)-Ionen im Medium, die als Verunreinigung vorkamen, für die Aktivierung ausreichten. Durch den Einsatz des Chelators Bathocuproine Disulfonat (BCS), der die im Assaypuffer vorhandenen Kupferionen wegfing, kam es zur Hemmung der Phosphorylierung. Durch gezielte Cu⁺-Zugabe erfolgte wieder eine Phosphointermediatbildung (Tsivkovskii *et al.*, 2002).

Bei der Membranpräparation mit ZntA_{Rm} in Membranen von GG48 und im Assay wurde der Metallchelator EDTA eingesetzt, so dass eigentlich keine zweiwertigen Metallionen, die die Phosphorylierung aktivieren, vorhanden sein sollten. Möglicherweise spielt hier der extrem histidinreiche N-Terminus von ZntA_{Rm} eine Rolle, dass noch am Protein gebundene Metallionen vorhanden waren, die durch 10 µM EDTA im Assay-Puffer nicht entfernt werden konnten und so auch ohne Metallzugabe die Phosphointermediatbildung förderten.

Bei der Untersuchung der Acylphosphatbildung der Membranen vom *E. coli*-Stamm GG48 mit CadA_{Rm} wurde ohne zusätzliche Metallinkubation kein Signal erhalten. Durch die vorherige Inkubation des Assay-Ansatzes mit verschiedenen zweiwertigen Ionen kam es zur Signalförderung. Dies erfolgte nicht nur durch die Substrate von CadA_{Rm} Cadmium- und Zinkionen sondern auch durch andere Metallionen, die kein Substrat von CadA_{Rm} darstellen (Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺). Durch die Zugabe von nichtradioaktiv markiertem ATP im Überschuss verringerte sich die Signalstärke. Es kam zur Verdrängung des Signals.

Für ZntA aus *E. coli*, die Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierende CPx-Typ ATPase, konnte eine Stimulation der Phosphorylierung durch [³³P]ATP neben Zn²⁺, Cd²⁺ und Pb²⁺ auch durch Cu²⁺

und Ni^{2+} beobachtet werden (Okkeri und Haltia, 1999). Durch Hou und Mitra (2003) wurde die Anregung der Phosphointermediatbildung von ZntA aus *E. coli* durch die physiologischen Substrate und andere divalente Kationen bestätigt. Sie wiesen eine Intermediatbildung durch Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} und außerdem durch Co^{2+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} nach. So ist es nicht ungewöhnlich, dass man für CadA_{Rm} auch Phosphointermediat-Bildungen nach Inkubation mit anderen zweiwertigen Ionen neben den eigentlichen Substraten erhält. Für ZntA aus *E. coli* (Hou und Mitra, 2003) konnte gezeigt werden, dass die Intermediatbildung mit ATP spezifisch für zweiwertige Ionen ist.

4.2. Der RND-Proteinkomplex CzcCBA

Den eigentlichen Transporter des CzcCBA-Komplexes stellt das RND-Protein CzcA dar (Goldberg *et al.*, 1999). Mit Hilfe des MFP CzcB und des OMF CzcC wird der Transport der Schwermetallionen ins Außenmedium gewährleistet (Paulsen *et al.*, 1997). In verschiedenen Studien wurden starke Indizien für die tatsächliche Existenz des Drei-Komponentenkomplexes erhalten. So sind die Strukturgene CzcC, CzcB und CzcA in einem Operon organisiert (van der Lelie *et al.*, 1997) und ein effizienter Transport der Substrate Co(II) , Zn(II) und Cd(II) ist nur bei Vorhandensein aller drei Proteine gewährleistet (Rensing *et al.*, 1997b; Legatzki *et al.*, 2003a). Ein direkter Nachweis der Interaktion zwischen den einzelnen Strukturproteinen konnte noch nicht erbracht werden. Bei *in vivo* Vernetzungsexperimenten mit Formaldehyd in Zellen von *E. coli* in denen *czcB* exprimiert wurde, konnte ein ~ 212 kDa multimerer CzcB-Komplex detektiert werden (Pribyl, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion der Strukturproteine des *czc*-Systems in *R. metallidurans* mit Hilfe des Vernetzers Formaldehyd untersucht. Formaldehyd ist ein relativ unspezifischer Vernetzer (Skare *et al.*, 1993), da er Verbrückungen zwischen den Proteinen in verschiedenen, nicht definierten Längen ausbilden kann. Es konnte eine Multimerisierung von CzcB unabhängig vom Vorhandensein von CzcA oder dem Substrat nachgewiesen werden (Abb. 23). Im Unterschied zu Versuchen von Pribyl (2001) wurden allerdings Banden verschiedener Größen erhalten (~ 56 kDa, ~ 160 kDa, ~ 180 kDa, ~ 212 kDa). Die ~ 56 kDa-Bande entsprach dem CzcB-Monomer. Die anderen Banden stellten möglicherweise multimeren Formen des MFP dar, eventuell Trimere (~ 160 kDa oder ~ 180 kDa) oder Tetramere (~ 212 kDa). Eine eindeutigere Zuordnung von Größen zu den Proteinbanden war allerdings nicht möglich, da kein geeigneter Marker aufgetragen wurde. Für das verwandte, Antibiotika-Resistenz vermittelnde Efflux-System AcrAB-TolC aus *E. coli* (Ma *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995), welches aus dem RND-Protein AcrB, dem MFP AcrA und dem OMF TolC besteht, konnte bei Vernetzungsexperimenten auch eine Multimerisierung von AcrA beobachtet werden (Zgurskaya und Nikaido, 2000a). Es wurde

die Bildung eines AcrA-Dimers und -Trimers nachgewiesen. Zum Beweis, dass sie Homooligomere darstellen wurden die MFP-Multimere mit Hilfe eines His-tags, der an AcrA fusioniert war, über Affinitätschromatographie gereinigt und mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Membranfusionsprotein HlyD, Teil des Drei-Komponentensystems HlyBD-TolC aus *E. coli* (Wandersman und Delepelaire, 1990), lag nach Vernetzungsexperimenten mit Disuccinimidylglutamat (DSG) ebenfalls als Homotrimer vor (Thanabalu *et al.*, 1998). Für verschiedene MFP wurde somit eine trimere Struktur mittels *Crosslink*-Experimenten bestimmt. Pribyl (2001) legte die bei ihm nachzuweisende Bande bei ~ 212 kDa als CzcB₃-Komplex fest, allerdings verwendete er ein SDS-PAGE-Gel einer anderen Acrylamid-Konzentration, so dass dieses Signal nicht der ~ 180 oder ~ 212 kDa Bande zugeordnet werden kann. Auch eine unspezifische Vernetzungsreaktion von CzcB mit anderen Proteinen von *R. metallidurans* ist nicht auszuschließen. Die Überprüfung des Vorkommens von CzcC in diesen Komplexen konnte aufgrund unspezifischer Reaktionen des polyklonalen Antikörpers gegen CzcC nicht durchgeführt werden.

Eindeutig konnte allerdings eine Interaktion zwischen dem RND-Protein CzcA und dem MFP CzcB nachgewiesen werden (Abb. 23). Es wurde eine <<212 kDa Bande mit Antikörpern gegen CzcA und auch mit Antikörpern gegen CzcB detektiert. Diese Bande war nur nachweisbar, wenn beide Proteine gebildet wurden. Über die Zusammensetzung dieses Komplexes können jedoch keine genauen Aussagen gemacht werden. Die exakte Größe des Komplexes konnte nicht bestimmt werden. Da durch Verknüpfung der Proteinkomplexe, deren Form und Gestalt, ein ungewöhnliches Laufverhalten im SDS-PAGE-Gel hervorgerufen werden kann (Higgs *et al.*, 1998), sind für genaue Aussagen weiterführende Untersuchungen sinnvoll. Eine Möglichkeit bestünde darin den Komplex über das an CzcA-fusionierte *Strep*-tag II[®]-Peptid über eine *Strep*Tactin-Säule zu reinigen. Die Reinigung von unvernetztem CzcA-*Strep*-tag II[®] aus *R. metallidurans* war prinzipiell möglich (Abb. 22). Wenn es gelänge den gesamten Komplex zu isolieren, könnte versucht werden die Molekülmasse über z.B. analytische Ultrazentrifugation oder Massenspektroskopie zu bestimmen.

Die Interaktion von RND-Protein und MFP konnte auch an anderen Beispielen nachgewiesen werden, z.B. zwischen dem RND MexB und dem MFP MexA aus *P. aeruginosa* die nach Expression in *E. coli* durch Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) vernetzt werden konnten (Tikhonova *et al.*, 2002). Das MFP AcrA konnte ohne Zusatz von Substrat zusammen mit dem RND AcrB mit Hilfe von Antikörpern koimmunopräzipitiert werden (Kawabe *et al.*, 2000). Von Zgurskaya und Nikaido (2000a) konnten in *in vivo* Vernetzungsexperimenten mit den *Crosslinkern* DSG oder DSP Subkomplexe von AcrB und AcrA der Formen AcrA₂B und AcrA₃B mit Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Komplexe wurden unabhängig vom OMF TolC und Substrat gebildet (Zgurskaya und Nikaido, 2000a). Eine kurze Region von bis zu 67 AS in der Nähe des C-terminalen Bereiches von AcrA ist möglicherweise in die Interaktion von AcrB und AcrA involviert (Elkins und Nikaido, 2003). Im letzten Jahr

konnten die 3D-Struktur von AcrB als erstem Vertreter der RND-Proteine aufklärt werden (Murakami *et al.*, 2002). AcrB bildete Trimere. Die 3D-Kristallstruktur von TolC zeigte, dass dieses auch als Trimer vorliegt (Koronakis *et al.*, 2000). So wird für den Komplex von einer Zusammensetzung von AcrA₃B₃-TolC₃ ausgegangen (Abb. 29) (Murakami *et al.*, 2002). Bei 2D-Kristallisationsversuchen mit AcrA konnte zwar kein Hinweis auf eine Trimere Form des MFP gefunden werden (Avila-Sakar *et al.*, 2001), allerdings führen die Autoren selbst an, dass in ihrem für die Kristallisation verwendeten System andere Bedingungen (Lipid-Layer-Schicht mit gereinigtem Protein) als in der natürlichen Umgebung herrschen und das es dadurch zu Abweichungen kommen kann.

In Analogie zum AcrAB-TolC-Komplex ist für CzcCBA die Form CzcC₃B₃A₃ am wahrscheinlichsten. Aussagen zur Involvierung des OMF CzcC in die vernetzten Proteinkomplexe konnten nicht gemacht werden, da die vorhandenen Antikörper nicht spezifisch genug waren.

4.3. Ausblick

Eine weitere biochemische Charakterisierung der CPx-Typ ATPasen ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} sollte erfolgen, um darüber die verschiedenen Rollen bei der Resistenz zu verstehen. Über Vesikel-Transport-Untersuchungen in *E. coli* könnten die unterschiedlichen Substrataffinitäten gegenüber Zink- und Cadmiumionen näher charakterisiert sowie eine mögliche aktivierende Rolle von Glutathion beim Transport untersucht werden. Weiterhin sollte die Bildung von Glutathion-Metall-Komplexen, insbesondere von Glutathion-Cadmium-Komplexen, in *R. metallidurans* experimentell belegt werden. Um die *in vivo* Bedeutung von Glutathion-Metall-Komplexen bei dem CPx-Typ ATPase-Transport zu untersuchen, könnte versucht werden einen Glutathion-negativen *R. metallidurans*-Stamm durch die Deletion der Glutathion-bildenden Enzyme (γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase bzw. Glutathion-Synthetase) zu erzeugen. Theoretisch sollte, wenn Glutathion *in vivo* eine fördernde Wirkung auf den Transport über die CPx-Typ ATPasen hat, die Transporteffizienz des Glutathion-negativen Stammes im Vergleich zu *R. metallidurans* AE104 verringert sein.

Die größten strukturellen Unterschiede zwischen den CPx-Typ ATPasen ZntA_{Rm} und CadA_{Rm} sind im N-Terminus zu finden. Durch Deletion dieses Bereiches oder durch den Austausch des N-Terminus von ZntA_{Rm} gegen den von CadA_{Rm} und umgekehrt sollte der Einfluss auf die Resistenzausbildung in *E. coli* sowie auf den Transport und die Substrataffinität charakterisiert werden.

Die Komponenten, die in die Regulation der Expression von *zntA*_{Rm} oder *cadA*_{Rm} in *R. metallidurans* eingreifen, sollten identifiziert werden. Dafür sollten zuerst die unmittelbaren umgebenden Gen-Strukturen beider CPx-Typ ATPase-Gene näher untersucht

werden. Durch die Zugänglichkeit der gesamten Genomsequenz von *R. metallidurans* CH34 (http://www.genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html) konnte stromaufwärts von *cadA_{Rm}* eine putative DNA-bindende Regulatorstruktur (Gen6854) identifiziert werden. Anhand der durchgeführten Experimente konnte eine Involvierung in die Regulation von *cadA_{Rm}* aber bis jetzt nicht bestätigt werden. Es sollte versucht werden, das Gen6854 über ein heterologes Expressionsystem in *E. coli* zu exprimieren und das Protein zu reinigen, um anschließend DNA-Bindestudien am putativen *cadA_{Rm}*-Promotor durchzuführen.

In unmittelbarer Nähe zu *zntA_{Rm}* konnten verschiedene Strukturen identifiziert werden, die Homologien zu Genen der *czc*-Determinante auf pMOL30 aufweisen, die Resistenz unter anderem auch gegenüber Zink- und Cadmiumionen vermittelt. Eine mögliche Rolle dieser Strukturen bei der Resistenzausprägung durch *ZntA_{Rm}* sollte durch z.B. Deletions- oder Insertionsmutation dieser Bereiche überprüft werden.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Einflusses verschiedener Efflux-Familien bei der Aufrechterhaltung der Zn(II)- oder Cd(II)-Homöostase in *R. metallidurans* wurden verschiedene Fragen aufgeworfen. Eine wichtige Überlegung, die in Bezug des Zn(II)/Cd(II)-Transportes durch den RND-Proteinkomplex *CzcCBA* diskutiert wurde, ist die Einspeisung der Substrat-Ionen vom Periplasma aus in den Transporter *CzcA*. Der Untersuchung der periplasmatischen Domänen von *CzcA*, die eine Rolle im Substrat-Transport spielen könnten, sollte weiter nachgegangen werden. Bisherige Ansätze über Chimärenbildung mit einem anderen Schwermetallionen-transportierenden RND-Protein führten aufgrund der Instabilität der resultierenden Proteine zu keinen Aussagen (Helbig, 2003). Versuche zur Aufklärung der 3D-Struktur von *CzcA*, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, führten bisher nicht zum Erfolg. Im letzten Jahr konnte die räumliche Struktur eines verwandten RND-Transporters, *AcrB* aus *E. coli*, bestimmt werden (Murakami *et al.*, 2002). Aufgrund der für dieses Protein bekannten Kristallisationsbedingungen sollten erneut ein Versuch zur Kristallisation von *CzcA* unternommen werden, um unter anderem zu klären, ob die strukturellen Voraussetzungen für eine periplasmatische Einspeisung der Schwermetallionen in *CzcA* überhaupt gegeben sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In *R. metallidurans* CH34 wurden Vertreter aller drei Proteinfamilien, die an der Resistenzbildung gegen Zink oder Cadmium durch Efflux beteiligt sein könnten, identifiziert: CPx-Typ ATPasen wie ZntA und CadA; RND-Proteine wie CzcA und CDF-Proteine wie CzcD. Die Gene *zntA* und *cadA* sind chromosomal lokalisiert. Die Gene *czcA* und *czcD* sind Teil der *czc*-Determinante auf dem Megaplasmid pMOL30. In der vorliegenden Arbeit wurden die CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA näher charakterisiert und das Zusammenspiel mit den beiden anderen Zn(II)/Cd(II)-Efflux-Systemen untersucht.

1. Die CPx-Typ ATPasen ZntA und CadA vermittelten in *R. metallidurans* und nach heterologer Expression im Schwermetall-sensitiven *E. coli*-Stamm GG48 Resistenz gegenüber Zink und Cadmium. ZntA war in *E. coli* auch in der Lage die Resistenz gegenüber Blei zu erhöhen.
2. Die Expression der beiden Gene *zntA* und *cadA* wurde im megaplasmidlosen *R. metallidurans*-Stamm AE104 nach Konstruktion von β -Galaktosidase-Transkriptionsfusionen untersucht. Beide Gene wurden durch Cadmium und Zink induziert. Das Vorhandensein von ZntA inhibierte die Induktion von *cadA* durch Zink im Bereich bis 300 μ M vollständig und durch Cadmium teilweise. Nach Deletion von *zntA* wurde *cadA* bei niedrigeren Schwermetallionen-Konzentrationen induziert als beim Wildtyp.
3. Die konstitutive Expression der Gene des Co(II)/Zn(II)/Cd(II)-transportierenden RND-Proteinkomplexes CzcCBA führte zur Inhibierung der Transkription der CPx-Typ ATPase-Gene *zntA* bzw. *cadA*. Durch Zink erfolgte keine Induktion mehr. Die Induktion durch Cadmium war vermindert. Die konstitutive Expression des Gens *czcD* hatte keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit von *zntA* oder *cadA* durch Schwermetallionen. Zur vollständigen Resistenz gegen Cadmium war die Anwesenheit mindestens einer der beiden CPx-Typ ATPasen nötig, auch in Gegenwart von CzcCBA.
4. Nach heterologer Expression der Gene von ZntA bzw. CadA in *E. coli*-Membranen konnte die Bildung eines stabilen Phosphointermediates mit radioaktiv-markiertem [γ ³²P]-ATP gezeigt werden. Die Proteine ZntA und CadA konnten nach Expression der Gene in *E. coli* gereinigt werden. Durch Metall-Chelat-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass ZntA bzw. CadA *in vitro* Zn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ aber nicht Ni²⁺ binden konnten.
5. Durch Vernetzungsexperimente mit Formaldehyd konnte nach konstitutiver Expression der RND-Komplex-Komponenten CzcC, CzcB und CzcA eine Multimerisierung von CzcB sowie die Interaktion von CzcB und CzcA nachgewiesen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adaikkalam, V. und S. Swarup.** 2002. Molecular characterization of an operon, *cueAR*, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **148**(9):2857-67.
- Agranoff, D. D. und S. Krishna.** 1998. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol* **28**(3):403-12.
- Akada, R.** 1994. Quick-Check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques* **17**:58.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17):3389-402.
- 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., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl und D. H. Nies.** 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* **181**(22):6876-81.
- Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, E. Molteni, D. L. Huffman und T. V. O'Halloran.** 2002. Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res* **12**(2):255-71.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith und K. Struhl.** 1993. Current protocols in molecular biology, Sec. Edition ed. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Avila-Sakar, A. J., S. Misaghi, E. M. Wilson-Kubalek, K. H. Downing, H. Zgurskaya, H. Nikaido und E. Nogales.** 2001. Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. *J Struct Biol* **136**(1):81-8.
- Axelsen, K. B. und M. G. Palmgren.** 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* **46**(1):84-101.
- Bal, N., E. Mintz, F. Guillain und P. Catty.** 2001. A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd²⁺-ATPase. *FEBS Lett* **506**(3):249-52.
- Bal, N., C. C. Wu, P. Catty, F. Guillain und E. Mintz.** 2003. Cd²⁺ and the N-terminal metal-binding domain protect the putative membranous CPC motif of the Cd²⁺-ATPase of *Listeria monocytogenes*. *Biochem J* **369**(3):681-5.
- Banci, L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, L. A. Finney, C. E. Outten und T. V. O'Halloran.** 2002. A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118). *J Mol Biol* **323**(5):883-97.
- Barrineau, P., P. Gilbert, W. J. Jackson, C. S. Jones, A. O. Summers und S. Wisdom.** 1984. The DNA sequence of the mercury resistance operon of the IncFII plasmid NR1. *J Mol Appl Genet* **2**(6):601-19.

- Bayle, D., S. Wangler, T. Weitzenegger, W. Steinhilber, J. Volz, M. Przybylski, K. P. Schafer, G. Sachs und K. Melchers. 1998. Properties of the P-type ATPases encoded by the *copAP* operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *J Bacteriol* **180**(2):317-29.
- Bayle, D., D. Weeks, S. Hallen, K. Melchers, K. Bamberg und G. Sachs. 1997. *In vitro* translation analysis of integral membrane proteins. *J Recept Signal Transduct Res* **17**(1-3):29-56.
- Beard, S. J., R. Hashim, J. Membrillo-Hernandez, M. N. Hughes und R. K. Poole. 1997. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* **25**(5):883-91.
- Beard, S. J., R. Hashim, G. Wu, M. R. Binet, M. N. Hughes und R. K. Poole. 2000. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**(2):231-5.
- Bensadoun, A. und D. Weinstein. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**(1):241-50.
- Berg, J. M. und Y. Shi. 1996. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* **271**(5252):1081-5.
- Binet, M. R. und R. K. Poole. 2000. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **473**(1):67-70.
- Bissig, K. D., H. Wunderli-Ye, P. W. Duda und M. Solioz. 2001. Structure-function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues. *Biochem J* **357**(1):217-23.
- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russell-Jones und E. C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**(1):175-9.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331):1453-74.
- Blencowe, D. K. und A. P. Morby. 2003. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3):291-311.
- Blindauer, C. A., M. D. Harrison, A. K. Robinson, J. A. Parkinson, P. W. Bowness, P. J. Sadler und N. J. Robinson. 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol Microbiol* **45**(5):1421-32.
- Borremans, B., J. L. Hobman, A. Provoost, N. L. Brown und D. van Der Lelie. 2001. Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **183**(19):5651-8.
- 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**:248-54.
- Brim, H., M. Heyndrickx, P. de Vos, A. Wilmotte, D. Springael, H. G. Schlegel und M. Mergeay. 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* **22**(2):258-68.

- Brocklehurst, K. R., J. L. Hobman, B. Lawley, L. Blank, S. J. Marshall, N. L. Brown und A. P. Morby.** 1999. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**(3):893-902.
- Brown, N. L., S. J. Ford, R. D. Pridmore und D. C. Fritzing.** 1983. Nucleotide sequence of a gene from the *Pseudomonas* transposon Tn501 encoding mercuric reductase. *Biochemistry* **22**(17):4089-95.
- Brown, N. L., J. V. Stoyanov, S. P. Kidd und J. L. Hobman.** 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3):145-63.
- Bull, P. C., G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes und D. W. Cox.** 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* **5**(4):327-37.
- Busenlehner, L. S., M. A. Pennella und D. P. Giedroc.** 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3):131-43.
- Chamngopol, S. und E. A. Groisman.** 2002. Mg²⁺ homeostasis and avoidance of metal toxicity. *Mol Microbiol* **44**(2):561-71.
- Chen, C. Y. und S. A. Morse.** 2001. Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett* **202**(1):67-71.
- Christie, G. E., T. J. White und T. S. Goodwin.** 1994. A *merR* homologue at 74 minutes on the *Escherichia coli* genome. *Gene* **146**(1):131-2.
- Coleman, J. E.** 1998. Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **2**(2):222-34.
- Dalet, K., E. Gouin, Y. Cenatiempo, P. Cossart und Y. Hechard.** 1999. Characterisation of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **174**(1):111-6.
- Daniels, M. J., J. S. Turner-Cavet, R. Selkirk, H. Sun, J. A. Parkinson, P. J. Sadler und N. J. Robinson.** 1998. Coordination of Zn²⁺ (and Cd²⁺) by prokaryotic metallothionein. Involvement of his-imidazole. *J Biol Chem* **273**(36):22957-61.
- de Meis, L. und A. L. Vianna.** 1979. Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **48**:275-92.
- deHaseh, P. L., M. L. Zupancic und M. T. Record, Jr.** 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol* **180**(12):3019-25.
- Deretic, V., S. Chandrasekharappa, J. F. Gill, D. K. Chatterjee und A. M. Chakrabarti.** 1987. A set of cassettes and improved vectors for genetic and biochemical characterization of *Pseudomonas* genes. *Gene* **57**(1):61-72.
- DiDonato, M., S. Narindrasorasak, J. R. Forbes, D. W. Cox und B. Sarkar.** 1997. Expression, purification, and metal binding properties of the N-terminal domain from the wilson disease putative copper-transporting ATPase (ATP7B). *J Biol Chem* **272**(52):33279-82.
- Diels, L., Q. Dong, D. van der Lelie, W. Baeyens und M. Mergeay.** 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J Ind Microbiol* **14**(2):142-53.
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay und D. H. Nies.** 1985. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch Int Physiol Biochim* **93**:B27-B28.

- Dinh, T., I. T. Paulsen und M. H. Saier, Jr.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **176**(13):3825-31.
- Dressler, C., U. Kües, D. H. Nies und B. Friedrich.** 1991. Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol* **57**:3079-85.
- Elkins, C. A. und H. Nikaido.** 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol* **184**(23):6490-8.
- Elkins, C. A., und H. Nikaido.** 2003. Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its c-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **185**(18):5349-56.
- Endo, G. und S. Silver.** 1995. CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* **177**(15):4437-41.
- Eng, B. H., M. L. Guerinot, D. Eide und M. H. Saier, Jr.** 1998. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **166**(1):1-7.
- Fairbanks, G. und J. Avruch.** 1972. Four gel systems for electrophoretic fractionation of membrane proteins using ionic detergents. *J Supramol Struct* **1**(1):66-75.
- Fan, B., G. Grass, C. Rensing, und B. P. Rosen.** 2001. *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)₂Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem Biophys Res Commun* **286**:414-8.
- Franke, S., G. Grass, D. H. Nies.** 2001. The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiol* **147**(4):965-72.
- Franke, S., G. Grass, C. Rensing und D. H. Nies.** 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**(13):3804-12.
- Fuhr, B. J. und D. L. Rabenstein.** 1973. Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. IX. The binding of cadmium, zinc, lead, and mercury by glutathione. *J Am Chem Soc* **95**(21):6944-50.
- Fujihira, E., N. Tamura und A. Yamaguchi.** 2002. Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **131**(1):145-51.
- Gaither, L. A. und D. J. Eide.** 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* **14**(3-4):251-70.
- Gatti, D., B. Mitra und B. P. Rosen.** 2000. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J Biol Chem* **275**(44):34009-12.
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke und D. H. Nies.** 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem* **274**(37):26065-70.
- Goris, J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diels, M. Mergeay, K. Kersters und P. Vandamme.** 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(5):1773-82.

- Gotoh, N., T. Kusumi, H. Tsujimoto, T. Wada und T. Nishino.** 1999. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **458**(1):32-6.
- Grass, G.** 2000. Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies und 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):4664-7.
- Grass, G., C. Grosse und D. H. Nies.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* **182**(5):1390-8.
- Grass, G., und C. Rensing.** 2001a. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5):902-8.
- Grass, G. und C. Rensing.** 2001b. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**(6):2145-7.
- Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith, und C. Rensing.** 2002. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**(3):864-6.
- Grosse, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder, und D. Nies.** Regulation of the metal resistance determinant *czc* from *Ralstonia metallidurans* by the four proteins CzcD, CzcR, CzcS, and CzcE. In Vorbereitung.
- Grosse, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. N. Santos, B. Lawley, N. L. Brown und D. H. Nies.** 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **181**(8):2385-93.
- Guerinot, M. L.** 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**(1-2):190-8.
- Guffanti, A. A., Y. Wei, S. V. Rood und 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**(1):145-53.
- Gunshin, H., B. Mackenzie, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan und M. A. Hediger.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**(6641):482-8.
- Hamer, D. H.** 1986. Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**:913-51.
- Hantke, K.** 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* **14**(3-4):239-49.
- Hassan, M. T., D. van der Lelie, D. Springael, U. Romling, N. Ahmed und M. Mergeay.** 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238**(2):417-25.
- Helbig, K.** 2003. Aufklärung der Funktion des Schwermetall-Transporters CzcA aus *Ralstonia metallidurans* CH34 durch gerichtete Mutagenese. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Henderson, P. J., C. K. Hoyle und A. Ward.** 2000. Expression, purification and properties of multidrug efflux proteins. *Biochem Soc Trans* **28**(4):513-7.
- Herrmann, L., D. Schwan, R. Garner, H. L. Mobley, R. Haas, K. P. Schafer und K. Melchers.** 1999. *Helicobacter pylori* *cadA* encodes an essential Cd(II)-Zn(II)-Co(II) resistance factor influencing urease activity. *Mol Microbiol* **33**(3):524-36.
- Hess, H. H., M. B. Lees und J. E. Derr.** 1978. A linear Lowry--Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal Biochem* **85**(1):295-300.

- Higgs, P. I., P. S. Myers und K. Postle.** 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExhB and ExhD from homomultimers. *J Bacteriol* **180**(22):6031-8.
- Higham, D. P., P. J. Sadler und M. D. Scawen.** 1986. Cadmium-binding proteins in *Pseudomonas putida*: pseudothioneins. *Environ Health Perspect* **65**:5-11.
- Hitomi, Y., C. E. Outten und T. V. O'Halloran.** 2001. Extreme zinc-binding thermodynamics of the metal sensor/regulator protein, ZntR. *J Am Chem Soc* **123**(35):8614-5.
- Hmiel, S. P., M. D. Snavely, J. B. Florer, M. E. Maguire und C. G. Miller.** 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *J Bacteriol* **171**(9):4742-51.
- Hoffmann, T.** 2001. Untersuchung der Regulation der Schwermetallresistenz in *R. metallidurans* CH34 durch Zweidimensionale Gelelektrophorese und Reporterfusion. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Hou, Z., und B. Mitra.** 2003. The metal specificity and selectivity of ZntA from *Escherichia coli* using the acylphosphate intermediate. *J Biol Chem* **278**(31):28455-61.
- Hou, Z. J., S. Narindrasorasak, B. Bhushan, B. Sarkar und B. Mitra.** 2001. Functional analysis of chimeric proteins of the Wilson Cu(I)-ATPase (ATP7B) and ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**(44):40858-63.
- Hsu, C. M. und B. P. Rosen.** 1989. Characterization of the catalytic subunit of an anion pump. *J Biol Chem* **264**(29):17349-54.
- Hughes, M. N. und R. K. Poole.** 1991. Metal speciation and microbial growth - the hard (and soft) facts. *J Gen Microbiol* **137**:725-34.
- Hultberg, M.** 1998. Rhizobacterial glutathione levels as affected by starvation and cadmium exposure. *Curr Microbiol* **37**(5):301-5.
- Huster, D., und S. Lutsenko.** 2003. The Distinct Roles of the N-terminal Copper-binding Sites in Regulation of Catalytic Activity of the Wilson's Disease Protein. *J Biol Chem* **278**(34):32212-8.
- Jamieson, D.** 2002. Saving sulfur. *Nat Genet* **31**(3):228-30.
- Jasper, P. und S. Silver.** 1997. Magnesium transport in microorganisms, p. 7-45. In E. D. Weinberg, Ed (ed.), In: Microorganisms and Minerals, vol. 3. Marcel Dekker, New York.
- Jin, Y. H., A. B. Clark, R. J. Slebos, H. Al-Refai, J. A. Taylor, T. A. Kunkel, M. A. Resnick und D. A. Gordenin.** 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* **34**(3):326-9.
- Johnson, J. L.** 1981. Genetic characterization, p. 450-72. In P. Gerhardt (ed.), Manual of Methods of General Bacteriology. ASM, Washington.
- Johnson, J. M. und G. M. Church.** 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* **287**(3):695-715.
- Juhnke, S.** 1997. Einfluß von Punktmutationen im *czcA*-Gen auf die Funktion des CzcA-Proteins. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Juhnke, S., N. Peitzsch, N. Hubener, C. Grosse und D. H. Nies.** 2002. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol* **179**(1):15-25.

- Karlin, S. und Z. Y. Zhu.** 1997. Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26):14231-6.
- Kawabe, T., E. Fujihira und A. Yamaguchi.** 2000. Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA. *J Biochem (Tokyo)* **128**(2):195-200.
- Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay und M. E. Maguire.** 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* **36**(5):1085-100.
- Khan, S., K. R. Brocklehurst, G. W. Jones und A. P. Morby.** 2002. The functional analysis of directed amino-acid alterations in ZntR from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **299**(3):438-45.
- Kidd, S. P. und N. L. Brown.** 2003. ZccR--a MerR-like regulator from *Bordetella pertussis* which responds to zinc, cadmium, and cobalt. *Biochem Biophys Res Commun* **302**(4):697-702.
- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi und C. Hughes.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**(6789):914-9.
- Kyte, J. und R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1):105-32.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259):680-5.
- Lane, T. W. und F. M. Morel.** 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9):4627-31.
- Lee, S. M., G. Grass, C. J. Haney, B. Fan, B. P. Rosen, A. Anton, D. H. Nies und C. Rensing.** 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol Lett* **215**(2):273-8.
- Lee, S. W., E. Glickmann und D. A. Cooksey.** 2001. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator. *Appl Environ Microbiol* **67**(4):1437-44.
- Legatzki, A., S. Franke, S. Lucke, T. Hoffmann, A. Anton, D. Neumann, und D. H. Nies.** 2003a. First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation* **14**(2):153-68.
- Legatzki, A., G. Grass, A. Anton, C. Rensing, und D. H. Nies.** 2003b. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol* **185**(15):4354-61.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Dervedde, M. Eitinger und B. Friedrich.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* **176**(14):4385-93.
- Liesegang, H.** 1994. Die Kobalt- und Nickelresistenz (*cnr*) aus *Alcaligenes eutrophus* CH34: Nukleotidsequenz, beteiligte Gene und Genprodukte. Dissertation. Georg-August-Universität, Göttingen.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui und H. G. Schlegel.** 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **175**(3):767-78.

- Liu, T., S. Nakashima, K. Hirose, Y. Uemura, M. Shibasaka, M. Katsuhara, und K. Kasamo.** 2003. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett* **542**(1-3):159-63.
- Lowry, O. H., A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75.
- Lu, D., B. Boyd und C. A. Lingwood.** 1997. Identification of the key protein for zinc uptake in *Hemophilus influenzae*. *J Biol Chem* **272**(46):29033-8.
- Lund, P. A., S. J. Ford und N. L. Brown.** 1986. Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501. *J Gen Microbiol* **132**(2):465-80.
- Lutsenko, S. und J. H. Kaplan.** 1995. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* **34**(48):15607-13.
- Lutsenko, S., K. Petrukhin, T. C. Gilliam und J. H. Kaplan.** 1997. Heterologous expression of the metal-binding domains of human copper-transporting ATPases (P1-ATPases). *Ann N Y Acad Sci* **834**:155-7.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido und J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**(19):6299-313.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido und J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**(1):45-55.
- Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros und M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* **35**(5):1065-78.
- Mandel, M. und A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**:159-62.
- Mao, W., M. S. Warren, D. S. Black, T. Satou, T. Murata, T. Nishino, N. Gotoh und O. Lomovskaya.** 2002. On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Mol Microbiol* **46**(3):889-901.
- McMurray, C. T. und J. A. Tainer.** 2003. Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat Genet* **34**(3):239-41.
- Melchers, K., T. Weitzenegger, A. Buhmann, W. Steinhilber, G. Sachs und K. P. Schafer.** 1996. Cloning and membrane topology of a P-type ATPase from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **271**(1):446-57.
- Mergeay, M., C. Houba und J. Gerits.** 1978. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas* [proceedings]. *Arch Int Physiol Biochim* **86**(2):440-2.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie und R. Wattiez.** 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3):385-410.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles und F. Van Gijsegem.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* **162**(1):328-34.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York.

- Mitra, B. und R. Sharma.** 2001. The cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*, is not essential for its function. *Biochemistry* **40**(25):7694-9.
- Moller, J. V., B. Juul und M. le Maire.** 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1286**(1):1-51.
- Mosteller, R. D. und R. V. Goldstein.** 1975. Unusual sensitivity of *E. coli* to adenine or adenine plus histidine. *J Bacteriol* **123**(2):750-1.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita und A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**(6907):587-93.
- Nelson, D. L. und E. P. Kennedy.** 1971. Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J Biol Chem* **246**(9):3042-9.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley und S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**(3):239-42.
- Nies, A., D. H. Nies und S. Silver.** 1989a. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171**(9):5065-70.
- Nies, A., D. H. Nies und S. Silver.** 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* **265**(10):5648-53.
- Nies, D. H.** 1991. Effluxsysteme als Grundlage bakterieller Metallresistenzen. *Bioforum* **7-8**:251-6.
- Nies, D. H.** 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**(10):2707-12.
- Nies, D. H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(6):730-50.
- Nies, D. H.** 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* **4**(2):77-82.
- Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3):313-39.
- Nies, D. H., M. Mergeay, B. Friedrich und H. G. Schlegel.** 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **169**(10):4865-8.
- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu und S. Silver.** 1989b. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19):7351-5.
- Nies, D. H. und S. Silver.** 1989a. Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J Bacteriol* **171**(7):4073-5.
- Nies, D. H. und S. Silver.** 1989b. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171**(2):896-900.
- Nies, D. H. und S. Silver.** 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* **14**(2):186-99.
- Nikaido, H., M. Basina, V. Nguyen, und E. Y. Rosenberg.** 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol* **180**(17):4686-92.

- Nucifora, G., L. Chu, T. K. Misra und S. Silver.** 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10):3544-8.
- Odermatt, A., H. Suter, R. Krapf und M. Solioz.** 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **268**(17):12775-9.
- Okkeri, J. und T. Haltia.** 1999. Expression and mutagenesis of ZntA, a zinc-transporting P-type ATPase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**(42):14109-16.
- Outten, C. E. und T. V. O'Halloran.** 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**(5526):2488-92.
- Outten, C. E., F. W. Outten und T. V. O'Halloran.** 1999. DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**(53):37517-24.
- Palmgren, M. G. und K. B. Axelsen.** 1998. Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2):37-45.
- Patzer, S. I. und K. Hantke.** 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**(6):1199-210.
- Patzer, S. I. und K. Hantke.** 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(32):24321-32.
- Patzer, S. I. und K. Hantke.** 2001. Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**(16):4806-13.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown und R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**(4):575-608.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi und M. H. Saier, Jr.** 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **156**(1):1-8.
- Paulsen, I. T. und M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **156**(2):99-103.
- Peitzsch, N., G. Eberz und D. H. Nies.** 1998. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl Environ Microbiol* **64**(2):453-8.
- Perrin, D. D. und A. E. Watt.** 1971. Complex formation of zinc and cadmium with glutathione. *Biochim Biophys Acta* **230**(1):96-104.
- Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch Microbiol* **100**:197-206.
- Pribyl, T.** 2001. Topologie des CzcCBA-Efflux-Komplexes aus *Ralstonia metallidurans*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Rabilloud, T., G. Carpentier und P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9**(6):288-91.
- Ramos, J. L., P. Duque, P. Godoy und A. Segura.** 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **180**(13):3323-9.
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra und B. P. Rosen.** 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2):652-6.

- Rensing, C., und G. Grass.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3):197-213.
- Rensing, C., M. Ghosh und B. P. Rosen.** 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* **181**(19):5891-7.
- Rensing, C., B. Mitra und B. P. Rosen.** 1997a. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26):14326-31.
- Rensing, C., T. Pribyl und D. H. Nies.** 1997b. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol* **179**(22):6871-9.
- Rensing, C., Y. Sun, B. Mitra und B. P. Rosen.** 1998. Pb(II)-translocating P-type ATPases. *J Biol Chem* **273**(49):32614-7.
- Riggle, P. J. und C. A. Kumamoto.** 2000. Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. *J Bacteriol* **182**(17):4899-905.
- Roberts, S. A., G. F. Wildner, G. Grass, A. Weichsel, A. Ambrus, C. Rensing, und W. R. Montfort.** 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem* **278**(34):31958-63.
- Rosen, B. P.** 1986. Recent advances in bacterial ion transport. *Annu Rev Microbiol* **40**:263-86.
- Rutherford, J. C., J. S. Cavet und N. J. Robinson.** 1999. Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J Biol Chem* **274**(36):25827-32.
- Saier, M. H., Jr.** 2000a. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2):354-411.
- Saier, M. H., Jr.** 2000b. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol* **182**(18):5029-35.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer und J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11**(5):841-7.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA-Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12):5463-67.
- Schmidt, T. und H. G. Schlegel.** 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* **176**(22):7045-54.
- Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting und P. Bork.** 2000. SMART, A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**(1):231-34.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork und C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11):5857.
- Schwuchow, T.** 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Sharma, R., C. Rensing, B. P. Rosen und B. Mitra.** 2000. The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(6):3873-8.

- Siddiqui, R. A., K. Benthin und H. G. Schlegel.** 1989. Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol* **171**(9):5071-8.
- Siddiqui, R. A., H. G. Schlegel und M. Meyer.** 1988. Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J Bacteriol* **170**(9):4188-93.
- Simon, R., U. Priefer und A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784-91.
- Skare, J. T., B. M. Ahmer, C. L. Seachord, R. P. Darveau und K. Postle.** 1993. Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked *in vivo* to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* **268**(22):16302-8.
- Smith, R. L., L. J. Thompson und M. E. Maguire.** 1995. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg²⁺ transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J Bacteriol* **177**(6):1233-8.
- Snively, M. D., J. B. Florer, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1989a. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: ²⁸Mg²⁺ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *J Bacteriol* **171**(9):4761-6.
- Snively, M. D., J. B. Florer, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1989b. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: expression of cloned genes for three distinct Mg²⁺ transport systems. *J Bacteriol* **171**(9):4752-60.
- Snively, M. D., S. A. Gravina, T. T. Cheung, C. G. Miller und M. E. Maguire.** 1991. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression. *J Biol Chem* **266**(2):824-9.
- Sofia, H. J., V. Burland, D. L. Daniels, G. Plunkett, 3rd und F. R. Blattner.** 1994. Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic Acids Res* **22**(13):2576-86.
- Solioz, M. und C. Vulpe.** 1996. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* **21**(7):237-41.
- Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, E. Birney, A. Bateman und R. Durbin.** 1998. Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucleic Acids Res* **26**(1):320-2.
- Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**(3):503-17.
- Spada, S., J. T. Pembroke und J. G. Wall.** 2002. Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *Escherichia coli* growth under stress conditions. *Extremophiles* **6**(4):301-8.
- Sturr, M. G., A. J. Ablooglu und T. A. Krulwich.** 1997. A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cations. *Gene* **188**(1):91-4.
- Taghavi, S., M. Mergeay und D. van der Lelie.** 1997. Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid* **37**(1):22-34.

- Tao, T., P. F. Grulich, L. M. Kucharski, R. L. Smith und M. E. Maguire.** 1998. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: biphasic magnesium and time dependence of the transcription of the *mgtA* and *mgtCB* loci. *Microbiology* **144** (3):655-64.
- Tao, T., M. D. Snavely, S. G. Farr und M. E. Maguire.** 1995. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg^{2+} in a manner similar to that of the *mgtB* P-type ATPase. *J Bacteriol* **177**(10):2654-62.
- Tartof, K. D. und C. A. Hobbs.** 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**:2.
- Thanabalu, T., C. Koronakis, C. Hughes und V. Koronakis.** 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* **17**(22):6487-6496.
- Thelwell, C., N. J. Robinson, und J. S. Turner-Cavet.** 1998. An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18):10728-33.
- Tibazarwa, C., S. Wuertz, M. Mergeay, L. Wyns und D. van Der Lelie.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol* **182**(5):1399-409.
- Tikhonova, E. B., Q. Wang und H. I. Zgurskaya.** 2002. Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **184**(23):6499-507.
- Tong, L., S. Nakashima, M. Shibasaka, M. Katsuhara und K. Kasamo.** 2002. A novel histidine-rich CPx-ATPase from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* related to multiple-heavy-metal cotolerance. *J Bacteriol* **184**(18):5027-35.
- Townsend, D. E., A. J. Esenwine, J. George, 3rd, D. Bross, M. E. Maguire und R. L. Smith.** 1995. Cloning of the *mgtE* Mg^{2+} transporter from *Providencia stuartii* and the distribution of *mgtE* in gram-negative and gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **177**(18):5350-4.
- Toyoshima, C., M. Nakasako, H. Nomura und H. Ogawa.** 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**(6787):647-55.
- Toyoshima, C. und H. Nomura.** 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **418**(6898):605-11.
- Tsai, K. J., Y. F. Lin, M. D. Wong, H. H. Yang, H. L. Fu und B. P. Rosen.** 2002. Membrane topology of the p1258 CadA Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-translocating P-type ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **34**(3):147-56.
- Tsai, K. J., K. P. Yoon und A. R. Lynn.** 1992. ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**(1):116-21.
- Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau und M. H. Saier, Jr.** 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(1):107-25.

- Tsivkovskii, R., J. F. Eisses, J. H. Kaplan und S. Lutsenko.** 2002. Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J Biol Chem* **277**(2):976-83.
- Turner, J. S., A. P. Morby, B. A. Whitton, A. Gupta und N. J. Robinson.** 1993. Construction of Zn²⁺/Cd²⁺ hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J Biol Chem* **268**(6):4494-8.
- Ullmann, A.** 1984. One-step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene* **29**(1-2):27-31.
- Vallee, B. L. und D. S. Auld.** 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**(24):5647-59.
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay und D. H. Nies.** 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* **23**(3):493-503.
- van Veen, H. W., T. Abee, G. J. Kortstee, W. N. Konings und A. J. Zehnder.** 1994. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**(7):1766-70.
- Vulpe, C., B. Levinson, S. Whitney, S. Packman und J. Gitschier.** 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* **3**(1):7-13.
- Wandersman, C. und P. Delepelaire.** 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12):4776-80.
- Weast, R. C., M. J. Astle und W. H. Beyer.** 1984. CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Florida, USA.
- Weber, K. und M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**(16):4406-12.
- Williams, L. E., J. K. Pittman und J. L. Hall.** 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta* **1465**(1-2):104-26.
- Worlock, A. J. und R. L. Smith.** 2002. ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**(16):4369-73.
- Wunderli-Ye, H. und M. Solioz.** 2001. Purification and functional analysis of the copper ATPase CopA of *Enterococcus hirae*. *Biochem Biophys Res Commun* **280**(3):713-9.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains:nucleotide sequence of M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1):103-19.
- Zeng, Q., C. Stalhandske, M. C. Anderson, R. A. Scott und A. O. Summers.** 1998. The core metal-recognition domain of MerR. *Biochemistry* **37**(45):15885-95.
- Zgurskaya, H. I., und H. Nikaido.** 1999. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13):7190-5.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 2000a. Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**(15):4264-7.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 2000b. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* **37**(2):219-25.

Konvertierungstabelle

Genbezeichnung	August 2002 ^{a)}		Juli 2003	
	Gennummer	<i>contig</i>	Gennummer	<i>contig</i>
<i>zntA</i>	4646	649	7074	374
<i>cadA</i>	6917	691	8357	375
Gen6854	6854	691	8735	375
<i>pbrR</i>	---	---	6436	373
Gen4094	---	---	4094	368
Gen4217	---	---	4217	369
Gen8606	---	---	8606	373
Gen8729	---	---	8729	375
Gen9377	---	---	9377	375
Gen9437	---	---	9437	375
Zink-induzier- bares RND-Gen				
Gen4596	4596	647	6563	373
chromosomale CDF-Homologe				
Gen38	38	706	7456	374
Gen76	76	708	9480	375

a) Daten vom August 2002 sind nicht mehr auf http://www.genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html zugänglich

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. H. Nies. Ich danke ihm für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Bearbeitung dieses Themas, für die anregenden Diskussionen, die konstruktive Kritik sowie der Möglichkeit diese Arbeit in seiner Gruppe durchzuführen, außerdem für das stete Bemühen für all seine Doktoranden eine ausreichende Finanzierung während der Promotionsphase zu ermöglichen.

Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen danke ich für die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten an seinem Institut durchzuführen sowie für die kritischen Diskussionen meiner Ergebnisse in unseren Montagsseminaren.

Diese Arbeit wurde unter anderem im Rahmen des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Bei Gregor, der mich ganz am Anfang mit der Arbeit im Labor vertraut gemacht hat, Ede, Sylvia, Susi, Monique und Annett möchte ich mich für manche anregende wissenschaftliche Diskussion sowie freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Ede möchte ich auch „in Erinnerung an die alte Zeiten in der 314“ für die vielen aufmunternden Worte und ein immer offenes Ohr bei auftauchenden Problemen danken.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. H. Nies (u.a. Martina, Tanja, Thomas, Conny, Grit S., Kerstin, Nadine, Judith, Cindy, Doreen und Grit R.) danke ich für das angenehme Arbeitsklima, hilfreiche Anregungen und die Etablierung verschiedener Methoden, auf die ich zurückgreifen konnte.

Grit, danke für die Hilfe bei der Reinigung des Großansatzes von CzCA.

Bei meinen Freunden (insbesondere bei Claudia, Winni, Steffen, Steffi, Peggy, Andreas, Silke) möchte ich mich für die moralische Unterstützung und den privaten Ausgleich in dieser Zeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester Susann die stets für mich da waren und das Wissen, dass ich mich immer auf meine Familie verlassen kann.

Lebenslauf

Name: Antje Legatzki
Geburtsdatum: 05.03.1975
Geburtsort: Brehna
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1981-07/1983 Helene-Lange-Schule Bitterfeld
09/1983-07/1990 Comenius-Oberschule Bitterfeld
Klasse mit erweitertem Russisch-Unterricht
09/1990-06/1993 Erweiterte Oberschule in Bitterfeld
Abschluss: Abitur

Studium:

10/1993-01/1999 Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
10/1997-12/1997 Diplomprüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Genetik,
Biochemie und Immunologie
01/1998-01/1999 Diplomarbeit zum Thema: „Einfluss der starken oder schwachen
Expression der *czc*-Determinante auf die Schwermetallresistenz
in *Alcaligenes eutrophus* CH34“
Abschluss als Diplom-Biologin (Note: sehr gut)

seit 01/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe
Prof. Dr. D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie im
Fachbereich Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Halle, den 18.9.2003

Antje Legatzki