

Das Kupfer-transportierende CusCFBA-Efflux-System
aus *Escherichia coli*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Sylvia Franke

geboren am 05. Juni 1975 in Rochlitz

Gutachter:

1. Prof. Dietrich H. Nies (MLU Halle-Wittenberg)
2. Prof. Christopher Rensing (University of Arizona, Tucson, AZ)
3. Prof. Dierk Scheel (IPB Halle / Saale)

Halle/Saale, 17. Dezember 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004509

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004509>]

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	5
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	5
2.2. Kultivierungsbedingungen	9
2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien	9
2.2.2. Nährmedien und Zusätze für Hefen	11
2.2.3. Anzucht, Induktion und Zellernte von <i>E. coli</i>	12
2.2.4. Stammhaltung	13
2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	13
2.3.1. Isolierung von DNA	13
2.3.1.1. Isolation von Gesamt-DNA nach Marmur	13
2.3.1.2. Mikroplasmidpräparation	14
2.3.1.3. Miniplasmidisolierung	14
2.3.1.4. Plasmidisolierung mittels <i>Spin</i> Säulen	15
2.3.1.5. Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen	15
2.3.2. DNA-Techniken	16
2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	16
2.3.2.2. DNA-Größenstandard	16
2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung	16
2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	16
2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA	17
2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	17
2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten	17
2.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	18
2.3.4.1. Auswahl der Primer	18
2.3.4.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.3.4.3. <i>Quick-Change</i> TM <i>Site-Directed Mutagenesis</i> -PCR	25
2.3.4.4. <i>Overlap extension</i> PCR	26
2.3.4.5. Reinigung von PCR-Produkten	26
2.3.5. DNA-Transfer in <i>Escherichia coli</i> und Selektion rekombinanter Klone	26
2.3.5.1. Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	26
2.3.5.2. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	27
2.3.5.3. Selektion plasmidtragender <i>E. coli</i> - Klone	27
2.3.5.4. Inaktivierung chromosomaler Gene von <i>E. coli</i> mittels PCR-Produkten	28
2.3.5.5. Gentransfer mittels P1-Transduktion	28
2.3.6. DNA-Sequenzierung	29
2.3.6.1. Sequenzierung mit dem <i>SequiTherm EXCEL</i> TM II <i>Long-Read</i> TM DNA Sequencing Kit-ALF TM	29
2.3.6.2. Sequenzierung unter Verwendung des <i>dRhodamine Termination Cycle Sequencing</i> -Kits	30

Inhaltsverzeichnis

2.3.6.3. Das Sequenziergel	31
2.3.6.4. Auswertung der Sequenzdaten.....	31
2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	32
2.4.1. Herstellung der Sonden	32
2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards.....	32
2.4.3. DNA:DNA-Hybridisierung	32
2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA- <i>Blotting</i>	32
2.4.3.2. Hybridisierung	33
2.4.4. Chemilumineszenz-Nachweis	33
2.5. Zellwachstumsversuche.....	34
2.5.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien	34
2.5.1.1. Messung der Zelltrübung.....	34
2.5.1.2. Zellanzucht von <i>Escherichia coli</i> - Stämmen in Wachstumsversuchen	34
2.5.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegen Kupfer	35
2.6. Enzymologische Methoden	36
2.6.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	36
2.6.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte	36
2.6.1.2. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	36
2.6.2. Topologie-Untersuchung von Protein-Carboxytermini	37
2.6.2.1. Zellanzucht, Induktion, Zellernte.....	37
2.6.2.2. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	37
2.7. Proteinbiochemische Methoden	38
2.7.1. Protein-Expression und -Reinigung über das <i>IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System</i>	38
2.7.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	38
2.7.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt.....	38
2.7.1.3. Native Proteinreinigung über Chitin-Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins.....	39
2.7.2. Protein-Expression und -Reinigung über das <i>StrepTag II® Protein Purification System</i>	39
2.7.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	40
2.7.2.2. Vorbereitung des Zellpellets für die Proteinreinigung.....	40
2.7.2.4. Native Proteinreinigung mittels <i>StrepTactin</i> -Chromatographie.....	41
2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	41
2.7.3.1. Proteinbestimmung von Membranproteinen.....	41
2.7.3.2. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm.....	42
2.7.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford	42
2.7.4. Chloroform-Methanol-Fällung	43
2.7.5. Elektrophoretische Methoden.....	43
2.7.5.1. Probenvorbereitung	43
2.7.5.2. Protein Marker	43
2.7.5.3. Lineare SDS-PAGE.....	43
2.7.5.4. SDS-Tricin-PAGE	44
2.7.5.5. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot).....	45
2.7.5.6. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen CusF und CusA	46
2.7.5.7. Aufreinigung von Antikörpern.....	46
2.7.5.8. Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation auf PVDF-Membranen	46
2.7.5.9. <i>StrepTagII®</i> Detektionssystem	47
2.7.6. Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	47

Inhaltsverzeichnis

2.7.6.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	47
2.7.6.2. Silberfärbung	48
2.7.6.3. Trocknung von Polyacrylamid-Gelen	48
2.7.7. Sequenzierung von Proteinen	48
2.7.8. Kupferbestimmung mittels <i>inductively-coupled-plasma mass-spectrometry</i> (ICP-MS)	49
2.10. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen über das <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -System	49
2.10.1. Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cdc25H-Zellen	49
2.10.2. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cdc25H und Überprüfung auf Protein-Interaktionen	50
3. ERGEBNISSE	51
3.1. Alle Genprodukte der <i>cus</i> -Strukturgenregion sind notwendig für die <i>cus</i> -vermittelte Kupferresistenz	51
3.1.1. CusA allein ist nicht in der Lage Resistenz gegenüber Kupfer zu vermitteln	53
3.1.2. Alle Komponenten des Efflux-Komplexes sind für die <i>cus</i> -vermittelte Kupferresistenz in <i>E. coli</i> notwendig	54
3.1.3. Immunologischer Nachweis des zentralen Transportproteins CusA in <i>cus</i> -Deletionsmutanten	59
3.2. Funktionelle Analyse des zentralen Transportproteins CusA	61
3.2.1. Methioninreste M ₅₇₃ , M ₆₂₃ , M ₆₇₂ und M ₈₁₂ sind wichtig für die Funktion des CusA-Proteins	65
3.2.2. Aminosäurereste der Transmembran-Helix IV sind wichtig für die Funktion von CusA	69
3.3. Charakterisierung des neuartigen Proteins CusF	72
3.3.1. Der Carboxy-Terminus von CusF ist im Periplasma lokalisiert	72
3.3.2. Reinigung von CusF	73
3.3.2.1. Reinigung von CusF als Fusionsprotein mit Intein und Chitin-Binde-Domäne	73
3.3.2.2. Reinigung von CusF über das <i>StrepTag</i> TM II-System	74
3.3.3. Das <i>cusF</i> -Gen wird <i>in vivo</i> exprimiert	75
3.3.4. Die Deletion von <i>cusF</i> hat keinen Einfluss auf die Regulation der Expression des <i>cusCFBA</i> -Operon	76
3.3.5. CusF interagiert mit CusB und CusC <i>in vivo</i>	80
3.3.6. CusF bindet 1 Molekül Kupfer pro Molekül Protein	81
3.3.7. Einfluss konservierter Aminosäurereste auf die Funktion von CusF	82
3.3.7.1. Das <i>cusF</i> -Gen <i>in trans</i> ist in der Lage den <i>E. coli</i> Stamm EC933(Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusF</i>) partiell zu komplementieren	82
3.3.7.2. Identifikation funktionell wichtiger Aminosäuren in CusF	84
3.3.7.3. Eine Fünffach-Histidinmutante von CusF wird nicht mehr ins Periplasma transportiert	85
3.3.7.4. Mutation der Methionine M ₆₉ und M ₇₁ führt zum Funktionsverlust	87
3.3.7.5. Die konservierte Aminosäurereste D ₄₈ und F ₇₃ haben keinen Einfluss auf die Funktion von CusF	89
4. DISKUSSION	90
4.1. Kupferdetoxifikation über den CBA-Efflux-Komplex	90
4.2. CusA, ein Protein der <i>Resistance Nodulation Cell Division</i> (RND) <i>Family</i>	95
4.3. CusF ist ein neuartiges periplasmatisches Kupferbindeprotein	103
4.4. Modell der Kupfer- und Silberdetoxifikation in <i>Escherichia coli</i>	110
4.5. Ausblick	112

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	113
6. LITERATUR	115

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidestd.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CBD	Chitin-Binde-Domäne
cDNA	komplementäre Desoxiribonucleinsäure
Cm/Cam	Chloramphenicol
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy Spiro- {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7] decan }-4-yl) phenyl phosphate
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxyterminus, carboxylendständiger AS-Rest
CY5	Fluoresceinmarkierung
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat

Inhaltsverzeichnis

DTT	Dithioreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENDOR	<i>electron nuclear double resonance</i>
ESEEM	<i>electron spin-echo envelope modulation</i>
FRT	FLP <i>recognition target</i>
G	Guanin
h	Stunde
HABA	4-Hydroxybenzne-2-carboxylic acid
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthansulfonsäure
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IPTG	Isopropyl-(-D-thiogalactopyranosid
Kan/Km	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
LB	Luria-Bertani.Medium
LiOAc	Lithiumacetat
MFP	<i>membran fusions protein</i> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min	Minute
mind.	mindestens
nt	Nukleotide
NA	Nähragar
NaAc	Natriumacetat
NB	Nährbouillon
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OM	<i>Outer Membrane</i> (äußere Membran)
OMF	<i>outer membrane factor</i> (Proteinfamilie)
ONPG	o-Nitrophenyl-D-galactopyranosid
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	<i>periplasmic efflux protein</i> (Proteinfamilie)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)

Inhaltsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RND	<i>Resistance, Nodulation, Cell Division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rpr	<i>M 13 Reverse Primer</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TMH	Transmembran-Durchgang
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
-UL	ohne Uracil und Leucin
upr	<i>M 13 Universal Primer</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
VIS	<i>visible</i>
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

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

Viele Übergangselemente werden von den Organismen als Spurenelemente für Enzyme benötigt. Metalle wie Eisen, Kupfer, Zink, Nickel, Cobalt und Mangan sind für die meisten Zellen essentiell. In geringen Konzentrationen werden sie für verschiedene Enzyme benötigt, sind aber in höheren Konzentrationen toxisch (Nies, 1999).

Auf Grund seiner Redoxchemie ist Kupfer eines der wichtigsten Spurenelemente. Cu/Zn-haltige Superoxiddismutasen entgiften freie Radikale und schützen die Zellen so vor oxidativen Schäden (Gort *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2000; Hallewell *et al.*, 1985). In der Atmungskette ist Kupfer als redoxaktives Zentrum der Cytochrom c Oxidase und Cytochrom bo Oxidase (Speno *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1999) zu finden. Auch viele andere Enzyme, wie die Aminoxidasen (Cooper *et al.*, 1992; Cai und Klinman, 1994; Federico *et al.*, 1997), Lysyloxidasen (Kosonen *et al.*, 1997), Nitritreduktasen (Glockner *et al.*, 1993; Kobayashi und Shoun, 1995; Velasco *et al.*, 2001), Tyrosinasen (Huber *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 2000) und Multicopper-Oxidasen (Kim *et al.*, 2001; Huffman *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002) enthalten Kupfer im aktiven Zentrum.

Wichtig für die Kupferhomöostase ist das Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Efflux des Kupfers. In Säugern und Hefen erfolgt die Kupferaufnahme in die Zellen z.B. über den spezifischen Cu-Transporter, Crt (Pena *et al.*, 1998; Pena *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Zhou und Thiele, 2001; Lee *et al.*, 2002b; Riggio *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* konnte durch Expression einer cDNA-Bank aus *A. thaliana* der Defekt der Kupfertransporter Ctr1 und Ctr3 komplementiert werden. Dies führte zur Identifikation eines Membranproteins (COPT1), das als erster pflanzlicher Kupfertransporter der Crt-family nachgewiesen wurde (Kampfenkel *et al.*, 1995).

In *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass das *outer membrane* Protein OprC Kupfer-reguliert ist (Yoneyama und Nakae, 1996). In *Enterococcus hirae* wird Kupfer möglicherweise über die P-Typ-ATPase CopA aufgenommen (Wunderli-Ye und Solioz, 2001). In *Streptococcus pyogenes* konnte ein ABC-Transporter identifiziert werden, der eine multiple Spezifität gegenüber Metallionen aufweist (Janulczyk *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Lipoprotein Kupfer, Zink und Eisen bindet. Der Transport von Zink und Eisen konnte nachgewiesen werden (Janulczyk *et al.*, 1999). Wie die Kupferaufnahme in anderen Bakterien erfolgt, ist weiterhin unklar. Nachdem für *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden konnte, dass Kupfer auch über Eisenaufnahmesysteme in die Zelle

transportiert wird (Hassett *et al.*, 2000), ist es möglich, dass auch in Bakterien Kupfer unspezifisch über andere Transporter in die Zelle gelangt (Kim *et al.*, 2001; Grass *et al.*, 2002).

Da Kupfer in hohen Konzentrationen extrem toxisch für die Zellen ist (Pena *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002a), muss die intrazelluläre Kupferkonzentration reguliert werden. Im Laufe der Zeit haben sich deshalb verschiedene Resistenzmechanismen entwickelt. In Eukaryoten erfolgt die Kupferdetoxifikation über P-Typ-ATPasen (Solioz *et al.*, 1994; Dameron und Harrison, 1998; Harrison und Dameron, 1999; Pena *et al.*, 1999; Riggle und Kumamoto, 2000; Weissman *et al.*, 2000). Auch in *Enterococcus hirae* wird der Kupferhaushalt über das Zusammenspiel zweier P-Typ-ATPasen, CopA und CopB, reguliert (Odermatt *et al.*, 1994; Solioz und Odermatt, 1995; Bissig *et al.*, 2001). Die Regulation der Genexpression erfolgt über das Cu(I)-Chaperon CopZ und den Repressor CopY (Odermatt und Solioz, 1995; Strausak und Solioz, 1997; Cobine *et al.*, 1999; Wimmer *et al.*, 1999; Lu und Solioz, 2001; Cobine *et al.*, 2002). Während CopA möglicherweise für die Kupferaufnahme verantwortlich ist (Odermatt *et al.*, 1994; Wunderli-Ye und Solioz, 2001), transportiert CopB überschüssiges Kupfer aus den Zellen (Odermatt *et al.*, 1994; Solioz und Odermatt, 1995; Bissig *et al.*, 2001).

In *Escherichia coli* und *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* kommen Plasmide vor, die Resistenz gegenüber Kupfer vermitteln (Tetaz und Luke, 1983; Williams *et al.*, 1993). Die *cop*-Determinante des Plasmides pPT23D von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* enthält die Gene für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem, *copRS*, sowie vier Strukturgene, *copABCD*, (Bender und Cooksey, 1987; Mellano und Cooksey, 1988; Mills *et al.*, 1993). CopA und CopC sind im Periplasma lokalisiert und binden Kupfer, während es sich bei CopB und CopD um Membranproteine handelt (Cha und Cooksey, 1991). Dabei ist CopB in der *outer membrane* lokalisiert (Cha und Cooksey, 1991). Aber auch chromosomal kodierte Kupferresistenzdeterminanten konnten in verschiedenen Stämmen von *Pseudomonas* identifiziert werden (Lim und Cooksey, 1993; Vargas *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996).

Auf dem Plasmid pRJ1004 von *E. coli* (Tetaz und Luke, 1983) befindet sich die *pco*-Determinante, die für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem PcoRS, die periplasmatische Multicopper-Oxidase PcoA, die beiden periplasmatischen Kupferbindepoteinen PcoC und PcoE sowie die membrangebundenen Proteinen PcoB (äußere Membran) und PcoD (Cytoplasmamembran) (Brown *et al.*, 1995; Huffman *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002c) kodiert. Während *pcoABCD* von PcoRS reguliert wird, konnte für *pcoE* eine Regulation über vom Chromosom kodierte Gene gefunden werden. (Brown *et al.*,

1995). Von Munson *et al.*, (2000) konnten auf dem Chromosom von *Escherichia coli* die Gene für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem, identifiziert werden, deren Genprodukte CusRS die Expression des plasmidkodierten *pcoE* regulieren. In Gegenrichtung zu *cusRS* konnte ein Operon *cusCFBA* (im *E. coli*-Genomprojekt als *ylcBCD-ybdE* bezeichnet (Blattner *et al.*, 1997)) identifiziert werden, dessen Expression ebenfalls Kupfer-reguliert ist (Munson *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2001). Eigene Untersuchungen einer Deletion von *cusA* in *E. coli* (Wildtyp) zeigten jedoch keine Differenz zum Wildtyp im Resistenzverhalten gegenüber Kupfer, doch eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Silber (Franke *et al.*, 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass *cusCFBA* neben Kupfer auch von Silber reguliert wird (Franke *et al.*, 2001). Unter anaeroben Bedingungen ist eine erhöhte Kupfersensitivität in Stämmen zu beobachten, bei denen eine Deletion des *cus* Systems vorliegt (Outten *et al.*, 2001).

Unter aeroben Bedingungen hatte eine Deletion des *cus* Systems keinen Einfluss auf die Kupfertoleranz (Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001a). Wurde *cus* aber zusätzlich zu *cueO* deletiert, hatte das eine deutliche Erhöhung der Kupfersensitivität zur Folge (Grass und Rensing, 2001a). Die Multicopper-Oxidase CueO schützt wahrscheinlich periplasmatische Proteine vor einer durch Kupfer hervorgerufenen Schädigung (Grass und Rensing, 2001b). Die Expression von *cueO* wird von dem MerR-ähnlichen Repressor CueR reguliert (Outten *et al.*, 2000). Ebenso erfolgt die Regulation der chromosomal kodierte P-Typ-ATPase CopA über CueR (Outten *et al.*, 2000; Petersen und Moller, 2000; Stoyanov *et al.*, 2001). Dabei erfolgt die Synthese von CopA Kupfer- und Silber-abhängig (Rensing *et al.*, 2000). Für CopA konnte der Transport von Cu(I) in *inside out* Vesikeln nachgewiesen werden so dass seine Rolle in der Kupferhomöostase von *Escherichia coli* wahrscheinlich der Transport von Cu(I) aus dem Cytoplasma in den periplasmatischen Raum ist. Die Deletion von *copA* führt zu einer Verminderung der Kupfertoleranz in *E. coli* (Rensing *et al.*, 2000).

Die *cus*-Determinante von *Escherichia coli* (Abb. 1) besteht aus sechs Genen, die in zwei Transkripten, *cusRS* und *cusCFBA* abgelesen werden (Franke *et al.*, 2001). Die Gene *cusRS* kodieren für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem, mit der membrangebundenen Histidin-Sensor-Kinase CusS und dem Response-Regulator CusR (Munson *et al.*, 2000). In Gegenrichtung befindet sich das *cusCFBA*-Operon, das für die Proteine eines CBA-Efflux-Komplexes kodiert.

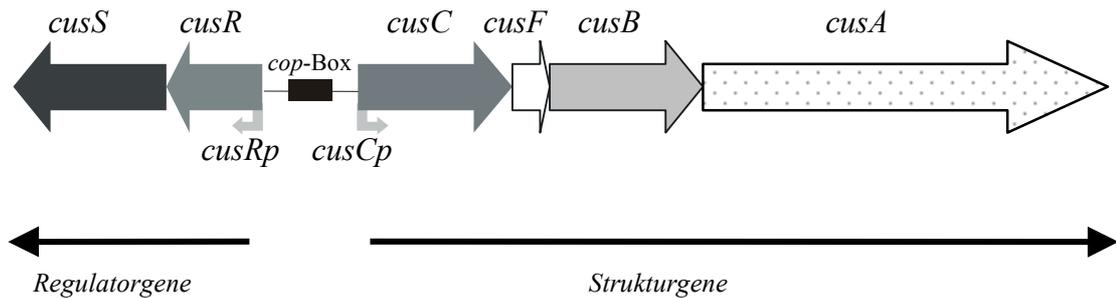


Abb. 1: Struktur der *cus*-Determinante von *Escherichia coli*.

Physikalische Karte der *cus*-Determinante. Die Gene und ihre Transkriptionsrichtung sind durch dicke Pfeile dargestellt. Dünne Pfeile unterhalb der Gene kennzeichnen die Transkripte, die von den Promotoren *cusRp* und *cusCp* aus abgelesen werden. Zwischen den beiden Promotoren befindet sich ein Sequenzmotiv mit großer Homologie zu der für die *cop*-Determinante beschriebenen *cop*-Box, für die Bindung des Response Regulators an die DNA.

CusA ist ein Vertreter der *resistance nodulation cell division* (RND) *superfamily* [T.C. 2.A.6.1.1(Saier, 2000)] von Protonen getriebenen Transportern der Cytoplasmamembran (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999). Topologie-Analysen von Vertretern der RND-Proteine deuten das Vorhandensein von 12 Transmembran-Durchgängen (TMH) sowie von zwei großen periplasmatischen hydrophilen Domänen zwischen den TMH I und II sowie TMH VII und VIII an (Goldberg *et al.*, 1999; Gotoh *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 1999; Fujihira *et al.*, 2002). CusB ist ein Vertreter der *membrane fusion proteins* (MFP) (Saier *et al.*, 1994), auch als *periplasmic efflux proteins* (PEPs) bezeichnet (Johnson und Church, 1999) und stellt im Modell des CBA-Efflux-Komplexes die Verbindung zwischen dem in der Cytoplasmamembran lokalisierten RND-Protein, CusA, und dem *outer membrane factor* (OMF) CusC her (Pribyl, 2001; Johnson und Church, 1999). Das mit CusC verwandte Protein TolC bildet als Homotrimer eine Pore in der Außenmembran. Auf Grund seiner Verwandtschaft kann für CusC eine ähnliche Struktur angenommen werden, so dass von CusA übernommene Kupferionen durch die CusC-Pore ins Außenmedium diffundieren (Andersen *et al.*, 2000; Koronakis *et al.*, 2000). Zwischen den Genen *cusC* und *cusB* des *cusCFBA*-Operon befindet sich ein zusätzliches Gen, *cusF* [im *E. coli*-Genomprojekt als *ylcC* bezeichnet (Blattner *et al.*, 1997)]. Die Funktion von CusF war bisher unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des CusCBA-Kupfer-Efflux-Komplexes mittels Gendeletion und Mutagenese. Für CusA sollten über gerichtete Mutagenese für die Funktion wichtige Aminosäurereste identifiziert werden. Ferner wurde das CusF-Protein charakterisiert, und seine Bedeutung für die Kupferresistenz ermittelt.

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>Escherichia coli</i>			
JM83		<i>ara</i> , $\Delta(lac - proAB)$, <i>rpsL</i> (str ^r), <i>thi</i> , $\Phi 80$, <i>lacZ</i> Δ M15	Vieira und Messing, 1982
XL1-Blue MRF ^r kan		$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMRmrr)$ 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^r Z Δ M15, Tn5 (kan ^r)]	Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue		<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^r Z Δ M15, Tn10 (tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987, Stratagene GmbH, Heidelberg
XL2-Blue		<i>recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44, relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^r Z Δ M15 Tn10 (tet ^r) <i>cam</i> ^r]	Jerpseth <i>et al.</i> , 1993, Amy Stratagene GmbH, Heidelberg
ER 2566		F λ <i>fhuA2</i> [lon] <i>ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> $\Delta(mcrC-mrr)$ 114::IS10 R(<i>mcr-73::miniTn10—TetS</i>)2 R(<i>zgb-210::Tn10</i>) (TetS) <i>endA1</i> [dcm]; T7-Expressionsstamm	NewEngland BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
CC118	pGP1-2	<i>araD139</i> , (<i>ara-leu</i>)7697, <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>rpsE</i> , <i>phoA20</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>thi</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), Stamm zur T7-Expression von Reportergenfusionen (kan ^r)	Manoil und Beckwith, 1985; Tabor und Richardson, 1985
BL21	pLys3	F ⁻ <i>dcm</i> , <i>omp</i> , <i>hsdS</i> , (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), lon ⁻ , <i>gal</i> λ , DE3, [pLysS, Cam ^r], Überexpressionsstamm für Strep-tag II [®] -System	Stratagene GmbH, Heidelberg

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 1:

DH5 α F'		F', Φ 80, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , λ^-	NewEngland BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
BW25113	pKD46	<i>lacI^d</i> , <i>rrnB</i> _{T14} , Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} , <i>hsdR514</i> , Δ <i>araBA-D</i> _{AH33} , Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} Red disruption system (γ , β , <i>exo</i> unter Kontrolle von <i>araBp</i>), <i>amp^r</i>	Datsenko und Wanner, 2000
BT340	pCP20	hitzeinduzierbare FLP Synthese, <i>amp^r</i>	Datsenko und Wanner, 2000
W3110		<i>E. coli</i> Wildtyp	
GG161		Δ <i>lacZYA::km</i>	Grass <i>et al.</i> , 2001
GR1		Δ <i>cueO::cm</i>	Grass und Rensing, 2001a
GR10		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusCFBA::cm</i>	Grass und Rensing, 2001a
GR15		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusA::cm</i>	Grass und Rensing, 2001a
EC931		BW25113 Δ <i>cusF::cm</i>	diese Arbeit
EC993		BW25113 Δ <i>cusB::cm</i>	diese Arbeit
EC994		BW25113 Δ <i>cusC::cm</i>	diese Arbeit
EC933		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusF</i>	diese Arbeit
EC950		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusB</i>	diese Arbeit
EC951		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusC</i>	diese Arbeit
EC952		Δ <i>cusF</i>	diese Arbeit
ECA009		Δ <i>cusA</i> Δ <i>lacZYA::km</i>	diese Arbeit
ECA010		Δ <i>cusF</i> Δ <i>lacZYA::km</i>	diese Arbeit
ECA011		Δ <i>cueO</i> Δ <i>lacZYA::km</i>	diese Arbeit
ECA013		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusA</i> Δ <i>lacZYA::km</i>	diese Arbeit
ECA015		Δ <i>cueO</i> Δ <i>cusF</i> Δ <i>lacZYA::km</i>	diese Arbeit
	pGEM [®] -T Easy	<i>amp^r</i> , <i>lacPOZ'</i> , zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, WI-USA
	pKD3	Derivat von pANTSy mit FRT-flankierter Chloramphenicol-Kassette (<i>cat</i>), <i>amp^r</i>	Datsenko und Wanner, 2000
	pECD595	Φ (<i>cusCp-lacZ</i>) in pKO3	Franke <i>et al.</i> , 2001

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 1:

pASK-IBA3	Expressionsvektor mit <i>Strep</i> -Tag II [®] (C-terminal) unter Kontrolle von <i>tetAp</i> , (amp ^r)	IBA-GmbH, Göttingen
pECD735	<i>cusF</i> als <i>EcoRI/PstI</i> -Fragment in pASK-IBA3	diese Arbeit
pECD736	pECD735 CusF M ₆₉ I/M ₇₁ I	diese Arbeit
pECD737	pECD735 CusF H ₂₅ R/H ₂₆ R/H ₂₇ R/H ₅₇ R/H ₅₈ R	diese Arbeit
pECD762	pECD735 CusF F ₇₃ Y	diese Arbeit
pECD763	pECD735 CusF H ₅₇ Q/H ₅₈ Q	diese Arbeit
pECD764	pECD735 CusF H ₂₅ Q/H ₂₆ Q/H ₂₇ Q	diese Arbeit
pECD765	pECD735 CusF D ₄₈ N	diese Arbeit
pECD766	pECD735 CusF H ₅₇ R/H ₅₈ R	diese Arbeit
pECD775	pECD735 CusF M ₆₉ I	diese Arbeit
pECD776	pECD735 CusF M ₇₁ I	diese Arbeit
pECD738	<i>cusA</i> als <i>EcoRI/PstI</i> -Fragment in pASK-IBA3	diese Arbeit
pECD739	pECD738 CusA M ₅₇₃ I	diese Arbeit
pECD740	pECD738 CusA M ₆₂₃ I	diese Arbeit
pECD741	pECD738 CusA M ₆₄₀ I	diese Arbeit
pECD742	pECD738 CusA M ₆₇₂ I	diese Arbeit
pECD743	pECD738 CusA M ₈₁₂ I	diese Arbeit
pECD744	pECD738 CusA M ₇₃₈ I	diese Arbeit
pECD745	pECD738 CusA M ₇₅₅ I	diese Arbeit
pECD746	pECD738 CusA M ₇₉₂ I	diese Arbeit
pECD747	pECD738 CusA M ₈₃₃ I	diese Arbeit
pECD748	pECD738 CusA M ₈₇₅ I/M ₈₇₈ I/M ₈₈₁ I	diese Arbeit
pECD767	pECD738 CusA A ₃₉₉ D	diese Arbeit
pECD768	pECD738 CusA D ₄₀₅ N	diese Arbeit
pECD769	pECD738 CusA E ₄₁₂ Q	diese Arbeit
pECD770	pECD738 CusA E ₄₁₂ D	diese Arbeit
pECD772	<i>cusCFBA</i> als <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment in pASK-IBA3	diese Arbeit
pTYB2	amp ^r , Expressionsvektor für Fusions-Proteine mit C-terminalem Intein mit CBD	New England BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
pECD771	<i>cusF</i> als <i>NdeI/blunt end</i> - Fragment in pTYB2	diese Arbeit
pSOS	<i>E.coli</i> -Hefe-Shuttle-Vektor, amp ^r , ColE1, 2μ ori, LEU2, P _{ADH1} , hSOS'	Stratagene GmbH, Heidelberg
pSOS-MAFB	MAFB, Positiv-Kontrolle in pSOS	Stratagene GmbH, Heidelberg

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 1:

pSOS -Coll	Murine 72 kDa TypIV Collagenase (aa 148-357) in pSOS	Stratagene GmbH, Heidelberg
pECD752	<i>cusF</i> ohne Leader (ab Aminosäure 23) als <i>BamHI/SalI</i> in pSOS	diese Arbeit
pMYR	<i>E.coli</i> -Hefe-Shuttle-Vektor, <i>cam^r</i> , <i>ColE1</i> , 2 μ ori, URA3, P _{GAL1} , Myristylations-Signal	Stratagene GmbH, Heidelberg
pMyr – MAFB	MAFB, Positiv-Kontrolle in pMyr	Stratagene GmbH, Heidelberg
pMyr – Lamin C	Humanes Lamin C (aa 67-230) in pMyr	Stratagene GmbH, Heidelberg
pECD750	<i>cusB</i> ohne Signalsequenz (ab Aminosäure 29) als <i>EcoRI/XhoI</i> in pSOS	diese Arbeit
pECD751	<i>cusC</i> ohne Signalsequenz (ab Aminosäure 21) als <i>EcoRI/XhoI</i> in pSOS	diese Arbeit
pECD637	pGEM [®] - T Easy-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>phoA</i> unter Kontrolle von p _{T7} (<i>amp^r</i> , <i>kan^r</i>),	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
pECD618	' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> ', verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD637 (<i>amp^r</i>), cytoplasmatische PhoA-Kontrolle, pGEM [®] -T Easy-Derivat	Pribyl, 2001
pECD619	<i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> ', verkürztes <i>blaM</i> mit Signalsequenz in pECD637 (<i>amp^r</i>), periplasmatische PhoA-Kontrolle, pGEM [®] -T Easy-Derivat	Pribyl, 2001
pECD749	<i>cusF</i> als <i>KpnI/XbaI</i> Fragment in pECD637	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cdc25H	Mat α , <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺</i>	Stratagene, Heidelberg

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}

Diese Festmedien dienten 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 wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli* - Stämmen.

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

20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
0.5 g NaCl
10 ml 0.25 M KCl
NaOH ad pH 7.0
Ad 1 l H₂O_{bidest}

SOB-Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* zur Gewinnung elektrokompetenter Zellen eingesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in SOC-Medium aufgenommen Um dieses zu erhalten, wurden MgSO₄ (5 µl 1 M MgSO₄ / ml) und Glucose (20 µl 1 M Glucose / ml) zu SOB-Medium zugegeben.

E) Spurenelementlösung SL6 (10 fach) 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}

F) 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}

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Für die Anzucht von *E. coli* wurden 10 g / l Hefeextrakt und 20 g / l Glycerin als Kohlenstoffquelle zugesetzt und mit autoklaviert.

G) Medienzusätze

Schwermetallsalze

Die Schwermetallsalze CuCl₂ und CuSO₄ lagen als 1 M wässrige Stammlösungen vor. Die Stammlösung wurde im sterilem Medium auf die beschriebenen Endkonzentrationen 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.

2. Material und Methoden

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
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. Nährmedien und Zusätze für Hefen (Stratagene, Heidelberg)

A) 10 x Dropout-Lösung

300 mg L-Isoleucin	200 mg L-Methionin
1500 mg L-Valin	500 mg L-Phenylalanin
200 mg L-Adenin-Hemisulfat	2000 mg L-Threonin
500 mg L-Arginin-HCl	500 mg L-Tyrosin
200 mg L-Histidin HCl Monohydrat	1000 mg L-Glutamat
500 mg L-Lysin HCl	1000 mg L-Aspartat

400 mg L-Serin

ad 1 l H₂O_{bidest}

Anschließend wurde die Lösung filtersterilisiert und bei 4°C gelagert (bis 1 Jahr lang stabil).

B) YPAD-Medium-Agar

10 g Hefeextrakt
20 g Bacto[®]-Pepton
20 g Glucose
20 g Bacto[®]-Agar
40 mg Adenin-Sulfat

ad 1 l H₂O_{bidest}

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

Für YPAD-Flüssigmedium wurde Medium ohne Bacto[®]-Agar zubereitet.

C) Synthetisches Glucose Minimal-Medium [SD/Glucose (-UL)]

- 1.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 5 g Ammonium-Sulfat
- 20 g Glucose
- ad 900 ml H₂O_{bidest}

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

D) Synthetisches Galaktose Minimal-Medium [SD/Galaktose (-UL)]

- 1.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 5 g Ammonium-Sulfat
- 20 g Galaktose
- 10 g Raffinose
- ad 900 ml H₂O_{bidest}

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

Zur Herstellung von *SD Dropout*-Agar-Platten wurden dem Medium 17 g Bacto-Agar zugesetzt. Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *S. cerevisiae*-Stämmen mit den Plasmiden pSOS und pMyr (und deren Derivaten).

2.2.3. Anzucht, Induktion und Zellernte von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in NB- oder LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben, wobei ebenfalls auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C/37°C (Brutraum) in fast waagrecht 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) gemessen. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30°C/37°C (im Brutraum) für 12-24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation in einer Hettich-Zentrifuge (Universal 30 RF, Tuttlingen) bei 4°C und 5000 rpm, in der Sigma-Laborzentrifuge bei 4°C und 12000 rpm oder durch 30 s Zentrifugation in der Sigma Tischzentrifuge.

2.2.4. Stammhaltung

E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar- bzw. NA-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum entsprechender Konzentration kultiviert. Die Stämme wurden alle vier Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 30°C bzw. 37°C wurden alle Platten im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Um einer Kontamination der Stämme vorzubeugen, wurden alle Stämme mit neu konstruierten Plasmiden sowie die Stämme, mit denen ständig gearbeitet wurde, in Glycerinkulturen bei -80°C aufbewahrt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Glycerin [Endkonzentration 20 % (v/v)] versetzt.

2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.3.1. Isolierung von DNA

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

2.3.1.1. 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 abzentrifugiert (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, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] verblieb der Ansatz für 15 min bei 30°C im Wasserbad. Es wurden 1.25 ml Saccharose-Lösung, 0.1 ml Proteinase-K-Lösung [2.5 g/l Proteinase K, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] und 1.25 ml SDS-Lösung [15 g/l] zugegeben, für 3 h bei 37°C und anschließend 15 min bei 55°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 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 4200 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 4200 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 (4500 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 4500 rpm und 4°C für 30 min 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 12000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Laborzentrifugen) 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 *Escherichia coli*, die als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt wurde.

2.3.1.2. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnten 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 Stop-Mix [40 % Glycerin (v/v), 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2TM, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) für 10 s und Zentrifugation für 3 min in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden ca. 25 µl des wässrigen Überstandes im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.3.1.3. Miniplasmidisolation (verändert nach Sambrook *et al.*, 1989)

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

1.5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Lösung I [50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA] vollständig resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung II [0.2 M NaOH, 10 g/l SDS]. Es wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III [3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure] zugesetzt, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation (Sigma

112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) für 10 min bei 12000 rpm an. Das weißliche Präzipitat wurde mittels sterilem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues steriles 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol. Nach dem Mischen wurde für 1 h bei 12000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, im Vakuum (Speed Vac SVC 100, Savant) getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem H₂O_{bidest} [mit 0.1 g RNaseA/I] aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.1.4. 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 12000 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 *CONCERT™ Rapid Plasmid Purification Miniprep System* (GIBCO BRL, Eggenstein) entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

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

Diese Plasmidisolation beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Zellen und der DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule. Es handelt sich hierbei um eine Methode, mit der hochreine, kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA gewonnen werden konnte. Die DNA wurde auf eine Anionen-Austauscher-Säule (QIAGEN GmbH, Hilden) gegeben und anschließend mit 1.25 mM NaCl eluiert. Diese Methode vermeidet die Verwendung von Phenol. Mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Mini Kit* konnten kleinere Mengen von *low-copy* Plasmiden zur Analyse gewonnen werden. Es wurden 10 ml *E. coli*-Übernachtskultur aufgearbeitet, und die Lösungen nach Anweisung des QIAGEN-Protokoll für Mini-präparation 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 Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-10 μ l (analytische Gele) bzw. 20-50 μ l (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen), bis die gesuchten Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Sichtbarmachung 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 (elf Fragmente, deren etwaige Größen bei 4000, 2500, 1700, 1300, 800, 660, 600, 510, 375, 230 und 140 bp liegen), dem *Gene Ruler* 100 bp DNA *LadderPlus* (MBI) (14 Fragmente der Größen 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp) und dem *Gene Ruler* 1 kb DNA *Ladder* (MBI) (14 Fragmente der Größen 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp).

2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

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

2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (analytisch) bis 100 μ l (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0.1 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10 fach 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.

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 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (niedrige Salzkonzentration).

Es wurde nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers vorgegangen und die DNA mit 50 μl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 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 Protokoll 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 Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:5. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 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 wurde 0.5 μl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison, Wi) verwendet. Die Ligation wurden über Nacht (pGEM[®]-T Easy) bzw. für 2-3 Tage (alle anderen Vektoren) bei 16°C inkubiert.

2.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.4.1. Auswahl der Primer

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

Die Oligonukleotid-Primer (Tabelle 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

Primer-Name / Sequenz 5'->3' _{Position}		Beschreibung
Orientierung		
<u>Deletionsprimer</u>		
Δ <i>cusB</i> _EC- P2	← ₅₄₃₃ CCAGAAATATTGGCTTCGGAATCAATCAGG AACAGGCCGCTCCATGGTCCATATGAATATCCT CC	Deletionsprimer für <i>cusB</i> mit ca. 40 Basen Übereinstimmung <i>down-stream</i> <i>cusB</i> und ca. 20 Basen, die in pKD3 binden
Δ <i>cusB</i> _EC- P1	→ ₄₂₆₉ CGCTTATTATCGGCAGCATGATCGCGGGCG GTATTATTTCTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Deletionsprimer für <i>cusB</i> mit ca. 40 Basen Übereinstimmung <i>up-stream</i> <i>cusB</i> und ca. 20 Basen, die in pKD3 binden
Δ <i>cusC</i> _EC- P2	← ₃₇₄₀ CCAAGTGCGGTATACAAAGAAATTTTCGTTA ACCTGACGGGCCCATGGTCCATATGAATATCCT CC	Deletionsprimer für <i>cusC</i> mit ca. 40 Basen Übereinstimmung <i>down-stream</i> <i>cusC</i> und ca. 20 Basen, die in pKD3 binden
Δ <i>cusC</i> _EC- P1	→ ₂₃₉₃ TTCTGCCATTTTGTGTGGCCCTTGCGCTAAC CGTTGTTTCAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Deletionsprimer für <i>cusC</i> mit ca. 40 Basen Übereinstimmung <i>up-stream</i> <i>cusC</i> und ca. 20 Basen, die in pKD3 binden

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 3:

$\Delta cusF_{EC}$ - P2	← 4250 TAAACCTGGGTTACTGGCTGACTTTAATAT CCTGTAATAACCATGGTCCATATGAATATCCTCC	Deletionsprimer für <i>cusF</i> mit ca. 40 Basen Übereinstimmung <i>down-</i> <i>stream cusF</i> und ca. 20 Basen, die in pKD3 binden
$\Delta cusF_{EC}$ - P1	→ 3871 TATTTAGAGTATGACTTTTAACTCCAGGAG AGAATAAATGGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Deletionsprimer für <i>cusF</i> mit ca. 40 Basen Übereinstimmung <i>up-</i> <i>stream cusF</i> und ca. 20 Basen, die in pKD3 binden
<u>Topologie-Primer</u>		
Topo <i>cusF</i> - <i>KpnI</i>	→ TTTGGTACCAGGAGAGAATAA ₃₉₀₈ ATGAAAAA AGCA	direkt <i>upstream</i> von <i>cusF</i> inklusive RBS (fett)
Topo <i>cusF</i> - <i>XbaI</i>	← CCTTCTAGA ₄₂₃₇ CTGGCTGACTTTAATATCCTG TAATAAAGAA	3'-Bereich von <i>cusF</i> ohne Stop-Codon
<u>Primer für Two-Hybrid System</u>		
YTH <i>cusF</i> - <i>SalI</i>	← AAAGTCGAC ₄₃₁₂ CGCAGAAATAATACCGCCCG	direkt stromabwärts von <i>cusF</i>
YTH <i>cusF</i> - <i>BamHI</i>	→ ATGGGATCC ₃₉₇₂ CTAACGAACATCATCATGAAA CCATG	<i>cusF</i> (ab Aminosäure 23) führt zu N-terminalen- Fusion mit Fusions- partner
YTH <i>cusB</i> - <i>EcoRI</i>	→ GCAGAATTC ₄₃₄₀ GAACCGCCTGCAGAAAAAAC G	<i>cusB</i> (ab Aminosäure 29) führt zu N-terminaler- Fusion mit Fusions- partner
YTH <i>cusB</i> - <i>XhoI</i>	← AACCTCGAG ₅₅₂₁ CCACCGAGCGACGAATAATC C	direkt stromabwärts von <i>cusB</i>
YTH <i>cusC</i> - <i>EcoRI</i>	→ TGTGAATTC ₂₄₃₇ GCACCGGATTATCAGCGTCC	<i>cusC</i> (ab Aminosäure 21) führt zu N-terminaler- Fusion mit Fusions- partner
YTH <i>cusC</i> - <i>XhoI</i>	← TGGCTCGAG ₃₈₀₀ CGAACGCAGACGCAGCACTA	direkt stromabwärts von <i>cusC</i>

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 3:

<u>Überexpressionsprimer und Primer für die <i>in trans</i> Komplementation</u>		
<i>cusF-NdeI</i>	→ GAACATATG ₃₉₁₁ AAAAAAGCACTGCAAGTCGC AATG	fügt direkt am ATG von <i>cusF</i> eine <i>NdeI</i> -Schnittstelle ein
<i>cusF-blunt</i>	← ₄₂₃₇ CTGGCTGACTTTAATATCCTGTAATAAAGA AAGG	3'-Bereich von <i>cusF</i> ohne Stop-Codon (für <i>blunt-end</i> -Klonierung)
<i>cusF-N-EcoRI</i>	→ AGAGAATTC ₃₉₀₈ ATGAAAAAAGCACTGCAAGT CG	5'-codierender Bereich von <i>cusF</i> für Klonierung in pASK-IBA3
<i>cusF-C-PstI</i>	← CCTCTGCAG ₄₂₃₇ CTGGCTGACTTTAATATCCTG TAATAAA	3'-Bereich von <i>cusF</i> ohne Stop-Codon, für Klonierung in pASK-IBA3 ein
<i>cusA-N-EcoRI</i>	→ GAAGAATTC ₅₄₉₁ ATGATTGAATGGATTATTCGT CGCTCG	5'-codierender Bereich von <i>cusA</i> für Klonierung in pASK-IBA3
<i>cusA-C-PstI</i>	← CTGCTGCAG ₈₆₃₁ TTTCCGTACCCGATGTCGGTG	3'-Bereich von <i>cusA</i> ohne Stop-Codon, für Klonierung in pASK-IBA3 ein
<i>cusC-N-EcoRI</i>	→ ATGAATTC ₂₃₇₇ ATGTCTCCTTGTAAACTTCTGC CAT	5'-codierender Bereich von <i>cusC</i> für Klonierung in pASK-IBA3
<i>cusA-C-XhoI</i>	← CTGCTCGAG ₈₆₃₁ TTTCCGTACCCGATGTCGGT	3'-Bereich von <i>cusA</i> ohne Stop-Codon, für Klonierung in pASK-IBA3 ein
<u><i>cusF</i>- Mutagenese-Primer</u>		
<i>cusF</i> d M69/71I	→ ₄₁₀₂ CTGGCCGGAGATCACCATCCGCTTTACCA TC	<i>Quick-change</i> -Mutagenese-Primer, führen Mutationen in <i>cusF</i> ein G ₄₁₁₄ C, G ₄₁₂₀ C (CusF M ₆₉ I/M ₇₁ I)
<i>cusF</i> u M69/71I	← ₄₁₃₂ GATGGTAAAGCGGATGGTGATCTCCGGCC AG	
<i>cusF</i> d M69I	→ ₄₁₀₂ CTGGCCGGAGATCACCATCCGCTTTACCAT C	<i>Quick-change</i> -Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>cusF</i> ein G ₄₁₁₄ C (CusF M ₆₉ I)
<i>cusF</i> u M69I	← ₄₁₃₂ GATGGTAAAGCGGATGGTGATCTCCGGCC AG	

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 3:

<i>cusF</i> d M71I	→	⁴¹⁰² CTGGCCGGAGATCACCAT C CGCTTTACCAT	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
		C	führen Mutation in <i>cusF</i>
<i>cusF</i> u M71I	←	⁴¹³² GATGGTAAAGCG G ATGGTGATCTCCGGCC	ein G ₄₁₂₀ C (CusF M ₇₁ I)
		AG	
<i>cusF</i> d H25/26/27R	→	³⁹⁶⁸ CAGGCTAACGAAC G T C G T C G TGAAACCAT	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
		GAGC	führen Mutationen in
<i>cusF</i> u H25/26/27R	←	⁴⁰⁰⁰ GCTCATGGTTT C A C G A C G ATTCGTTAG	<i>cusF</i> ein A ₃₉₈₁ G, A ₃₉₈₄ G,
		CCTG	A ₃₉₈₇ G (CusF H ₂₅ R/H ₂₆ R/ H ₂₇ R)
<i>cusF</i> d H57/58R	→	⁴⁰⁶⁴ AAAATCACCATCC G T C G C GATCCGATTGC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
		T	führen Mutationen in
<i>cusF</i> u H57/58R	←	⁴⁰⁹³ AGCAATCGGATCG C G A C G GATGGTGATTT	<i>cusF</i> ein A ₄₀₇₇ G, A ₄₀₈₀ C
		T	(CusF H ₅₇ R/H ₅₈ R)
<i>cusF</i> d H25/26/27Q	→	³⁹⁷¹ GCTAACGAACA G C A G C A G GAAACCATGA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
		GC	führen Mutationen in
<i>cusF</i> u H25/26/27Q	←	⁴⁰⁰⁰ GCTCATGGTTT C T G C T G C TGTTCCGGTAGC	<i>cusF</i> ein T ₃₉₈₂ G, T ₃₉₈₅ G,
			T ₃₉₈₈ G (CusF H ₂₅ Q/H ₂₆ Q/ H ₂₇ Q)
<i>cusF</i> d H57/58Q	→	⁴⁰⁶⁷ ATCACCATCC A G C A G GATCCGATTGCT	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
			führen Mutationen in
<i>cusF</i> u H57/58Q	←	⁴⁰⁹³ AGCAATCGGATC C T G C T G G ATGGTGAT	<i>cusF</i> ein T ₄₀₇₈ G, C ₄₀₈₁ G
			(CusF H ₅₇ Q/H ₅₈ Q)
<i>cusF</i> d F73Y	→	⁴¹¹⁴ TGACCATGCGCT A TACCATCACCCC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusF</i> u F73Y	←	⁴¹³⁷ GGGGTGATGGTA T AGCGCATGGTCA	führen Mutation in <i>cusF</i>
			ein T ₄₁₂₆ A, (CusF F ₇₃ Y)
<i>cusF</i> d D48N	→	⁴⁰³⁶ GGTAAAGGGTATC A ATCTGGAAAGCAA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusF</i> d D48N	←	⁴⁰⁶² TTGCTTTCCAGAT T GATAACCCTTTACC	führen Mutation in <i>cusF</i>
			ein G ₄₀₄₉ A, (CusF D ₄₈ N)

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 3:

<u><i>cusA</i>-Mutagenese-Primer</u>			
<i>cusA</i> d M573I	→ ₇₁₉₅	GACTTGTTGTATAT C CCATCGACGCTGC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M573I	← ₇₂₂₂	GCAGCGTCGATGG G ATATAACAACAAGTC	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₂₀₉ C, (CusA M ₅₇₃ I)
<i>cusA</i> d M623I	→ ₇₃₄₆	CTCCGCTGGAGAT C GTAGAAACGACC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M623I	← ₇₃₇₁	GGTCGTTTCTAC G ATCTCCAGCGGAG	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₃₅₉ C, (CusA M ₆₂₃ I)
<i>cusA</i> d M640I	→ ₇₃₉₇	GGCGGCCAGGCAT C ACGATGGACAAAA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M640I	← ₇₄₂₃	TTTTGTCCATCGT G ATGCCTGGCCGCC	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₄₁₀ C, (CusA M ₆₄₀ I)
<i>cusA</i> d M672I	→ ₇₄₉₃	ACCGTATCGATAT C CTCTCAACCGGC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M672I	← ₇₅₁₉	GCCGGTTGAGAG G ATATCGATACGGT	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₅₀₆ C, (CusA M ₆₇₂ I)
<i>cusA</i> d M812I	→ ₇₉₁₁	TACCGGACCGTCGAT C CTGAAAACC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M812I	← ₇₉₃₅	GGTTTTTCAG G ATCGACGGTCCGGTA	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₉₂₆ C, (CusA M ₈₁₂ I)
<i>cusA</i> d M738I	→ ₇₆₉₀	GCACGTTACGGTAT C ACGGTGGCGGAT	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M738I	← ₇₇₁₆	ATCCGCCACCGT G ATACCGTAACGTGC	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₇₀₄ C, (CusA M ₇₃₈ I)
<i>cusA</i> d M755I	→ ₇₇₄₄	GGCGGGGCGAT C GTTGGCGAAACGG	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M755I	← ₇₇₆₉	CCGTTTCGCCAAC G ATCGCCCCGCC	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₇₅₅ C, (CusA M ₇₅₅ I)
<i>cusA</i> d M792I	→ ₇₈₅₃	TCCTGACGCCGAT C AAGCAGCAAATCA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M792I	← ₇₈₇₉	TGATTTGCTGCTT G ATCGGCGTCAGGA	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₈₆₆ C, (CusA M ₇₉₂ I)
<i>cusA</i> d M833I	→ ₇₉₇₆	GCGATCGTGACAT C GTGTCGGTGGTTC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer,
<i>cusA</i> u M833I	← ₈₀₀₂	GAACCACCGACAC G ATGTCACGATCGC	führen Mutation in <i>cusA</i> ein G ₇₉₈₉ C, (CusA M ₈₃₃ I)

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 3:

<i>cusA</i> d M875/879/ 881I	→ ₈₁₀₀ TAAGCTTAAACTCAT C GTGCCGAT C ACGTT GAT C ATTATCTTCGTG	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führen Mutationen in
<i>cusA</i> u M875/879/ 881I	← ₈₁₄₅ CACGAAGATAAT G ATCAACGT G ATCGGCA C G ATGAGTTTAAGCTTA	<i>cusA</i> ein G ₈₁₁₅ C, G ₈₁₂₄ C, G ₈₁₃₃ C, (<i>CusA</i> M ₈₇₅ I/ M ₈₇₈ I/M ₈₈₁ I)
<i>cusA</i> d A399D	→ ₆₆₇₄ GCATTGCGATT G ACGTCGGGGCGAT	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>cusA</i>
<i>cusA</i> u A399D	← ₆₆₉₈ ATCGCCCCGAC G TCAATCGCAATGC	ein C ₆₆₈₆ A, (<i>CusA</i> A ₃₉₉ D)
<i>cusA</i> d D405N	→ ₆₆₉₀ CGGGGCGATGGT C AATGCTGCTATC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>cusA</i>
<i>cusA</i> u D405N	← ₆₇₁₄ GATAGCAGCATT G ACCATCGCCCCG	ein G ₆₇₀₃ A, (<i>CusA</i> D ₄₀₅ N)
<i>cusA</i> d E412Q	→ ₆₇₁₁ TATCGTCATGAT C AGAATGCGCATAA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>cusA</i>
<i>cusA</i> u E412Q	← ₆₇₃₇ TTATGCGCATTCT G GATCATGACGATA	ein C ₆₇₂₄ G, (<i>CusA</i> E ₄₁₂ Q)
<i>cusA</i> E412D	d → ₆₇₁₄ CGTCATGATCG A TAATGCGCATAAAC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führen Mutation in <i>cusA</i>
<i>cusA</i> E412D	u ← ₆₇₃₉ GTTTATGCGCATT A TCGATCATGACG	ein G ₆₇₂₆ T, (<i>CusA</i> E ₄₁₂ D)
<u>sonstige Primer</u>		
<i>cat</i>	→ ATGGACAAC T TCTTCGCCCC	Kontrollprimer, bindet im <i>cat</i> -Gen
Δ <i>cusF</i> UU <i>Bam</i> HI	← TGAGGATCC ₄₅₄₄ CCGTTTT C ACCCCCAGATTC	stromabwärts von <i>cusF</i>
Δ <i>cusF</i> OD <i>Bam</i> HI	→ AGCGGATCC ₃₅₆₉ TGGCATCGCTGCAA A TACTT	stromaufwärts von <i>cusF</i>
Δ <i>cusF</i> UD <i>Eco</i> RI	→ AATGAATTC ₄₁₉₃ CAGCAGGGCAAC C TTTCTTTA TTA	am Ende von <i>cusF</i>
Δ <i>cusF</i> OU <i>Eco</i> RI	← ACGAATTC ₃₉₁₉ TGCTTTTT C ATTTATTCTCTCC TG	am Anfang von <i>cusF</i>
Promotor down	→ CAGGGATCC ₂₂₂₁ ATT C CTCCGCATGTTGCC	ca. 150 bp vor ATG von <i>cusC</i>
<i>cusA</i> S up	← ₆₃₃₉ TTCGCCTTCGCCGTT T AGTTC	innerhalb <i>cusA</i>
<i>cusA</i> S down	→ ₅₇₃₈ GCGGTTTCTCACAGTT T GGCG	innerhalb <i>cusA</i>

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 3:

<u>Sequenzierprimer</u>			
Seq pTYB2	←	CY'5-TCTTTACCCATGACCTTATTACCAACCTC	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pTYB2-Konstrukte
<i>cusA</i> seq down	→	⁶⁵⁸⁸ GATTATTTTCGTTGCCGCTGGG	Sequenzierprimer (ABI) für Mutationen in <i>cusA</i>
<i>Strep</i> Tag up	←	ATTTTTCGAACTGCGGGTGGC	Sequenzierprimer (ABI) für pASK-IBA3 Konstrukte
<i>Strep</i> Tag down	→	GGCGCCGAGACCGCTTTGAACGTATCATT	Sequenzierprimer (ABI) für pASK-IBA3- Konstrukte
Upr-CY'5	←	CY'5-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	CY'5-markierter <i>universal</i> Sequenzier- primer (ALF) für pGEM- T-Easy-Konstrukte
Rpr-CY'5	→	CY'5-CAGGAAACAGCTATGAC	CY'5-markierter <i>reverse</i> Sequenzierprimer (ALF) für pGEM-T-Easy- Konstrukte
pGEM rev	←	ATATGGTCGACCTGCAGGCG	<i>reverse</i> Sequenzier- primer (ALF) für pGEM- T-Easy - Konstrukte
pGEM fwd	→	GCGAAAGGGGGATGTGCTGC	<i>forward</i> Sequenzier- primer (ALF) für pGEM- T-Easy - Konstrukte

^{a)}für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet. Vergrößert und **fett** dargestellte Basen weisen auf Austausch hin. Tiefergestellte Ziffern kennzeichnen die Basenposition in der *cus*-Sequenz (Accession AE000162 U00096). Kursiv dargestellte Basen in den Deletionsprimern sind zur Sequenz von pKD3 homolog.

2.3.4.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von durch Transformation erzeugten Klonen.

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

2. Material und Methoden

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 Mg²⁺-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 H₂O_{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.

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

Diese Methode diente zur Mutagenese eines oder mehrerer nebeneinander liegender Basenpaare. Wichtig hierfür ist das Vorliegen der zu mutierenden Sequenz in einem relativ kleinen doppelsträngigen, *supergecoilten* Vektor (z.B. pASK-IBA3), der aus einem *dam*⁺-*E. coli*-Stamm isoliert wurde. Je ein Mutagenese-Primer für jeden Strang, die zueinander komplementär sind, diente zum Einführen der gewünschten Mutation. Sie wurden in einer

PCR-Reaktion eingesetzt, die dann das gesamte Plasmid mit Insert amplifizierte. Um *second-site*-Reversionen zu begegnen, wurde die *Pwo*-Polymerase (mit Korrekturlesefunktion) eingesetzt. Wichtig war außerdem nur wenige Zyklen zu durchlaufen (16 + 1 pro jeden Basenaustausch). Anschließend wurde der Reaktionsansatz gereinigt und mit *DpnI* behandelt. Dieses Enzym verdaut spezifisch die parentale, *dam*-methylierte DNA nicht aber das PCR-Produkt. Der mutierte Vektor konnte dann ganz normal für Transformations-Experimente eingesetzt werden, ohne dass er vorher eine Ligation erfolgte.

2.3.4.4. Overlap extension PCR

Auch über diese Methode erfolgte die Mutagenese mehrerer nebeneinander liegender Basenpaare. Dabei wurden zwei mit Standard-PCR generierte Amplika, an deren Enden durch „Mutagenese-Primer“ die gewünschte Veränderung der Basenfolge erreicht wurde, als *Template* eingesetzt. Die beiden Amplika überlappen randständig in einem Bereich von ca. 25 bp. Die „Randprimer“ der ersten beiden PCRs, wurden für die zweite Reaktion verwendet. Die Annealing-Temperatur der Gesamtreaktion wurde durch die Annealing-Temperaturen der eingesetzten Randprimer und des überlappenden Zwischenbereiches festgelegt.

2.3.4.5. 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).

2.3.5. DNA-Transfer in *Escherichia coli* und Selektion rekombinanter Klone

2.3.5.1. Transformation nach der CaCl₂-Methode

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Die Transformation wurde in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Von dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Diese wurde 1:100 in einer 100 ml Hauptkultur verdünnt und bei 37°C bis zu einem OD₆₀₀ von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden zu je 50 ml in sterile, auf Eis vorgekühlte Greiner-Röhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4°C (Hettich Universal, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde vorsichtig in je 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert (auf Eis) und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und im Eisbad bis zur Transformation (mindestens 3 h, maximal 24 h) aufbewahrt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei –80°C gelagert.

Je 200 μ l CaCl_2 -kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der zu transformierenden DNA vorsichtig gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C an, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis gekühlt wurden (2 min). Nach Zugabe von 0.8 ml Nährbouillon/LB-Medium und Inkubation für 45 min bei $37^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}$ wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei $37^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}$ inkubiert.

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

A) Herstellung kompetenter Zellen

200 ml SOB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach Abkühlung auf Eis (15 min) zentrifugiert (15 min 5000 rpm, 4°C) und das Zellpellet dreimal mit je 50 ml eiskaltem Glycerin (10 %) gewaschen, und die Zellen nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4°C) in 500 μ l Glycerin [10 % (v/v)] aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden als 40 μ l-Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

B) Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser der Fa. Biorad (München). Pro Ansatz wurden 40 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5 μ l Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 μF , 1.8 kV und 200 Ω , wodurch eine Feldstärke von 12.5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3.5-4.5 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei $30^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$ inkubiert. 50-200 μ l des Ansatzes wurden auf Selektionsagar ausplattiert.

2.3.5.3. Selektion plasmidtragender *E. coli* - Klone

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

2.3.5.4. Inaktivierung chromosomaler Gene von *E. coli* mittels PCR-Produkten (Datsenko und Wanner, 2000)

Dieses System beruht auf dem Prinzip der ortsspezifischen Rekombination unter Verwendung des λ Red (γ , β , *exo*) Rekombinase Systems. Ein chromosomales Gen wird gegen eine selektierbare Antibiotikaresistenz ausgetauscht, welche durch PCR amplifiziert wurde. Die

genutzten Primer enthielten eine zum Zielgen ca. 40 nt homologe Sequenz für die Rekombination. Mit amplifiziert wurden FRT (*FLP recognition target*) sites, die für die Wiederentfernung der Antibiotikaresistenz notwendig sind.

A) Inaktivierung der Gene

Zur Gewinnung elektrokompenter Zellen wurde *E. coli* BW25113 mit pKD46 mit L-Arabinose (Endkonzentration 1 mM) in SOB-Medium angezogen und elektrokompente Zellen, wie zuvor beschrieben, hergestellt. Unter Kontrolle des Arabinosepromotors stehen die Gene des λ Red (γ , β , *exo*) Rekombinase Systems. Die Zellen wurden mit gereinigten PCR-Produkten (ca. 40 bp *up-* und *down-stream* des zu deletierenden Genes, FRT-sites und Antibiotikaresistenz-Kassette) elektroporiert und auf Antibiotika-haltigen (Kanamycin, Chloramphenicol) Agar-Platten selektiert. Zur Entfernung des Helferplasmides (pKD42) wurden die Klone auf Antibiotika-freiem Agar ausgestrichen und bei 43°C inkubiert. Die Überprüfung erfolgte durch Selektion auf Kanamycin bzw. Chloramphenicol und Negativselektion auf Ampicillin. Die Überprüfung des Genaustausches gegen die Antibiotikaresistenz erfolgte mittels PCR.

B) Eliminierung der Antibiotikaresistenz

Das Plasmid pCP20 hat eine Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenz, ein temperatursensitives Replikationsorigin und eine temperaturabhängige Induzierbarkeit der FLP-Synthese. Die Mutanten wurden mit pCP20 transformiert und auf Ampicillin bei 30°C selektiert. Kolonien wurden auf Nichtselektivagar bei 43°C inkubiert und dann auf den Verlust sämtlicher Resistenzgene getestet. Der Großteil der Klone verliert bei diesem Schritt die FRT-flankierten Resistenzgene und gleichzeitig das FLP-Helferplasmid (pCP20). Die Kontrolle der Deletion erfolgte mittels PCR.

2.3.5.5. Gentransfer mittels P1-Transduktion (Provence und Curtiss, 1981)

A) Gewinnung des P1-Lysates

Eine Übernachtskultur von *E. coli* wurde 1:20 in LB-Medium mit 2.5 mM CaCl₂ (Lbroth) verdünnt und 90 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein vorhandenes P1-Lysat 1:20 in LB verdünnt. Zu 100 μ l dieser Verdünnung wurden 900 μ l der *E. coli* Kultur gegeben und zur Phagenabsorption 20-30 min bei 37°C inkubiert. 200 μ l des Ansatzes wurden zu 2 ml Weichager pipettiert und auf LB-Agar ausplattiert. Nach 6 stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Weichagar mit 5 ml LB-Medium mit 10 mM MgCl₂ abgeschwemmt und in ein steriles 15 ml Geiner-Röhrchen überführt. Es wurden 0.1 ml Chloroform je 4 ml Lysat zugegeben und 2 min kräftig geschüttelt. Das Lysat wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag abzentrifugiert (5000 rpm, 4°C, 10 min) und der

Überstand in ein neues 15 ml Geiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von einigen Tropfen Chloroform wurde das Lysat bei 4°C gelagert.

B) P1-Transduktion

Eine Übernachtskultur des *E. coli* Zielstammes wurde 1:20 in LB-Medium mit 5 mM CaCl₂ verdünnt und 100 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (5 min 5000 rpm) und in 1/10 Vol. SM+Ca²⁺ [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂] resuspendiert. Die Zellen wurden 20 min bei RT inkubiert. Das P1-Lysat wurde in SM+Ca²⁺ verdünnt und zu 0.1 ml pro Verdünnungsstufe wurden 0.1 ml Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde für 20 min bei 30°C-37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.2 ml LB-Medium mit 50 mM Na-Citrat wurde für eine weitere Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann 200 µl auf Selektivagar ausplattiert. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.6. 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.

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

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter Verwendung des *SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™* (Epicentre Technologies, Madison, USA). Es wurden CY'5-markierte-Primer (Tabelle 3) verwendet.

Zuerst wurde auf Eis ein *Premix* pipettiert:

- 7.2 µl *SequiTherm EXCEL II Sequencing Puffer*
- 2.0 µl Fluorescein-markierter Primer (2 pmol)
- x µl DNA (250 fmol)
- ad 16 µl steriles H₂O_{bidest}
- 1.0 µl *SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase* (5 U/µl)

Der *Premix* wurde gemischt und auf Eis gelagert.

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

Die PCR wurde in einem UNO-Thermoblock mit Deckelheizung (Biometra, Göttingen) nach folgenden Temperaturprogramm durchgeführt:

2. Material und Methoden

1)	5 min	95°C	Denaturierung
2)	30 s	95°C	Denaturierung
3)	15 s	50°C	<i>Annealing</i>
4)	60 s	70°C	<i>Extension</i>
	Schritt 2 bis 4:	30 Zyklen	
5)	Pause	4°C	Kühlung

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

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

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

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)	Pause	4°C	

Nach Ablauf des Programms wurde die wässrige Unterphase abgenommen und restliches Mineralöl durch Adhäsion an einen schräg gelegten Streifen Parafilm entfernt. Die DNA wurde anschließend zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl Ethanol zugegeben wurden. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei RT und 14000 rpm 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.

2.3.6.3. 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 50 %</i> (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

2.3.6.4. Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Alf-Manager DBA. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen Clone 4 (*Clone Manager*-Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, USA) und Dnasis (Version V5.00) ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten *Internet-Programm Basic Logic Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem *Internet-Programm ClustalW* vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den *Internet-Programmen Simple Modula Architecture Research* (SMART, Schultz *et al.*, 1998, Schultz *et al.*, 2000), *Scan Prosite*, *Profile Scan* und *Compute pI/Mw Expsy* des *Expsy 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 bis 600 bp-Fragmente aus genomischer DNA von *E. coli* W3110 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 (10x) und dNTP-Labeling-Mix (10x) 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

Um die Größe der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden ein Digoxigenin-markierter Größenstandard eingesetzt. Für die Southern-Experimente kamen die DIG-Marker VII (17 DNA-Fragmente mit folgenden Größen: 8576; 7427; 6106; 4899; 3639; 2799; 1953; 1882; 1515; 1482; 1164; 992; 718; 710; 492; 359 und 81 bp) und VI (15 Fragmente mit folgenden Größen: 2176; 1766; 1230; 1033; 653; 517; 453; 394; 298; 234; 220 und 154 bp) zum Einsatz. Der Marker wurde mit im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht. Als nachteilig bei dieser Methode ist allerdings die Instabilität der Markierung anzusehen.

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

2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA-Blotting

Genomische DNA der zu untersuchenden Derivate von *E. coli* GR1($\Delta cueO$) 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:

Depurinieren: 5 min in 0.25 N HCl

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

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

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit H₂O_{bidest} gespült.

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 20 min in sterilem H₂O und anschließend in 10 x SSC [0.15 M Na-Citrat (pH 7.0), 1.5 M NaCl] geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Agarose-Gel auf die Membran erfolgte mittels VacuumBlotter (Appligene). Die vorbereitete Membran wurde auf mit 10 x SSC benetztes Filterpapier in der Blotting-Apparatur 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 3 minütige Bestrahlung mit UV (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 Hybridisierungsofen (OV4, Biometra) bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (68°C) prähybridisiert. Die markierte Sonde wurde in 10 ml neuer Hybridisierungslösung aufgenommen und 10 min im Wasserbad denaturiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde sie gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht.

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

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

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

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

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

Alle Schritte zum Chemilumineszenz-Nachweis wurden unter leichtem Schwenken (Laborwippe) bei 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 1:20000 in Puffer 2) behandelt.

Anschließend wurde 2 mal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min in Puffer 3 [0.1 M Tris-HCl, 0.1M NaCl (pH 9.5)] äquiliibriert, vorsichtig abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt. Die

Membran wurde gleichmäßig mit der verdünnten Substratlösung (CSPD in Puffer 3 1:100) benetzt, mit einer zweiten Folie abgedeckt und 5 min inkubiert. Die Membran wurde auf sauberem Filterpapier soweit abgetrocknet, dass keine überschüssige Flüssigkeit mehr vorhanden war und luftblasenfrei in eine neue Folie eingeschweißt. Zum besseren Start des Substratumsatzes wurde 15 min bei 37°C inkubiert.

Die Membran wurde in einer Röntgenkassette für 15 min bis 3 h auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch 4 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 (15 h) bestimmt. Dazu wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd., England) gemessen. Die Bestimmung des Zelltrockengewichtes erfolgte mittels Eichkurven (Schwuchow, 1997; Grass, persönliche Mitteilung).

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

Die Zelltrübungsmessungen wurden in LB-Medium mit CuCl_2 in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte eine einheitliche, in LB-Medium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogene Vorkultur des jeweiligen Stammes. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm kultiviert und nach 16 h entnommen. Den

Stämmen, die neue Plasmidkonstrukte enthielten, wurde in der Vorkultur das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben. Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten Kulturröhrchen. Für Wachstumsversuche mit CuCl_2 wurde eine Zwischenkultur (1:500 aus Vorkultur angeimpft und 2 h bei 37°C unter schütteln inkubiert) angezogen.

Für die Anzucht der kontinuierlich zu vermessenden Hauptkulturen wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 20 ml LB-Medium mit der entsprechenden Vor- bzw. Zwischenkultur 0.2 - 1 %ig beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 37°C im Brutraum unter ständigem Schütteln inkubiert. Das Zellwachstum wurde kontinuierlich mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

Für die Bestimmung des Zellwachstumes nach 16 h wurde LB-Medium mit CuCl_2 0.2 %ig aus der Zwischenkultur beimpft und die Optische Dichte bei 600 nm nach 15 stündiger schüttelnder Inkubation bei 37°C vermessen.

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

Die Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) erfolgte auf LB-Agar. Es wurden Platten mit steigender Konzentration an CuCl_2 gegossen. Für Komplementationsexperimente enthielten die LB-Agar-Platten außerdem den Induktor Anhydrotetrazyklin (AHT $200\mu\text{g/l}$) zur Induktion der Genexpression. Vorkulturen der entsprechenden Stämme wurden 1:500 in frischem LB-Medium verdünnt und 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus dieser Zwischenkultur wurden die Stämme in Sektoren auf den Platten ausgestrichen und über Nacht (15 h) bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der MIC gegen Kupfer der Mutanten von CusF erfolgte unter Verwendung von CuSO_4 bei pH 7.5.

Als Minimale Inhibitor Konzentration wird die Metallkonzentration bezeichnet, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen.

2.6. Enzymologische Methoden

2.6.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Miller, 1992)

2.6.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte

Die für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *Escherichia coli* wurden in Tris-Minimalmedium mit 1 g/l Hefeextrakt und 2 g/l Glycerin angezogen.

Aus einer Übernachtskultur in LB wurde eine zweite Vorkultur in Tris-Minimalmedium angeimpft. Am folgenden Tag wurden Hauptkulturen angeimpft und unter Schütteln 2 h bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte eine Aufteilung der Kultur und die Inkubation mit verschiedenen Metallkonzentrationen für 3 h bei 30°C. Nach dieser Zeit wurden je 0.2 ml Kultur in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 4°C, 12000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Zelldichte zu diesem Zeitpunkt erfolgte als Optische Dichte bei 600 nm.

2.6.1.2. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Das Zellpellet wurde in 950 μ l Z-Puffer [0.6 M Na₂HPO₄, 0.4 M NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.5 M Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50 μ l Permeabilisierungspuffer [2.5 g/l CTAB, 5 g/l Natriumdesoxycholat] permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Substratlösung [4 g/l o-Nitrophenylgalactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz gemischt und bis zur Gelbfärbung bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des ONPG zu o-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Natriumcarbonat erhöhte den pH-Wert des Reaktionsansatzes auf 11, wodurch die β -Galaktosidase inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Mit Hilfe der Extinktion [E_{420}] und der Reaktionszeit [= Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion] konnte die β -Galaktosidase-Aktivität in Miller-Units nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U]} = (1000 * E_{420}) / (\text{Reaktionszeit} * \text{Probenvolumen} * OD_{600})$$

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

Zur Bestimmung der Lage der C-Termini im Cytoplasma oder Periplasma wurden die zu untersuchenden Proteine C-terminal mit der *Leader*-losen Alkalischen Phosphatase (PhoA') fusioniert. Für die Enzymaktivität von PhoA' ist seine Lokalisierung im Periplasma notwendig. Nur wenn der C-Terminus mit dem PhoA'-Anteil des Fusionsproteins ins Periplasma transportiert wird, kann durch einen Enzymtest eine Aktivität nachgewiesen werden.

2.6.2.1. Zellanzucht, Induktion, Zellernte

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

2.6.2.2. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Das Zellpellet wurde in 500 µl Waschpuffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgSO₄ und 1 mM Jodazetamid (nach dem Autoklavieren zugeben)] resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 1ml *Assay*-Puffer [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM ZnCl₂ und 1 mM Jodazetamid (nach dem Autoklavieren zugeben)] resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 50 µl 1 g/l SDS-Lösung und 50 µl Chloroform permeabilisiert. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Substratlösung [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.4 % Paranitrophenol, immer frisch herstellen] und Mischen gestartet. Die Zeit bis sich die Probe bei 37°C im Wasserbad durch Nitrophenolbildung leicht gelb färbte, wurde bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von 120 µl Stoppmix [1 M KH₂PO₄ (5 Teile), 0.5 mM EDTA (pH 8.0) (1 Teil)] und Inkubation auf Eis beendet. Der Ansatz wurde 4 min bei 4°C und 12000 rpm pelletiert, der Überstand vorsichtig in eine Küvette gegossen und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit Hilfe der Extinktion [E_{420}] und der Reaktionszeit [= Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion] nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U]} = 72.131 * E_{240} / \text{Reaktionszeit}$$

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

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

2.7. Proteinbiochemische Methoden

2.7.1. Protein-Expression und -Reinigung über das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* (NEW ENGLAND BioLabs_{Inc.} GmbH, Schwalbach i. Taunus)

Die Reinigung von Proteinen über das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* (NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus) beruht auf der Überexpression eines Fusionsproteins aus Target und Intein mit Chitin-Binde-Domäne. Dieses Protein kann an eine Chitinsäule binden, während andere Proteine durch Waschschrte von der Säule entfernt werden. Durch Zugabe von DTT und Inkubation über Nacht bei 4°C wird in einem *self-cleavage*-Prozess das Target-Protein vom Intein abgespalten und kann von der Säule eluiert werden, während das Intein mit Chitin-Binde-Domäne am Säulenmaterial verbleibt. Die Regeneration der Säule erfolgt mittels 10 g/l SDS.

2.7.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* ER2566 transformiert. Die Hauptkulturen in LB-Medium zur Überexpression (100-500 ml) wurden direkt mit frischem Material einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von ca. 100 KE schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Induktion der T7-Polymerase durch Zugabe von 0.1-0.5 mM IPTG [Endkonzentration] und Inkubation über Nacht bei 16 – 20°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm, 4°C für 10 min (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) 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) Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5-1.0 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100] resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 10 x in 20 s-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 5 000 rpm und 4°C zentrifugiert.

B) French-Press

Das Zellpellet wurde in 30 ml (pro Liter Kultur) Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100] resuspendiert und mit DNaseI (10 mg/ml) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer French-Press (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm²) in mehreren Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (5000 rpm, 1 h, 4°C) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

2.7.1.3. Native Proteinreinigung über Chitin-Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml, QIAGEN, Hilden) oder eine 10 ml Glassäule (Pharmacia, Freiburg i. Breisgau) wurde mit dem Säulenmaterial (*Chitin Beads*) gepackt (Bindekapazität 2 mg/ml) und mit 10 Vol. Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100] equilibriert. Im Falle der Glassäule wurde diese an ein *High-Load* (Pharmacia, Freiburg i. Breisgau) angeschlossen und alle Lösungen unter einer konstanten Flussrate, entsprechend den Angaben des Herstellers appliziert.

Der klare Rohextrakt wurde auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band, während die anderen Proteine durch Waschen mit 17 Vol. Säulenpuffer entfernt wurden. Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgte durch Addition von 3 Vol. *Cleavage Buffer* [20 mM HEPES (pH 8.0), 50 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.1 % (v/v) Triton X-100] mit 40-100 mM DTT [Stammlösung 1 M in 0.01 M NaAc (pH 5.2)] auf die Säule über Nacht.

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

2.7.2. Protein-Expression und -Reinigung über das *StrepTag II*[®] Protein Purification System (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

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

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

2.7.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21(pLys) transformiert. Die Vorkultur, die über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, wurde 1 %ig in frisches LB-Medium überführt. Die Hauptkulturen in LB-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 (Anhydrotetracyclin)/l induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 8000 rpm und 4°C (Sorvall, Tuttlingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

2.7.2.2. Vorbereitung des Zellpellets für die Proteinreinigung

A) Gewinnung des periplasmatischen Extraktes

Zur Gewinnung des periplasmatischen Extraktes von *E. coli* wurde nach den Anweisungen des *StrepTag* II-Benutzenhandbuches vorgegangen.

Nach der Zellernte wurde das Pellet in 1/100 Vol. eiskalten Puffer P [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM Saccharose, ± 1 mM EDTA] resuspendiert, in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der Spheroplasten wurde die Suspension zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 15 min). Der klare Überstand (periplasmatischer Extrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stand nun für weitere Arbeiten zur Verfügung.

B) Zellaufschluß und Gewinnung des Rohextraktes

Die Zellen wurden in Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), ± 1 mM EDTA] resuspendiert. Nach Zugabe des Proteinaseinhibitors PMSF (1 mM) und DNaseI (10 mg/ml) erfolgte der Zellaufschuss wie unter 2.7.1.2. beschrieben.

C) Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand einer Ultrazentrifugation (100000 x g, 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 einer Membranproteinbestimmung nach Lowry unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde dann auf 10 mg/ml eingestellt. Die so gewonnene Membranfraktion wurde mit verschiedenen Detergenzien für 30 min auf Eis solubilisiert, wobei ein Verhältnis von 2 mg Detergenz / 1 mg Membranprotein eingestellt wurde. Nach erfolgter Solubilisierung wurden ungelöste Membranreste sowie Zelltrümmer durch eine weitere Ultrazentrifugation (100000 g, 30 min, 4°C) pelletiert. Die so gewonnenen Membranproteine konnten für die Affinitäts-chromatographie eingesetzt werden.

2.7.2.4. Native Proteinreinigung mittels *StrepTactin*-Chromatographie

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml – 10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1-3 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 *StrepTagII*-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 10 Vol. Puffer W (ohne NaCl) entfernt.

Das Target-Protein wurde mittels Puffer E [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), \pm 1 mM EDTA, 2.5 mM Desthiobiotin] eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch das Spülen mit 10 Vol. Puffer R [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM HABA] regeneriert.

Für die Reinigung von Membranproteinen enthielten alle verwendeten Puffer 0.2 % N-Lauroylsarcosine.

2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

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

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

10 % (w/v) Natriumdesoxycholat (frisch hergestellt)

24 % (w/v) 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 CuSO₄

12.5 ml 0.8 M NaOH

ad 100 ml H₂O_{bidest} (lichtgeschützt aufbewahrt)

Mix: 25 Vol. Reagenz A und 2 Vol. Reagenz B

Reagenz C: 1 Vol. Folin Ciocalteu Reagenz mit 2 Vol. H₂O_{bidest}

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

Die Proben wurden mit Puffer auf 600 μ l verdünnt, mit 10 μ l 1 % iger (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und nach Durchmischung 15 min bei RT inkubiert. Zur

Fällung der Proteine wurden anschließend 200 µl 24 % (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation 7 min, 12000 rpm und bei 4°C in einer Tischzentrifuge (*Sigma 112*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden die Überstände sorgfältig entfernt und das Pellet mit 450 µl Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente resuspendiert waren, wurden den Proben 2 x 300 µl Reagenz C zugesetzt, wobei jeweils sofort gemischt wurde. Die Proben wurden 30-60 min lichtgeschützt bei RT inkubiert, bevor die Extinktion bei 750 nm gegen einen Nullwert gemessen wurde. Zu jeder Messreihe wurde eine Eichkurve im Bereich von 5-60 µg Protein pro Ansatz mit BSA aufgenommen.

2.7.3.2. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm

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

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

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

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

2.7.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford, 1976

Für die Proteinbestimmung wurden 20 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. – verdünnung mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 594 nm.

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde.

Die Herstellung der Bradford-Lösung erfolgte, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96 % Ethanol 1 h gerührt und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85 %ige o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H₂O bidest aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei RT im Dunkeln.

2.7.4. Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984)

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

Dazu wurden 100 µl Proteinprobe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt, 300 µl Wasser zugegeben und nach Schütteln für 2 min in einer Tischzentrifuge bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 300 µl Methanol wurde wieder kräftig geschüttelt und erneut für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und im entsprechenden Volumen H₂O_{bidest} und Probenpuffer aufgenommen.

2.7.5. Elektrophoretische Methoden

Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Fa. Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Dabei wurden Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm verwendet. Die Größe der Gele betrug 8.5 x 7.5 x 0.1 cm.

2.7.5.1. Probenvorbereitung

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 20 g/l SDS, 50 % (v/v) Glycerin 0.5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau] gemischt und 5 min bei 96°C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufs Gel.

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

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

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

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

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 10, 12.5, 15 oder 17.5 %ige Gele zum Einsatz.

2. Material und Methoden

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

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

Sammelgel:	30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid	
Stammlösung		0.33 ml
0.625 M Tris-HCl (pH 8.8)		0.4 ml
5 g/l SDS		0.4 ml
H ₂ O 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.

2.7.5.4. SDS-Tricine-PAGE (Schägger und von Jagow, 1988)

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

2. Material und Methoden

Gelzusammensetzung:	Sammelgel	Trenngel
40 % Acrylamid	0.2 ml	2.4 ml
Gelpuffer [3 M Tris, 10.4 mM SDS (pH 8.45)]	0.496 ml	1.92 ml
H ₂ O bidest	1.3 ml	1.48 ml
Glycerin	-	0.88 ml
10 % APS	13.3 µl	40 µl
TEMED	1.7 µl	5 µl

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

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

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

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

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

2.7.5.6. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen CusF und CusA

Die polyklonalen Antikörper gegen die in *E. coli* überexprimierten Proteine CusA und CusF wurde im Labor von Dr. Beate Fricke, Institut für Physiologische Chemie, MLU-Halle, generiert. Das Protein wurde dazu dreimal im Abstand von drei Wochen zu je 40-45 µg in die Zwischenzehen eines Kaninchens gespritzt (*geboostert*). Eine Woche darauf erfolgte die präparative Blutabnahme (15 ml).

2.7.5.7. Aufreinigung von Antikörpern (Sambrook *et al.*, 1989)

Polyklonale Antikörper gegen CusA wurden mittels Lysat von *E. coli* GR15(Δ *cueO* Δ *cusA::cm*) aufgereinigt. Eine Kultur von GR15 wurde in LB-Medium angezogen. Nach Zellernte wurden die Zellen in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 10 x in 20 s-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 4°C, 10 min) zur Entfernung der Zelltrümmer wurde das Lysat bei -20°C gelagert.

Das Antiserum wurde 1:10 in TNT [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween20] mit 5 g/l Magermilchpulver verdünnt und 0.5 ml des GR15-Lysates pro ml Antiserum zugegeben. Der Ansatz verblieb 4 h bei Raumtemperatur und konnte dann für immunologische Nachweise eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte nach Zugabe von 0.05 % Natriumazid bei 4°C.

2.7.5.8. 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. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzymaktivität (alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase) ermöglicht den Nachweis der gebildeten Protein/IgG/Anti-IgG-Komplexe durch 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 Proteine 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 % „Glücksglee“-Magermilchpulver] inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend erfolgte ein Waschen der Membran für 3 x 5 min mit PBS-Tween [0.1 % Tween 20 (v/v)]. Danach wurde die Membran in PBS-Tween mit dem gegen das nachzuweisende Antigen-Protein gerichteten 1. Antikörper für 1-3 h inkubiert, wobei sich die Konzentration des Antikörpers nach dessen erwarteter Spezifität

richtete. Es wurden Verdünnungen zwischen 1:100-1:50000 eingesetzt. Der ersten Antikörper-Inkubation folgte 3 x 15 min Waschen der Membran in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Darauf wurde die Membran mit einem Anti-IgG-Antikörper (monoklonal, Anti-Kaninchen-Antikörper-Peroxidase [Sigma-Aldrich, Deisenhofen]) für 1 h inkubiert, der 1:50000 in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den darauf folgenden Waschschritten (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 Nachweisreaktion wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 15 ml DetektionslösungI [1.5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.5) und 8.16 µl H₂O₂ ad 15 ml H₂O_{bidest}] und DetektionslösungII [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 in eine aufgeschnittene Plastikfolie gepackt und ein Röntgenfilm (Lumifilm, Amersham, Little Chalfont, England) 30 s bis 2 min exponiert.

2.7.5.9. *StrepTagII*[®] Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

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

Die Blot-Membran wurde in 15 ml Inkubationspuffer SI 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Es wurden 3.7 µl *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat zugegeben und weitere 30 min bei RT geschüttelt. Die Membran wurde mit H₂O_{bidest} abgespült und dann 2 x 2 min in Puffer W [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), ± 1 mM EDTA] und anschließend 2 min in H₂O_{bidest} gewaschen.

Der Nachweis erfolgte über die unter 2.7.5.8. B beschriebene Lichtreaktion oder eine Färbereaktion. Dazu wurden 15 ml Peroxidase-Reaktionspuffer ER auf die Membran gegeben und 0.1 ml 3 % (w/v) 4- Chlornaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol) sowie 15 µl Peroxidase-Substrat [30 % (v/v) H₂O₂] hinzupipettiert und bis zu 30 min zur Färbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O_{bidest} abgestoppt und die Membran luftgetrocknet.

2.7.6. Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.7.6.1. 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 Entfärberlösung [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.

2.7.6.2. 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 % (v/v) 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.

2.7.6.3. Trocknung von Polyacrylamid-Gelelen

Um die PAA-Gele haltbar zu machen, wurden sie mittels Vakuumvorrichtung getrocknet. Die Gele wurden 15 min in Geltrocknungslösung [3 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) Methanol] inkubiert. Für die Trocknung wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Geltrocknungslösung benetzte Folien gelegt. Nach Anlegen des Vakuum wurde der Geltrockner (*Gel Slab Drier* GSD-4, Pharmacia, Freiburg i. Breisgau) 75 min auf 60°C erhitzt. Die Gele verblieben danach noch bis zur vollständigen Abkühlung unter Vakuum.

2.7.7. Sequenzierung von Proteinen

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

2.7.8. Kupferbestimmung mittels *inductively-coupled-plasma mass-spectrometry* (ICP-MS)

Mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) an Proteine gebundene Metallionen nachbewiesen. Gereinigtes Protein wurde mit CuCl₂ inkubiert und nicht gebundenes Kupfer mittels Dialyse (Vivaspin 20 ml Concentrator mit *cut-off* von 3000 Da; Vivascience, Satorius)

Die Analysen wurden im Labor von Mike Kopplin der *Analytical Section of the Hazard Identification Core, College of Pharmacy, University of Arizona* (Tucson, AZ) durchgeführt. Das Protokoll wurde in Anlehnung nach EPA Method 6020A durchgeführt. 0.5 ml einer Probe wurden in ein 5 ml Teflon Gefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml konzentrierter Salpetersäure (*trace metal grade*) wurde das Gefäß fest verschlossen. Die Proben wurden in der Mikrowelle 5 min bei 70 % Leistung erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Proben weitere 5 min bei voller Leistung erhitzt. Die Proben wurden abgekühlt in ein neues Gefäß überführt und mit *Milli-Q* Wasser aufgefüllt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) unter Verwendung einer externen Eichkurve. Terbium wurde als interner Standard genutzt. Aus der Menge an eingesetztem Protein und dem Messwert konnte dann das Verhältnis Metall:Protein bestimmt werden.

2.10. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen über das *Yeast-Two-Hybrid-System* (*Cyto Trap*Tm, Stratagene, Heidelberg)

Das *Yeast-Two-Hybrid-System* dient zur Untersuchung der *in vivo* Interaktion von zwei Proteinen (pro- oder eukaryotisch) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H. Das erste Protein wird hierbei mit dem Protein hSos (einem Protein der RAS-Hitzestress-Antwort) fusioniert. Dieses Konstrukt diente als *Bait* (Beute). Ein zweites Protein wird mit einem Myristylationssignal (führt zur Membranassoziation) fusioniert. Diese Konstrukte dienten als *Target* (*Predator*). Interagieren die Fusionen miteinander, kommt es zur Membranassoziation von hSos. Dieses aktiviert den GDP/GTP-Austausch am Protein RAS. So wird eine Kaskade gestartet, die der Hefe ermöglicht, bei erhöhten Temperaturen zu überleben.

2.10.1. Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H-Zellen

5 x 100 ml Kulturen *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H in YPAD-Medium wurden in separaten 250 ml Erlenmeyer-Kolben inokuliert. Die Kulturen wurden dazu für etwa 48 Stunden bei 25°C stark geschüttelt bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.7.

Zur Kontrolle wurden jetzt 75 µl der Kultur auf eine YPAD-Agar-Platte ausplattiert und bei 37°C für mind. 4 Tage inkubiert. Es sollten nicht mehr als 30 Kolonien wachsen, da sonst eine hohe Anzahl von Revertanten oder andere Hefe-Stämme vorhanden wären.

Alle 100 ml Kulturen wurden bei 4000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und in 100 ml H₂O bidest durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 5 ml Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 4000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert, in 50 ml sterilem LiSORB [100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA und 1 M Sorbitol] resuspendiert und bei RT für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2600 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und in 500 µl LiSORB aufgenommen. Es wurden 1 ml Heringsspermien-DNA-Lösung [400 µl einer 20 mg/ml Heringsspermien-DNA-Lösung und 600 µl LiSORB] zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Dann wurden 9 ml PEG/LiOAc-Lösung [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM LiOAc (pH 7.5) und 400 g/l PEG 3350] und 880 µl Dimethylsulfoxid zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Die kompetenten Zellen wurden zu Aliquoten von je 1 ml bei -80°C eingefroren.

2.10.2. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae cdc25H* und Überprüfung auf Protein-Interaktionen

Zu 100 µl kompetenten Hefe-Zellen wurden je 0.3 µg der beiden Plasmide pSOS und pMyr (bzw. deren Derivate) zugegeben. Nach Zugabe von β-Mercaptoethanol wurde der Ansatz gut gemischt und 30 min bei RT mit gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, bevor sie für 5 min auf Eis gestellt wurden. Die gesamte Transformationsreaktion wurde auf SD/Glucose (-UL) Agar-Platten ausplattiert und für 4-6 Tage bei RT inkubiert.

Für jede Transformation wurden mindestens drei Kolonien gepickt und jeweils in 25 µl H₂O bidest resuspendiert. Davon wurden je 2.5 µl auf zwei SD/Glucose (-UL) Agar-Platten und auf zwei SD/Galaktose (-UL) Agar-Platten ausplattiert. Jeweils eine Platte wurde bei 37°C, die andere bei RT für mindestens 5 Tage inkubiert. Durch Galaktose wurde der GAL1-Promotor auf dem Plasmid pMyr und damit auch das myristylierte Fusionsprotein induziert. Bei einer Interaktion mit dem hSos-Fusionsprotein kam es zur Koloniebildung auf SD/Galaktose (-UL) Agar-Platten bei 37°C.

3. ERGEBNISSE

Die Deletion in der *cus*-Determinante von *Escherichia coli* führt unter anaeroben Bedingungen zu einer verminderten Kupfertoleranz (Outten *et al.*, 2001), hat aber keinen Einfluss bei aerobem Wachstum (Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001a). Erst nach Deletion von *cueO*, dem Gen für die periplasmatische Multicopper-Oxidase, hat eine Deletion in der *cus*-Determinante eine Verminderung der Kupferresistenz zur Folge (Grass und Rensing, 2001a). Aus diesem Grund wurde die Charakterisierung der *cus*-vermittelten Kupferresistenz von *E. coli* in einem *cueO*-Deletionsstamm durchgeführt.

3.1. Alle Genprodukte der *cus*-Strukturgenregion sind notwendig für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz

In der *cus*-Determinante kodiert *cusA* für das zentrale Transportprotein des CusCBA-Efflux-Komplexes. Im *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO::cm$) führte die zusätzliche Deletion von *cusA* zu einem drastischen Verlust der Kupfertoleranz. Wie die Deletion von *cusA* führte auch die Deletion des gesamten Operons *cusCFBA* im *E. coli cueO*-Deletionsstamm GR1 zum Verlust der Kupferresistenz (Grass und Rensing, 2001a). Dabei zeigen beide Doppeldelentionsstämme die gleiche Sensitivität gegen Kupfer (Grass und Rensing, 2001a) (Tab. 4). Bei der Deletion von *cusA* bzw. *cusCFBA* in den *E. coli* Stämmen GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) und GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) wurden die zu deletierenden Genregionen gegen eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette mit flankierenden FRT-*sites* ausgetauscht (Abb. 2) (Grass und Rensing, 2001a)

3. Ergebnisse

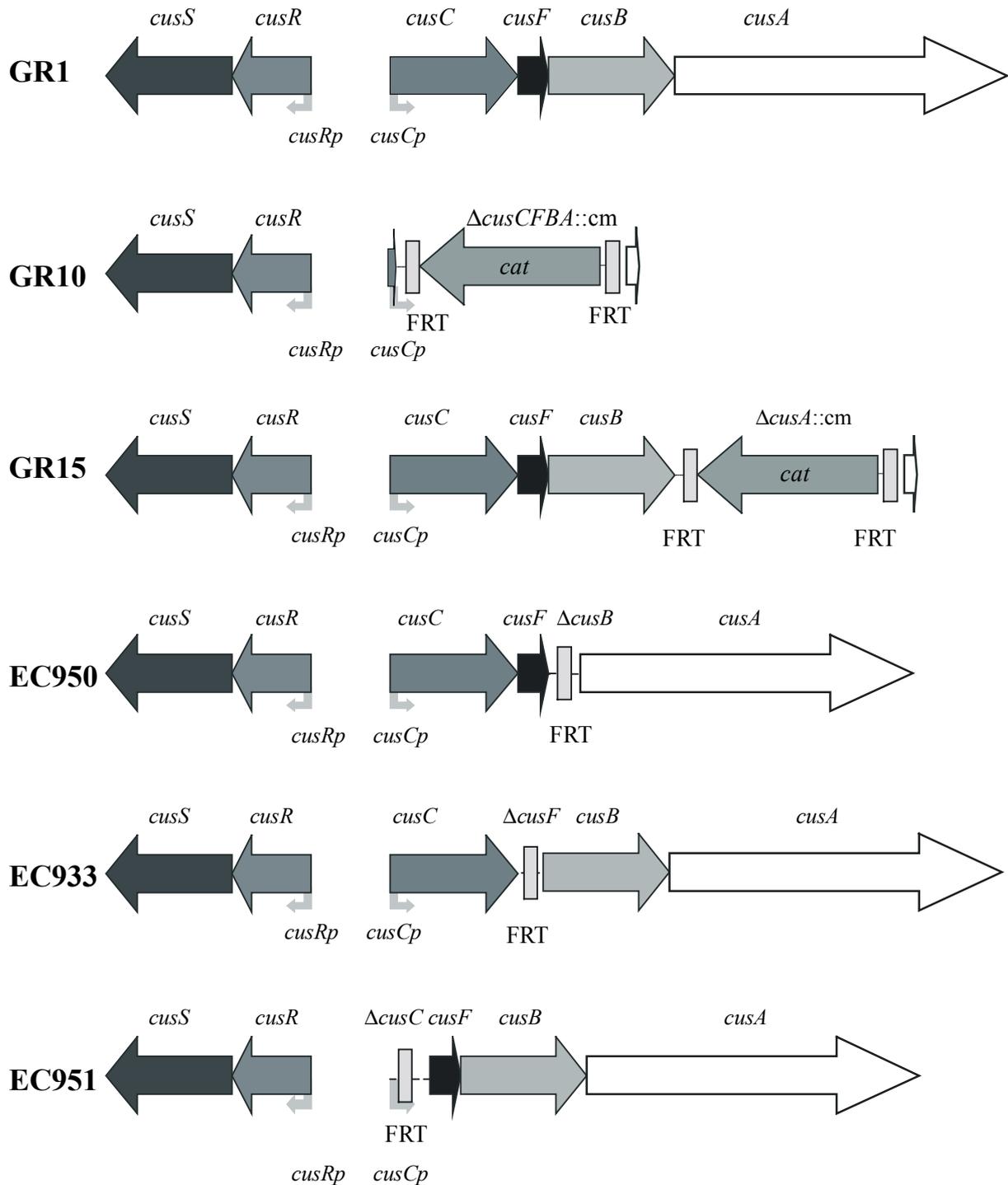


Abb. 2: Physikalische Karte der *cus*-Determinante in verschiedenen Derivaten von *E. coli* Stamm GR1.

Bei allen *E. coli* Stämmen handelt es sich um Derivate von GR1, der eine Deletion des Gens *cueO* aufweist (Grass und Rensing, 2001a). In Stamm GR15 wurde *cusA* gegen die Chloramphenicolresistenz *cat* ersetzt, in *E. coli* Stamm GR10 erfolgte der Austausch des gesamten *cusCFBA*-Operon gegen *cat* (Grass und Rensing, 2001a). Bei den anderen Stämmen erfolgte die Deletion der Gene *cusB* (EC950), *cusF* (EC933) bzw. *cusC* (EC951) indem zuerst auch ein Austausch des Zielgenes gegen *cat* erfolgte. In einem zweiten Rekombinationsschritt über die eingeführten FRT-sites wurde die Resistenz wieder entfernt, um polare Effekte zu vermeiden.

3.1.1. CusA allein ist nicht in der Lage Resistenz gegenüber Kupfer zu vermitteln

Um die *cus*-vermittelte Kupferresistenz näher charakterisieren zu können, sollte zunächst versucht werden, den *E. coli* Doppeldeletionsstamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) durch Expression von *cusA in trans* zu komplementieren. Das Gen *cusA* wurde über PCR (Primer *cusA*-N-*EcoRI* + *cusA*-C-*PstI*) aus der genomischen DNA von *E. coli* Stamm W3110 amplifiziert und in pASK-IBA3 kloniert. Das resultierende Plasmid pECD738(*cusA*) wurde im *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) für Komplementationsexperimente eingesetzt.

Durch Expression von *cusA in trans* war es möglich, den *E. coli* Doppeldeletionsstamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) partiell zu komplementieren, auch wenn das Resistenzniveau des Ausgangsstammes GR1($\Delta cueO::cm$) nicht erreicht wurde (Tab. 4). Doch waren die Unterschiede der Minimalen Inhibitor Konzentration zwischen GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) und GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) (pECD738) groß genug um weiterführende Mutagenese-Experimente mit *cusA* durchführen zu können.

Um die Frage zu klären, ob CusA als zentrales Transportprotein des CusCBA-Efflux-Komplexes allein in der Lage ist, Resistenz gegen Kupfer zu vermitteln, wurde pECD738(*cusA*) in *E. coli* Stamm GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) transformiert und für Wachstumsversuche eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden *cusCFBA* über PCR (Primer *cusC*-N-*EcoRI* + *cusA*-C-*XhoI*) aus genomischer DNA von *E. coli* Stamm W3110 amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA3 kloniert. Das resultierende Plasmid pECD772, das *cusCFBA* (CusA als C-terminale *StrepTagII*-Fusion) exprimiert, wurde ebenfalls in *E. coli* Stamm GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) transformiert.

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration gegen Kupfer ($CuCl_2$) auf LB-Agar zeigte, dass die Expression von *cusA* allein nicht in der Lage war, den *E. coli* Stamm GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) zu komplementieren (Tab. 4). Demgegenüber konnte durch Expression von *cusCFBA in trans* eine partielle Komplementation von *E. coli* Stamm GR10 erreicht werden, das ähnlich dem Resistenzniveau nach Expression von *cusA* im *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) war (Tab. 4).

3.1.2. Alle Komponenten des Efflux-Komplexes sind für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz in *E. coli* notwendig

Im *E. coli* *cueO*-Deletionsstamm GR1 führen sowohl die zusätzliche Deletion des gesamten *cusCFBA*-Operon, als auch die Deletion von *cusA* zur Kupfersensitivität. Dabei führt die Deletion des für das zentrale Transportprotein kodierenden Genes *cusA* zu der gleichen Sensitivität gegenüber Kupfer, wie eine Deletion des gesamten Operon *cusCFBA*. Da die Expression von *cusA* in *E. coli* Stamm GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) zu keiner Kupferresistenz führte, sollte der Einfluss der anderen Gene des *cusCFBA*-Operon auf die Vermittlung der Kupferresistenz untersucht werden.

Das Gen *cusB* kodiert für ein Protein der Familie Membranfusionsproteine. Diese Proteine sind Bestandteil der CBA-Transport-Komplexe und stellen die Verbindung zwischen dem RND-Protein und dem *outer membrane factor* her. Zur Deletion von *cusB* über das von Datsenko und Wanner (2000) beschriebene System wurden Primer vor und nach *cusB* abgeleitet ($\Delta cusB$ -P2 und $\Delta cusB$ -P1, Tab. 3). Dabei waren die 40 Basen am 5'-Ende der Primer zur *cusB* flankierenden Sequenz homolog, während die jeweils 20 Basen am 3'-Ende der Primer homolog zur Sequenz des Plasmides pKD3 waren. Von diesem Plasmid wurde mittels PCR das *cat*-Gen einschließlich der flankierenden FRT-sites amplifiziert und das Amplifikat in *E. coli* Stamm BW25113(pKD46) elektroporiert. Über die 40 homologen Basen ober- und unterhalb von *cusB* erfolgte ein *gene replacement* mittels des von pKD46 kodiertem λ -Red Rekombinase-System was zur Deletion von *cusB* führte an dessen Stelle das Gen der Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) eingeführt wurde, so dass der *E. coli* Stamm EC993(BW25113 $\Delta cusB::cm$) resultierte. Über P1-Transduktion wurde $\Delta cusB::cm$ in GR1($\Delta cueO::cm$), nach Eliminierung des *cat*-Genes, eingeführt. Um polare Effekte durch die Deletion von *cusB* zu vermeiden, die Chloramphenicol-Resistenz über die mit eingeführten FRT-sites eliminiert. Der resultierenden *E. coli* Stamm EC950 weist Deletionen in *cueO* und *cusB* auf (Abb.2).

Zur Überprüfung der korrekten Deletion wurde genomische DNA der *E. coli* Stämme GR1($\Delta cueO::cm$) und EC951($\Delta cueO \Delta cusB$) isoliert und nach Restriktion mit *MunI* für *Southern*-Hybridisierung eingesetzt. Als Sonde diente ein ca. 600 bp DNA-Fragment (CUSA-S), das zur Sequenz von *cusA* homolog war. In der *MunI* geschnittenen DNA von *E. coli* EC950($\Delta cueO \Delta cusB$) war ein um ca. 1.2 kb verkürztes Fragment im Vergleich zu *MunI* geschnittener genomischer DNA von *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO::cm$) nachweisbar, was der Deletion von *cusB* entsprach (Abb. 3B).

3. Ergebnisse

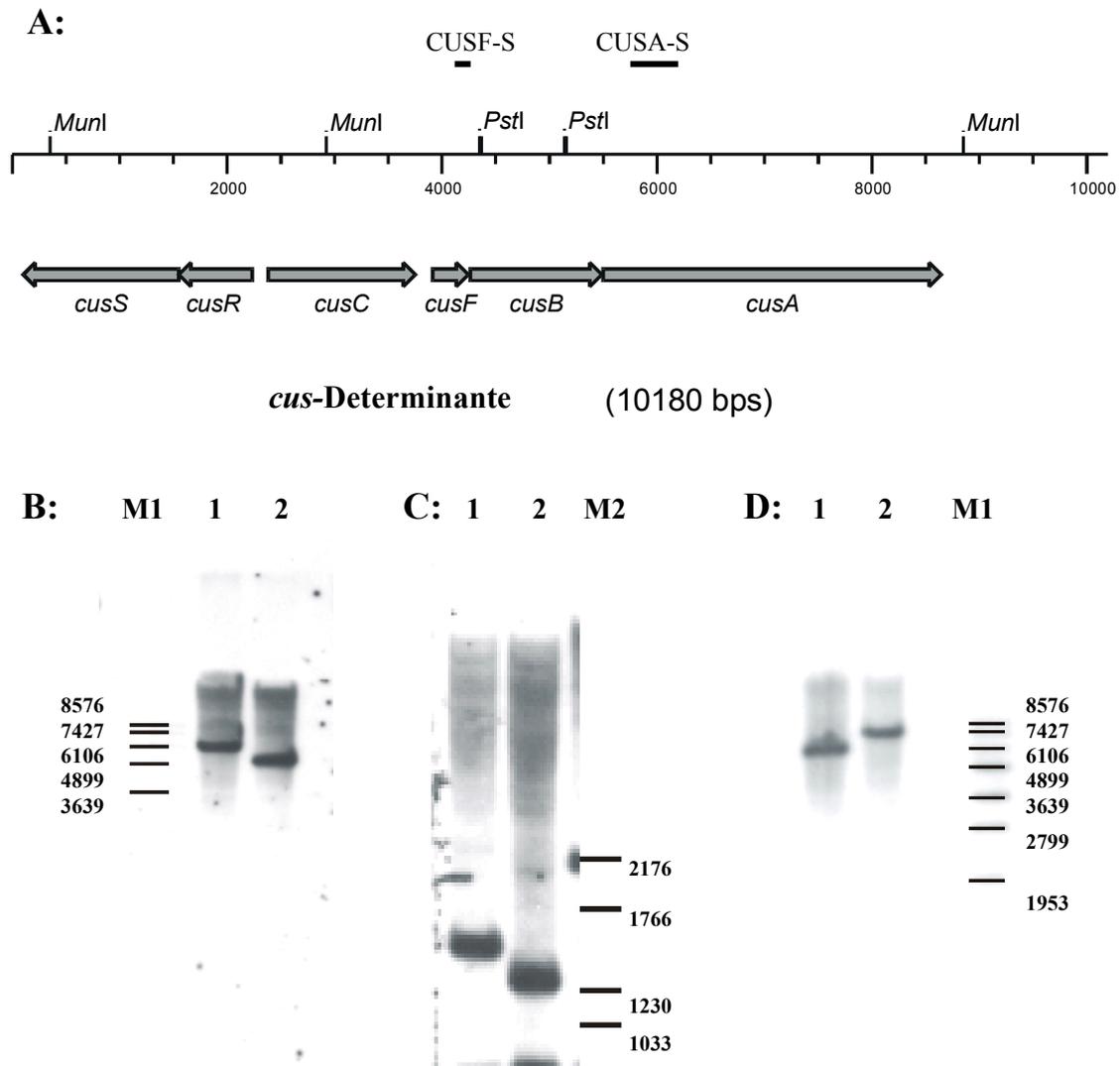


Abb. 3: Nachweis von Deletionen in der *cus*-Determinante in Derivaten des *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO$) mittels Southern DNA:DNA-Hybridisierung.

- A: Physikalische Karte der *cus*-Determinante mit ausgewählten, für die Überprüfung der Deletionsstämme relevanten, Restriktions-Schnittstellen und Lage der Sonden CUSA-S und CUSF-S.
- B-D: Genomische DNA der *E. coli* Stämme GR1($\Delta cueO::cm$) (Spur 1 in den drei Teilabbildungen B bis D) EC950($\Delta cueO \Delta cusB$) (Spur2 Teilabbildung B), EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) (Spur2 Teilabbildung C) und EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) (Spur2 Teilabbildung D) wurde *MunI* (B, D) bzw. *MunI/PstI* (C) geschnitten, in einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetragen und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung mit den Digoxigenin-11-dUTP- markierten Sonden CUSA-S (Teilabbildungen B und D) oder CUSF-S (Teilabbildung C) erfolgte über Nacht bei 68°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz. M1 und M2 kennzeichnen die Digoxigenin-markierten DNA *molecular weight marker* VII (M1) bzw. VI (M2).

3. Ergebnisse

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration zeigte für *E. coli* Stamm EC950($\Delta cueO \Delta cusB$), dass die Deletion von *cusB* zu einem vollständigem Verlust der Kupfertoleranz führte, entsprechend einer Deletion von *cusA* bzw. des Operons *cusCFBA* in den *E. coli* Stämmen GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) und GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) (Tab. 4). Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde der *E. coli* Stamm EC950($\Delta cueO \Delta cusB$) in Wachstumsversuchen im Flüssigmedium mit $CuCl_2$ eingesetzt. Der *cusB*-Deletionsstamm verhielt sich ähnlich dem *cusA*-Deletionsstamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) und war wie dieser Kupfer-sensitiv (Abb. 4).

Tabelle 4: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) von Kupfer in *Escherichia coli* GR1 - Derivaten^a

<i>E. coli</i> - Stamm	Relevanter Genotyp	MIC $CuCl_2$ [mM]
GR1	$\Delta cueO::cm$	3.25
GR15	$\Delta cueO \Delta cusA::cm$	1.5 ^{b)}
GR15(pECD738)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ in trans	2.75 ^{b)c)}
GR10	$\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$	1.5 ^{b)}
GR10(pECD738)	$\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm, cusA$ in trans	1.5 ^{b)c)}
GR10(pECD772)	$\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm, cusCFBA$ in trans	2.75 ^{b)c)}
EC950	$\Delta cueO \Delta cusB$	1.5 ^{b)}
EC951	$\Delta cueO \Delta cusC$	1.75 ^{b)}
EC933	$\Delta cueO \Delta cusF$	2.25

^{a)} Die Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 37°C für 16 h mehr sichtbar war. Übernachtskulturen der Stämme wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt und nach 2 stündigem Wachstum bei 37°C auf LB-Agar mit $CuCl_2$ ausgestrichen. Jede Bestimmung wurde mehrfach mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

^{b)} Die Kolonien waren klein und mukoid bei Konzentrationen nahe der MIC.

^{c)} LB-Agar-Platten zur Komplementation enthielten den Induktor AHT (Anhydrotetracyclin) [200 µg/l].

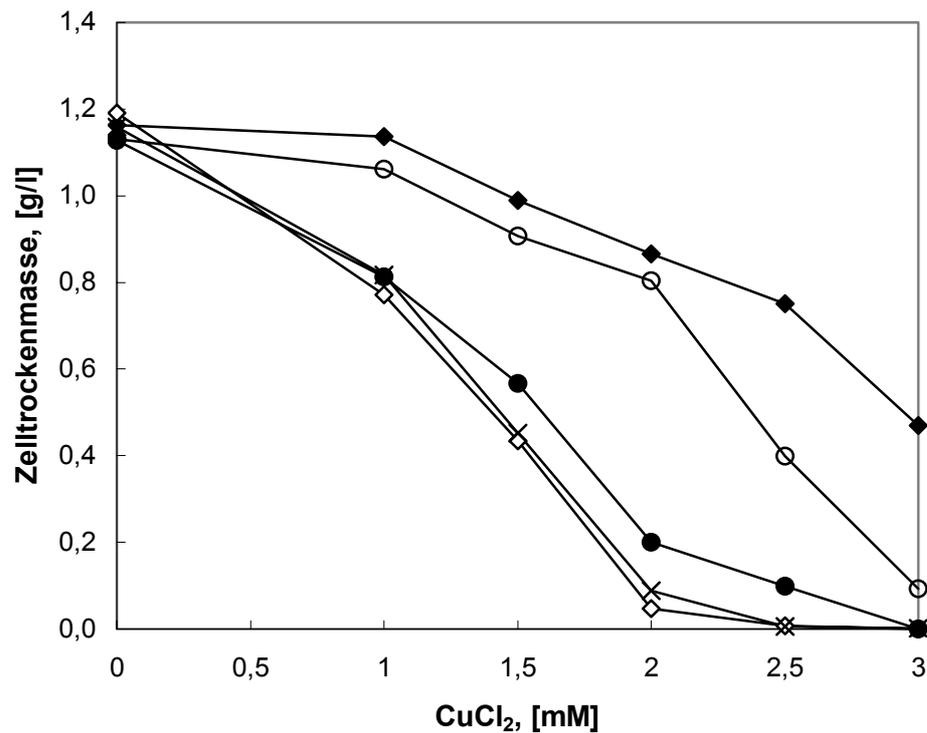


Abb. 4: Einfluss von Kupfer auf das Wachstum von *E. coli* *cus*-Deletionsstämmen.

Übernachtskulturen wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt. Nach Wachstum bei 37°C für 2 h erfolgte eine erneute 1:500 – Verdünnung in LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CuCl₂. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) nach 15 h bei 37°C ermittelt. Die Zelltrockenmasse [g/l] wurde mit Hilfe einer Eichkurve berechnet und der Mittelwert aus drei Messungen gegen die eingesetzte Kupferkonzentration aufgetragen. Die Versuche wurden mit den *E. coli* Stämmen GR1(Δ*cueO*::*cm*) (◆), GR15(Δ*cueO* Δ*cusA*::*cm*) (◇), EC933(Δ*cueO* Δ*cusF*) (○), EC950(Δ*cueO* Δ*cusB*) (×) und EC951(Δ*cueO* Δ*cusC*) (●) durchgeführt.

Analog zur Deletion von *cusB* erfolgte die Deletion des zwischen *cusC* und *cusB* gelegenen Genes *cusF*. Dazu wurden die Primern (Δ*cusF*-P2 und Δ*cusF*-P1, Tab. 3) zur Amplifikation von *cat* vom Plasmid pKD3 genutzt. Der resultierende *E. coli* Stamm EC933(Δ*cueO* Δ*cusF*) (Abb. 2) wurde mittels *Southern*-Hybridisierung auf korrekte Deletion überprüft (Abb. 3C). Die genomische DNA der *E. coli* Stämme GR1(Δ*cueO*::*cm*) und EC933(Δ*cueO* Δ*cusF*) wurde *MunI/PstI* geschnitten und nach Auftrennung im Agarose-Gel und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit der Sonde CUSF-S hybridisiert. Im Doppeldeletionsstamm

EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) war ein um ca. 250 bp verkürztes DNA-Fragment nachweisbar (Abb. 3C).

Die Bestimmung der MIC gegen Kupfer ($CuCl_2$) auf LB-Agar zeigte eine Verminderung der Kupfertoleranz des *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) gegenüber des Ausgangsstammes GR1($\Delta cueO::cm$) (Tab. 4). Dabei war der *cueO cusF*-Doppeldelentionsstamm noch deutlich toleranter gegen Kupfer, als eine Deletion von *cusA* oder *cusB*. Ferner zeigten Wachstumsversuche im Flüssigmedium, dass der *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) in der Lage war bei höheren $CuCl_2$ Konzentrationen zu wachsen als die *E. coli* Stämme GR15($\Delta cueO \Delta cusA$) und EC950($\Delta cueO \Delta cusB$). Doch war der *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) deutlich sensitiver gegenüber Kupfer als *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO::cm$) (Abb. 4). Somit konnte für CusF gezeigt werden, dass es an der Vermittlung der Kupferresistenz beteiligt, wenn auch nicht essentiell ist.

Das Gen *cusC* kodiert für einen *outer membrane factor* als Bestandteil des CBA-Efflux-Komplexes. *Outer membrane* Faktoren bilden eine Pore in der äußeren Membran durch die die Substrate des Transportkomplexes ins Außenmedium gelangen. Um den Einfluss von CusC auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz charakterisieren zu können, wurde *cusC* mit Hilfe des von Datsenko und Wanner (2000) beschriebenen Systems analog *cusB* und *cusF* deletiert. Die korrekte Deletion im resultierenden *E. coli* Stamm EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) (Abb. 2) wurde mittels *Southern*-Hybridisierung überprüft (Abb. 3D). Genomische DNA von *E. coli* Stamm EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) wurde mit *MunI* geschnitten und nach Auftrennung der Fragmente mit der Sonde CUSA-S hybridisiert. Da sich im deletierten Bereich eine *MunI*-Schnittstelle befand, war das nachgewiesenen DNA-Fragment größer als im Kontrollstamm GR1($\Delta cueO::cm$) (Abb. 3D).

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegen Kupfer ergab für *E. coli* Stamm EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) auf LB-Agar 1.75 mM $CuCl_2$ und lag damit deutlich unter der MIC der *E. coli* Stämme GR1($\Delta cueO::cm$) und EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) (Tab. 4). Dennoch war der *E. coli* Stamm EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) toleranter gegenüber Kupfer als die *E. coli* Stämme GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$), GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) oder EC950($\Delta cueO \Delta cusB$). Das deutet darauf hin, dass CusC zwar wichtig, aber nicht essentiell, für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz ist. Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde auch der Deletionsstamm *E. coli* EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) in Wachstumsversuchen im Flüssigmedium eingesetzt. Dabei konnte das Ergebnis der Bestimmung der MIC bestätigt werden (Abb. 4). *E.*

coli Stamm EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) wuchs in LB-Medium mit $CuCl_2$ besser als die Deletionsstämme GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) und EC950($\Delta cueO \Delta cusB$), war aber sensitiver gegenüber Kupfer als der *E. coli* Ausgangsstamm GR1($\Delta cueO::cm$) und der *cusF*-Deletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$).

Es konnte gezeigt werden, dass alle von *cusCFBA* kodierten Gene wichtig für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz waren. Dabei waren CusA, als Cytoplasmamembran-gebundene Komponente des Proteinkomplexes, und das Membranfusionsprotein CusB essentiell. Demgegenüber war nach Deletion von *cusC*, kodiert für den *outer membrane factor* des Transportkomplexes, noch eine geringe Restresistenz erkennbar. Den geringsten Einfluss hatte die Deletion von *cusF*, doch konnte gezeigt werden, dass CusF an der *cus*-vermittelten Kupferresistenz in *E. coli* beteiligt ist.

3.1.3. Immunologischer Nachweis des zentralen Transportproteins CusA in *cus*-Deletionsmutanten

Es konnte gezeigt werden, dass CusA für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz in *Escherichia coli* essentiell war. CusA allein war aber nicht in der Lage, Resistenz zu vermitteln. Für eine weitere Charakterisierung der *cus*-vermittelten Kupferresistenz in *E. coli* wurden weitere *cus*-Deletionsstämme von *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO::cm$) konstruiert. Um zu zeigen, dass das beobachtete Resistenzverhalten der Doppeldeletionsstämme nicht auf polare Effekte zurückzuführen ist, sollte die Expression von *cusA*, dem letzte Gen des *cusCFBA*-Operon immunologisch überprüft werden. Dazu war es notwendig, CusA zu reinigen und polyklonale Antikörper zu generieren.

Von den Komplementationsversuchen der *E. coli* Stämme GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) und GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) lag *cusA* bereits in pASK-IBA3 kloniert vor. Das *cusA*-Gen befand sich unter Kontrolle des Promotors *tetAp*, so dass die Transkription mit dem Induktor Anhydrotetracyclin (AHT) initiiert werden konnte. CusA wurde als C-terminales Fusionsprotein mit dem *StrepTagII* Epitop, „NH₂-WSHPQFEK-COOH“, und acht zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren synthetisiert. Das *StrepTagII* Epitop bindet an das Säulenmaterial, *StrepTactin*-Sephrose, und das Fusionsprotein konnte aus der Membran in einem Reinigungsschritt mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden (Abb. 5).

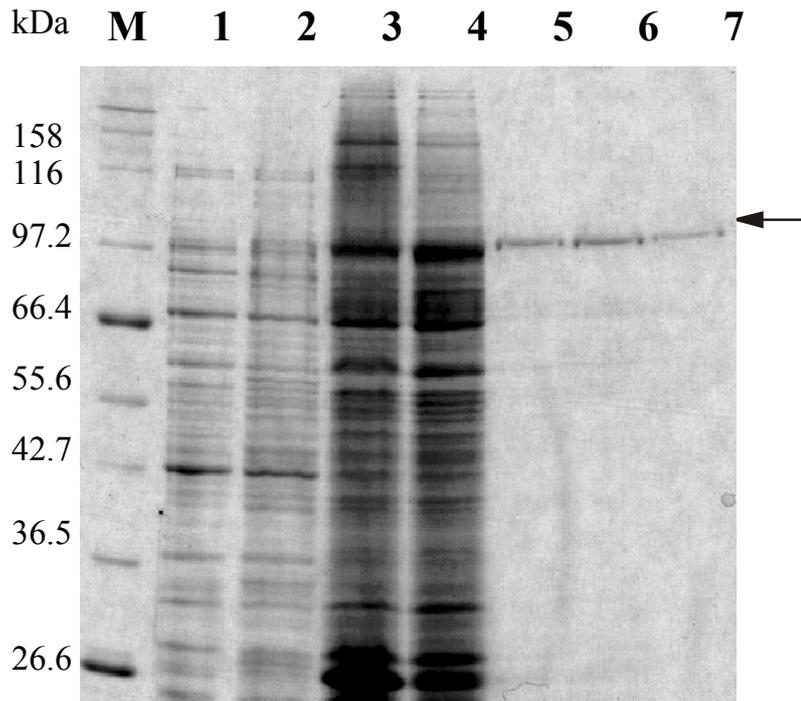


Abb. 5: Reinigungsschema des CusA Proteins in der SDS-PAGE (10 %) nach Laemmli (1970), Coomassie gefärbt.

CusA wurde in *E. coli* Stamm BL21(pLys) als C-terminale *Strep*Tag II-Fusion synthetisiert, aus der Membranfraktion solubilisiert und über *Strep*Tactin-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Aufgetragen sind die Rohextrakte vor (Spur 1) nach (Spur 2) Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin [200 µg/l] (je 25 µg Zelltrockenmasse), jeweils 10 µl der präparierten Membran vor (Spur 3) und nach (Spur 4) Solubilisierung mit N-Laurolylsarcosin und anschließender Ultrazentrifugation sowie Proben der Elutionsfraktionen 2 bis 4 (Spuren 5 – 7) (entspricht ca. 2 bis 4 µg Protein). Der Pfeil kennzeichnet CusA, M die aufgetragenen Markerproteine (#7702, New England Biolabs).

Das gereinigte Protein CusA wurde zur Generierung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen genutzt. Um nachzuweisen, dass die Deletion der Gene *cusC*, *cusF* bzw. *cusB* zu keinen polaren Effekten führte, wurde CusA in den Deletionstämmen mittels Immunoblotting mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 6). Membranpräparationen der *E. coli* Stämme GR1($\Delta cueO::cm$), EC950($\Delta cueO \Delta cusB$), EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) und EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und, nach Transfer auf eine PVDF-Membran, CusA mit CusA-spezifischen polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Da nach Induktion mit $CuCl_2$ CusA im *E. coli* Kontrollstamm GR1($\Delta cueO::cm$) und den Deletionstämmen EC933($\Delta cueO \Delta cusF$), EC950($\Delta cueO \Delta cusB$) und EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) nachgewiesen werden konnte, konnten polare Effekte durch die Deletionen ausgeschlossen werden.

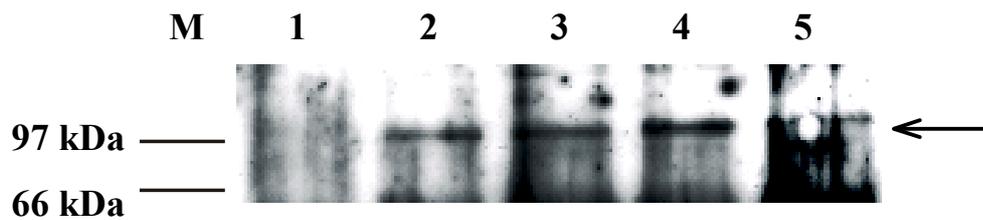


Abb. 6: Nachweis von CusA mittels Immunoblotting in verschiedenen *E. coli cus*-Deletionsstämmen.

Die *E. coli* Stämme GR1($\Delta cueO::cm$) (Spuren 1 und 2), EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) (Spur 3), EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) (Spur 4) und EC950($\Delta cueO \Delta cusB$) (Spur 5) wurden in LB-Medium angezogen und für 30 min mit 1.5 mM $CuCl_2$ (Spuren 2, 3, 4, 5) oder ohne Metall (Spur 1) inkubiert. Nach Präparation der Membranen wurden diese in einer SDS-PAGE separiert und nach Transfer auf eine PVDF-Membran CusA immunologisch mit CusA-spezifischen polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. M kennzeichnet Markerproteine.

3.2. Funktionelle Analyse des zentralen Transportproteins CusA

Proteine der RND-Familie, wie CusA, besitzen zwölf Transmembran-Durchgänge (TMH) und zwei große hydrophile Domänen, die nach Topologieuntersuchungen an anderen Vertretern dieser Proteinfamilie (Goldberg *et al.*, 1999; Gotoh *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 1999; Fujihira *et al.*, 2002), im Periplasma lokalisiert sind. Der N- und der C-Terminus der RND-Proteine befinden sich im Cytoplasma. Auf dieser Grundlage und anhand einer Topologievorhersage über das Internetprogramm SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) konnte für CusA ein Topologiemodell erstellt werden (Abb. 7). Auch CusA verfügt über 12 Transmembran-Durchgänge die durch fünf cytoplasmatische und sechs periplasmatische *loops* verbunden sind. Die beiden großen hydrophilen Domänen zwischen TMH I und II sowie zwischen TMH VII und VIII sind im periplasmatischen Raum lokalisiert.

3. Ergebnisse

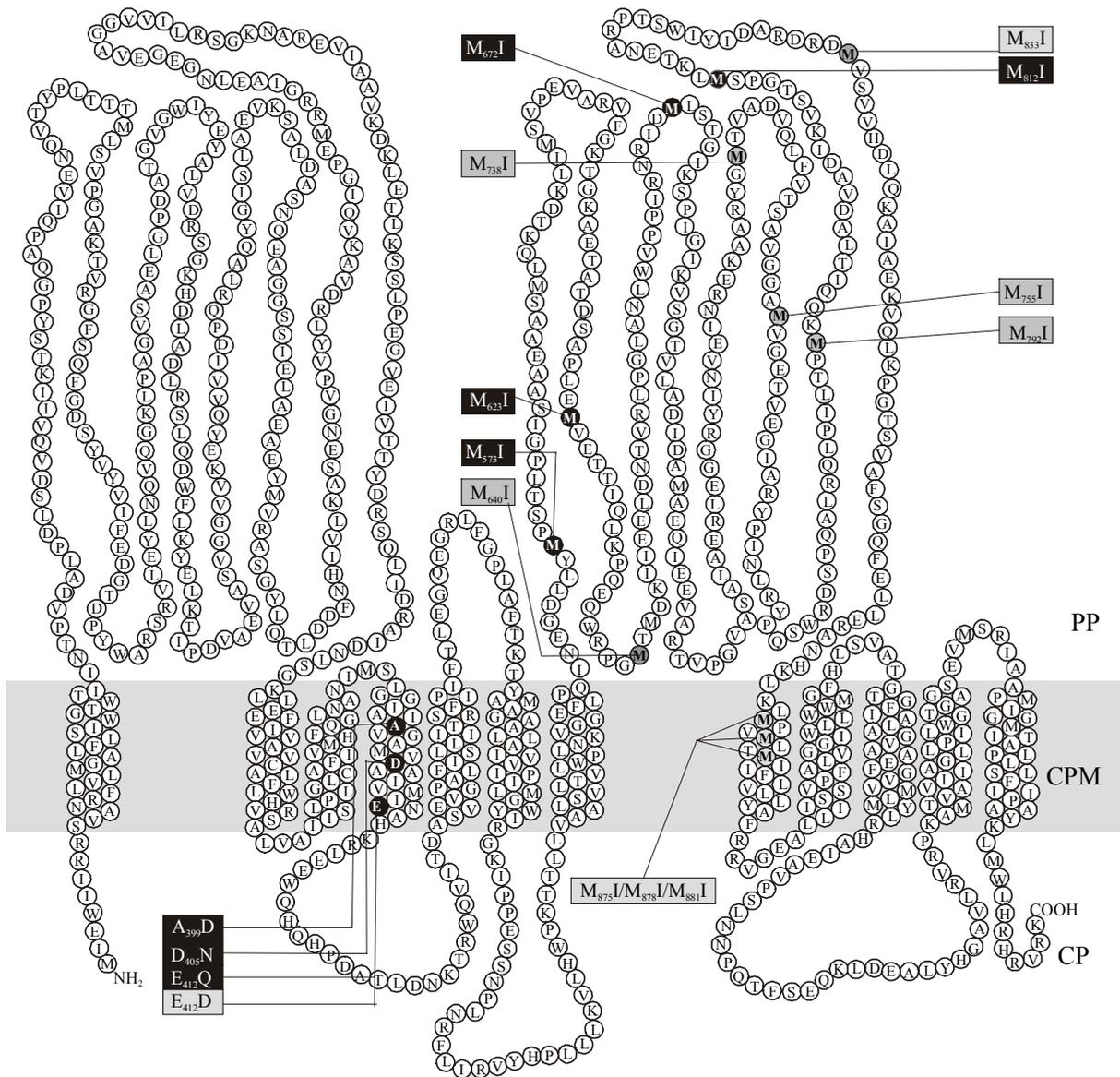


Abb. 7: Zweidimensionales Topologiemodell von CusA.

Das Modell der Membrantopologie von CusA wurde anhand der bekannten Topologien von CzcA, AcrB, MexB und MexD sowie nach der Topologievorhersage des Internetprogrammes SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) erstellt. Die Aminosäuresequenz ist durch Kreise dargestellt in die der Ein-Buchstaben-Code eingetragen wurde. CPM kennzeichnet die Cytoplasmamembran, CP das Cytoplasma und PP den periplasmatischen Raum. Durch *Quick-Change*-Mutagenese veränderte Aminosäuren sind gekennzeichnet und die eingeführten Aminosäureaustausche angegeben. Dabei kennzeichnet **schwarz auf grauem** Grund Aminosäureaustausche, die keinen Einfluss auf die *cus*-vermittelte Resistenz hatten, während **weiß auf schwarzem** Grund die Mutationen angibt, die zu Verlust bzw. zu einer Verminderung der Resistenz führten.

3. Ergebnisse

Für die Kupfer-Detoxifikation über den CusCBA-Komplex werden zwei Wege postuliert, ein Transport der Kupferionen aus dem Cytoplasma über beide Membranen (*Transenvelope-Transport*) (Saier *et al.*, 1994) bzw. eine Entgiftung des Periplasmas (Grass und Rensing, 2001a). Um die Theorie der Entgiftung des periplasmatischen Raumes zu untersuchen, sollten mögliche periplasmatische Kupferbindestellen identifiziert und ihr Einfluss auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz charakterisiert werden.

In der zweiten periplasmatischen Domäne von CusA ist eine Vielzahl von Methioninresten vorhanden. Methioninreste wurden als Liganden für die extrazelluläre Bindung des Kupfers an spezifische Kupfer-Transporter identifiziert (Puig *et al.*, 2002). Vergleiche der Aminosäuresequenz der zweiten periplasmatischen Domäne, zwischen den TMH VII und VIII, von CusA mit SilA (Gupta *et al.*, 1999), der Sequenz zweier hypothetischer Proteine CusA(709) und CusA(619) von *Ralstonia metallidurans* CH34 (http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html) (Gene 3646 und 8739 auf den Contigs 709 und 619) und dem Genprodukt des *orfF* aus *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Gene Bank accession number AB044351; Nakajima, 2000) zeigten, dass einige der Methioninreste (M₅₇₃, M₆₂₃, M₆₄₀, M₆₇₂ und M₈₁₂) von CusA auch in den anderen vier Proteinen bzw. zwischen CusA und SilA (M₇₃₈, M₇₅₅, M₇₉₂, M₈₃₃ von CusA) konserviert sind (Abb. 9). Neben diesen einzelnen konservierten Resten konnte in der postulierten Transmembran-Helix VIII, nach der zweiten periplasmatischen Domäne, ein Motiv (M₈₇₅XXM₈₇₈XXM₈₈₁) identifiziert werden, dass Ähnlichkeit zu beschriebenen extrazellulären Kupferbindemotiven (Zhou und Thiele, 2001; Puig *et al.*, 2002). aufweist. Auch dieses Motiv ist zwischen CusA und SilA konserviert (Abb. 8).

```

CusA_EC      LVAALSVLTVLWPLNKGGEFLPQINEGDLLYMPSTLPGISAAEAASMLQKTDKCLIMSVP 600
Sila_ST      LVAALSIFTVVWPLSQVGGEFLLPKINEGDLLYMPSTLPGVSPAEEAALLQTTDKLIKSV 600
CusA(709)_RM ALAGVLLVATAWPI MRTGGEFMPPLDEGDLLYMP S ALPGLAAGKASQLLQQTDRLIKTV 600
CusA(619)_RM ALAVVALVATAWPI MRIGGEFMPPLDEGDLLYMP S ALPGLSAGKAAQLLQQTDRLIKSV 600
ORFF_PS      LIAALVFLSTLWPLSRLGGEFLPQMDEGDLLYMP S ALPGLSASKASQLLQLTDRMILTVP 600
              *:  :  .:.  **:  :  *****:  :*****:*****:..*:  **:  ***:  :**

CusA_EC      EVARVFGKTGKAETATDSAPLEMVETTIQLKPEQWRPGMTMDKII EELDNTVRLPGLAN 660
Sila_ST      EVASVFGKTGKAETATDSAPLEMVETTIQLKPEDQWRPGMTIDKII EELDRTVRLPGLAN 660
CusA(709)_RM EVASVFGKAGRADSATDPAPIEMFETTIRFKPKDQWRPGMTTDKLV EELDRIVKVPGLSN 660
CusA(619)_RM EVATVQGKAGRADSATDPAPLEMVETTIQFKPRDQWRPGMTPDKLV EELDRVVKIPGLSN 660
ORFF_PS      EVDRVFGKAGRADSATDPAPLEMVETTIRFKPKQWRAGMTPEKLI EALDKAVQVPGLSN 660
              **  *  ***:  :**  .***:  :***  .***:  :***  .***  .***  :***:  **  .  ***:  :**

```

3. Ergebnisse

CusA_EC	LWVPPIRNRID <u>ML</u> STGIKSPIGIKVSGTVLADIDAMAEQIEEVARTVPGVASALAERLEG	720
Sila_ST	LWVPPIRNRID <u>ML</u> STGIKSPIGIKVSGTVLSDIDATAQSIEAVAKTVPGVSVLAERLEG	720
CusA(709)_RM	IWVPPIRNRID <u>ML</u> ATGIKSPVGIKVAGTDLKEIDRLATRIEEAVKTVPGVTSALAERLTG	720
CusA(619)_RM	IWVPPIRNRID <u>ML</u> ATGIKSPVGIKVAGTDLKEIDRLATRIEEAVKPVPGVTSALAERLTG	720
ORFF_PS	IWVPPIRNRID <u>ML</u> ATGVKSPVGIKVAGTSLAQIDQATQQIEAVAKQVAGVQSALAERLTG :*****:*:*:*:*:*:*:* * :* * : * * . : * . * * * . * * * * *	720
CusA_EC	GRYINVEINREKAARYG <u>MT</u> VADVQLFVTSAVGGAM <u>V</u> GETVEGIARYPINLRYPSWRDSP	780
Sila_ST	GRYIDIDINREKASRYG <u>MT</u> VGDVQLFVSSAIGGAM <u>V</u> GETVEGVARYPINIRYPQDYRNSP	780
CusA(709)_RM	GRYIDVDIDRAAAGRYGLNIEDVQSIVSSAIGGETVGEVVDGLARFPINVRYPRDDRDSI	780
CusA(619)_RM	GRYIDVDIDRAAAGRYGLNIGDVQAVSSAIGGENIGEVVDGLARYPINVRYPRDYRDSV	780
ORFF_PS	GRYVDVRIINRQAARYGMNISDVQAVVSSAIGGSNIGEVVEGLARYPINLRYGREWRDTA * * * : : * : * * . * * * : . : * * * . * : . * * * * : * * . * * * * : * * * * * : . * : :	780
CusA_EC	QALRQLPILTP <u>MK</u> QQITLADVADIKVSTG <u>PSML</u> KTENARPTSWIYIDARDRDM <u>VS</u> VVHDL	840
Sila_ST	QALKQMPILTP <u>MK</u> QQITLGDVADINVVSGPT <u>ML</u> KTENARPASWIYVDARGRDM <u>VS</u> VVNDI	840
CusA(709)_RM	DALRRLPIVTDSGLQIALADVARIITVMQGP <u>PM</u> LRSENARLSGWVYVDIRGRDLRSTVRDM	840
CusA(619)_RM	EQLRSLPIVTDGQQIVLSDVARIIRVEQGP <u>PM</u> LRSENARLSGWIYVDIRGRDLRSAVRDM	840
ORFF_PS	QALKGLPVVTSSGQQITLSMVADVSIITDG <u>PPML</u> RSENGRLSGWVYVDVRGRDLATTVKEL : * : : * : * * . * . * * : : * * . * * : * * . * : . * * * * : . * . : :	840
CusA_EC	QKAIAEKVQLKPGT <u>SVAF</u> SGQFELLERANHK <u>LKL</u> <u>MVP</u> MTLMIIIFVLLYLAF	891
Sila_ST	KTAISEKVKLRPGT <u>SVAF</u> SGQFELLEHANK <u>LKL</u> <u>MVP</u> MTVMIIIFILLYLAF	891
CusA(709)_RM	QAAVAKAVPMPAGYALSWSGQFEYLERATAKLVVVPFTLLIIIFVLLYLVF	891
CusA(619)_RM	QAAVSKAVPMPAGYLSWSGQFEYLERAAAKMKVVVPFTLLIIIFVLLYLVF	891
ORFF_PS	QTQIASRVQLAPGLTVSYSGQFEYLERANQRLLWVIPATLAIIFVLLYFTF : . : * : . * : : : * * * * * * * * * * : : : * * : * * * * * : . * :	891

Abb. 8: Sequenz-Alignment von CusA mit verwandten Proteinen.

Dargestellt ist ein *Alignment* von CusA von *E. coli* [CusA_EC] mit verwandten Proteinen von Aminosäure 541 bis 891. Dies umfasst laut Topologievorhersagen die Membrandurchgang VII und VIII einschließlich der zweiten periplasmatischen Domäne von CusA (TMH von CusA sind unterstrichen). Dargestellt sind außerdem SilA (*Salmonella enteritica* pv. *typhimurium* pMG101) [Sila_ST], zwei hypothetischen Proteinen von *Ralstonia metallidurans* CH34 (Contig 619 Produkt des Genes 3646) [CusA(619)_RM] (Contig 709 Produkt des Genes 8739) [CusA(709)_RM] sowie dem Genprodukt des *orfF* von *Pseudomonas syringae* [ORFF_PS].

Identische (⊖) und ähnliche (· und :) Aminosäuren sind unterhalb der Sequenz von ORFF gekennzeichnet. Methioninreste, die zwischen allen fünf Proteinen konserviert sind, sind im **Fettdruck** dargestellt. Konservierte Methioninreste zwischen CusA und SilA, sowie das Motiv M₈₇₅XXM₈₇₈XXM₈₈₁, sind grau unterlegt

In anderen, für die Resistenz gegenüber divalenten Kationen beschriebenen RND-Proteinen wie CzcA (Gene Bank accession number P13511; Nies *et al.*, 1989), CnrA (G47056; Liesegang *et al.*, 1993) von *Ralstonia metallidurans* CH34 und NccA (I395580; Schmidt und Schlegel, 1994) von *Achromobacter xylosoxidans* 31A zeigte, dass diese Methioninreste in

diesen Proteinen nicht vorhanden waren (Ergebnis nicht gezeigt). Möglicherweise könnten diese Aminosäurereste für die Funktion von CusA im Kupfer- / Silber-Transport wichtig sein.

3.2.1. Methioninreste M₅₇₃, M₆₂₃, M₆₇₂ und M₈₁₂ sind wichtig für die Funktion des CusA-Proteins

Um den Einfluss der konservierten Methioninreste von CusA auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz in *Escherichia coli* zu untersuchen, wurden die Methioninereste von CusA, die auch in den anderen RND-Proteinen (SilA, CusA(709), CusA(619) und ORFF) vorhanden waren, mittels *Quick-Change-Mutagenesis* PCR (mit pECD738 als *Template* und den in Tab. 3 angegebenen Primern) zu Isoleucin umgewandelt. Die Überprüfung der Mutationen erfolgte mittels Sequenzierung. Die mutierten *cusA*-Gene wurden im *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) exprimiert und die Expression mittels Immunoblotting nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente das von pECD738 kodierte CusA Wildtypprotein. Die Expressionsrate der Mutantenproteine von CusA war vergleichbar mit der Positivkontrolle (Abb. 9D bzw. Daten nicht gezeigt).

Alle Derivate von CusA wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, den Phänotyp von *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) zu komplementieren. Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration gegen CuCl₂ auf LB-Agar ergab zwei Typen von Mutationen (Tab. 5). Der Austausch der Methioninreste M₅₇₃, M₆₂₃ oder M₆₇₂ zu Isoleucin führte zu inaktiven Mutantenproteinen. Dabei handelte es sich um drei der fünf Methioninreste, die in CusA, SilA, den beiden hypothetischen Proteinen aus *Ralstonia metallidurans* CH34 und dem Genprodukt des *orfF* von *Pseudomonas syringae* konserviert waren (Abb. 8).

Demgegenüber hatten die Einzelmutationen M₆₄₀I, M₈₁₂I, M₇₃₈I, M₇₅₅I, M₇₉₂I oder M₈₃₃I sowie die Dreifach-Mutation M₈₇₅I/M₈₇₈I/M₈₈₁I keinen oder nur einen minimalen Einfluss auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz. Die MIC gegen CuCl₂ zeigte bei Synthese dieser Mutantenproteine von CusA im *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) keinen oder nur einen minimalen Unterschied zur Positivkontrolle (Tab. 5). Der Austausch der Methionine M₆₄₀ oder M₈₁₂ zu Isoleucin hatte keinen Einfluss auf die Kupferresistenz, obwohl diese Methioninreste zwischen allen fünf untersuchten Proteinen konserviert waren. Die anderen Methioninreste sowie das Motiv (M₈₇₅XXM₈₇₈XXM₈₈₁) sind nur zwischen CusA und SilA konserviert und für die Funktion von CusA wahrscheinlich nicht wichtig.

3. Ergebnisse

Tabelle 5: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) von Kupfer in *Escherichia coli* - Derivaten mit Mutationen in *cusA* ^{a)}

Stamm / Plasmid	Relevanter Genotyp	MIC, [mM] CuCl ₂
GR1	$\Delta cueO::cm$	3.25
GR15 (pASK-IBA3)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm$	1.5
GR15 (pECD738)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ in trans	2.75
<u>Mutationen in der zweiten periplasmatischen Domäne</u>		
GR15 (pECD740)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₆₂₃ I) in trans	1.25
GR15 (pECD742)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₆₇₂ I) in trans	1.25
GR15 (pECD739)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₅₇₃ I) in trans	1.5
GR15 (pECD743)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₈₁₂ I) in trans	2.5
GR15 (pECD745)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₇₅₅ I) in trans	2.5
GR15 (pECD747)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₈₃₃ I) in trans	2.5
GR15 (pECD748)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₈₇₅ I/M ₈₇₈ I/M ₈₈₁ I) in trans	2.5
GR15 (pECD741)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₆₄₀ I) in trans	2.75
GR15 (pECD744)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₇₃₈ I) in trans	2.75
GR15 (pECD746)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA M ₇₉₂ I) in trans	2.75
<u>Mutationen in der TMH IV</u>		
GR15 (pECD768)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA D ₄₀₅ N) in trans	1.5
GR15 (pECD769)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA E ₄₁₂ Q) in trans	1.5
GR15 (pECD767)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA A ₃₉₉ D) in trans	1.75
GR15 (pECD770)	$\Delta cueO \Delta cusA::cm, cusA$ (CusA E ₄₁₂ D) in trans	2.5

^{a)} Die Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 37°C für 16 h mehr sichtbar war. Übernachtkulturen der Stämme wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt. Nach Wachstum für 2 h bei 37°C erfolgte der Ausstrich auf LB-Agar mit CuCl₂. Jede Bestimmung wurde mehrfach mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Der LB-Agar für die Komplementationsexperimente wurde der künstliche Induktor AHT [200 µg/l] zur Expression des unter Kontrolle des Promotors *tetAp* stehenden *cusA* zugesetzt.

3. Ergebnisse

Um die Ergebnisse der Bestimmung der MIC gegen Kupfer zu verifizieren, wurden Wachstumsversuche in Flüssigmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an CuCl_2 durchgeführt. Dabei konnte die Wichtigkeit der Methioninreste M_{573} , M_{623} und M_{672} bestätigt werden. Nach Expression dieser Derivate von CusA, CusA M_{573}I (pECD739), CusA M_{623}I (pECD740) oder CusA M_{672}I (pECD742), in *E. coli* Stamm GR15($\Delta\text{cueO } \Delta\text{cusA}::\text{cm}$) zeigte sich keinen Unterschied im Wachstumsverhalten mit CuCl_2 im Vergleich zur Negativkontrolle (GR15 mit pASK-IBA3) (Abb. 9A). Auch die Ergebnisse der Einzelmutationen CusA M_{640}I (pECD741), CusA M_{738}I (pECD744), CusA M_{755}I (pECD745), CusA M_{792}I (pECD746) oder CusA M_{833}I (pECD747) sowie der Dreifach-Mutation CusA $\text{M}_{875}\text{I}/\text{M}_{878}\text{I}/\text{M}_{881}\text{I}$ (pECD748) konnten in Wachstumsversuchen in Flüssigmedium bestätigt werden (Abb. 9B bzw. Daten nicht gezeigt).

Ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zwischen Flüssig- und Festmedium konnte mit dem Mutantenprotein CusA M_{812}I (pECD743) beobachtet werden. Der *E. coli* Stamm GR15($\Delta\text{cueO } \Delta\text{cusA}::\text{cm}$) mit pECD743 (CusA M_{812}I) verhielt sich auf Festmedium ähnlich der Positivkontrolle, während der Stamm im Flüssigmedium mit CuCl_2 ein zu Positiv- und Negativkontrolle intermediäres Wachstum aufwies (Abb. 9C).

Diese Ergebnisse zeigten, dass einige der konservierten Methioninreste der zweiten großen periplasmatischen Domäne von CusA wichtig für die Funktion des Proteins sind. Möglicherweise sind diese Methioninreste an der Bindung des Metalls beteiligt. Demgegenüber scheinen andere, ebenfalls konservierte, Methioninreste für die Resistenzvermittlung nicht wichtig zu sein.

3. Ergebnisse

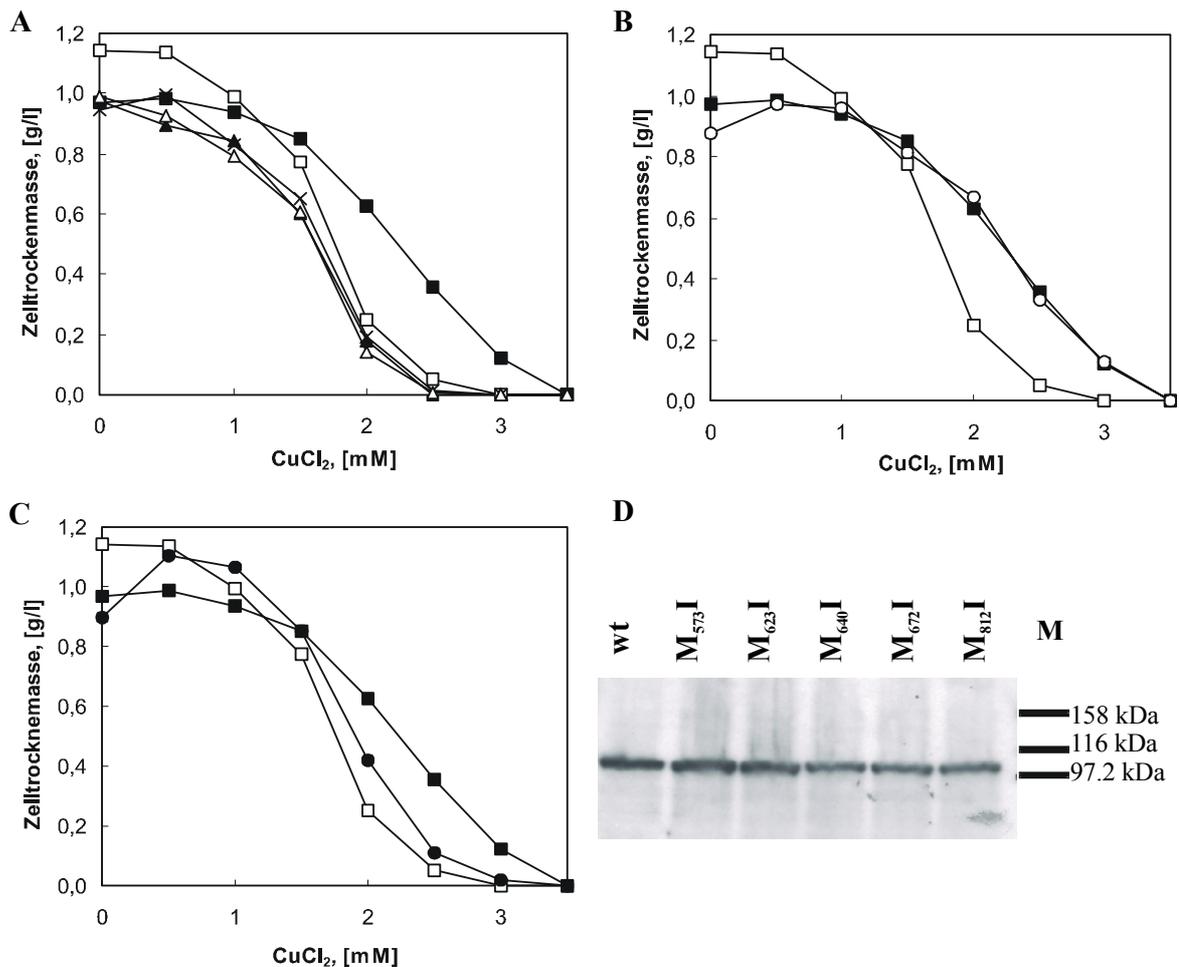


Abb. 9: Einfluss von Aminosäureaustauschen in der zweiten periplasmatischen Domäne von CusA auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz und Nachweis der Mutantenproteine.

Einfluss der Methioninreste der zweiten periplasmatischen Domäne auf das Wachstumsverhalten in Anwesenheit von CuCl₂. Übernachtskulturen wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Verdünnung (1:500) in LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CuCl₂. Das Zellwachstum wurde als optische Dichte (OD₆₀₀) nach 15 h bei 37°C ermittelt. Die Zelltrockenmasse [g/l] wurde mit Hilfe einer Eichkurve kalkuliert und gegen die eingesetzte Konzentration an CuCl₂ aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen. Als Kontrollen dienen die *E. coli* Stämme GR15(Δ *cueO* Δ *cusA*::*cm*) (pASK-IBA3) (□) und GR15(Δ *cueO* Δ *cusA*::*cm*) (pECD738) (■) (Teilabbildungen A, B, C).

- A) Einfluss der Aminosäureaustausche CusA M₅₇₃I [GR15(pECD739)] (▲), CusA M₆₂₃I [GR15(pECD740)] (×) und CusA M₆₇₂I [GR15(pECD742)] (△) auf das Wachstum von *E. coli* Stamm GR15(Δ *cueO* Δ *cusA*::*cm*) mit *cusA* *in trans*.
- B) Einfluss des Aminosäureaustausches CusA M₆₄₀I [GR15(pECD741)] (○) auf das Wachstum von *E. coli* Stamm GR15(Δ *cueO* Δ *cusA*::*cm*) mit *cusA* *in trans*.
- C) Einfluss des Aminosäureaustausches CusA M₈₁₂I [GR15(pECD743)] (●) auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* Stamm GR15(Δ *cueO* Δ *cusA*::*cm*) mit *cusA* *in trans*.
- D) Immunologischer Nachweis der CusA-Mutanten M₅₇₃I, M₆₂₃I, M₆₄₀I, M₆₇₂I und M₈₁₂I. 50 µg (Trockengewicht) Zellen wurden nach Expression der *cusA*-Derivate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden CusA immunologisch mit Hilfe von *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen und mittels ECL visualisiert.

3.2.2. Aminosäurereste der Transmembran-Helix IV sind wichtig für die Funktion von CusA

In der Transmembran-Helix IV von CusA konnten geladene Aminosäurereste identifiziert werden (Abb. 7), die auch in anderen Vertretern der RND-Proteinfamilie konserviert sind. Für CzcA, dem zentralen Transportprotein der *czc*-vermittelten Cobalt-, Zink-, Cadmiumresistenz von *Ralstonia metallidurans* CH34 konnte ein Einfluss dieser Aminosäurereste auf die vermittelte Resistenz gezeigt werden (Goldberg *et al.*, 1999). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Transmembran-Helix IV von CzcA mit CusA (Abb. 10) zeigte, dass zwei der geladenen Aminosäuren (D₄₀₈ und E₄₁₅ von CzcA) auch in CusA konserviert sind (D₄₀₅ und E₄₁₂). Anstelle des D₄₀₂ von CzcA befindet sich in CusA an Position 399 ein Alaninrest. Über *Quick-Change-Mutagenesis* PCR bzw. *Overlap-Extension-PCR* wurden die Basenaustausche G₆₇₀₃A (CusA D₄₀₅N), C₆₇₂₄G, (CusA E₄₁₂Q), G₆₇₂₆T, (CusA E₄₁₂D) und C₆₆₈₆A, (CusA A₃₉₉D) in *cusA* eingeführt. Die Mutationen in den resultierenden Plasmiden wurden durch Sequenzierung überprüft und die Expression immunologisch nachgewiesen (Abb. 11D). Alle Mutantenproteine von CusA wurden in ähnlicher Menge wie das Wildtyp-Protein gebildet, so dass beobachtete Veränderungen im Wachstumsverhalten nicht auf eine verminderte Synthese oder Abbau der Mutantenproteine zurückzuführen sind. Die *cusA*-Derivate wurden in *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) transformiert und das Wachstum der Stämme in Anwesenheit von Kupfer untersucht.

```

CusA          393  LGGIAI AVGAMVDAAIVMIENAH 415
CzcA          398  LG--ALDFGIIIDGAVVIVENCV 418
                **   *:  . *  : : * . * : * : * : * * .

```

Abb. 10: Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenz der TMH IV von CusA und CzcA.

Dargestellt ist der Vergleich der Aminosäuresequenz der Transmembran-Helix IV von CusA (*E. coli*) und CzcA (*R. metallidurans* CH34). „★“ kennzeichnet identische, „:“ und „·“ ähnliche Aminosäurereste. Die konservierten geladenen Aminosäurereste sind im **Fett**druck, das A₃₉₉ von CusA und das entsprechende D₄₀₂ von CzcA *kursiv* dargestellt.

3. Ergebnisse

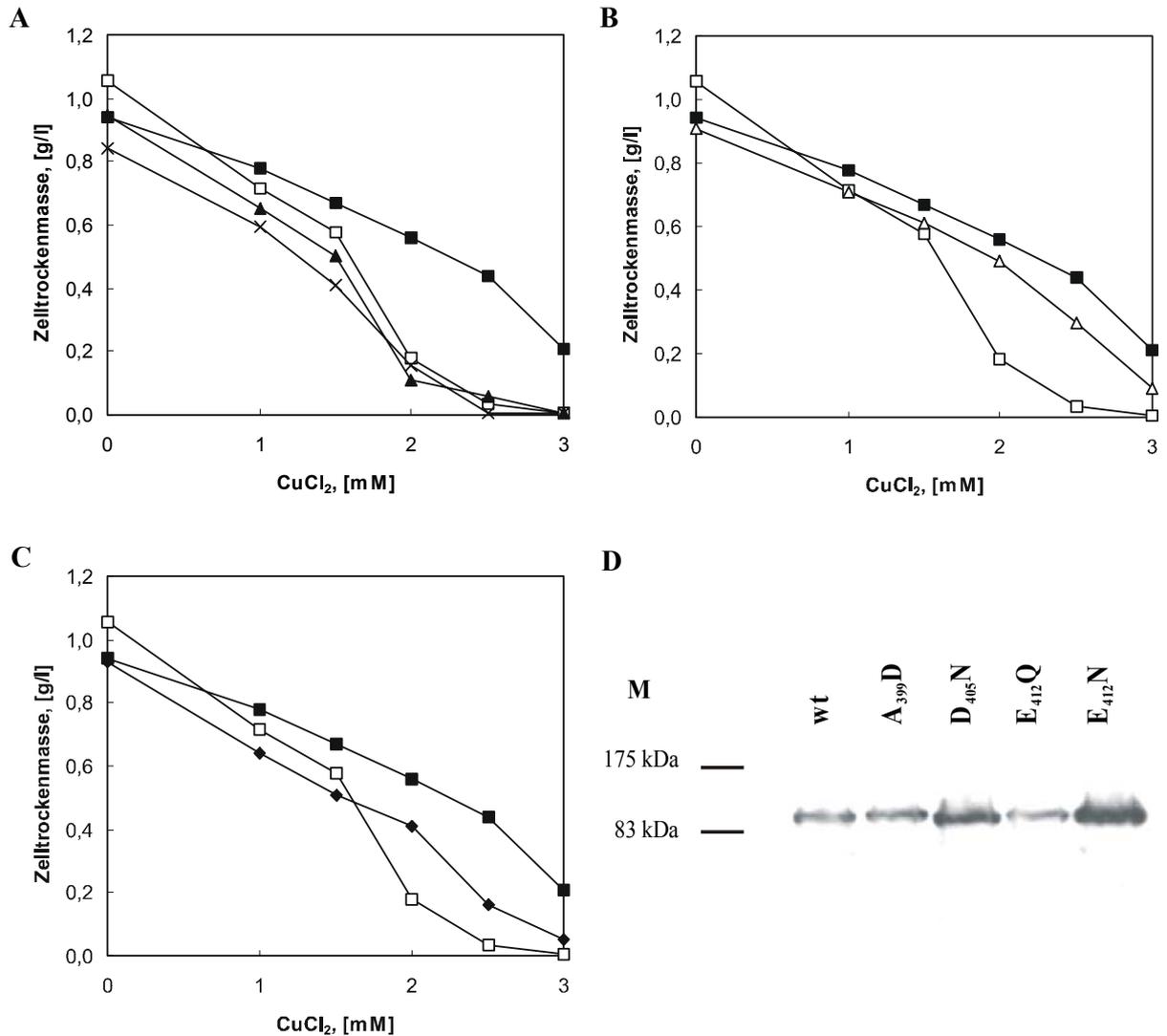


Abb. 11: Nachweis von Derivaten von CusA mit Austausch von Aminosäureresten in der Transmembran-Helix IV und Ihr Einfluss auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz.

Übernachtskulturen wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine erneute 1:500 – Verdünnung in LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CuCl₂. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) nach 15 h bei 37°C ermittelt. Das Verhältnis Zelltrochkenmasse/Volumen wurde mit Hilfe einer Eichkurve berechnet und gegen die eingesetzte Konzentration an CuCl₂ aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen. In allen drei Diagrammen dienen als Negativ- und Positivkontrolle die *E. coli* Stämme GR15(Δ*cueO* Δ*cusA*::cm) (pASK-IBA3) (□) und GR15(Δ*cueO* Δ*cusA*::cm) (pECD738) (■).

- A) *E. coli* Stamm GR15 mit *cusA*, CusA D₄₀₅N (▲) und E₄₁₂Q (×), *in trans*.
- B) *E. coli* Stamm GR15 mit *cusA*, CusA E₄₁₂D (Δ), *in trans*.
- C) *E. coli* Stamm GR15 mit *cusA*, CusA A₃₉₉D (◆), *in trans*.
- D) Immunologischer Nachweis von CusA-Derivaten mit Aminosäureaustauschen in der Transmembran-Helix IV. 50 µg (Trockengewicht) Zellen nach Expression der *cusA*-Derivate einer in SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, mittels *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugat immunologisch nachgewiesen und mittels ECL visualisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein geladener Aminosäurereste in der Transmembran-Helix IV an den Positionen 405 und 412 für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz notwendig war. Die Mutationen CusA D₄₀₅N (pECD768) und E₄₁₂Q (pECD769) führten zum vollständigen Verlust der Fähigkeit der Komplementation des *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) (Tab. 5; Abb. 11A). Wurde der Glutaminsäurerest E₄₁₂ zu Asparaginsäure umgewandelt (pECD770), hatte das nur eine minimale Verminderung der Resistenz bei *in trans* Komplementation des *E. coli* Stamm GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) zur Folge (Tab. 5, Abb. 11B). Die Einführung einer zusätzlichen Ladung durch Austausch des Alaninrestes A₃₉₉ zu dem an dieser Position in CzcA vorhandenen Asparaginsäurerest, pECD767(CusA A₃₉₉D), führte zu einem intermediären Wachstumsverhalten (Tab. 5, Abb. 11C).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die geladenen Aminosäurereste in der Transmembran-Helix IV wichtig für die Funktion von CusA sind. Die Einführung einer zusätzlichen negativen Ladung, wie sie in Transportern divalenter Kationen zu finden ist, führte zur Verminderung der *cus*-vermittelten Kupferresistenz.

3.3. Charakterisierung des neuartigen Proteins CusF

3.3.1. Der Carboxy-Terminus von CusF ist im Periplasma lokalisiert

Für *cusF* konnte eine Beteiligung an der *cus*-vermittelten Resistenz gegen Kupfer in *E. coli* gezeigt werden. Welche Rolle das Protein aber dabei spielt, war weiterhin unbekannt. Um ihm eine Funktion bei der Kupferentgiftung zuordnen zu können, galt es als erstes die Frage der Lokalisation von CusF zu klären. Sequenzanalysen von CusF postulierten eine *leader*-Sequenz und somit periplasmatische Lokalisation des Proteines (Abb. 12).

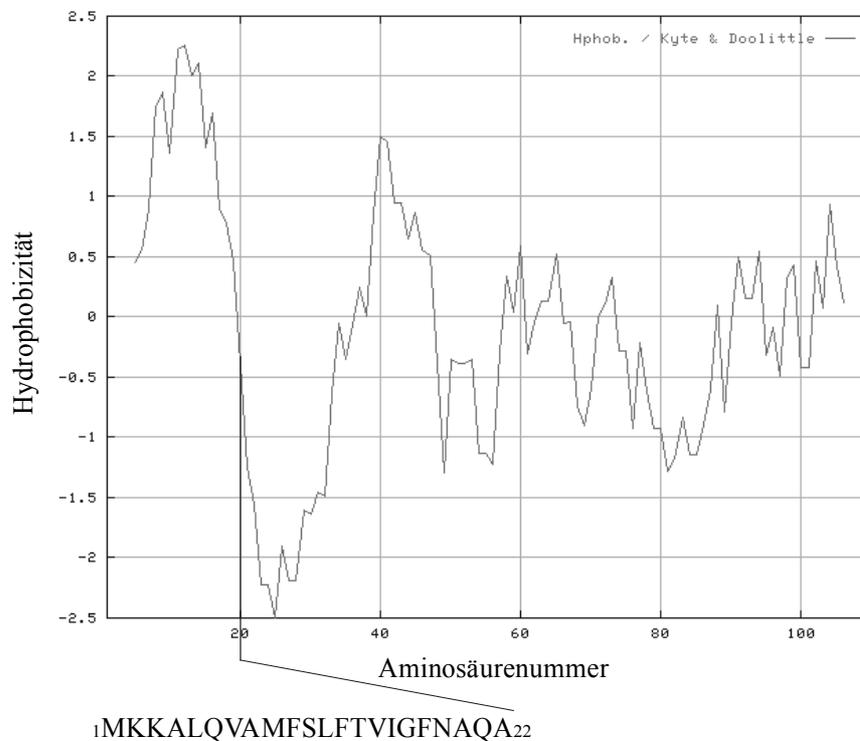


Abb. 12: Hydrophobie-Profil von CusF nach Kyte und Doolittle (1982).

Das Hydrophobie-Profil von CusF wurde über (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) erstellt. Die Hydrophobie ist als Funktion der Aminosäureposition dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren positive Werte. Mit angegeben ist die Aminosäuresequenz des nach dem Internetprogramm SOSUI (http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosuisignal/sosuisignal_submit.html) postulierten periplasmatischen *leaders*.

3. Ergebnisse

Um dies nachweisen zu können, wurde *cusF* vor das Gen der Alkalischen Phosphatase (AP) (*'phoA* ohne *leader*) kloniert. CusF wird so als C-terminales Fusionsprotein mit *'PhoA* synthetisiert. Die Alkalische Phosphatase ist nur im Periplasma aktiv. Da das *'phoA*-Gen ohne eigenen *leader* kloniert wurde, war seine Lokalisation abhängig von der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins, CusF. Das *cusF*-Gen wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *E. coli* Stamm W3110 amplifiziert (Primer: topo *agrF-KpnI* + topo *agrF-XbaI*) und in pECD637 kloniert. Das entstandene Plasmid pECD749 sowie die beiden Kontrollplasmide pECD618 (*'phoA* ohne *leader*, Negativkontrolle) und pECD619 (*'phoA* mit *leader*, Positivkontrolle) wurden in den *Escherichia coli* Stamm CC118, der für keine eigene Alkalische Phosphatase kodiert, transformiert. Der Enzymtest zeigte für die CusF-*'PhoA* – Fusion eine ca. 30-fach höhere Enzymaktivität als die Negativkontrolle, PhoA im Cytoplasma. Selbst im Vergleich zur Positivkontrolle, PhoA im Periplasma, lag eine höhere Aktivität vor (Tab. 6). Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von CusF periplasmatisch lokalisiert ist.

Tabelle 6: Untersuchung der Topologie des C-terminus von CusF mittels Reportergenfusion

Plasmid	Relevanter Genotyp	Spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) ^{a)} , [U/mg Trockengewicht]
pECD749	<i>cusF-'phoA</i>	116.3 ± 69.00
pECD618	Negativkontrolle der AP (cytoplasmatische Lokalisation)	4.31 ± 1.31
pECD619	Positivkontrolle der AP (periplasmatische Lokalisation)	53.2 ± 4.55

^{a)} Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Messungen.

3.3.2. Reinigung von CusF

3.3.2.1. Reinigung von CusF als Fusionsprotein mit Intein und Chitin-Binde-Domäne

Für eine weitergehende Charakterisierung sollte CusF überexprimiert und gereinigt werden. Hierfür wurde das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* (NEW ENGLAND

BioLabs GmbH, Schwallbach im Taunus) gewählt. Dabei wird das gewünschte Protein als C-terminales Fusionsprotein mit selbst-spleißendem Intein und Chitinbindedomäne (CBD) synthetisiert. Über die Chitin-Binde-Domäne erfolgt die Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial. Nach Abspaltung des Fusionsteiles unter reduzierenden Bedingungen kann das *Target*-Protein von der Chitin-Säule eluiert werden.

Das Gen *cusF* wurde über PCR (Primer: *cusF-NdeI* + *cusF-blunt*) aus der genomischen DNA von *E. coli* Stamm W3110 amplifiziert, in den Überexpressionsvektor pTYB2 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Das resultierende Plasmid pECD771 wurde in den *E. coli* Expressionsstamm ER2566 transformiert und CusF gereinigt. CusF (ca. 11 kDa) konnte in mehreren Fraktionen von der Säule als Doppelbande eluiert werden (Abb. 13A).

Das gereinigte CusF Protein wurde N-terminal ansequenziert. Die dabei erhaltene Sequenz „ANEHH“ stimmte mit den Aminosäuren 22 bis 25 von CusF überein, wobei es sich um die ersten fünf Aminosäuren nach dem postulierten *leader*-Sequenz handelte. Somit konnte gezeigt werden, dass der *leader* von CusF *in vivo* abgespalten wird. Ferner wurde CusF zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen eingesetzt.

3.3.2.2. Reinigung von CusF über das *StrepTag*TM II-System

Da bei der Reinigung von CusF über das *IMPACT*TM T7:One-Step Protein Purification System (NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Schwallbach im Taunus) das *cusF*-Gen unter Kontrolle des T7-Promotors stand, war die Expression vom *E. coli* Stamm abhängig, da dieser die T7-Polymerase exprimieren musste. Um *cusF* von Stamm unabhängig exprimieren zu können, wurde ein zweites System zur Reinigung von CusF verwendet, das *StrepTag*TM II-System (IBA, Göttingen). Dabei wurde CusF als C-terminales Fusionsprotein mit dem *StrepTag* II Epitop, „NH₂-WSHPQFEK-COOH“, und acht zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren synthetisiert. *StrepTag* II bindet an das Säulenmaterial *StrepTactin*-Sepharose und das Fusionsprotein kann so in einem Reinigungsschritt mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden.

Unter Verwendung der Primer *cusF-N-EcoRI* und *cusF-C-PstI* wurde das *cusF* Gen aus dem Genom von *E. coli* mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *EcoRI* und *PstI* in den Vektor pASK-IBA3 kloniert. Das resultierende Plasmid pECD735 wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Expression von *cusF* erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21(pLys). Abbildung 13B zeigt das Reinigungsschema von CusF aus dem periplasmatischen Extrakt.

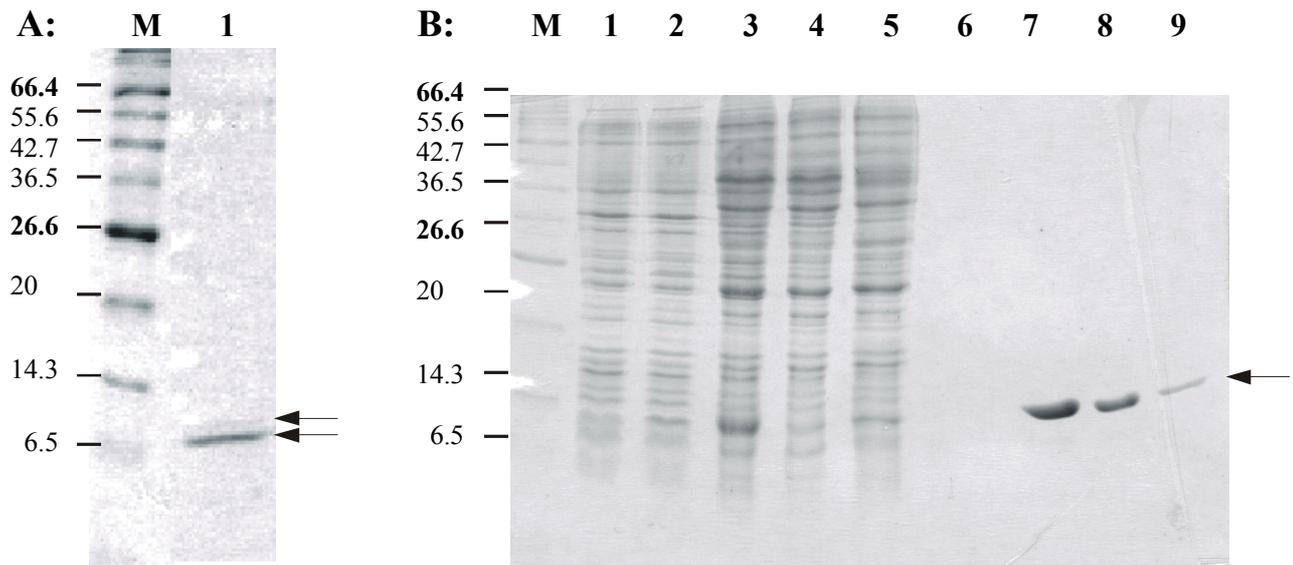


Abb. 13: Reinigung von CusF in der SDS-PAGE (17.5 %) (Laemmli, 1970), Coomassie gefärbt

- A) Reinigung von CusF über das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* (NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Schwallbach im Taunus). CusF wurde als Fusionsprotein mit Intein und Chitin-Binde-Domäne synthetisiert und mittels Chitin-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Nach autokatalytischer Spaltung konnte CusF von der Säule eluiert werden. Aufgetragen sind ca. 0.5 μg (20 μl) der ersten Elutionsfraktion.
- B) Reinigungsschema von CusF als *StrepTag II*-Fusion aus dem periplasmatischen Extrakt. CusF wurde als C-terminale *StrepTagII*-Fusion exprimiert, periplasmatischer Extrakt präpariert und CusF aus diesem über *Strep*-Tactin-Sepharose Affinitätschromatographie nativ gereinigt. Aufgetragen sind jeweils 10 μl der Rohextrakte mit *cusF* nicht induziert (Spur 1) bzw. *cusF* induziert (Spur 2), je 5 μl des periplasmatischen Extraktes (Spur 3), des Säulendurchlaufes (Spur 4) sowie der ersten (Spur 5) und letzten (Spur 6) Waschfraktion und 5 μl der Elutionsfraktionen 3 bis 5 (ca. 4.5 bis 0.5 μg Protein) (Spuren 7-9).

3.3.3. Das *cusF*-Gen wird *in vivo* exprimiert

Um zu untersuchen, ob *cusF* auch *in vivo* exprimiert wird, wurden die *E. coli* Stämme W3110 (wt), EC952(ΔcusF), GR1($\Delta\text{cueO}::\text{cm}$) und EC933($\Delta\text{cueO} \Delta\text{cusF}$) in LB-Medium angezogen und mit CuCl_2 inkubiert. CusF wurde im periplasmatischen Extrakt mit CusF-spezifischen polyklonalen Antikörper immunologisch nachgewiesen (Abb. 14). Nach Inkubation mit Kupfer konnten CusF-spezifische Signale in den *E. coli* Stämmen W3110 und GR1(ΔcueO) detektiert werden (Abb. 14, Spuren 2 und 4). Keine CusF-spezifischen Signale waren in den beiden *cusF*-Deletionsstämmen EC933($\Delta\text{cueO} \Delta\text{cusF}$) und EC952(ΔcusF) (Abb. 14, Spuren 3

und 5) sowie in der nicht mit CuCl_2 inkubierten Probe von *E. coli* Stamm W3110 (Abb. 14, Spur 1) nachweisbar. Somit konnte gezeigt werden, dass *cusF* in *E. coli in vivo* Kupfer-abhängig exprimiert wird.

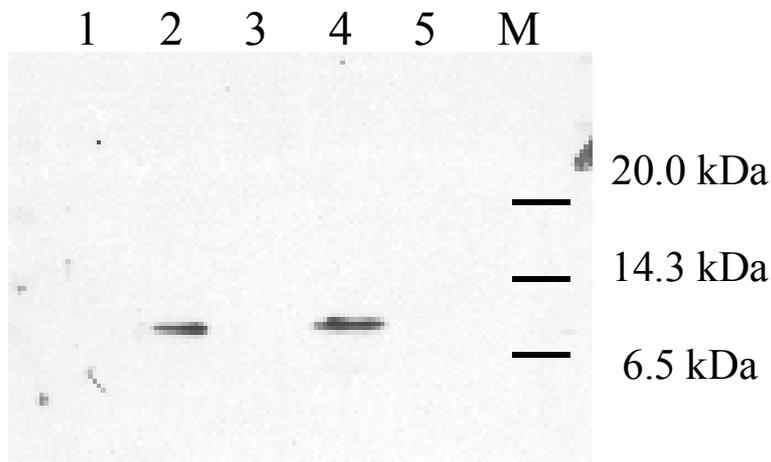


Abb. 14: *In vivo* - Nachweis von CusF mittels Immunoblotting.

Die Stämme W3110, GR1($\Delta cueO$), EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) und EC952($\Delta cusF$) von *E. coli* wurden bis zu einer Zelldichte von 100 Klett-Einheiten angezogen und für 30 min mit 1.5 mM CuCl_2 (Endkonzentration) inkubiert. Periplasmatischer Extrakt wurde gewonnen, in einer SDS-PAGE separiert und nach Transfer auf eine PVDF-Membran CusF mit CusF-spezifischen polyklonalen Antikörpern immunologisch nachgewiesen.

Spur: 1: periplasmatischer Extrakt von *E. coli* Stamm W3110 (ohne Cu^{2+} inkubiert)
2: periplasmatischer Extrakt von *E. coli* Stamm W3110 (30 min mit 1.5 mM Cu^{2+} inkubiert)
3: periplasmatischer Extrakt von *E. coli* Stamm EC952 (30 min mit 1.5 mM Cu^{2+} inkubiert)
4: periplasmatischer Extrakt von *E. coli* Stamm GR1 (30 min mit 1.5 mM Cu^{2+} inkubiert)
5: periplasmatischer Extrakt von *E. coli* Stamm EC933 (30 min mit 1.5 mM Cu^{2+} inkubiert)
M: Markerproteine (New England Biolabs)

3.3.4. Die Deletion von *cusF* hat keinen Einfluss auf die Regulation der Expression des *cusCFBA*-Operon

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass *cusF* Kupfer-abhängig exprimiert wurde und das Protein periplasmatisch lokalisiert war. Damit war aber immer noch nicht bekannt, wie CusF in die *cus*-vermittelte Kupferresistenz involviert ist. Möglich wäre eine regulatorische Funktion des Proteins. Um den Einfluss der Deletion des *cusF*-Genes auf die Regulation charakterisieren zu können, wurde eine Promotor-Reportergen-Fusion [$\Phi(\text{cusCp-lacZ})$] in den

verschiedenen *cus*-Deletionsstämmen von *E. coli* eingesetzt, und der Einfluss der Deletionen auf die Aktivität der β -Galaktosidase bei steigender Kupferkonzentration untersucht.

Da die Promotor-Reportergen-Fusion [$\Phi(\textit{cusCp-lacZ})$] auf einem Plasmid kloniert vorlag, das Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt, war zunächst in den *E. coli* Stämmen GR5($\Delta\textit{cusA}::\textit{cm}$) und GR15($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{cusA}::\textit{cm}$) das bei der Deletion von *cusA* an dieser Stelle eingesetzte *cat*-Gen zu eliminieren (vgl. Abb. 2). Dies erfolgte wie bei der Konstruktion der *E. coli* Stämme EC933($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{cusF}$), EC950($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{cusB}$) und EC951($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{cusC}$) über hitzeinduzierte Rekombination der das *cat*-Gen flankierenden FRT-sites.

Um die Kupfer-abhängige Induktion des unter Kontrolle des Promotors *cusCp* stehenden *lacZ*-Genes über die Aktivität des Enzymes untersuchen zu können, mussten alle Arbeiten in *E. coli* Stämmen ohne eigene aktive β -Galaktosidase durchgeführt werden. Von Datsenko und Wanner (2000) lag der *E. coli* Stamm DE(*lacZYA*)514::km vor, bei dem das Operon *lacZYA* deletiert und gegen eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ($\Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$) ausgetauscht worden war. Grass *et al.* (2001) führten diese Deletion mittels P1-Transduktion in *E. coli* Stamm W3110 ein, um *E. coli* Stamm GG161($\Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$) zu konstruieren. Analog dazu wurde $\Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$ in die *cusF*-Deletionsmutanten von *E. coli* W3110 und *E. coli* GR1($\Delta\textit{cueO}::\textit{cm}$) transduziert. Die resultierenden Stämme ECA010($\Delta\textit{cusF} \Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$) und ECA015($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{cusF} \Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$) wiesen neben der Deletion des *cusF*-Genes auch eine Deletion des *lacZYA*-Operon auf, das durch *gene replacement* gegen die Kanamycin-Resistenz-Kassette ausgetauscht worden war. Als Kontrolle dienten der *E. coli* Stamm GG161($\Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$) und die nach P1-Transduktion von $\Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$ in *E. coli* GR1($\Delta\textit{cueO}$) und die *E. coli* *cusA*-Deletionsstämmen resultierenden Stämme ECA011($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$), ECA009($\Delta\textit{cusA} \Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$) und ECA013($\Delta\textit{cueO} \Delta\textit{cusA} \Delta\textit{lacZYA}::\textit{km}$). In die *lacZYA*-Deletionsstämmen wurde das die Promotor-Reportergen-Fusion tragende Plasmid pECD595[$\Phi(\textit{cusCp-lacZ})$] transformiert, und die Aktivität der β -Galaktosidase nach Zugabe von CuCl_2 ermittelt.

Sollte CusF an der Regulation des Promotors *cusCp* beteiligt sein, müsste die Deletion von *cusF* zu einer Veränderung der Expression unter Kontrolle von *cusCp* stehender Gene führen, was sich in einer Veränderung der β -Galaktosidase-Aktivität in den *E. coli* Stämmen mit Deletion von *cusF* äußern würde. Die Untersuchungen der Induzierbarkeit des Promotors *cusCp* als Reportergenfusion wurde in Tris-gepuffertem Mineralsalzmedium mit 0.2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle und 0.1 % Hefeextrakt (Tris-MM) durchgeführt. Die Stämme

3. Ergebnisse

wurden in Tris-MM angezogen und die Proben zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität drei Stunden nach Zugabe von CuCl_2 entnommen.

Es zeigte sich, dass ab einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ CuCl_2 eine deutliche Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität (ca. 23-fach im Vergleich zur nicht mit CuCl_2 inkubierten Probe) im *E. coli* Kontrollstamm GG161($\Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) pECD595[$\Phi(\text{cusCp-lacZ})$] zu beobachten war (Abb. 15A). Eine Erhöhung der Kupferkonzentration führte zu einer weiteren Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität, wobei mit der Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eine maximale Induktion nicht erreicht wurde.

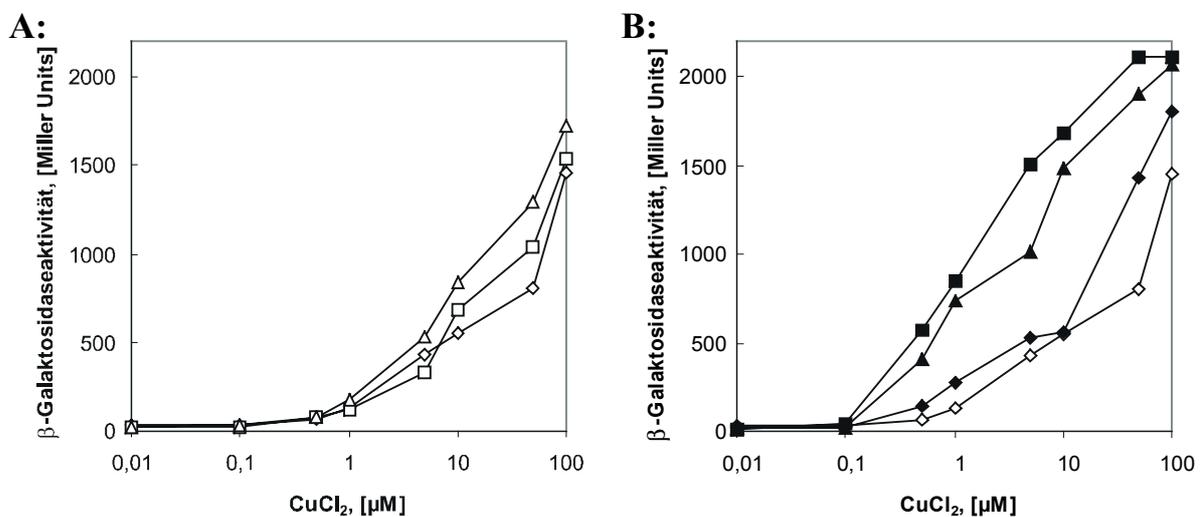


Abb. 15: Induktion der β -Galaktosidaseaktivität in verschiedenen Derivaten von *E. coli* W3110 und GR1(ΔcueO) mit $\Phi(\text{cusCp-lacZ})$ in trans.

Kulturen der Derivate der *E. coli* Stämme W3110 und GR1(ΔcueO) mit pECD595[$\Phi(\text{cusCp-lacZ})$] wurden 1:100 in frischem Medium (Tris-MM) verdünnt. Nach 2 stündigem Wachstum (OD_{600} ca. 0.1) wurden die Kulturen geteilt und verschiedene Konzentrationen CuCl_2 zugegeben. Nach weiteren 3 h bei 30°C wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt und Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität genommen. Diese wurde gegen die Kupferkonzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen.

- A) Induktion von $\Phi(\text{cusCp-lacZ})$ in *E. coli* W3110: GG161($\Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\diamond), ECA109($\Delta\text{cusA} \Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\square) und ECA110($\Delta\text{cusF} \Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\triangle) mit CuCl_2 .
- B) Induktion von $\Phi(\text{cusCp-lacZ})$ in *E. coli* GR1(ΔcueO): ECA111($\Delta\text{cueO} \Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\blacklozenge), ECA113($\Delta\text{cueO} \Delta\text{cusA} \Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\blacksquare), ECA115($\Delta\text{cueO} \Delta\text{cusF} \Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\blacktriangle) und nochmals GG161($\Delta\text{lacZYA}::\text{km}$) (\diamond) als Referenz mit CuCl_2 .

Auch die *cusA*- und *cusF*-Deletionsstämme ECA009($\Delta cusA \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] und ECA010($\Delta cusF \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] zeigten ab einer Kupferkonzentration $\geq 5 \mu M$ eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität (Abb. 15A). Dabei waren die β -Galaktosidase-Aktivitäten dieser drei Stämme einander vergleichbar.

Die Deletion von *cueO* in *E. coli* führt zu einer erhöhten Kupfersensitivität (Grass und Rensing, 2001a). Dabei hatte diese Deletion nur minimalen Einfluss auf die Induzierbarkeit des Promotors *cusCp*. Die minimal einzusetzende Kupferkonzentration um eine deutliche Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität zu erhalten lag bei den beiden *E. coli* Stämmen GG161($\Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] und ECA011($\Delta cueO \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] zwischen 1 und 5 μM $CuCl_2$ (Abb. 7B). Dabei war aber bei *E. coli* Stamm ECA011($\Delta cueO \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] der Anstieg der Enzymaktivität bei steigender Kupferkonzentration stärker als im Vergleich zur Kontrolle GG161($\Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] (Abb. 15B).

Eine Deletion in der *cus*-Determinante in den *cueO*-Deletionsstämmen *E. coli* ECA013($\Delta cueO \Delta cusA \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] und ECA015($\Delta cueO \Delta cusF \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$], führte zu einer weiteren Verringerung der Kupferkonzentration, die notwendig war, um die Transkription der unter Kontrolle des Promotors *cusCp* stehenden Gene zu initiieren. Schon die Zugabe von 0.5 μM $CuCl_2$ führte zu einer deutlichen Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität, die mit einer weiteren Erhöhung der Kupferkonzentration zunahm. Dabei zeigten die beiden Stämme ECA013($\Delta cueO \Delta cusA \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] und ECA015($\Delta cueO \Delta cusF \Delta lacZYA::km$) pECD595[$\Phi(cusCp-lacZ)$] nur minimale Unterschiede (Abb. 15B). Da eine Deletion von *cusF*, zusätzlich zur Deletion von *cueO*, geringeren Einfluss auf die Kupfertoleranz hatte als eine Deletion von *cusA* wenn *cueO* ebenfalls deletiert war, könnte darauf auch der etwas flachere Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität bei Steigerung der Kupferkonzentration zurückzuführen sein (Abb. 15B) und nicht auf eine regulatorische Wirkung von CusF.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist eine Beteiligung von CusF an der Regulation der Transkription des *cusCFBA*-Operon unwahrscheinlich. Die allgemeine Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität in den Derivaten von *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO::cm$) mit zusätzlicher Deletion in *cus* ist als Versuch der Kompensation der verminderten

Kupferdetoxifikation und damit Erhöhung der Kupferkonzentration in diesen Stämmen anzusehen.

3.3.5. CusF interagiert mit CusB und CusC *in vivo*

Die Ergebnisse der Promotor-Reporterfusion, $\Phi(\text{cusCp-lacZ})$, zeigten, dass CusF wahrscheinlich nicht an der Regulation des *cusCFBA*-Operon beteiligt ist. Da aber ein eindeutiger Einfluss der *cusF*-Deletion auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz nachgewiesen werden konnte, muss CusF am Export der Kupferionen in das Außenmedium beteiligt sein. Um eine mögliche Interaktion des periplasmatisch lokalisierten CusF mit den Komponenten des CusCBA-Efflux Komplexes zu untersuchen wurde das *Cyto Trap Yeast-Two-Hybrid*-System (Stratagene, Heidelberg) genutzt. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine mit dem menschlichen hSos (*Bait*) bzw. mit einem Myristylationssignal für die Membranassoziation (*Target*) synthetisiert. Die Expression erfolgt in einem temperatursensitivem Stamm von *S. cerevisiae* mit Mutation im Gen *cdc25*. Dabei handelt es sich um das Hefe-homologe des menschlichen Sos, welches den Ras-Signalweg aktiviert, der ein Wachstum bei höheren Temperaturen ermöglicht. Da hSos über kein eigenes Signal zur Membranassoziation verfügt, muss der Fusionspartner (*Bait*) mit dem membrangebundenen *Target* interagieren, damit eine Membranständigkeit des hSos und somit eine Signalübertragung erfolgen kann. Um Falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, ist es nur möglich die Interaktion löslicher Proteine zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden über PCR (Primer Tab. 3) die Gene für Derivate von CusF, CusB und CusC ohne Signalsequenzen bzw. Membrananker ('CusF ab Aminosäure 23, 'CusB ab Aminosäure 29 und 'CusC ab Aminosäure 21) aus genomische DNA von W3110 amplifiziert. Die Amplifikate 'cusB und 'cusC wurden in den *Predator*-Vektor pMyr kloniert und zur Kontrolle sequenziert. 'CusF wurde in den *Bait*-Vektor pSos kloniert und sequenziert. Positiv- und Negativ-Kontrollen waren Konstrukte des Herstellers.

Die Kontrollplasmide sowie jeweils pECD752('cusF) und pECD750('cusB) bzw. pECD751('cusC) wurden in *Saccharomyces cerevisiae* *cdc25H* cotransformiert. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 37°C waren auf den SD/Galaktose (-UL)-Agar Platten nur die Stämme überlebensfähig, bei denen es zu einer Interaktion der Proteine von *Bait*- und *Pretator*-Vektor kam. Es zeigte sich, dass beide Stämme, mit pECD752('cusF) +

pECD750('cusB) und pECD752('cusF) + pECD751('cusC), auf Galaktose in der Lage waren zu wachsen (Ergebnis nicht gezeigt). Somit deuteten die *Yeast-Two-Hybrid*-Ergebnisse auf Interaktion von CusF mit CusB und CusC *in vivo*.

3.3.6. CusF bindet 1 Molekül Kupfer pro Molekül Protein

Um zu untersuchen, ob CusF in der Lage ist, Kupfer zu binden, wurde der Kupfergehalt einer CusF-Proteinlösung bestimmt. Gereinigtes CusF-Protein wurde mit CuCl_2 (0.5 mM) inkubiert und ungebundenes Kupfer mittels Dialyse entfernt. CusF mit gebundenem Kupfer zeigte eine pink-violette Färbung (Abb. 16A). Ein UV/*visible* Spektrum wurde aufgenommen. Dies zeigte ein Absorptions-Maximum bei ca. 510 nm (Abb. 16B).

Der Kupfergehalt von CusF wurde mittels ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) von Mike Kopplin, Analytical Section of the Hazard Identification Core (Southwest Hazardous Waste Program, Tucson, USA) bestimmt. Die Berechnung des molaren Verhältniss Protein zu Kupfer ergab, dass CusF pro mol Protein ca. 1 mol Kupfer (0.925 ± 0.115) gebunden hatte.

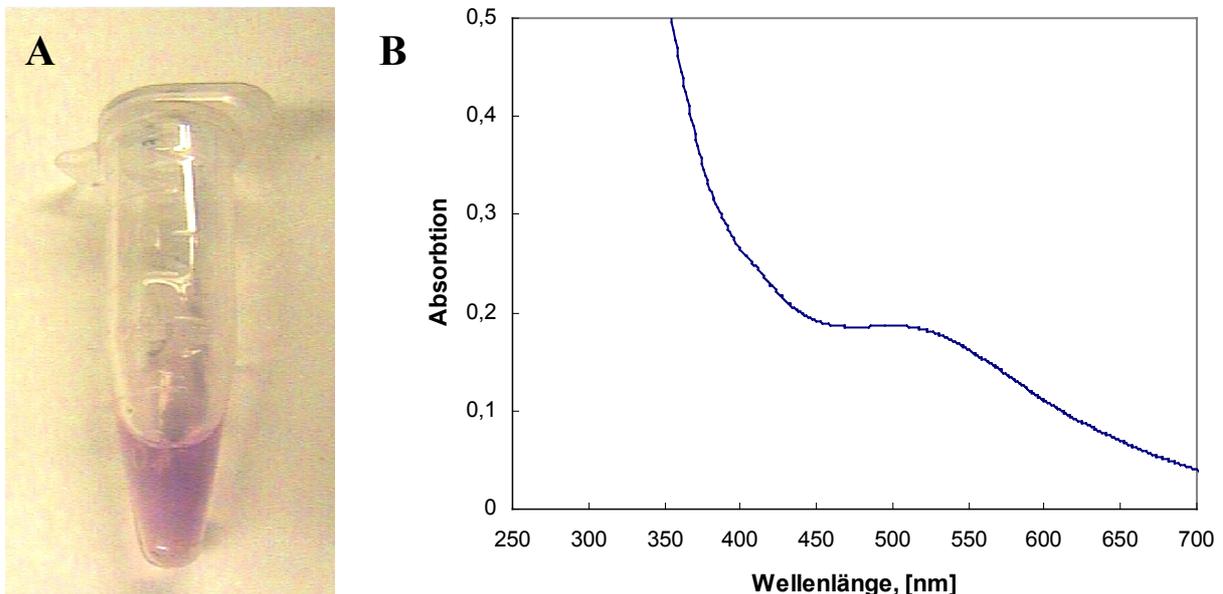


Abb. 16: Analyse von CusF

Gereinigtes CusF-Protein wurde mit CuCl_2 inkubiert und ungebundenes Kupfer mittels Dialyse entfernt.

- A) CusF-Protein (3.5 mM) in Tris-HCl (pH 7.0) mit gebundenem Kupfer.
- B) Das UV/*visible* Spektrum von CusF [$0.75 \mu\text{M}$ in Tris-HCl (pH 7.0)] mit gebundenem Kupfer wurde bei Raumtemperatur an einem Varian Cary 300 aufgenommen.

3.3.7. Einfluss konservierter Aminosäurereste auf die Funktion von CusF

3.3.7.1. Das *cusF*-Gen *in trans* ist in der Lage den *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) partiell zu komplementieren

Zur Identifikation wichtiger Aminosäurereste in CusF war es wichtig zu zeigen, dass *cusF* (wt) *in trans* in der Lage ist, den *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) zu komplementieren. Für die Reinigung von CusF wurden zwei Plasmide, pECD771 (CusF als C-terminale Fusion mit Intein und Chitin-Binde-Domäne) und pECD735 (CusF als C-terminale *StrepTagII*-Fusion) konstruiert. Da in pECD771 *cusF* unter Kontrolle des T7-Promotors vorlag, der *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) aber nicht für die T7-Polymerase kodiert, wurde für die Komplementationsexperimente das Plasmid pECD735 eingesetzt.

Bei Expression von *cusF* als *StrepTagII*-Fusion, unter Kontrolle des Promotors *tetAp*, konnte die erhöhte Sensitivität von *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) gegenüber Kupfer teilweise wieder aufgehoben werden (Tab. 7). Da bei der Verwendung von $CuCl_2$ im Medium zur Bestimmung der MIC die Unterschiede zwischen Deletionsmutante EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) und der Komplementation mit pECD735(*cusF*) gering waren, wurden für weitere Untersuchungen LB-Agar-Platten mit $CuSO_4$ und pH 7.5 verwendet. Dies führte zwar zu einer geringeren Konzentrationen von $CuSO_4$, die vom *E. coli* Deletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) toleriert werden konnte, doch war der Unterschied zwischen Negativkontrolle (EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) pASK-IBA3) und *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) mit *cusF in trans* deutlicher.

Tabelle 7: Minimale Inhibitor Konzentration von *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) bei Komplementation mit CusF-Mutanten

<i>E. coli</i> - Stamm	Relevanter Genotyp	MIC ^{a)}
		CuCl ₂ , [mM]
GR1(pASK-IBA3)	$\Delta cueO::cm$	3.25
EC933(pASK-IBA3)	$\Delta cueO \Delta cusF$	2.25
EC933(pECD735)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ in trans	2.75
		CuSO ₄ , [mM] (pH 7.5)
GR1(pASK-IBA3)	$\Delta cueO::cm$	3.0
EC933(pASK-IBA3)	$\Delta cueO \Delta cusF$	1.25
EC933(pECD735)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ in trans	2.25
EC933(pECD736)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF M ₆₉ I/M ₇₁ I) in trans	1.25
EC933(pECD736)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF M ₆₉ I) in trans	1.5
EC933(pECD775)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF M ₇₁ I) in trans	1.5
EC933(pECD776)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF H ₂₅ R/H ₂₆ R/H ₂₇ R/ H ₅₇ R/H ₅₈ R) in trans	1.0 ^{b)}
EC933(pECD766)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF H ₅₇ R/H ₅₈ R) in trans	1.75
EC933(pECD763)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF H ₅₇ Q/H ₅₈ Q) in trans	2.0
EC933(pECD764)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF H ₂₅ Q/H ₂₆ Q/H ₂₇ Q) in trans	2.25
EC933(pECD765)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF D ₄₈ N) in trans	2.25
EC933(pECD762)	$\Delta cueO \Delta cusF, cusF$ (CusF F ₇₃ Y) in trans	2.25

^{a)} Die Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 37°C für 16 h mehr sichtbar war. Übernachtskulturen der Stämme wurden 1:500 in LB-Medium verdünnt. Nach Wachstum für 2 h bei 37°C erfolgte der Ausstrich auf LB-Agar mit CuCl₂ bzw. LB-Agar mit CuSO₄ (pH 7.5). Jede Bestimmung wurde mehrfach mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. LB-Agar – Platten enthielten AHT (200 µg/l).

^{b)} Vermindertes Wachstum auch auf LB-Agar-Platten mit AHT in Abwesenheit von Kupfer.

3.3.7.2. Identifikation funktionell wichtiger Aminosäuren in CusF

Eine Deletion von *cusF* führte zu einer höheren Kupfersensitivität im *E. coli* Doppeldeletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$), die durch Expression von *cusF* *in trans* partiell komplementiert werden konnte. Für die Funktion von CusF spielt die Kupferbindung wahrscheinlich eine entscheidende Rolle.

Über die Internet-gestützte BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1997) konnten in den Genomen von *Agrobacterium tumefaciens* C58 (NC_003063), *Burkholderia cepacia* (Contig 359 Gen 34), *Sinorhizobium meliloti* (NC_003047) und *Ralstonia metallidurans* CH34 (Contig 692 Gen 19) hypothetische Proteine identifiziert werden, die zu 18.05 % (*Burkholderia cepacia* [53.38 % Ähnlichkeit]), 21.82 % (*Ralstonia metallidurans* [52.73 % Ähnlichkeit]), 22.52 % (*Sinorhizobium meliloti* [55.86 % Ähnlichkeit]) und 20 % (*Agrobacterium tumefaciens* [52.73 % Ähnlichkeit]) identisch zu CusF aus *Escherichia coli* K12 sind. Durch ein Sequenz-Alignment (<http://www.ch.embnet.org/wwtmp/sq.26857.aln>) von CusF mit diesen Proteinen, sowie dem hypothetischen Genprodukt des *orf96* der *sil*-Determinante aus *Salmonella enteritica* pv. *thyphimurium* (41.96 % Identität, 71.43 % Ähnlichkeit) (Abb. 17) konnten konservierte Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Funktion von CusF notwendig sein könnten.

In allen für das *Alignment* verwendeten Proteinsequenzen konnte ein hoch konserviertes Motiv, „MTM“ identifiziert werden. Da bekannt ist, dass Methionine an der Kupferbindung beteiligt sein können (Pena *et al.*, 1999; Zhou und Thiele, 2001; Puig *et al.*, 2002), wäre es möglich, dass diese konservierten Methioninreste an der Bindung des Kupfers in CusF beteiligt sind. Außerdem sind als mögliche Kupferliganden fünf Histidinreste in CusF vorhanden, von denen einer, H₅₈, in allen sechs ähnlichen Proteinen konserviert ist. Als weitere potentielle Liganden des Kupfers könnten eine konservierter Phenylalaninrest, F₇₃, und ein Aspartatrest, D₄₈, dienen. Um zu überprüfen, inwieweit diese Aminosäurereste wichtig für die Funktion von CusF sind, wurden Aminosäureaustausch-Mutationen eingeführt, und die Fähigkeit der Mutanten zur Komplementation von *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) untersucht.

3. Ergebnisse

CusF_EC	-----MKKALQVAMFSLFTVIGFNAQANEHHHETMSEAQPQVISA	40
o96aa_ST	-----MLKHISHGDMNAAS-----DASVQQ--VIKG	24
<i>A. tumefaciens</i>	-----MKTIVNFTLAAALLLAAPFSAFAQEFTKG	29
<i>S. meliloti</i>	-----MKTIVKSTLAFALALGTAYGAFAADFTKG	29
692_RM	-----MEGMDMTPSAGAKKAPQVPA	21
<i>B. cepacia</i>	MNIPASCRTVDVVTNIFNFGEGEMKNVLISSMTVCMLTVSASSHAAAASAAGAQAGGDVKA	60
CusF_EC	TG---VVKGIDLESKKITIHDPAAVNWPE MTM RFTIT-PQTKMSEIKTGDKVAFNFVQ	96
o96aa_ST	TG---IVKIDIDMNSKKITISHEAIPAVGWPA MTM RFTFVNADDAINALKTGNHVDFSFIQ	81
<i>A. tumefaciens</i>	-----TVKKVDVAAKKVTITHEDLKNLDMPG MTM VFRVK-DDAILAKLKEGADIEFIAER	83
<i>S. meliloti</i>	-----TVKKVDAAKAKVTLMHEDLKELEMPG MTM VFRVK-DEALLSKLKEGDQIEFVAER	83
692_RM	-----EVRKIDAATGKITLKHGPIANLGMSA MTMA FVK-DPAMLKGLKEGDQVSATFDS	75
<i>B. cepacia</i>	GMSHGEVRKVDLAAGKLTIRHGPLENLGMDA MTMA FKVK-DPAMLSQVEAGDSIDFVAEE	119
	* : * : * : * : : * * * * . : : * :	
CusF_EC	QGNLSLLQDIKVSQ-	110
o96aa_ST	QGNISLLKSINVTQS	96
<i>A. tumefaciens</i>	ADGKLVVAQVK----	94
<i>S. meliloti</i>	VDGKLTVTEVK----	94
692_RM	VDGKATVVDLRK---	87
<i>B. cepacia</i>	VDGALTVMKLEKR--	132
	.. : :.	

Abb. 17: Sequenz-Alignment von CusF mit hypothetischen Proteinen aus Genomprojekten und o96aa der *sil*-Determinante von pMG101.

Zu CusF ähnliche Proteine wurden in den Genomsequenzen von *Agrobacterium tumefaciens* C58 (NC_003063), *Burkholderia cepacia* (Contig 359 Gen 34), *Sinorhizobium meliloti* (NC_003047) und *Ralstonia metallidurans* CH34 (Contig 692 Gen 6892) (692_RM) gefunden. Dargestellt ist das Alignment dieser Proteine mit CusF von *Escherichia coli* (CusF_EC) und o96aa der *sil*-Determinante des Plasmides pMG101 *Salmonella enteritica* pv. *typhimurium* (o96aa_ST). Identische (*) und ähnliche (: und .) Aminosäuren sind in der Reihe unterhalb der Sequenz des Proteines aus *Burkholderia cepacia* gekennzeichnet.

Die Methionine des konservierten Motives „MTM“ sind im Fettdruck, die Histidinreste von CusF grau unterlegt und die konservierten Histidine (H₅₈ in CusF) mit Rahmen. Die konservierte Asparagiensäurereste (D₄₈ in CusF) und Phenylalanine (F₇₃ in CusF) sind *kursiv* dargestellt.

3.3.7.3. Eine Fünffach-Histidinmutante von CusF wird nicht mehr ins Periplasma transportiert

Das Protein CusF besitzt fünf Histidine, die als mögliche Liganden einer Kupferbindung von Interesse sind. Mittels *overlap-extension*-PCR wurden, unter Verwendung der Primer CusF down H_{25/26/27}R + CusF up H_{25/26/27}R und CusF down H_{57/58}R + CusF up H_{57/58}R, die Basenaustausche A₃₉₈₁G, A₃₉₈₄G, A₃₉₈₇G, A₄₀₇₇G und A₄₀₈₀C in pECD735 eingeführt. Das

resultierende Plasmid pECD757 kodierte für ein Fünffach-Mutanten-Protein CusF H₂₅R/H₂₆R/ H₂₇R/H₅₇R/H₅₈R [CusF(H®R)_V]. Die Bestimmung der MIC gegen Kupfer zeigte, dass dieses Protein nicht mehr in der Lage war, *E. coli* Stamm EC933(Δ *cueO* Δ *cusF*) zu komplementieren (Tab. 7). Vielmehr zeigte diese Mutante bei Anwesenheit des Induktors Anhydrotetracyclin (AHT) auch ohne Kupfer ein vermindertes Wachstum (Ergebnis nicht gezeigt).

Um den Einfluss der Histidinreste auf die Funktion von CusF zu spezifizieren, wurden zwei Doppelmutanten CusF H₅₇R/H₅₈R (pECD766), CusF H₅₇Q/H₅₈Q (pECD763), sowie die Dreifachmutante CusF H₂₅Q/H₂₆Q/H₂₇Q (pECD764) von CusF in pECD735 konstruiert. Alle drei Plasmide wurden in *E. coli* Stamm EC933(Δ *cueO* Δ *cusF*) transformiert und die MIC gegen CuSO₄ auf LB-Agar-Platten (pH 7.5) bestimmt. Es zeigte sich, dass ein Austausch der Histidinereste H₂₅, H₂₆ und H₂₇ zu Glutamin in der Dreifachmutante keinen Einfluss auf das Resistenzverhalten des *E. coli* Stamm EC933(Δ *cueO* Δ *cusF*) mit *cusF* (CusF H₂₅Q/H₂₆Q/H₂₇Q) *in trans* hatte (Tab. 7). Auch die Doppelmutation mit Austausch der Histidinreste H₅₇ und H₅₈ zu Glutamin hatte nur einen geringen Einfluss auf die Komplementationsfähigkeit des Mutantenproteines (Tab. 7). Demgegenüber war CusF nach dem Aminosäureaustausch H₅₇R/H₅₈R nur noch zu einer minimalen Komplementation des *E. coli* Deletionsstammes EC933(Δ *cueO* Δ *cusF*) fähig (Tab. 7).

Die immunologische Analyse des periplasmatischen Extraktes unter Verwendung des *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugates nach Expression dieser Derivate von *cusF* ergab für CusF H₅₇Q/H₅₈Q und CusF H₂₅Q/H₂₆Q/H₂₇Q Signale (Abb. 18A, Spuren 1 und 2), die die gleiche Größe und Intensität wie CusF (wt) in der SDS-PAGE aufwiesen (Abb. 18A, Spur 5). Demgegenüber zeigte die Doppelmutante CusF H₅₇R/H₅₈R ein Signal, das deutlich größer war, als das des Wildtyp-Proteins (Abb. 18A, Spur 3). Für CusF(H®R)_V konnte in periplasmatischen Extrakt kein Signal gefunden werden (Abb. 18A, Spur 4). Die Fünffach-Histidinmutante von CusF wurde demnach entweder nicht mehr in den periplasmatischen Raum transportiert, oder war in diesem instabil und wurde abgebaut. Im Rohextrakt konnte für CusF(H®R)_V ein Signal erhalten werden, das größer war, als das für das CusF-Wildtyp-Protein. Dies entsprach dem für CusF H₅₇R/H₅₈R detektiertem Signal (Ergebnis nicht gezeigt). Diese beiden Mutationen führten zu Proteinen, die nicht mehr prozessiert wurden, wobei die Fünffach-Histidinmutante im Cytoplasma akkumuliert wurde.

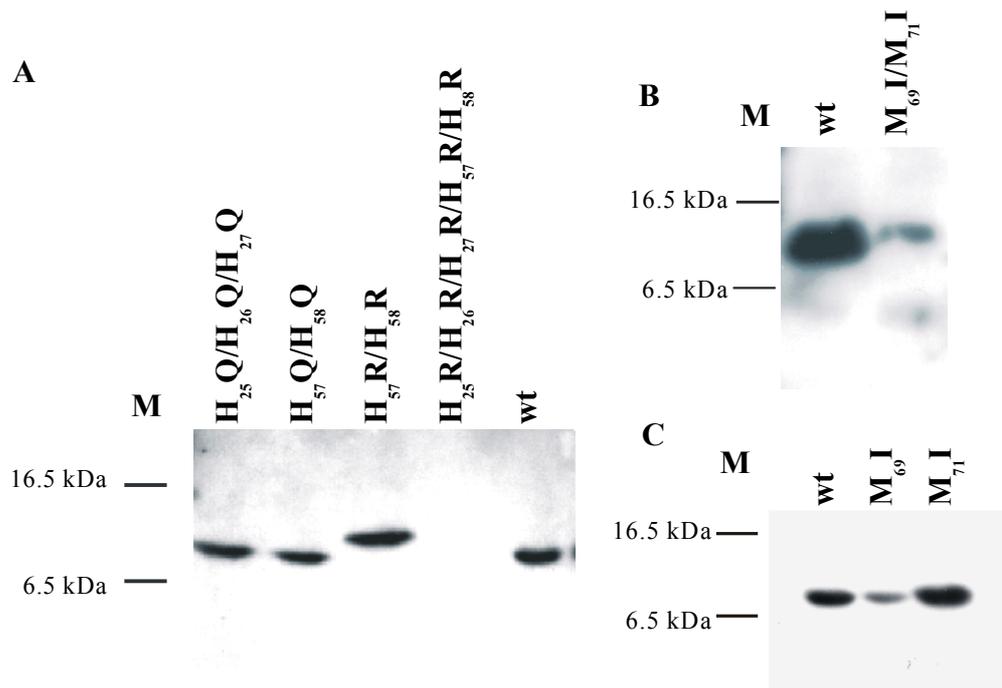


Abb. 18 : Immunologischer Nachweis von Mutantenproteinen von CusF in periplasmatischen Extrakten. Das Plasmid pECD735 (CusF wt) sowie die für die Mutantenproteine von CusF kodierenden Plasmide wurden in *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) transformiert. Nach AHT-induzierter Expression der mutierten Gene von *cusF* wurde der periplasmatische Extrakt gewonnen und äquivalente Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurde CusF immunologisch mit *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen.

- A) *E. coli* Stamm EC933 mit CusF Histidin-Mutanten
- B) *E. coli* Stamm EC933 mit CusF M₆₉I/M₇₁I
- C) *E. coli* Stamm EC933 mit CusF M₆₉I und CusF M₇₁I

3.3.7.4. Mutation der Methionine M₆₉ und M₇₁ führt zum Funktionsverlust

Mittels *Quick-Change* Mutagenese-PCR wurden unter Verwendung der Primer (CusF-d-M_{60/71}I und CusF-u-M_{69/71}I) die Basenaustausche G₄₁₁₄C und G₄₁₂₀C in *cusF* eingeführt, was zum Austausch der Methioninreste M₆₉ und M₇₁ in pECD735 jeweils zu Isoleucin führte. Das resultierende Plasmid pECD736 wurde durch Sequenzierung überprüft und für Komplementationsanalysen in *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) eingesetzt. Es zeigte sich, dass CusF M₆₉I/M₇₁I nicht mehr in der Lage war, den *E. coli* Deletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) zu komplementieren (Tab. 7).

Der immunologische Nachweis von CusF M₆₉I/M₇₁I ergab, dass das Mutantenprotein zwar in geringerem Maße gebildet wurde, es dennoch korrekt im Periplasma lokalisiert war. CusF M₆₉I/M₇₁I konnte sowohl im Rohextrakt, als auch im periplasmatischen Extrakt nachgewiesen werden und wies die gleiche Größe wie CusF (wt) auf (Abb. 18B bzw. Ergebnis nicht gezeigt). Obwohl die Intensität des Signales für CusF M₆₉I/M₇₁I deutlich geringer im Vergleich zu CusF (wt) war, konnte gezeigt werden, dass CusF M₆₉I/M₇₁I in den periplasmatischen Raum transportiert und auch prozessiert wurde.

Der Verlust der Fähigkeit zur Komplementation von *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) durch Expression der Doppel-Methionin-Mutante könnte auf die Unfähigkeit des Proteins, CusF M₆₉I/M₇₁I, zur Kupferbindung zurückzuführen sein. Um diese Frage zu klären, wurde CusF M₆₉I/M₇₁I mittels *Strep*Tactin-Affinitäts-Chromatographie gereinigt (Ergebnis nicht gezeigt) und die Kupferbindung analysiert. Nach Inkubation des gereinigten Proteins mit CuCl₂ und Entfernung des nicht gebundenen Kupfers mittels Dialyse wurde die Menge an gebundenem Kupfer mittels ICP-MS bestimmt. Die Bestimmung des Verhältnis Kupfer zu CusF ergab 0.225 ± 0.085 mol Kupfer pro mol CusF M₆₉I/M₇₁I. Dies deutete darauf hin, dass mindestens einer der Methioninreste des Motivs „MTM“ an der Kupferbindung beteiligt war. Zur weiteren Charakterisierung der Bedeutung der beiden Methioninreste für die Resistenzvermittlung wurden zwei Einzelmutanten CusF M₆₉I und CusF M₇₁I konstruiert. Über *Quick-Change* Mutagenese- bzw. *overlap-extension*-PCR wurden die entsprechenden Basenaustausche in *cusF* auf pECD735 eingeführt. Die resultierenden Plasmide pECD775(CusF M₆₉I) und pECD776(CusF M₇₁I) wurden mittels Sequenzierung überprüft und nach Transformation in *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusA$) für die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration eingesetzt. Es zeigte sich, dass beide Einzelmutationen zu einer Verminderung der Kupferresistenz führten. Sie waren aber im Gegensatz zur Doppelmutante CusF M₆₉I/M₇₁I noch in der Lage eine minimale Resistenz in *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) zu vermitteln (Tab. 7). Der immunologische Nachweis von CusF M₆₉I und CusF M₇₁I bewies, dass beide Mutantenproteine im periplasmatischen Extrakt nachweisbar war (Abb. 18C). Dabei war CusF M₇₁I in einer zum Wildtyp-Protein vergleichbaren Menge nachweisbar, während CusF M₆₉I in geringerer Menge vorlag. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Methioninreste M₆₉ und M₇₁ von CusF wichtig für die Vermittlung der Kupferresistenz sind.

3.3.7.5. Die konservierte Aminosäurereste D₄₈ und F₇₃ haben keinen Einfluss auf die Funktion von CusF

Weitere Aminosäurereste, die an der Bindung von Metallen beteiligt sein können, sind Cystein, Tyrosin oder Phenylalanin (Pena *et al.*, 1999). In der Aminosäuresequenz von CusF befinden sich keine Cystein- und Tyrosinreste aber fünf Phenylalaninreste, von denen eines, F₇₃, konserviert ist (Abb. 17). Desweiteren können auch geladene Aminosäuren an der Kupferbindung beteiligt sein. Ein Asparaginsäurerest, D₄₈ in CusF, ist ebenfalls zwischen diesen Proteinen konserviert (Abb. 17). Mittels *Quick-Change* Mutagenese-PCR (Primer aus Tab. 3) wurden die Basenaustausche T₄₁₂₆A, (CusF F₇₃Y, pECD762) bzw. G₄₀₄₉A, (CusF D₄₈N, pECD765) in *cusF* eingeführt und die Mutation in den resultierenden Plasmiden mittels Sequenzierung überprüft.

Die Bestimmung der MIC gegen CuSO₄ von *E. coli* Stamm EC933(Δ *cueO* Δ *cusF*) mit pECD765(CusF D₄₈N) bzw. pECD762(CusF F₇₃Y) *in trans* zeigte keinen Unterschied zur Komplementation mit dem *cusF*-Wildtyp-Gen (Tab. 7). Dies deutete darauf hin, dass diese beiden Aminosäurereste nicht wichtig für die Funktion von CusF sind.

Bei CusF handelt es sich um ein periplasmatisches Protein, das an der Vermittlung der Kupferresistenz in *Escherichia coli* beteiligt ist. Dabei ist CusF in der Lage Kupfer zu binden und eine Interaktion mit den Proteinen CusC und CusB des CusCBA-Efflux-Komplexes einzugehen. Wichtig für die Kupferbindung und die Funktion von CusF sind die Methioninreste M₆₉ und M₇₁. Aminosäureaustausch-Mutationen anderer konservierter Aminosäurereste hatte keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins.

4. DISKUSSION

4.1. Kupferdetoxifikation über den CBA-Efflux-Komplex

Effluxkomplexe des CBA-Typs sind in Bakterien weit verbreitet. Sie bestehen aus einem Protein der *resistance nodulation cell division* (RND)-Familie (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999; Saier, 2000), einem Membranfusionsprotein (MFP) (Saier *et al.*, 1994) und einem *outer membtane factor* (OMF) (Paulsen *et al.*, 1997).

So sind z.B. multiple Antibiotikaresistenzen von *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* auf die Wirkung eines derartigen Transportkomplexes zurückzuführen (Ma *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1995; Fralick, 1996; Okusu *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 1996; Zgurskaya und Nikaido, 1999; Li *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2000; Nikaido und Zgurskaya 2001). Aber auch in anderen Bakterien, wie *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Acinetobacter baumannii*, wurden ähnliche Antibiotika-Resistenzsysteme gefunden (Hagman *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1997; Magnet *et al.*, 2001). Andere Effluxkomplexe des CBA-Typs vermitteln Resistenz gegen Schwermetalle, wie z.B. gegen Cobalt, Zink und Cadmium [*czc*-Determinante (Nies *et al.*, 1989)] oder Cobalt und Nickel [*cnr*-Determinante (Liesegang *et al.*, 1993)] in *Ralstonia metallidurans* CH34 (Goris *et al.*, 2001), die Cadmium-Zink-Resistenz (*czr*) von *Pseudomonas aeruginosa* (Hassan *et al.*, 1999), die Nickel-Cobalt-Cadmium-Resistenz (*ncc*) von *Achromobacter xylosoxidans* A31 (Schmidt und Schlegel 1994), die Silber-Resistenz-Determinante (*sil*) von *Salmonella enterica* pv. *typhimurium* (Gupta *et al.*, 1999) oder die Kupfer-Silber-Resistenz (*cus*) von *E.coli* (Munson *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing 2001a) (Abb.19).

Die Regulation der einzelnen Resistenzsysteme erfolgt sehr unterschiedlich. So wird *cnr* von *R. metallidurans* CH34 und wahrscheinlich auch *ncc* von *A. xylosoxidans* 31A über einen ECF-Sigma-Faktor/Anti-Sigma-Faktor-Komplex reguliert (Grass, 2000). Im Gegensatz dazu regulieren Zwei-Komponenten-Regulationssysteme die Expression der Strukturgene der Cobalt-Zink-Resistenz (*czr*) von *P. aeruginosa*, der *sil*-Determinante von *S. enterica* pv. *typhimurium* und der *cus*-Determinante von *E. coli* (Gupta *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1999; Munson *et al.*, 2000). An der Regulation der *czc*-Determinante von *R. metallidurans* CH34 sind neben einem Zwei-Komponenten-Regulationssystem weitere Gene beteiligt, deren Funktion allerdings noch nicht vollständig geklärt ist (Große *et al.*, 1999; Anton, 2001; Große und Nies, pers. Mitteilung). In allen Resistenzdeterminanten kodiert eine Strukturgenregion, die für die drei Proteine des CBA-Effluxkomplexes. Sowohl bei der *cus*-, als auch bei der *sil*-

Determinante ist als Besonderheit ein zusätzliches Gen (*cusF* bzw. *orf96aa*) vorhanden, das sich zwischen dem Gen für den *outer membrane factor* CusC bzw. SilC und dem Gen für das Membranfusionsprotein CusB bzw. SilB befindet (Abb. 19).

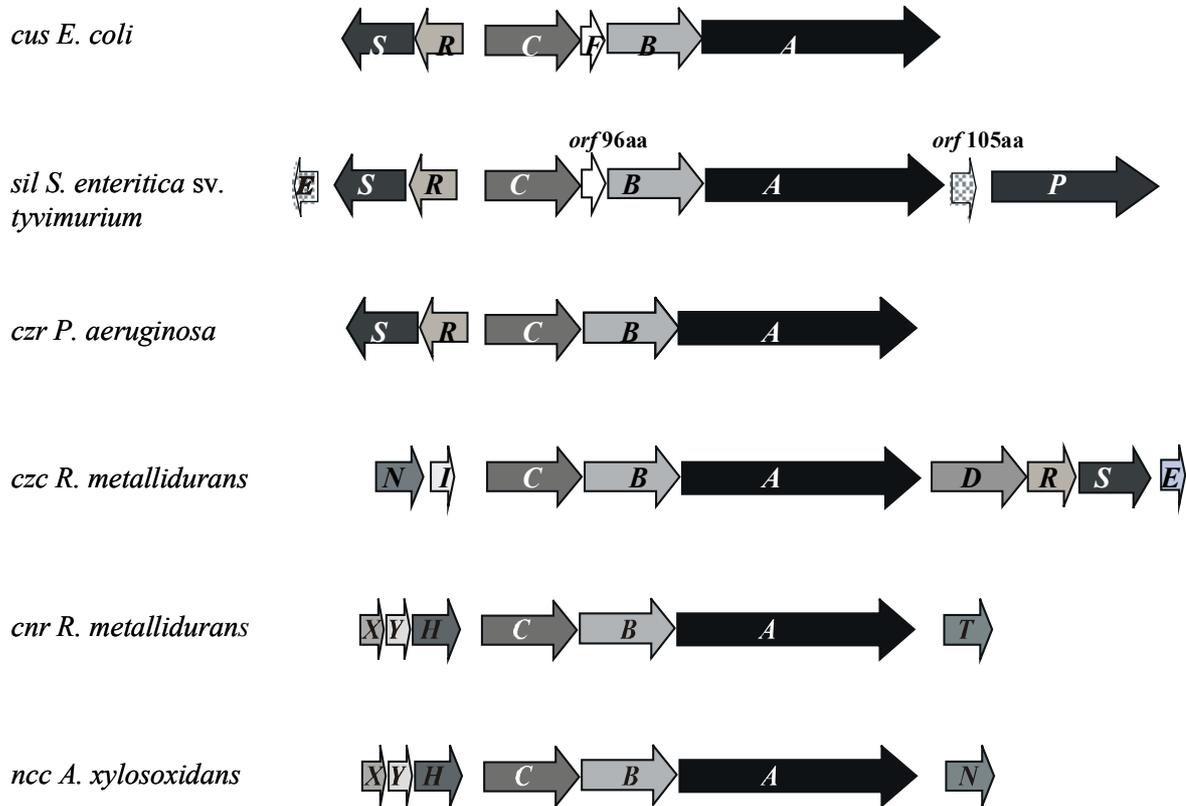


Abb. 19: Vergleich verschiedener Schwermetallresistenzdeterminanten

Dargestellt ist die Genanordnung verschiedener Determinanten, *cus* (*E. coli*), *sil* (*S. enterica* pv. *typhimurium*), *czr* (*P. aeruginosa*), *czc* und *cnr* (*R. metallidurans* CH34) und *ncc* (*A. xylosoxidans* 31A), die Resistenz gegen Schwermetalle vermitteln.

Die *cus*-Determinante von *E. coli* besteht aus zwei Operonen, *cusRS* und *cusCFBA*, die in Gegenrichtung transkribiert werden. In eigenen Arbeiten (Franke *et al.*, 2001) sowie von Grass und Rensing (2001a) konnte gezeigt werden, dass unter aeroben Bedingungen eine Deletion des *cus* Systems keinen Einfluss auf die Kupfertoleranz von *Escherichia coli* hat. Auch eine Deletion von *cusA* in einem *copA*-Deletionsstamm von *E. coli* führt zu keiner

weiteren Verminderung der Resistenz (Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001a). Bei CopA handelt es sich um eine *soft metal* P-Typ-ATPase von *E. coli*, die Resistenz gegen Kupfer vermittelt (Rensing *et al.*, 1999; Gatti *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 2000). Erst die zusätzliche Deletion von *cueO* hat eine Verringerung der Resistenz gegenüber Kupfer zur Folge, wobei es keinen Unterschied in der Kupfersensitivität zwischen der Deletion des gesamten Operons *cusCFBA* und der Deletion des Genes für das zentrale Transportprotein, *cusA*, gibt (Grass und Rensing, 2001a). CueO ist eine periplasmatisch lokalisierte Multicopper-Oxidase, die periplasmatische Enzyme vor Kupfer-bedingter Schädigung schützt (Grass und Rensing, 2001b).

In anderen Schwermetall-Resistenzsystemen kann durch alleinige Expression des RND-Proteines eine geringe Resistenz gegen die entsprechenden Schwermetallionen erhalten werden. So zeigt die Expression von *czcA* in einem metallsensitiven Stamm von *Ralstonia metallidurans* CH34 eine geringe Restresistenz gegenüber Zink und Cobalt (Rensing *et al.*, 1997; Legatzki *et al.*, 2002). Auch im Falle der von *cnr* vermittelten Resistenz gegenüber Cobalt und Nickel kann nach Deletion von *cnrCB* eine geringe Restresistenz beobachtet werden (Grass, 2000). Somit scheinen diese beiden RND-Proteine (CnrA und CzcA) in der Lage zu sein, Schwermetallionen aus dem Cytoplasma ins Periplasma zu transportieren und dadurch allein Resistenz zu vermitteln. Wenn auch CusA Kupferionen aus dem Cytoplasma transportiert, sollte es nach Expression von *cusA in trans* in einem *E. coli cueO cusCFBA*-Doppeldeletionsstamm möglich sein, eine minimale Resistenz wieder herzustellen. Doch zeigte sich, dass CusA allein keine messbare Resistenz gegen Kupfer in *E. coli* vermittelte. Erst die Expression des gesamten Operon *cusCFBA* konnte den *E. coli* Deletionsstamm GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA$) komplementieren. Somit scheint CusA allein nicht in der Lage zu sein, Resistenz gegen Kupfer zu vermitteln. Allerdings ist die von *cus* vermittelte Resistenzspanne geringer, als die von *czc* und *cnr* vermittelten Resistenzen in *R. metallidurans* CH34, so dass eine eventuell von CusA vermittelte Resistenz nicht nachweisbar war. Doch sind in allen Systemen die anderen Proteine des CBA-Komplexes für die volle Resistenz notwendig.

Während nach der Deletion des für den *outer membrane factor* kodierenden Genes *cusC* noch eine minimale Kupfertoleranz zu erkennen war, führte der Verlust des Membranfusionsproteins CusB zu einer Kupfersensitivität, die gleich einer Deletion des Genes für das zentrale Transportprotein CusA war. Für Vertreter der Familie der *outer membrane factor* konnte gezeigt werden, dass sie teilweise einander funktionell zu ersetzen

können. So sind in *R. metallidurans* CH34 die *outer membrane* Faktoren der verwandten Systeme *ncc* und *czc* in der Lage, einen *cnrC*-Deletionsstamm partiell zu komplementieren, wobei das Resistenzniveau der Expression von *cnrC in trans* erreicht wird (Grass, 2000).

Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch Untersuchungen der multiplen Antibiotikaresistenzen von *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* verfügt über mehrere chromosomal kodierte Antibiotika-Efflux-Systeme, z.B. MexAB-OprM (Poole *et al.*, 1993), MexCD-OprJ (Poole *et al.*, 1996) und MexEF-OprN (Kohler *et al.*, 1997), die in ihrer Expression und Substratspezifität variieren. Die Inaktivierung von *oprJ* führt in *P. aeruginosa* zu einer Verminderung der Resistenz gegenüber der von MexCD-OprJ entgifteten Antibiotika. Dieser Effekt kann durch OprM wieder aufgehoben werden, wobei aber das Substratspektrum des MexCD-OprJ-Systems erhalten bleibt (Gotoh *et al.*, 1998). Auch zeigen andere Arbeiten, dass OprM in der Lage ist, OprN im MexEF-OprN-System funktionell zu ersetzen (Maseda *et al.*, 2000). Doch ist es nicht möglich, OprM im MexAB-OprM-System gegen OprN auszutauschen (Maseda *et al.*, 2000), wogegen ein MexAB-OprJ-Efflux Komplex funktionell aktiv ist (Srikumar *et al.*, 1997; Yoneyama *et al.*, 1998).

Unter der Annahme, dass auch der Cus-Komplex in der Lage ist, einen *outer membrane factor* eines anderen Transportsystemes zu rekrutieren, könnte dies zu der beobachteten Restresistenz gegenüber Kupfer in *E. coli* Stamm EC951($\Delta cueO \Delta cusC$) führen. Ein natürliches Beispiel für die Funktion eines *outer membrane factor* in verschiedenen Transportsystemen ist mit TolC von *Escherichia coli* gegeben. TolC ist sowohl an der Vermittlung multipler Antibiotikaresistenzen, als auch an der Proteinsekretation beteiligt (Fralick, 1996; Andersen *et al.*, 2000; Sharff *et al.*, 2001). Ein Vergleich der in der Sequenz von *E. coli* K12 identifizierten Mitglieder der OMF-Familie zeigt, dass die Identität dieser meist hypothetischen Proteine zu CusC mit maximal 24 % (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) gering ist. Dies könnte auch erklären, weshalb die verbliebene Kupferresistenz nach Deletion von *cusC* sehr gering war, wogegen die in *R. metallidurans* durch *czcC* und *nccC in trans* erhaltene Resistenz gegen Nickel und Cobalt der der Komplementation mit *cnrC* entspricht (Grass, 2000). Durch die Analyse multipler *Alignments* von Vertretern der Familie der OMF wird für diese Proteinfamilie eine einheitliche Sekundärstruktur angenommen (Johnson und Church, 1999). Nach Kristallisation und Aufklärung der Struktur von TolC (Koronakis *et al.*, 1997; Koronakis *et al.*, 2000) wurde für einen anderen Vertreter der OMF, OprM von *P. aeruginosa*, ein dreidimensionales Strukturmodell entwickelt (Wong *et al.*, 2001). Ausgehend davon, dass die Struktur von TolC

auch auf CusC übertragen werden kann, ist CusC als Homotrimer anzusehen, das einen Kanal in der äußeren Membran formt, der sich als Tunnel in das Periplasma hineinzieht.

Im Gegensatz zum *E. coli cueO cusC*-Deletionsstamm, der eine geringe Restresistenz gegen Kupfer zeigte, war ein Stamm mit Deletion des Genes *cusB*, *E. coli* Stamm EC950($\Delta cueO \Delta cusB$), vollständig kupfersensitiv, ähnlich einer Deletion von *cusA* bzw. einer Deletion des gesamten *cusCFBA* Operon in *E. coli* Stamm GR1($\Delta cueO$). Untersuchungen der Cobalt-Nickel-Resistenz von Grass (2000) zeigten, dass es nicht möglich ist, das Membranfusionsprotein CnrB gegen ein MFP der Resistenzsysteme, *czc* und *ncc*, auszutauschen. Auch Studien an den Antibiotika-Resistenzsystemen von *P. aeruginosa* zeigten, dass ein Transportkomplex, der aus RND- und MFP-Protein verschiedener *mex*-Operone besteht, inaktiv ist (Maseda *et al.*, 2000). Die Expression eines *mexEB-oprM*-Operon vermittelt keine Resistenz.

Für das TolC-AcrAB-System von *E. coli* konnten Komplexe bestehend aus AcrA und AcrB durch Coimmunpräzipitation nachgewiesen werden (Kawabe *et al.*, 2000). Zgurskaya und Nikaido (2000a) zeigten über *crosslinking*-Experimente das Vorhandensein von Komplexen der Formen AcrA₂, AcrA₃, AcrA₂B und AcrA₃B. Diese Komplexe werden auch in Abwesenheit von Substraten gebildet. Versuche TolC-haltige Proteinkomplexe nachzuweisen führten zu keinem Ergebnis, so dass von einer reversiblen Bildung des TolC-AcrAB-Komplexes ausgegangen wird (Zgurskaya und Nikaido, 2000a). Auch für das TolC-HylBD-System für den Hämolystransport von *E. coli* konnte substratunabhängig die Bildung eines Komplexes HylD und HylB gezeigt werden (Thanabalu *et al.*, 1998). Bei Anwesenheit des Substrates HylA und des Präkomplexes aus HylD und HylB ist TolC als Bestandteil des Transportkomplexes nachweisbar (Thanabalu *et al.*, 1998). Der daraufhin vorgeschlagene Weg des Proteintransportes ist wahrscheinlich auch auf die über Transportkomplexe des CBA-Typs vermittelten Resistenzen gegenüber Metalle oder organischer Verbindungen übertragbar. Im Ruhezustand befindet sich ein Homotrimer des *outer membrane factor* in der äußeren Membran ohne Interaktion zu dem in der Cytoplasmamembran lokalisierten Präkomplex aus RND- und MFP-Protein. Für den Cytoplasmamembran-gebundenen Komplex wird eine Zusammensetzung RND₁-MFP₃ vorgeschlagen (Zgurskaya und Nikaido, 2000a). Bei Bindung des Substrates an das RND-Protein wird über die Membranfusionsproteine der Kontakt zwischen Präkomplex und OMF hergestellt und das Substrat durch die vom *outer membrane factor* gebildete Röhre geschleust (Thanabalu *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2000).

4.2. CusA, ein Protein der *Resistance Nodulation Cell Division* (RND) Family

Das zentrale Transportprotein des CusCBA-Efflux-Komplexes ist ein Protein der RND-Familie (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999; Saier, 2000). In veröffentlichten bakteriellen Genomsequenzen lassen sich über 100 Vertreter dieser Proteinfamilie identifizieren, doch ist nur ein Teil von ihnen bisher charakterisiert. Von vier Vertretern konnte mit Hilfe von Reporterfusionen eine Aufklärung der Membrantopologie erfolgen. Dabei handelt es sich bei AcrB (*E. coli*) (Fujihira *et al.*, 2002), MexB und MexD (*P. aeruginosa*) (Gotoh *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 1999) um drei Transporter organischer Verbindungen, die Resistenz gegen Antibiotika vermitteln, und bei CzcA (*R. metallidurans* CH34) (Goldberg *et al.*, 1999; Pribyl, 2001) um einen Schwermetalltransporter. RND-Proteine besitzen zwölf Transmembran Durchgänge (TMH) sowie zwei große hydrophile, periplasmatisch lokalisierte Domänen zwischen den TMH I und II sowie zwischen TMH VII und VIII. C- und N-Terminus befinden sich im Cytoplasma. Auf Grund der Homologie von CusA zu diesen vier Proteinen und auf der Grundlage der Vorhersage membrandurchspannender Sequenzen über das Internetprogramm SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) konnte für CusA ein zweidimensionales Topologiemodell erstellt werden (Abb. 7).

RND-Proteine wurden als Protonen Sym- und Antiporter beschrieben (Saier *et al.*, 1994). Für CzcA aus *R. metallidurans* CH34 konnte nach Rekonstitution des gereinigten Proteins in Detergenz-destabilisierten Liposomen eine Protonen-abhängige Akkumulation radioaktiver Isotope von Cobalt, Zink und Cadmium nachgewiesen werden (Goldberg *et al.*, 1999). Dies wird als Indiz für einen Transport der Metall-Ionen aus dem Cytoplasma über die Cytoplasmamembran durch CzcA gesehen und würde erklären, warum CzcA allein geringe Resistenz gegen Cobalt und Zink vermittelt (Rensing *et al.*, 1997; Legatzki *et al.*, 2002).

Für die Detoxifikation des Kupfers über den CusCBA-Komplex werden zwei Modelle angenommen, zum einen ein wie für CzcA gezeigter Transport aus dem Cytoplasma über beide Membranen nach außen, *Transenvelope*-Transport (Saier *et al.*, 1994), zum anderen der von Grass und Rensing (2001a) vorgeschlagene Transport der Kupferionen aus dem periplasmatischen Raum ins Außenmedium. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen ist der Transport der Kupferionen aus dem Cytoplasma unwahrscheinlich, da CusA alleine nicht in der Lage war, Kupferresistenz zu vermitteln, und eine Deletion von *cusA* sowohl im Wildtyp

von *E. coli*, als auch nach Deletion des Genes der das Cytoplasma entgiftenden P-Typ-ATPase CopA zu keiner erhöhten Sensitivität gegenüber Kupfer führte.

Resistenzsysteme gegenüber Antibiotika, wie *acrAB* von *Salmonella*, sind in der Lage, auch Resistenz gegenüber Verbindungen zu vermitteln, die nicht ins Cytoplasma transportiert werden (Nikaido *et al.*, 1998). Somit sollte auch eine Substratbindung an der periplasmatischen Seite des Transporters und ein Transport über den CBA-Efflux-Komplex aus dem Periplasma möglich sein (Zgurskaya und Nikaido, 2000b).

Die Internet-gestützte BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1997) von CusA zeigte die größten Homologien zu SilA von *S. enterica* pv. *typhimurium*, ORFF von *P. syringae* und zwei hypothetischen Proteinen, CusA(709) und CusA(619) (kodiert von Gen 8739 Contig 709 und Gen 3646 Contig 619) von *R. metallidurans* CH34. SilA hat mit 84 % die höchste Identität zu CusA (Gupta *et al.*, 1999). Die Sequenz von ORFF von *P. syringae* (Plasmid pPaCu1) wurde von Nakajima (2000) als Kupferresistenzgen veröffentlicht. In der Datenbank von *R. metallidurans* CH34 (http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/) konnten zwei hypothetische Proteine auf den Contigs 709 und 619 identifiziert werden, CusA(709) und CusA(619), die möglicherweise in der Regulation des Kupferhaushaltes von *R. metallidurans* CH34 involviert sind. Diese drei hypothetischen Proteine sind zu 65.3 % (CusA(619) *R. metallidurans*), 66 % (CusA(709) *R. metallidurans*) und 66 % (ORFF *P. syringae*) identisch zu CusA von *E. coli*. Im Gegensatz dazu weisen Transporter der RND-Familie, die am Transport divalenter Kationen oder organischer Verbindungen beteiligt sind nur eine 20 – 35 %ige Homologie zu CusA auf. Bei SilA handelt es sich um einen Transporter, der an der Resistenzvermittlung gegen monovalente Schwermetallkationen, Ag(I), beteiligt ist.

Unter anaeroben Bedingungen hat eine alleinige Deletion des *cus*-Systems starken Einfluss auf die Kupferresistenz, während keine Resistenzverminderung unter aeroben Bedingungen zu beobachten ist (Outten *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001a). Kupfer liegt im Cytoplasma als Cu(I) vor und wird als solches auch über die P-Typ-ATPase CopA ins Periplasma transportiert (Rensing *et al.*, 2000). Unter aeroben Bedingungen erfolgt eine Oxidation zu Cu(II). Demgegenüber ist unter anaeroben Bedingungen das Verhältnis Cu(II) zu Cu(I) zur Seite des monovalenten Kation verschoben. Da dem *cus*-System eine bedeutende Rolle bei der Kupfertoleranz unter anaeroben Bedingungen zukommt (Outten *et al.*, 2001), sollte der CusCBA-Komplex in der Lage sein, monovalente Schwermetallkationen, Cu(I) und Ag(I), zu transportieren. Eine direkte Transportmessung war bisher nicht möglich, da in

Deutschland radioaktive Kupfer-Isotope nicht verfügbar sind. Messungen mit ^{110m}Ag scheiterten daran, dass Silber an das Filtermaterial band.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wird ein Transport der Kupferionen aus dem Periplasma als wahrscheinlicher angesehen. Ist dies der Fall, sollten sich in den periplasmatischen Domänen von CusA Aminosäurereste befinden, die in der Lage sind, das Substrat des Transportkomplexes, Kupfer, zu binden.

Die hoch spezifischen Kupfertransporter Ctr1 und Ctr3 aus *S. cerevisiae* (Pena *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2001) Ctr4 und Ctr5 (*S. pombe*) (Zhou und Thiele, 2001) und h/mCtr1 (Säuger) (Zhou und Gitschier, 1997; Kuo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002b) besitzen in der extrazellulären N-terminalen Domäne sogenannte „Mets“-Motive, MX_2MXM , (Zhou und Thiele, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese Methioninreste wichtig für die Funktion der Transportproteine sind (Pena *et al.*, 1999; Pena *et al.*, 2000; Zhou und Thiele, 2001; Puig *et al.*, 2002). Nach Deletion der „Mets“-Motive sowie Mutation des konservierten Methioninrestes, M_{127} von yCtr1, ist yCtr1 nicht mehr in der Lage, Kupfer zu transportieren (Puig *et al.*, 2002). Desweiteren führt die Mutation der Methioninreste des konservierten MX_3M -Motivs der TMH II in Ctr1 und Ctr3 von *S. cerevisiae* zum Verlust der Fähigkeit des Kupfertransportes, wogegen die Mutation des zweiten nicht konservierten MX_3M -Motivs in der TMH II von yCtr1 keinen messbaren Einfluss hat (Puig *et al.*, 2002).

Bei Analyse der nach der Topologievorhersage periplasmatisch lokalisierten Bereiche von CusA (Abb. 7) lassen sich in der zweiten großen periplasmatischen Domäne zwischen TMH VII und VIII zwölf Methioninreste identifizieren. Der Vergleich der Proteinsequenz der zweiten periplasmatischen Domäne von CusA mit SilA, *S. enterica* pv. *typhimurium* (Gupta *et al.*, 1999), ORFF, *P. syringae* (Nakajima, 2000), und den beiden putativen RND-Proteinen CusA(709) und CusA(619) von *R. metallidurans* CH34 zeigt, dass fünf dieser Methioninreste in allen Proteinen konserviert sind (Abb. 8). Vier weitere Methioninreste sind in CusA und SilA vorhanden, fehlen jedoch in den Sequenzen der anderen drei Proteine (Abb. 8). Diese (teilweise) konservierten Methioninreste bilden allerdings kein für die Metallbindung postuliertes Sequenzmotiv. Ein mögliches Kupferbinde-Motiv des MXM -Typs, $\text{M}_{640}\text{TM}_{642}$, konnte in CusA identifiziert werden, wobei nur der Methioninrest M_{640} konserviert ist. In den andere vier Proteinen befinden sich an der Position des M_{642} ungeladene Aminosäurereste mit unpolaren oder polaren Seitenketten, bei denen es sich nicht um potentielle Liganden des Kupfers handelt. Eine Anordnung von Methioninresten in einem hypothetischen Metallbindemotiv, $\text{MX}_2\text{MX}_2\text{M}$, konnte in der Transmembranhelix VIII von CusA identifiziert

werden, M₈₇₅VPM₈₇₈TLM₈₈₁ (Abb. 8). Dieses Motiv ist auch in SilA vorhanden, fehlt jedoch in den anderen drei Proteinen (Abb. 8).

Demgegenüber fehlen diese Methioninreste in RND-Proteinen, wie CzcA und CnrA (*R. metallidurans* CH34), NccA (*A. xylosoxidans* 31A) und CztA (*P. aeruginosa*), die als Transporter für zweiwertige Kationen beschrieben wurden (Nies *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993; Schmidt und Schlegel, 1994; Hassan *et al.*, 1999). Auch in Transportern multipler Antibiotikaresistenzen, Acr-Systeme (*E. coli*) (Ma *et al.*, 1995; Zgurskaya und Nikaido, 1999; Rosenberg *et al.*, 2000; Nikaido und Zgurskaya, 2001) und Mex-Systeme (*P. aeruginosa*) (Li *et al.*, 1995; Poole *et al.*, 1996; Maseda *et al.*, 2000; Mine *et al.*, 1999) sind diese Methioninreste nicht vorhanden.

Die Mutation der in CusA und SilA konservierten Methioninreste der Sequenz M₈₇₅VPM₈₇₈TLM₈₈₁ hatte keinen Einfluss auf die vermittelte Kupferresistenz. Ferner zeigten die Mutationen der anderen zwischen SilA und CusA konservierten Methioninreste keinen Einfluss auf die *cus*-vermittelte Kupferresistenz. Auch die Mutation des Methioninrest M₆₄₀, als Teil des möglichen Kupferbindemotiv M₆₄₀TM₆₄₂, hatte keine Auswirkung auf die *cus*-vermittelte Resistenz gegenüber Kupfer. Demgegenüber führte der Austausch der Methioninreste M₅₇₃, M₆₂₃ oder M₆₇₂ zu Isoleucin bei Wachstumsversuchen sowohl auf Festmedium, als auch im Flüssigmedium zum vollständigen Verlust der Komplementationsfähigkeit des *E. coli cueO cusA*-Doppeldeletionsstammes GR15. Während durch Mutation von M₈₁₂ zu Isoleucin auf Festmedium keine Verminderung der Kupfertoleranz ermittelt werden konnte, zeigte CusA M₈₁₂I im *E. coli* Stamm GR15(Δ *cueO* Δ *cusA::cm*) im Flüssigmedium eine erhöhte Kupfersensitivität. Die vier Methioninreste, M₅₇₃, M₆₂₃, M₆₇₂ und M₈₁₂ sind Teil hoch konservierter Sequenzmotive (Abb. 20), die an der Bindung des Substrates auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran beteiligt sein könnten. In diesen Sequenzmotiven enthaltene negative Ladungen sind auch in Vertretern der RND-Proteine für den Transport divalenter Kationen zu finden (Abb. 20). Da sie in Transportern fehlen, die Resistenz gegen organische Verbindungen vermitteln, könnten sie für die Bindung der Schwermetall-Kationen notwendig sein. Die Sequenzmotive, deren Bestandteil die Methioninreste M₅₇₃, M₆₂₃ und M₆₇₂ sind, sind stärker konserviert, als das Motiv, zu dem M₈₁₂ gehört (Abb. 20). Dies könnte der Grund für den unterschiedlich starken Einfluss der Aminosäureaustausche auf die vermittelte Kupferresistenz sein. Während die Methioninreste M₅₇₃, M₆₄₀ und M₆₇₂ essentiell für die Funktion von CusA sind, kann der Verlust des M₈₁₂ teilweise kompensiert werden. Das Vorhandensein potentieller Kupfer-

4. Diskussion

Liganden in den periplasmatischen Bereichen von CusA und deren essentielle Rolle für die Vermittlung der Kupferresistenz weisen auf einen Transport der Kupferionen aus dem Periplasma hin.

A:

```
CusA_EC      EGDLLYMPSTLP 578
SilA_ST      EGDLLYMPSTLP 578
CusA(709)_RM EGDLLYMPSALP 578
CusA(619)_RM EGDLLYMPSALP 578
ORFF_PS     EGDLLYMPSALP 578
            * : : : : : : : * *
```

```
CzcA_RM      EGDIAIQALRIP 579
CzrA_PA      EGDFFAMQGLRVP 579
CnrA_RM      ELNLNLSVSRIP 562
NccA_AX      EQNLNLSVSRIP 603
            * : : : . . : : * *
```

B:

```
CusA_EC      PLEMVETT 627
SilA_ST      PLEMVETT 627
CusA(709)_RM PIEMFETT 627
CusA(619)_RM PLEMFETT 627
ORFF_PS     PLEMFETT 627
            * : * * . * * *
```

```
CzcA_RM      PPNISDGY 629
CzrA_PA      PPNASDSY 639
CnrA_RM      PPNASDNY 651
NccA_AX      PPNASDNY 652
            * * * * * . *
```

C:

```
CusA_EC      RIDMLS 674
SilA_ST      RIDMLS 674
CusA(709)_RM RIDMLA 674
CusA(619)_RM RIDMLA 674
ORFF_PS     RIDMLA 674
            * * * * * :
```

```
CzcA_RM      RFNELI 678
CzrA_PA      RFNELI 678
CnrA_RM      RFNELI 700
NccA_AX      RFNELI 701
            * * * * * *
```

D:

```
CusA_EC      PSMLKTE 816
SilA_ST      PTMLKTE 816
CusA(709)_RM PPMLRSE 816
CusA(619)_RM PPMLRSE 816
ORFF_PS     PPMLRSE 816
            * . * * : : *
```

```
CzcA_RM      PNQISRE 825
CzrA_PA      PNQISRE 825
CnrA_RM      LNEVSRD 837
NccA_AX      LNEVSRD 838
            * : : * * :
```

Abb. 20: Vergleich der Aminosäuresequenz mono- und divalente Kationen transportierender Proteine der RND-Familie.

Dargestellt sind Ausschnitte von Sequenz-Alignments von RND-Proteinen, die monovalente (in jeder Teilabbildung die oberen fünf Sequenzen) bzw. divalente (in den Teilabbildungen die unteren vier Sequenzen) Schwermetallkationen entgiften. Es handelt sich dabei um die konservierten Sequenzmotive deren Bestandteile die für die Funktion von CusA wichtigen konservierten Methioninreste M₅₇₃ (A), M₆₂₃ (B), M₆₇₂ (C) und M₈₁₂ (D) sind und der entsprechenden Sequenzausschnitte der Transporter divalenter Schwermetallkationen CzcA (CzcA_RM), CnrA (CnrA_RM) aus *R. metallidurans* CH34, CzrA (CzrA_PA) von *P. aeruginosa* und NccA (NccA_AX) von *A. xylosoxidans* 31A. Bei den Transportern monovalenter Schwermetallkationen handelt es sich um CusA (CusA_EC) aus *E. coli*, SilA (SilA_ST) aus *S. enterica* pv. *typhimurium*, den RND-Proteinen von Contig 709 (CusA(709)_RM) und 619 (CusA(619)_RM) von *R. metallidurans* CH34 und dem Produkt des *orfF* (ORFF_PS) von *P. syringae*. Die Alignments erfolgten über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Ober- und unterhalb der Sequenzen sind identische (⊕) und ähnliche (: und .) Aminosäurereste gekennzeichnet. Die in den Transportern monovalenter Ionen konservierten Methioninreste sind im **Fett**druck, konservierte negativ geladene Aminosäurereste **kursiv** und im **Fett**druck dargestellt.

Für einen Transport aus dem Cytoplasma, sollten sich in den cytoplasmatisch lokalisierten Bereichen von CusA Kupfer-Bindestellen befinden. Für CzcA wurde die Metallbindestelle in der cytoplasmatischen Domäne zwischen TMH IV und V angenommen. Es zeigte sich, dass einer der drei für die Metallbindung vorgeschlagenen Histidinreste, H₄₃₉, für die *czc*-vermittelte Resistenz essentiell ist (Juhnke, 1997). In den cytoplasmatischen Domänen von CusA konnten Histidinreste als mögliche Liganden identifiziert werden. Histidinreste sind zwar an der Bildung der Kupferzentren von Enzymen beteiligt, doch wird ihnen hauptsächlich eine Beteiligung an der Bindung zweiwertiger Kationen, wie Zn²⁺, Co²⁺ und Ni²⁺, zugeschrieben. Kupfer dagegen liegt im Cytoplasma als Cu(I) vor. Kupfer-transportierende P-Typ-ATPasen und cytoplasmatische Kupfer-bindende Chaperone, wie das menschliche HAH1 (Klomp *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1998), ATX1 aus *S. cerevisiae* (Lin und Culotta, 1995; Lin *et al.*, 1997; Portnoy *et al.*, 1999) sowie CopZ aus *Enterococcus hirae* (Wimmer *et al.*, 1999), binden Kupfer über cytoplasmatisch lokalisierte Methionin- und Cysteinreste, in einem „MXCX₂C“-Motiv (Hung *et al.*, 1998; Cobine *et al.*, 1999; Forbes *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1999; Portnoy *et al.*, 1999; Wimmer *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001), auch wenn Fan *et al.*, (2001) zeigen konnten, dass die Cysteinreste für den Transport nicht essentiell sind. In ATP7A, Menkes Disease Protein, sind diese Bindestellen für die Proteinrelokalisierung wichtig (Goodyer *et al.*, 1999). Die Analyse der cytoplasmatisch lokalisierten Bereiche von CusA zeigte, dass eine derartige MXCX₂C Kupferbindestelle nicht vorhanden war. Doch ist eine direkte Entgiftung des Cytoplasmas über den CusCBA-Efflux-Komplex nicht gänzlich auszuschließen.

Von welcher Seite der Cytoplasmamembran die Metallionen auch transportiert werden, erfolgt die Energetisierung der RND-Proteine durch den Protonengradienten über der Cytoplasmamembran (Paulsen *et al.*, 1996). Ausgehend von der Membrantopologie der RND-Proteine mit 12 TMH kann die Ausbildung von zwei Kanälen in der Cytoplasmamembran angenommen werden. Dass es sich dabei um zwei Kanäle aus je sechs TMH handelt, wird von der Annahme einer intragenen Duplikation eines Vorläufergenes während der Evolution unterstützt (Saier, 1994). Für CzcA werden für die beiden Kanäle unterschiedliche Funktionen vorgeschlagen (Goldberg *et al.*, 1999). Während einer für den Kationentransport wichtig ist, werden die Protonen über den zweiten Kanal aus dem periplasmatischen Raum ins Cytoplasma transportiert. In energetisierten *insite out* Vesikeln von *E. coli* konnte nach Expression von *czc* ein Protonenfluss durch Zugabe von Zink gezeigt werden (Nies, 1995).

Auch für AcrB konnte ein substratabhängiger Protonenfluss nach Rekonstitution des Proteins in Proteoliposomen nachgewiesen werden (Zgurskaya und Nikaido, 1999).

Negativ geladene Aminosäurereste, die am Transport der Protonen beteiligt sein könnten, sind in der TMH IV von CzcA vorhanden. Dieses Motiv D₄₀₂FGIIDD₄₀₈AAIVMIE₄₁₅ ist auch in ähnlicher Form in anderen RND-Proteinen zu finden (Abb. 21). Dabei sind der zweite Aspartat- und der Glutamatrest von CzcA in den meisten Transportern der RND-Familie konserviert. In den Transportern divalenter Schwermetall-Kationen ist auch der erste Aspartatrest, D₄₀₂ von CzcA, konserviert (Abb. 21B). Demgegenüber befindet sich an dieser Position in den Transportern monovalenter Kationen und organischer Verbindungen ein hoch konservierter Alaninrest (Abb. 21A, C). Während Transporter monovalenter Kationen in der TMH IV nur über zwei negativ geladene Aminosäurereste verfügen (Abb. 21C), besitzen die Transporter organischer Verbindungen direkt neben dem ersten konservierten Aspartat einen zweiten, in dieser Gruppe der RND-Proteine konservierten Aspartatrest (Abb. 21A).

Transportstudien radioaktiver Metalle in Proteoliposomen mit rekonstituiertem CzcA zeigen zwei Arten des Kationentransportes, einen sehr schnellen Einstrom der Ionen, der als erleichterte Diffusion beschrieben wird und einen langsamen Transport, der auf den Kationen-Protonen-Antiport zurückgeführt wird (Goldberg *et al.*, 1999). Die Mutation der Aspartatreste in der TMH IV hatte keinen Einfluss auf die erste schnelle Metallaufnahme, doch fehlt die als Substrat-Protonen-Antiport beschriebene langsame Metallaufnahme, was zu dem Schluss führt, dass die geladenen Aminosäurereste der TMH IV am Protonentransport beteiligt sind (Goldberg *et al.*, 1999).

A:

	TMH IV	
	----->	
AcrB (<i>E. coli</i>)	NLTMTFGMVLAIGLLVDDAIVVVENVER	418
AcrF (<i>E. coli</i>)	NLTMTFGMVLAIGLLVDDAIVVVENVER	418
YhiV (<i>E. coli</i>)	NLTMTFGMVLAIGLLVDDAIVVVENVER	418
MexB (<i>P. aeruginosa</i>)	NLTMTFGMVLAIGLLVDDAIVVVENVER	418
AcrD (<i>E. coli</i>)	NLTMTFAMVLAIGLLVDDAIVVVENVER	418
MexD (<i>P. aeruginosa</i>)	NMMTMTFGMVLAIGILVDDAIVVVENVER	420
MexF (<i>P. aeruginosa</i>)	NALSLFGLVLAIGIVVDDAIVVVENVER	421
	* :::*.:*****:*****	

4. Diskussion

B:

```

                                TMH IV
                                ----->
CzcA (R. metallidurans)      MSLGALDFGIIIDGAVVIVENCV 418
CnrA (R. metallidurans)      MSLGALDFGLIIDGAVIIVENSL 441
NccA (A. xylosoxidans)       MSLGALDFGLIIDGAVIIVENSL 442
CzrA (P. aeruginosa)         MSLGALDFGIIVDGAVVIVENAI 418
                                *****:****:****.:

```

C:

```

                                TMH IV
                                ----->
CusA (E. coli)                LGGIAIavgamvDAAIVMIENAH 415
Sila (S. enterica)            LGGIAIavgamvDAAIVMIENAH 415
CusA(709) (R. metallidurans)  LGGIAIavgamvDAAVVMIENAH 415
CusA(619) (R. metallidurans)  LGGIAIavgamvDAAVVMIENAH 415
OrfF (P. syringae)           LGGIAIAIGAMVDAAVVMIENAH 415
                                *****:*****:*****

```

Abb. 21: Vergleich der Aminosäuresequenzen der TMH IV verschiedener Vertreter der RND-Proteine.

Dargestellt sind Ausschnitte, TMH IV, der *Alignments* von RND-Proteinen die an der Resistenzvermittlung gegen organische Verbindungen (A), zweiwertige Schwermetallkationen (B) oder einwertige Schwermetallkationen (C) beteiligt sind. Die Sequenz-*Alignments* erfolgten über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Die nach Topologieuntersuchungen bzw. -vorhersagen die TMH IV bildenden Aminosäurereste sind gekennzeichnet. „⊕“ kennzeichnet identische, „:“ und „.“ ähnliche Aminosäurereste. Die konservierten negativ geladenen Aminosäurereste (D und E) sind im **Fett**druck dargestellt.

Aminosäureaustausch-Mutationen in CusA, D₄₀₅N oder E₄₁₂Q, die zu einer Verminderung der Ladung in der TMH IV führten, hatten einen vollständigen Verlust der Kupferresistenz zur Folge. Demgegenüber erreichte ein Stamm mit einer „Ladungs-konservierenden“ Mutation, CusA E₄₁₂D, auf Festmedium nahezu das Resistenzniveau des Wildtyps gegenüber Kupfer, zeigte aber im Flüssigmedium ein vermindertes Wachstum. Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit den Daten für CzcA (Juhnke, 1997; Goldberg *et al.*, 1999), als auch mit den erst kürzlich veröffentlichten Daten von Aires *et al.* (2002) für MexF und Guan und Nakae (2001) für MexB von *P. aeruginosa* überein. Austausche der geladenen Aminosäurereste zu ungeladenen Aminosäuren führen in CzcA zu einem vollständigen Verlust der *czc*-vermittelten Resistenz gegen Cobalt, Zink und Cadmium (Goldberg *et al.*, 1999), während der Austausch des Glutamat E₄₁₅ zu Aspartat auf Festmedium zu keinem Resistenzverlust führt, doch ein verzögertes Wachstum in Flüssigmedium zeigt (Juhnke, 1997; Goldberg *et al.*, 1999). Auch in MexB und MexF hat die Mutation der konservierten Aspartatreste, D₄₀₇ und D₄₀₈ von MexB

bzw. D₄₁₀ und D₄₁₁ von MexF, zu ungeladenen Aminosäureresten einen Verlust der Funktion der Proteine zur Folge (Guan und Nakae, 2001; Aires *et al.*, 2002). Ebenso führt die Einführung einer positiven Ladung anstelle des konservierten Glutamat E₄₁₇ in MexF zum vollständigen Verlust der Resistenz (Aires *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu dem Aspartatrest D₄₀₂ von CzcA befindet sich an dieser Stelle bei den Transportern monovalenter Kationen und organischer Verbindungen ein Alaninrest. Während in CzcA der Verlust der Ladung an dieser Position zum vollständigen Resistenzverlust führt (Goldberg *et al.*, 1999), hatte die Einführung einer negativen Ladung, A_{399D}, in CusA eine Verminderung der Kupferresistenz zur Folge. Wie auch in anderen RND-Proteinen sind die in der Transmembran-Helix IV von CusA vorhandenen negativen Ladungen essentiell für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz. Somit kann auch für CusA der Transport der Protonen in das Cytoplasma, zur Energetisierung des Kupfertransportes, über den mit von TMH IV gebildeten Kanal angenommen werden.

4.3. CusF ist ein neuartiges periplasmatisches Kupferbindeprotein

Eine Besonderheit der *cus*-Determinante ist das Vorhandensein eines zusätzlichen Genes, *cusF*, in der Strukturgenregion. Von den anderen Resistenzsystemen besitzt nur die *sil*-Determinante von *S. enterica* pv. *typhimurium* ein vergleichbares Gen, das wie *cusF* zwischen den Genen für den *outer membrane factor* und dem Membranfusionsprotein angeordnet ist (Abb. 19). Das Gen *cusF* kodiert für ein Protein mit einer theoretischen Größe von ca. 10 kDa. Die Deletion von *cusF* führte im *E. coli* *cueO*-Deletionsstamm GR1 zum Absinken der Kupfertoleranz, doch war der *E. coli* Doppeldeletionsstamm EC933(Δ *cueO* Δ *cusF*) in der Lage, höhere Kupferkonzentrationen zu tolerieren, als ein Stamm von *E. coli* mit Deletion von *cueO* und *cusCFBA*.

Die Analyse der Aminosäuresequenz postulierte für CusF eine *leader*-Sequenz (M₁-Q₂₁), so dass eine periplasmatische Lokalisation angenommen wurde. Eine Reporterfusion von CusF-*PhoA* bestätigte diese Vermutung. Unter Verwendung des von Pribyl (2001) konstruierten Reporterplasmid-Set 3 konnte eine periplasmatische Lokalisation des C-Terminus von CusF gezeigt werden. Da *PhoA* keinen eigenen *leader* mehr besitzt, entscheidet die Sequenz des Fusionspartners über Lokalisation des Fusionsproteins und somit

über die Aktivität von PhoA. Die Alkalische Phosphatase ist nur bei periplasmatischer Lokalisation in der Lage, Disulfidbrücken zu bilden, die für die Ausbildung der enzymatischen Aktivität notwendig sind (Derman und Beckwith, 1991). Da die Aktivität des CusF-PhoA-Fusionsproteins ca. 30-fach höher als die Negativkontrolle, konnte von einer periplasmatischen Lokalisation des C-Terminus von CusF ausgegangen werden. Der Nachweis von CusF im periplasmatischen Extrakt von *E. coli* nach Inkubation der Zellen mit CuCl₂ sowie die Reinigung des Proteins aus dem periplasmatischen Extrakt bestätigten, dass es sich bei CusF um ein periplasmatisches Protein handelt. Am Ende der *leader*-Sequenz von CusF befindet sich zudem ein AXA-Motiv (AQA) als typische Spaltstelle für die Signalpeptidase (Pugsley, 1993; Karamyshev *et al.*, 1998). Die N-terminale Sequenzierung des gereinigten Proteins CusF zeigte dann auch, dass der *leader* abgespalten wurde.

Mit Hilfe der in den veröffentlichten Genomsequenzen von Bakterien gefundenen Proteine, die Homologie zu CusF aufweisen (Abb. 17), konnten keine Aussagen über die Funktion von CusF für die *cus*-vermittelte Kupferresistenz gemacht werden. Es handelt sich ausschließlich um hypothetische Proteine, deren Gene nicht Teil putativer CBA-Effluxkomplex kodierender Operone darstellen.

Ausgeschlossen werden kann eine regulatorische Funktion von CusF, wie sie für CzcE der Cobalt-Zink-Cadmium-Resistenz von *R. metallidurans* CH34 nachgewiesen werden konnte (Große und Nies, pers. Mitteilung). CzcE ist ein periplasmatisches Protein, das in der Lage ist, Schwermetallionen zu binden (Hoffmann, 2001). Die Deletion von *czcE* führt zu einer Steigerung der vom Promotor *czcNp* ausgehenden Transkription. Die Übertragung des Signales über das Vorhandensein periplasmatischer Schwermetallionen zu *czcNp* ist noch nicht aufgeklärt, doch ist eindeutig eine regulatorische Funktion für CzcE nachweisbar (Große und Nies, pers. Mitteilung). Obwohl keine Homologie zwischen CzcE und CusF besteht, wäre es möglich, dass CusF an der Regulation der *cus*-Determinante beteiligt ist. Wäre dies der Fall, sollte eine Deletion von *cusF* einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Transkription des *cusCFBA*-Operons haben. Die Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität einer Φ (*cusCp-lacZ*)-Fusion in den verschiedenen *cus*-Deletionsstämmen von *E. coli* zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen einem Stamm mit der Deletion von *cusF* zu Stämmen mit Deletion der anderen Gene des *cusCFBA*-Operon. Somit ist eine Beteiligung von CusF an der Regulation der Transkription der *cus*-Determinante unwahrscheinlich.

In anderen Kupferresistenz vermittelnden Systemen sind periplasmatisch lokalisierte Kupfer bindende Proteine, PcoC bzw. CopC, für die Ausbildung der vollen Resistenz notwendig (Cha

und Cooksey, 1991; Brown *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002c). Doch ist ihre Funktion noch immer unklar. Es wird vermutet, dass sie Kupfer binden und zu den Multicopper-Oxidase PcoA bzw. CopA transportieren. Somit könnte ihre Funktion die eines periplasmatischen Kupfer-Chaperons sein. Beide Proteine, CopC und PcoC, besitzen methioninreiche Sequenzmotive, MX₂MX₂MX₂HX₂M, für die eine Beteiligung an der Kupferbindung angenommen wird (Cha und Cooksey, 1991; Brown *et al.*, 1995). Kupfer wird in einem Verhältnis eins zu eins an diese Proteine gebunden (Cha und Cooksey, 1991; Huffman *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002c). CusF zeigt zwar keine Homologie zu PcoC und CopC, ist aber wie diese Proteine in der Lage, Kupfer zu binden und könnte als „Chaperon“ das gebundene Kupfer zum CusCBA-Effluxkomplex transportieren. Die für die Übertragung des Kupfers auf den CusCBA-Efflux-Komplex notwendige Interaktion von CusF mit den Proteinen des Komplexes konnte über das *Yeast-Two-Hybrid*-System nachgewiesen werden. Andererseits könnte CusF auch einen festen Bestandteil des Proteinkomplexes bilden.

Ein Vergleich zu zwei hypothetischen Membranfusionsproteinen von *R. metallidurans* CH34, CusB(709) (Gen 8738 Contig 709) und CusB(619) (Gen 3645 Contig 619), zeigt, dass es sich hierbei um mögliche Fusionsproteine aus einem CusB- und CusF-ähnlichem Protein handeln könnte (Abb. 22). Während jeweils die ersten 400 Aminosäuren denen von CusB entsprechen (Abb. 22A), besitzen diesen beiden Proteine am C-Terminus zusätzlich ca. 100 Aminosäurereste, die in CusB nicht vorhanden sind, jedoch CusF entsprechen (Abb. 22B).

A:

CusB_EC	-----MKKIALIIGSMIAGGIIISAAG---FTWVAK-----AEPPAEKTSTAERK	41
CusB(709)	MKTTAIARVAMSLAVAAGLGGAYYLGGQQQRHQQASGSATVNGPHDGHDPAAAGAEKTKGR	60
CusB(619)	----MNARLTITATCLVLIIGVAGYSG---YHLGAL-----HTMPATSATQGDRK	42
	::: * * * .* ::	
CusB_EC	ILFWYDPMYPNTRFDKPGKSPFMDMDLVPKYADEESSA-----SGVRIDPTQTQNLGVKT	96
CusB(709)	ILYWRDPMVPGQRFDKPGKSPYMDMPLIPVYEEENADG-----AAVRIDGRVTQNLGVRT	115
CusB(619)	ILYWHDPMPVPGQRFDKPGKSPFMDMPLVPVYADGDDAGNGVKNKGGVSIDSRIAQNLGIRT	102
	:* * * . *****:*** *: * * : : . . * ** :****:**	
CusB_EC	ATVTRGPLTFAQSFPANVSYNEYQYAIVQARAAGFIDKVYPLTVGDKVQKGTPLLDLTIP	156
CusB(709)	AEVKLGRLEMALQVPGNVAINERGIQARTTGFVEHTYVRTTMEVTRKQALAQVYSP	175
CusB(619)	AEVKSAMGAVVEAPGNVAIDERSIRVIQARTTAFVQHVGVVRLDLPVRQQTTLVTFYAP	162
	* * . : . . *.** : * :****:.*:.. : . : *:* * . *	

4. Diskussion

CusB_EC	DWVEAQSEYL-LLRETGGTATQT-EGILERLRLAGMPEADIRRLIATQKIQTRFTLKAPI	214
CusB(709)	DWVAAQEEYLAVARMPGNPQPELDRDAAVARMRQVGMTDQIRVVQASGKLPRLTVNSAV	235
CusB(619)	DWVAAQEEYLAVMRLPVSLQTDLASAAKARMLQSGMTQSQADAVIRTGKLQSAQSIASPL	222
	*** **.* ** : * . . . : . . * : ** . : : : * : * . : : . :	
CusB_EC	DGVITAFDLRAGMNIKDNVVAKIQGMDFVWVTAIPEISIAWLKVDASQFTLTVPARPDK	274
CusB(709)	DGIIVTEVVGARDGMTVPPGMTLFRIASLATVWVLAEVPEAQAAALRPGQAVMASTTALPNL	295
CusB(619)	DGLVTEIAVREGMTISPGMTLFRILADLTQVWVIAEVPEAQARSIAPGQTVTVSATAAP-D	281
	** : * . * ** . : . . : : : . : * * * * : * : * : . . . : . * * *	
CusB_EC	TLTIRKWTLLPGVDAARTLQLRLEVDNADEALKPGMNAWLQLNTAS-EPMLLIPSQALI	333
CusB(709)	ALPGKVDITILPDVSAGTRTIKVRIELQNKDRKLLPGMFMVSRMVPAGATERLLVPSEALI	355
CusB(619)	PVQKVDAILPDVDPATRTIKVRIVLPNKQRRLLVPGMFASVRFENGDRQDVLQIPTEAVI	341
	. : : : * * . * . . * * * : : * : * . * * * . : : : . . * : * : * : *	
CusB_EC	DTGSEQRVITVDADGRFVVKRVAVFQASQGVTAALRSGLAEGEKVVSSGLFLIDSEANISG	393
CusB(709)	RTGARTIAMVAKGEGGFDPVEVKAGATAGGQSEILEGLKAGQQVVVSGQFLIDSEASLRG	415
CusB(619)	RTGQRSLVMVDAGQRGYVSTEIRTGREVDGMTAVISGLRAGQVVVTVSGQFLIDSEASLRG	401
	** . . : . . : . . * : : . ** * : * * * * * * * * . : *	
CusB_EC	ALERMRS-----ESATHA-----	407
CusB(709)	TVARMQETTSGPPVDSAASEASAAGPEHRAVGRIQSIGERSLIIAHEAIPSAQWGAMTME	475
CusB(619)	TSERLETPVTAS-APSAPSTPSTATQEHEATGRIEAVNADSLTISHSAVPSAQWGAMTMD	460
	: * : . . : * * *	
CusB_EC	-----	
CusB(709)	FAAPPAGLPQGLKAGDRVAFSFRLLDPHGMATLVTVPVAPQVQTAGAKP	521
CusB(619)	FAAHDAQLKGLKPGDRIRFRFHLEADGTAMLSSVQPAGAEGGQR-	501

B:

CusF_EC	-----MKKALQVAMFSLFTVIG	18
CusB(709)	RTGARTIAMVAKGEGGFDPVEVKAGATAGGQSEILEGLKAGQQVVVSGQFLIDSEASLRG	415
CusB(619)	RTGQRSLVMVDAGQRGYVSTEIRTGREVDGMTAVISGLRAGQVVVTVSGQFLIDSEASLRG	401
	: : * . : * : : *	
CusF_EC	FNAQANEHHHET---MS-EAQPVVISATGVVKGIDLESKKITIHHDPIAAVNWPMTMR	73
CusB(709)	TVARMQETTSGPPVDSAASEASAAGPEHRAVGRIQSIGERSLIIAHEAIPSAQWGAMTME	475
CusB(619)	TSERLETPVTAS-APSAPSTPSTATQEHEATGRIEAVNADSLTISHSAVPSAQWGAMTMD	460
	: : : : . : * * . . . : : * * *	
CusF_EC	FTITPQTKMSEIKTGDKVAFNFVQQGNLSLLQDIKVSQ-----	110
CusB(709)	FAAPPAGLPQGLKAGDRVAFSFRLLDPHGMATLVTVPVAPQVQTAGAKP	521
CusB(619)	FAAHDAQLKGLKPGDRIRFRFHLEADGTAMLSSVQPAGAEGGQR-	505
	* : . : * * : : * *	

Abb. 22: Vergleich der Aminosäuresequenz von CusB und CusF mit der Sequenz hypothetischer MFP von *R. metallidurans* CH34.

Die hypothetischen MFP wurden im Genomprojekt von *Ralstonia metallidurans* CH34 identifiziert. Das Alignment erfolgte über ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Dabei sind in der Reihe unterhalb der Sequenzen identische (☞) und ähnliche (: und .) Aminosäurereste gekennzeichnet.

- A) Sequenz-Alignment von CusB von *E. coli* und zwei hypothetischen Membranfusionsproteinen CusB(709) und CusB(619) von *R. metallidurans* CH34.
- B) Sequenz-Alignment von CusF von *E. coli* und dem C-Terminus (ca. 170 Aminosäurereste) der beiden hypothetischen Membranfusionsproteinen CusB(709) und CusB(619) von *R. metallidurans* CH34.

Über dieser beiden potentiellen Resistenzdeterminanten von *R. metallidurans* CH34 ist nichts weiter bekannt. Auch wenn Untersuchungen von Rehbein und Große (pers. Mitteilung) zeigen, dass das hypothetische *cusBA*-Operone von Silber (Contig 619) bzw. von Kupfer, Silber, Cadmium, Cobalt und Nickel (Contig 709) schwach induziert werden, bleibt offen, inwieweit sie funktionell aktiv sind. Da beide hypothetischen Operone nur für ein Membranfusionsprotein und ein Protein der *resistance nodulation cell division*-Familie kodieren, müsste für die Bildung eines aktiven Effluxkomplexes der *outer membrane factor* eines anderen Resistenzsystemes rekrutiert werden. Zwar wurde gezeigt, dass die OMF verschiedener ähnlicher Resistenzsysteme einander funktionell ersetzen können (Srikumar *et al.*, 1997; Gotoh *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.*, 1998; Maseda *et al.*, 2000; Grass, 2000), jedoch ist bisher nur für TolC bekannt, dass es unter natürlichen Bedingungen Bestandteil mehrerer Export- und Sekretionssysteme sein kann (Fralick, 1996; Andersen *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2001; Sharff *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um Transportsysteme für organische Verbindungen. Demgegenüber sind in allen charakterisierten Schwermetall-Resistenzsystemen die Gene für den OMF Bestandteil eines Operon mit den Genen für das Membranfusionsprotein und RND-Protein. Solange diesen beiden Operonen von *R. metallidurans* keine Funktion zugeordnet werden kann, deuten die bisherigen Daten darauf hin, dass CusF ein im Periplasma frei bewegliches Protein ist, das als Kupfer-Chaperon agieren könnte.

Das Protein CusF wies nach Bindung von Kupfer eine violette Färbung auf und zeigt im UV-visible-Spektrum ein Maximum bei ca. 510 nm. Bei anderen Kupfer-bindenden Proteinen dieser Farbe liegt ein binukleäres Kupferzentrum vor, bei dem die beiden Kupferatome über Schwefelbrücken von Cysteinen miteinander verbunden sind (Kelly *et al.*, 1993; Hay *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999). Da in der Aminosäuresequenz von CusF keine Cysteinreste vorhanden sind, ist die Koordination des Kupfers im Protein weiterhin unklar. Für PcoC konnten Huffmann *et al.*, (2002) eine ähnliche Färbung des Proteines nach Bindung von Kupfer zeigen. Doch weicht das im UV-vis-Spektrum ermittelte Maximum von dem von CusF-Cu ab. Auch in der Sequenz von PcoC befinden sich keine Cysteinreste, doch werden Histidin- und Methioninreste als Liganden des Kupfers vorgeschlagen (Brown *et al.*, 1995). ENDOR- (*electron nuclear double resonance*) und ESEEM- (*electron spin-echo envelope modulation*) Analysen von PcoC unterstützen diese Annahme der Kupferkoordination (Huffman *et al.*, 2002), auch wenn PcoC nach Mutation einer postulierten Metallbindestelle, M₆₆KGM₆₉SSH₇₂, immer noch in der Lage war, Kupfer in der gleichen Stöchiometrie wie das

Wildtyp-Protein zu binden (Lee *et al.*, 2002c). Eine Veränderung der Bindungskonstante in den Mutanten zeigt, dass diese Aminosäurereste dennoch einen Einfluss auf die Bindung des Kupfers haben (Lee *et al.*, 2002c).

CusF besitzt fünf Histidin- und sechs Methioninreste als mögliche Liganden des Kupfers. Zwei dieser Methioninreste bilden ein potentiell Kupferbindezentrum des MXM-Typs ($M_{69}TM_{71}$), das auch in hypothetischen Proteinen mit Homologie zu CusF vorhanden ist (Abb. 17). Demgegenüber sind die anderen vier Methioninreste weder in diesen Proteinen noch in den C-termini der hypothetischen Membranfusionsproteine CusB(709) und CusB(619) von *R. metallidurans* CH34 konserviert. Der Austausch der beiden konservierten Methioninreste zu Isoleucin in CusF hatte einen vollständigen Funktionsverlust zur Folge. Das Protein CusF $M_{69}I/M_{71}I$ war nicht mehr in der Lage, den *E. coli* Deletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) zu komplementieren. Die Analyse von gebundenem Kupfer ergab ein Verhältnis von ca. 0.2 Kupfer pro CusF-Molekül im Gegensatz zum CusF-Wildtyp-Protein, das ein mol Kupfer pro mol Protein binden konnte. Somit ist mindestens einer der beiden konservierten Methioninreste von CusF an der Kupferbindung beteiligt. Ferner zeigte sich, dass dieses Protein zwar in den periplasmatischen Raum transportiert wurde, doch konnte es dort in wesentlich geringerer Menge nachgewiesen werden, als das Wildtyp-Protein, was auf eine mögliche Proteininstabilität hinwies. Auch der Austausch von M_{69} oder M_{71} zu Isoleucin führte in CusF zu fast vollständigen Verlust der Mutantenproteine CusF $M_{69}I$ bzw. CusF $M_{71}I$ den *E. coli* Doppeldeletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) zu komplementieren. Somit sind beide Methioninreste wichtig für die Funktion von CusF. Es ist wahrscheinlich, dass beide Methioninreste als Liganden des Kupfers agieren können.

Von den fünf Histidinresten in CusF ist das Histidin an Position 58 innerhalb der zu CusF homologen Proteine konserviert. Um einen Hinweis der Beteiligung dieser Aminosäurereste an der Funktion von CusF zu erhalten, wurden zunächst eine Mutante konstruiert, bei der alle fünf Histidin- gegen Argininreste ausgetauscht wurden. Dieses Mutanten-Protein konnte den *E. coli* Deletionsstamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) nicht mehr komplementieren. Die Induktion der Synthese von CusF $H_{25}R/H_{26}R/H_{26}R/H_{57}R/H_{58}R$ [CusF(H \rightarrow R)_V] im *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$) durch Anhydrotetracyclin (AHT) führte auch in Abwesenheit von Kupfer zu einem verschlechterten Wachstum des Stammes. Von Andersson *et al.*, (1992) wurde der Einfluss geladener Aminosäurereste auf die Topologie der Proteine untersucht. Dabei zeigte sich, dass Lysin- und Argininreste zu einer bevorzugt cytoplasmatischen Lokalisation der Domänen führen, in denen sie präsent sind. Obwohl es sich bei Histidin wie

Lysin und Arginin um eine proteinogene Aminosäure mit positiv geladener Seitenkette handelt, weichen die pK_a -Werte der Seitengruppen dieser Aminosäuren voneinander ab, so dass unterschiedliche Ladungen des Gesamtproteins bei physiologischem pH-Wert resultieren. Dies erklärt, dass Histidin im Gegensatz zu Arginin und Lysin die Topologie der Proteine nicht beeinflusst (Andersson *et al.*, 1992). Beim immunologischen Nachweis der Fünffach-Histidinmutante von CusF war das Protein im Rohextrakt, nicht aber im periplasmatischen Extrakt nachweisbar, d.h. die Einführung der Mutationen in CusF führte zur Fehllokalisierung bzw. Instabilität des Proteins und somit zum Abbau im Periplasma. Ferner wies das im Rohextrakt detektierte Mutantenprotein auf Grund seiner Größe darauf hin, dass CusF(H→R)_v nicht mehr prozessiert wurde. Um dennoch klären zu können, ob die Histidinreste für die Funktion von CusF wichtig sind, wurden Doppelmutanten, CusF H₅₇R/H₅₈R und CusF H₅₇Q/H₅₈Q, und eine Dreifachmutante CusF H₂₅Q/H₂₆Q/H₂₇Q konstruiert. Es zeigte sich, dass auch das Mutanten-Protein CusF H₅₇R/H₅₈R nicht prozessiert wurde. Doch war es im Gegensatz zu CusF(H→R)_v im periplasmatischen Extrakt nachweisbar. Ferner zeigte CusF H₅₇R/H₅₈R eine verminderte Fähigkeit zur Komplementation von *E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$), hatte aber nicht den bei CusF(H→R)_v beobachteten toxischen Effekt. Die Mutationen CusF H₅₇Q/H₅₈Q, und CusF H₂₅Q/H₂₆Q/H₂₇Q hatten keinen oder nur geringen Einfluss auf die Komplementierbarkeit des Deletionsstammes. Desweiteren wiesen diese beiden Proteine im periplasmatischen Extrakt die gleiche Größe wie CusF (wt) auf, was auf eine korrekte Prozessierung der Proteine hinwies. Zwar führte der Austausch der Histidinreste zu Arginin zu inaktivem CusF-Protein, die Mutationen zu Glutamin zeigten jedoch, dass die Histidinreste von CusF wahrscheinlich nicht wichtig für die Funktion des Proteines sind.

Für CueO, eine weitere Komponente der Kupferhomöostase in *E. coli*, wurden labile Kupferbindungen über Methionin- und Aspartatreste nachgewiesen (Grass und Montfort, pers. Mitteilung). Zwischen CusF und homologen Proteinen liegt ein konservierter Aspartatrest (D₄₈) vor. Als weitere mögliche Liganden von Metallen sind z.B. Phenylalaninreste (Pena *et al.*, 1999) bekannt. Ein hoch konservierter Phenylalaninrest F₇₃ befindet sich in unmittelbarer Nähe der für die Resistenzvermittlung essentiellen Methioninreste. Doch hatten die Mutationen F₇₃T und D₄₈N in CusF keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins, so dass die Beteiligung dieser Aminosäurereste an der Kupferbindung unwahrscheinlich erscheint.

Abschließen kann für CusF gesagt werden, dass es zusammen mit dem CusCBA-Efflux-Komplex an der Kupferdetoxifikation beteiligt ist und keinen Einfluss auf die Regulation der

Expression von *cusCFBA* hat. Die Bindung des Kupfers erfolgt wahrscheinlich über mindestens einen Methioninrest. Im Gegensatz dazu ist eine Beteiligung der Histidinreste sowie der konservierten Aminosäurereste F₇₃ und D₄₈ an der Kupferbindung unwahrscheinlich. Für CusF wird eine Funktion als periplasmatisches Kupfer-Chaperon angenommen, das Kupfer bindet und zum CusCBA-Efflux-Komplex transportiert.

4.4. Modell der Kupfer- und Silberdetoxifikation in *Escherichia coli*

Aus den zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten lässt sich folgendes Modell für die Entgiftung von Kupfer und Silber in *Escherichia coli* über die chromosomal kodierten Systeme aufstellen. Der Transport beider Metalle aus dem Cytoplasma erfolgt über die P-Typ-ATPase CopA, für die der Transport von Cu(I) in *inside out* Vesikel nachgewiesen werden konnte (Rensing *et al.*, 2000). Auch war es möglich eine Kupfer- und Silber-abhängige Aktivierung der ATPase-Aktivität im Rohextrakt von *E. coli* nach Expression von *copA* zu zeigen (Fan und Rosen, pers. Mitteilung). Um eine toxische Wirkung des Silbers durch Bindung an periplasmatische Proteine zu verhindern, muss ein Weitertransport über den CusCBA-Komplex ins Außenmedium erfolgen. Dies erklärt, weshalb beide Einzeldelationen $\Delta copA$ oder $\Delta cusA$ zu einer erhöhten Silbersensitivität führten (Franke *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001; Franke und Nies, unveröffentlicht).

Kupfer wird im Periplasma möglicherweise über die CueO-vermittelte Oxidation von Enterobactin an dessen Oxidationsprodukt gebunden (Grass und Rensing, persönliche Mitteilung). Unter anaeroben Bedingungen oder nach Deletion von *cueO* entfällt dieser Weg der Kupferdetoxifikation. Die von CopA hervorgerufene Akkumulation des Kupfers im Periplasma und die fehlende Inaktivierung des Kupfers über CueO induzierte die Transkription des *cusCFBA*-Operons. Wie eigene Arbeiten und Arbeiten von Outten *et al.*, (2001) zeigen, führen beide Voraussetzungen zur Absenkung der für die Induktion des *cusCFBA*-Operons notwendigen Kupferkonzentration im Medium. Im jetzigen Modell übernimmt CusF die Rolle eines periplasmatischen Kupfer-Chaperons, indem es die im Periplasma befindlichen Kupferionen bindet und zum CusBA-Präkomplex transportiert (Abb. 23A). Nach Weiterleitung des Kupfers an CusA erfolgt dann über CusB die Interaktion zu CusC um den funktionsfähigen Transportkomplex zu generieren. Da die über das *Yeast-Two-*

Hybrid-System gewonnenen Daten sowohl auf eine Interaktion von CusF zu CusB, als auch zu CusC weisen, könnte CusF dann auch für eine Stabilisierung des Transportkomplexes verantwortlich sein. Die Kupferionen werden von CusA in die von CusC gebildete Röhre entlassen, durch die sie ins Außenmedium gelangen. Dabei erfolgt die Stabilisierung des Gesamtkomplexes durch CusB.

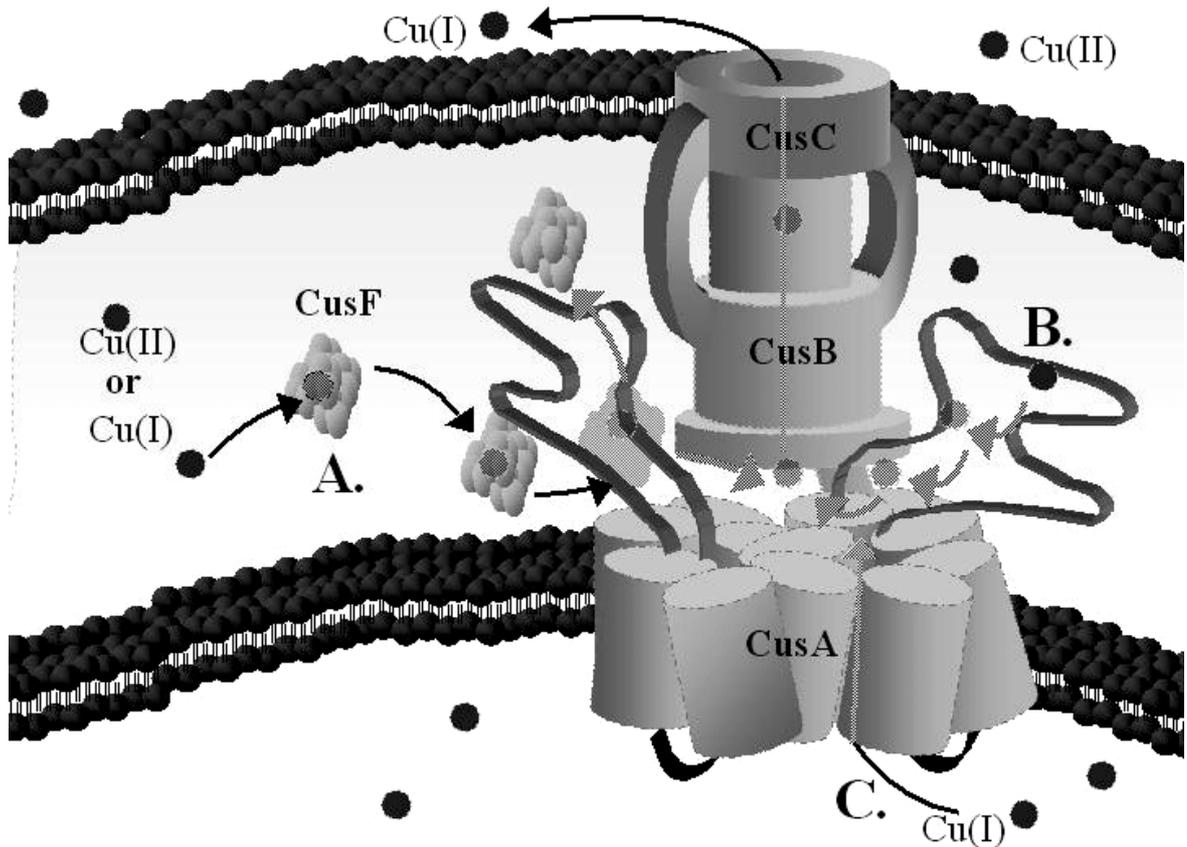


Abb. 23: Modell der Kupferdetoxifikation über das *cus*-System.

Im aktuellen Modell der *cus*-vermittelten Kupferentgiftung werden Kupferionen an CusF gebunden, und dann zum CusCBA-Efflux transportiert, über den sie anschließend ins Außenmedium transportiert werden (A). Außerdem ist es möglich, dass Kupferionen im Periplasma direkt an CusA binden, um entgiftet zu werden (B). Eine weitere Möglichkeit ist der direkte Transport aus dem Cytoplasma (C).

Da eine Deletion von *cusF* nicht zum vollständigen Verlust der Kupferresistenz führte, ist ebenfalls eine direkte Bindung der frei im Periplasma vorkommende Kupferionen an den CusCBA-Transportkomplex und anschließende Entgiftung möglich (Abb. 23B).

Eine weitere Möglichkeit der Entgiftung von Kupfer- und Silberionen durch die *cus*-Determinante stellt der direkte Transport der Schwermetallionen aus dem Cytoplasma über beide Membranen ins Außenmedium, *Transenvelope*-Transport, dar (Abb. 23C). Auch wenn aufgrund der bisherigen Ergebnisse ein Transport aus dem Periplasma favorisiert werden kann, ist diese Möglichkeit für die Resistenzvermittlung nicht auszuschließen.

4.5. Ausblick

Die wichtigste, noch zu klärende Frage ist weiterhin die Rolle von CusF in der *cus*-vermittelten Kupferresistenz. Um dies zu untersuchen, ist es notwendig die fehlenden Liganden bei der Bindung des Kupfers an CusF zu identifizieren. Bei CusF handelt es sich bei anscheinend um ein neuartiges Kupferzentrum, für das nach Kristallisation des Proteins die an der Kupferbindung beteiligten Aminosäurereste identifiziert werden könnten. Auch wäre zu untersuchen, welche Aminosäurereste von CusF für die Interaktion mit dem Transportkomplex wichtig sind. Desweiteren ist zu klären, ob es sich bei CusF tatsächlich um ein frei im Periplasma bewegliches Kupfer-Chaperon handelt, oder ob CusF Bestandteil des CusCBA-Efflux-Komplexes ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Kupfer ist auf Grund seiner Redoxeigenschaften eines der wichtigsten Spurenelemente, doch ist auf dieses Redoxverhalten auch seine Toxizität zurückzuführen. In *Escherichia coli* wurden bisher drei chromosomal kodierte Systeme identifiziert, die an der Kupferhomöostase beteiligt sind: Die P-Typ-ATPase CopA transportiert Cu(I) aus dem Cytoplasma in den periplasmatischen Raum. Die Multicopper-Oxidase CueO schützt periplasmatische Enzyme vor Kupfer-induzierten Schäden. Das Cus-System wird durch zwei Operone, *cusRS* und *cusCFBA*, kodiert, die in Gegenrichtung transkribiert werden. Das *cusRS*-Operon kodiert für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem, *cusCFBA* für die Proteine eines CBA-Efflux-Komplexes und für CusF. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der *cusCFBA*-vermittelten Kupferresistenz, die in *E. coli* nur in Abwesenheit von CueO bestimmbar ist.

1. Durch Expression von *cusA* bzw. *cusCFBA* *in trans* konnten die *E. coli* Stämme GR10($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) bzw. GR15($\Delta cueO \Delta cusA::cm$) partiell komplementiert werden. Ohne CusB und CusC war CusA nicht in der Lage, im *E. coli* Stamm GR10 Resistenz zu vermitteln. Die Deletion von *cusC*, *cusF* oder *cusB* in *E. coli* GR1($\Delta cueO::cm$) hatte eine Verminderung der Kupferresistenz zur Folge. Dabei führte eine Deletion von *cusB* zu gleich starkem Resistenzverlust, wie die Deletion von *cusA*. Demgegenüber zeigte ein Stamm mit Deletion von *cusC* eine geringe Restresistenz. Den geringsten Einfluss hatte die Deletion von *cusF*, doch konnte auch hier eindeutig die Beteiligung an der Kupferresistenz gezeigt werden.
2. Als RND-Protein besitzt CusA 12 Transmembran-Durchgänge und zwei große periplasmatische Domänen. In der zweiten periplasmatischen Domäne konnten Methioninreste als potentielle Liganden des Kupfers identifiziert werden. Diese Reste sind auch in anderen RND-Proteinen konserviert, die möglicherweise am Transport monovalenter Kationen beteiligt sind. Der Austausch der Methioninreste M₅₇₃, M₆₂₃ und M₆₇₂ führte zum Verlust der Kupferresistenz und sind daher essentiell. Der Austausch von M₈₁₂ zu Isoleucin führte zu einer Verringerung der Kupfertoleranz. Die Mutation anderer ebenfalls konservierter Methioninreste der zweiten periplasmatischen Domäne von CusA hatte keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins.

3. Mutationen konservierter geladener Aminosäurereste in der Transmembran-Helix IV von CusA zeigten, dass die negativen Ladungen essentiell für die Funktion des Proteins sind. Demgegenüber hatte die Einführung einer zusätzlichen Ladung eine Verminderung der *cus*-vermittelten Kupferresistenz zur Folge.
4. CusF ist im Periplasma lokalisiert. Das Protein wurde nativ gereinigt. Die *leader*-Sequenz wurde *in vivo* nach Aminosäure Q₂₁ abgespalten, so dass ein prozessiertes Protein im Periplasma vorlag. Es wurden polyklonale Antikörper gegen CusF gewonnen, mit denen CusF im periplasmatischen Extrakt von *E. coli* nachgewiesen wurde. Die Expression von CusF erfolgte Kupfer-abhängig. Gereinigtes CusF-Protein band *in vitro* ein mol Kupfer pro mol Protein, war violett gefärbt und zeigte im UV/visible Spektrum ein Absorptions-Maximum bei ca. 510 nm.
5. Ergebnisse des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems deuten auf eine Interaktion von CusF mit CusB und CusC. Die Deletionen der Gene des *cusCFBA*-Operons führten zu einer erhöhten Cus-Expression vom Promotor *cusCp*, wobei keine Unterschiede zwischen den einzelnen Mutantenstämmen auftraten. Somit ist für CusF eine Rolle bei der Regulation des Promotors *cusCp* unwahrscheinlich.
6. Durch Expression von CusF *in trans* war es möglich, einen *cusF*-Deletionsstamm [*E. coli* Stamm EC933($\Delta cueO \Delta cusF$)] partiell zu komplementieren. Mutation der konservierten Methioninreste M₆₉ und M₇₁ in CusF verminderte die Fähigkeit zur Kupferbindung auf 0.2 mol Kupfer pro mol Protein und die Komplementationsfähigkeit des Mutanten-CusF.
7. Mutation der Histidinreste von CusF zu Glutamin hatte keinen Einfluss auf die vermittelte Kupferresistenz. Nach Austausch der Histidinreste H₅₇ und H₅₈ zu Argininresten wurde das Protein nicht mehr prozessiert. Eine Fünffach-Histidin-Arginin-Mutante wurde im Cytoplasma akkumuliert. Auch die Mutation weiterer Aminosäurereste (D₄₈N und F₇₃Y) als mögliche Liganden des Kupfers, hatte keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins.

6. LITERATUR

- Aires, J. R., J. C. Pechere, C. Van Delden und T. Kohler.** 2002. Amino Acid Residues Essential for Function of the MexF Efflux Pump Protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(7):**2169-73.
- 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.
- Andersen, C., C. Hughes und V. Koronakis.** 2000. Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Rep.* **1(4):**313-8.
- Andersen, C., C. Hughes und V. Koronakis.** 2001. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol.* **13(4):**412-6.
- Andersson, H., E. Bakker und G. von Heijne.** 1992. Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **267(3):**1491-5.
- 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.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith und K. Struhl.** 1993. Current protocols in molecular biology. Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Bender, C. L. und D. A. Cooksey.** 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Bacteriol.* **169(2):**470-4.
- Bensadown, A. und D. Weinstein.** 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem.* **70:241-250.**
- 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(Pt 1):**217-23.
- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russel-Jones und E. C. Gottschlich.** 1984. A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal Biochem.* **136:175-179.**

- 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.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**:248-254.
- Brown, N. L., S. R. Barrett, J. Camakaris, B. T. Lee und D. A. Rouch.** 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol*. **17**(6):1153-66.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez und J. M. Short.** 1987. XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galactosidase selection. *Biotechniques*. **5**:376-378.
- Cai, D. und J. P. Klinman.** 1994. Copper amine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization of an active enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. **33**(24):7647-53.
- Cha, J. S. und D. A. Cooksey.** 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**(20):8915-9.
- Cobine, P., M. D. Harrison und C. T. Dameron.** 1999. Copper-binding properties of the N-terminus of the Menkes protein. *Adv Exp Med Biol*. **448**:153-64.
- Cobine, P., W. A. Wickramasinghe, M. D. Harrison, T. Weber, M. Solioz und C. T. Dameron.** 1999. The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett*. **445**(1):27-30.
- Cobine, P. A., G. N. George, C. E. Jones, W. A. Wickramasinghe, M. Solioz und C. T. Dameron.** 2002. Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY: metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry*. **41**(18):5822-9.
- Cooper, R. A., P. F. Knowles, D. E. Brown, M. A. McGuirl und D. M. Dooley.** 1992. Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K- 12. *Biochem J*. **288**(Pt 2):337-40.
- Dameron, C. T. und M. D. Harrison.** 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr*. **67**(5 Suppl):1091S-1097S.

- Datsenko, K. A. und B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(12):6640-5.
- Derman, A. I. und J. Beckwith.** 1991. *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol.* **173**(23):7719-22.
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**(13):6127-6145.
- Fan, B., G. Grass, C. Rensing und B. P. Rosen.** 2001. *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem Biophys Res Commun.* **286**(2):414-8.
- Federico, R., R. Angelini, L. Ercolini, G. Venturini, A. Mattevi und P. Ascenzi.** 1997. Competitive inhibition of swine kidney copper amine oxidase by drugs: amiloride, clonidine, and gabexate mesylate. *Biochem Biophys Res Commun.* **240**(1):150-2.
- Forbes, J. R., G. Hsi und D. W. Cox.** 1999. Role of the copper-binding domain in the copper transport function of ATP7B, the P-type ATPase defective in Wilson disease. *J Biol Chem.* **274**(18):12408-13.
- Fralick, J. A.** 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**(19):5803-5.
- Franke, S., G. Grass und D. H. Nies.** 2001. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology.* **147**(Pt 4):965-72.
- 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.
- Gatti, D., B. Mitra und B. P. Rosen.** 2000. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J Biol Chem.* **275**(44):34009-12.
- Glockner, A. B., A. Jungst und W. G. Zumft.** 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol.* **160**(1):18-26.
- 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.
- Goodyer, I. D., E. E. Jones, A. P. Monaco und M. J. Francis.** 1999. Characterization of the Menkes protein copper-binding domains and their role in copper-induced protein relocalization. *Human Mol Gen.* **8**(8):1473-1478.

- 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**(Pt 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.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, A. Nomura, K. Okamoto, M. Tsuda und T. Nishino.** 1998. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **165**(1):21-7.
- Grass, G.** 2000. Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Grass, G., 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. und C. Rensing.** 2001a. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**(6):2145-7.
- Grass, G. und C. Rensing.** 2001b. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **286**(5):902-8.
- 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., 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.
- Guan, L., M. Ehrmann, H. Yoneyama und T. Nakae.** 1999. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* **274**(15):10517-22.
- Guan, L. und T. Nakae.** 2001. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **183**(5):1734-9.
- Gupta, A., K. Matsui, J. F. Lo und S. Silver.** 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med.* **5**(2):183-8.

- Gupta, A., L. T. Phung, D. E. Taylor und S. Silver.** 2001. Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiology*. **147**(Pt 12):3393-402.
- Hagman, K. E., W. Pan, B. G. Spratt, J. T. Balthazar, R. C. Judd und W. M. Shafer.** 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology*. **141**(Pt 3):611-22.
- Harrison, M. D. und C. T. Dameron.** 1999. Molecular mechanisms of copper metabolism and the role of the Menkes disease protein. *J Biochem Mol Toxicol*. **13**(2):93-106.
- Harrison, M. D., C. E. Jones, M. Solioz und C. T. Dameron.** 2000. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci*. **25**(1):29-32.
- Harrison, M. D., S. Meier und C. T. Dameron.** 1999. Characterisation of copper-binding to the second sub-domain of the Menkes protein ATPase (MNK12). *Biochim Biophys Acta*. **1453**(2):254-60.
- 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.
- Hassett, R., D. R. Dix, D. J. Eide und D. J. Kosman.** 2000. The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. **351 Pt 2**:477-84.
- Hay, M. T., R. M. Milberg und Y. Lu.** 1996. Preparation and characterization of mercury and silver derivatives of an engineered purple copper center in azurin. *J Am Chem Soc*. **118**:11976-11977.
- Hess, H. H. und J. E. Lees.** 1978. Water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal Biochem*. **85**:295-300.
- Huber, M., G. Hintermann und K. Lerch.** 1985. Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry*. **24**(22):6038-44.
- Huffman, D. L., J. Huyett, F. W. Outten, P. E. Doan, L. A. Finney, B. M. Hoffman und T. V. O'Halloran.** 2002. Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the Multicopper Oxidase Function of PcoA, Two Essential Components of *Escherichia coli pco* Copper Resistance Operon. *Biochemistry*. **41**(31):10046-55.
- Hung, I. H., R. L. Casareno, G. Labesse, F. S. Mathews und J. D. Gitlin.** 1998. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defence. *J Biol Chem*. **273**(3):1749-54.
- Janulczyk, R., J. Pallon und L. Bjorck.** 1999. Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* ABC transporter with multiple specificity for metal cations. *Mol Microbiol*. **34**(3):596-606.

- Jensen, P. Y., N. Bonander, L. B. Moller und O. Farver.** 1999. Cooperative binding of copper(I) to the metal binding domains in Menkes disease protein. *Biochim Biophys Acta.* **1434**(1):103-13.
- Jerpseth, B., A. Greener, J. M. Short, J. Viola und P. L. Kretz.** 1993. *Strategies.* **6**:6.
- Johnson, J. L.** 1981. Genetic Characterization. In: Gerhardt, P. (Ed.) Manual of Methods of General Bacteriology, ASM, Washington, USA:450-472.
- 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.
- Kampfenkel, K., S. Kushnir, E. Babiychuk, D. Inze und M. Van Montagu.** 1995. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem.* **270**(47):28479-86.
- Karamyshev, A. L., Z. N. Karamysheva, V. N. Kajava, V. N. Ksenzenko und M. A. Nesmeyanova.** 1998. Processing of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: role of the primary structure of the signal peptide cleavage region. *J Mol Biol.* **277**(4):859-870.
- 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.
- Kelly, M., P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost und M. Saraste.** 1993. Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center. *J Biol Chem.* **268**(22):16781-7.
- Kim, C., W. W. Lorenz, J. T. Hoopes und J. F. Dean.** 2001. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *J Bacteriol.* **183**(16):4866-75.
- Klomp, L. W., S. J. Lin, D. S. Yuan, R. D. Klausner, V. C. Culotta und J. D. Gitlin.** 1997. Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem.* **272**(14):9221-6.
- Kobayashi, M. und H. Shoun.** 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Biol Chem.* **270**(8):4146-51.
- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty und J. C. Pechere.** 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **23**(2):345-54.

- Koronakis, V., J. Li, E. Koronakis und K. Stauffer.** 1997. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol.* **23**(3):617-26.
- 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.
- Kosonen, T., J. Y. Uriu-Hare, M. S. Clegg, C. L. Keen und R. B. Rucker.** 1997. Incorporation of copper into lysyl oxidase. *Biochem J.* **327**(Pt 1):283-9.
- Kuo, Y. M., B. Zhou, D. Cosco und J. Gitschier.** 2001. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(12):6836-41.
- Kyte, J. und R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol.* **157**:105-132.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lee, D. H., T. R. O'Connor und G. P. Pfeifer.** 2002a. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG→TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* **30**(16):3566-73.
- Lee, J., M. M. Pena, Y. Nose und D. J. Thiele.** 2002b. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem.* **277**(6):4380-7.
- Lee, J., J. R. Prohaska und D. J. Thiele.** 2001. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(12):6842-7.
- Lee, S. M., G. Grass, C. Rensing, S. R. Barrett, C. J. Yates, J. V. Stoyanov und N. L. Brown.** 2002c. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**(3):616-20.
- Legatzki, A., S. Franke, S. Lucke, T. Hoffmann, A. Anton, D. Neumann und D. H. Nies.** 2002. First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. eingereicht.
- Li, X. Z., N. Barre und K. Poole.** 2000. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* **46**(6):885-93.

- Li, X. Z., H. Nikaido und K. Poole.** 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(9):1948-53.
- 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.
- Lim, C. K. und D. A. Cooksey.** 1993. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* **175**(14):4492-8.
- Lin, S. J. und V. C. Culotta.** 1995. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(9):3784-8.
- Lin, S. J., R. A. Pufahl, A. Dancis, T. V. O'Halloran und V. C. Culotta.** 1997. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem.* **272**(14):9215-20.
- Lowry, O. H., A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**:265-275.
- Lu, Z. H. und M. Solioz.** 2001. Copper-induced proteolysis of the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem.* **276**(51):47822-7.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **16**(1):45-55.
- 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.
- Magnet, S., P. Courvalin und T. Lambert.** 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**(12):3375-80.
- Mandel, M. und A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* **53**:159-162.
- Manioli, C. und J. Beckwith.** 1985. TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:8129-8133.
- Maseda, H., H. Yoneyama und T. Nakae.** 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(3):658-64.

- Mellano, M. A. und D. A. Cooksey.** 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Bacteriol.* **170**(6):2879-83.
- Mergeay, M., D. H. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles und F. van Gijsegen.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a fakultativ chemolithotroph with plasmid bound resistance to heave metals. *J Bacteriol.* **162**:328-334.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mills, S. D., C. A. Jasalavich und D. A. Cooksey.** 1993. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* **175**(6):1656-64.
- Mine, T., Y. Morita, A. Katakao, T. Mizushima und T. Tsuchiya.** 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:415-417.
- Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten und T. V. O'Halloran.** 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **182**(20):5864-71.
- Nakamura, M., T. Nakajima, Y. Ohba, S. Yamauchi, B. R. Lee und E. Ichishima.** 2000. Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem J.* **350 Pt 2**:537-45.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley und S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* **28**(3):239-242.
- 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., A. Nies, L. Chu und S. Silver.** 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(19):7351-5.

- 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.
- Nikaido, H. und H. I. Zgurskaya.** 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**(2):215-8.
- Odermatt, A., R. Krapf und M. Solioz.** 1994. Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. *Biochem Biophys Res Commun.* **202**(1):44-8.
- Odermatt, A. und M. Solioz.** 1995. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem.* **270**(9):4349-54.
- Okusu, H., D. Ma und H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol.* **178**(1):306-8.
- Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale und T. V. O'Halloran.** 2001. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **276**(33):30670-7.
- Outten, F. W., C. E. Outten, J. Hale und T. V. O'Halloran.** 2000. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. *J Biol Chem.* **275**(40):31024-9.
- 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.
- Pena, M. M., J. Lee und D. J. Thiele.** 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* **129**(7):1251-60.
- Pena, M. M., S. Puig und D. J. Thiele.** 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem.* **275**(43):33244-51.
- Pena, M. M. O., K. A. Koch und D. J. Thiele.** 1998. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **18**(6):2514-23.
- Petersen, C. und L. B. Moller.** 2000. Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene.* **261**(2):289-98.

- Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of Rhodospirillaceae. *Arch Microbiol.* **100**:197-206.
- Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li und T. Nishino.** 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **21**(4):713-24.
- Poole, K., K. Krebs, C. McNally und S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* **175**(22):7363-72.
- Portnoy, M. E., A. C. Rosenzweig, T. Rae, D. L. Huffman, T. V. O'Halloran und V. C. Culotta.** 1999. Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem.* **274**(21):15041-5.
- Pribyl, T.** 2001. Topologie des CzcCBA-Efflux-Komplexes aus *Ralstonia metallidurans*. Dissertation Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- Provence, D. L. und R. I. Curtiss.** 1981. Gene transfer in Gram-Negative Bacteria: Generalized Transduction in *E. coli* with Phage P1. in Gerhard, P. (Ed.) *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM, Washington, D.C.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* **57**(1):50-108.
- Puig, S., J. Lee, M. Lau und D. J. Thiele.** 2002. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high-affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem.* **30**:30.
- Rabilloud, T., G. Carpentier und P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis.* **9**(6):288-291.
- Rensing, C., 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., M. Ghosh und B. P. Rosen.** 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol.* **181**(19):5891-7.
- Rensing, C., T. Pribyl und D. H. Nies.** 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol.* **179**(22):6871-9.
- Riggio, M., J. Lee, R. Scudiero, E. Parisi, D. J. Thiele und S. Filosa.** 2002. High affinity copper transport protein in the lizard *Podarcis sicula*: molecular cloning, functional characterization and expression in somatic tissues, follicular oocytes and eggs. *Biochim Biophys Acta.* **1576**(1-2):127-35.

- 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., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing und W. R. Montfort.** 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(5):2766-71.
- Robinson, H., M. C. Ang, Y. G. Gao, M. T. Hay, Y. Lu und A. H. Wang.** 1999. Structural basis of electron transfer modulation in the purple CuA center. *Biochemistry.* **38**(18):5677-83.
- Rosenberg, E. Y., D. Ma und H. Nikaido.** 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol.* **182**(6):1754-6.
- Saier, M. H., Jr.** 1994. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanings concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol Rev.* **58**(1):71-93.
- Saier, M. H., Jr.** 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**(2):354-411.
- 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 Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanchez, L., W. Pan, M. Vinas und H. Nikaido.** 1997. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol.* **179**(21):6855-7.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA-Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **75**:5463-5467.
- Schägger, H. und G. von Jagow.** 1987. Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**:368-379.
- 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 Acides Res.* **28**:231-234.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork und Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:5857.

- Schwuchow, T.** 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sharff, A., C. Fanutti, J. Shi, C. Calladine und B. Luisi.** 2001. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur J Biochem.* **268**(19):5011-26.
- Solioz, M. und A. Odermatt.** 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem.* **270**(16):9217-21.
- Solioz, M., A. Odermatt und R. Krapf.** 1994. Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* **346**(1):44-7.
- Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**:503-517.
- Speno, H., M. R. Taheri, D. Sieburth und C. T. Martin.** 1995. Identification of essential amino acids within the proposed CuA binding site in subunit II of Cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* **270**(43):25363-9.
- Srikumar, R., X. Z. Li und K. Poole.** 1997. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **179**(24):7875-81.
- Stoyanov, J. V., J. L. Hobman und N. L. Brown.** 2001. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol.* **39**(2):502-11.
- Strausak, D. und M. Solioz.** 1997. CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J Biol Chem.* **272**(14):8932-6.
- Tabor, S. und C. C. Richardson.** 1985. A bacteriophagesystem for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:1074-1078.
- Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes und V. Koronakis.** 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J.* **17**(22):6487-96.
- Tetaz, T. J. und R. K. Luke.** 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **154**(3):1263-8.
- 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.

- Vargas, E., S. Gutierrez, M. E. Ambriz und C. Cervantes.** 1995. Chromosome-encoded inducible copper resistance in *Pseudomonas strains*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **68**(3):225-9.
- Velasco, L., S. Mesa, M. J. Delgado und E. J. Bedmar.** 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu- containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta*. **1521**(1-3):130-4.
- Vieira, J. und J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. **19**(3):259-268.
- Wang, X., M. C. Ang und Y. Lu.** 1999. Kinetics of copper incorporation into an engineered purple azurin. *J Am Chem Soc*. **121**:2947-2948.
- Weber, K. und M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. **244**(16):4406-4412.
- Weissman, Z., I. Berdicevsky, B. Z. Cavari und D. Kornitzer.** 2000. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(7):3520-5.
- Wessel, D. und V. J. Flügge.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. **138**:141-143
- Williams, J. R., A. G. Morgan, D. A. Rouch, N. L. Brown und B. T. Lee.** 1993. Copper-resistant enteric bacteria from United Kingdom and Australian piggeries. *Appl Environ Microbiol*. **59**(8):2531-7.
- Wimmer, R., T. Herrmann, M. Solioz und K. Wuthrich.** 1999. NMR structure and metal interactions of the CopZ copper chaperone. *J Biol Chem*. **274**(32):22597-603.
- Wong, K. K., F. S. Brinkman, R. S. Benz und R. E. Hancock.** 2001. Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol*. **183**(1):367-74.
- Wunderli-Ye, H. und M. Solioz.** 1999. Effects of promoter mutations on the in vivo regulation of the cop operon of *Enterococcus hirae* by copper(I) and copper(II). *Biochem Biophys Res Commun*. **259**(2):443-9.
- 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.
- Yang, C. H., H. R. Azad und D. A. Cooksey.** 1996. A chromosomal locus required for copper resistance, competitive fitness, and cytochrome c biogenesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(14):7315-20.

- Yoneyama, H. und T. Nakae.** 1996. Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology*. **142**(Pt 8):2137-44.
- Yoneyama, H., A. Ocaktan, N. Gotoh, T. Nishino und T. Nakae.** 1998. Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. **244**(3):898-902.
- Zgurskaya, H. I. und H. Nikaido.** 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.
- Zhou, B. und J. Gitschier.** 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(14):7481-6.
- Zhou, H. und D. J. Thiele.** 2001. Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. **276**(23):20529-35.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D. H. Nies für die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung dieses Themas bedanken, für seine konstruktiven Vorschläge und anregenden/kritischen Diskussionen sowie die Möglichkeit der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten an seinem Institut durchzuführen und die kritischen Diskussionen der Ergebnisse in den Montagsseminaren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Gregor bedanken, der mich vor über fünf Jahren unter seine Fittiche nahm und mir die ersten Schritte im Labor beibrachte. Danke für Dein schier unerschütterliches Vertrauen in meine Fähigkeiten, die vielen eingebrachten Ideen und Vorschläge, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und vor allem dafür, dass Du mein Gewissen bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit warst und Dir viel Zeit fürs Korrekturlesen genommen hast, auch wenn Zeit das ist, was Du nie übrig hast. Danke auch für die Aufnahme während der vier Monate in Tucson und die unvergesslichen Eindrücke dort.

Ebenso möchte ich mich bei Antje für das Korrekturlesen bedanken und ihr immer offenes Ohr bei den unvermeidlichen Krisen im Labor.

Prof. Dr. Christopher Rensing danke ich für die Möglichkeit meinen wissenschaftlichen Horizont in seinem Labor an der U of A zu erweitern. Allen Mitarbeitern seines Labors danke ich für die herzliche Aufnahme und Hilfe sowie ihr Verständnis bei den nicht zu vermeidenden sprachlichen Problemen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst möchte ich für die Finanzierung eines dreimonatigen Aufenthaltes im Labor von Prof. Dr. Christopher Rensing an der U of A.

Bei Frau Dr. Beate Fricke möchte ich mich für die Herstellung der Antikörper bedanken.

Mike Kopplin der *Analytical Section of the Hazard Identification Core, College of Pharmacy* der *University of Arizona* (Tucson, AZ, USA) danke ich für die Durchführung der Kupferbestimmung mittels ICP-MS. Prof. Dr. William R. Montfort und Dr. Andrzej Weichsel vom *Department of Biochemistry and Molecular Biophysics* der U of A danke ich für den gewährten Einblick in die Proteinkristallisation.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. H. Nies danke ich für das angenehme Arbeitsklima, etablierte Methoden auf die ich zurückgreifen konnte und die vielen hilfreichen Tipps und Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie danke ich für die ständige Unterstützung sowie dafür, dass sie mir immer das Gefühl gab, die richtige Entscheidung getroffen zu haben, auch wenn ich selbst manchmal ins Zweifeln kam.

Lebenslauf

Name:	Sylvia Franke
Geburtsdatum:	05.06.1975
Geburtsort:	Rochlitz
Familienstand:	ledig
09/1982 – 08/1990	Polytechnische Oberschule „Juri Gagarin“ in Geithain
09/1990 – 06/1994	Erweiterte Oberschule / Gymnasium in Geithain
06/1994	Allgemeine Hochschulreife
10/1994 – 12/1999	Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/1998 – 10/1998	Diplomprüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Botanik
11/1998 – 11/1999	Diplomarbeit zum Thema: „Chromosomale Silberresistenz in <i>Escherichia coli</i> “ Abschluss: Diplom-Biologe (Prätikat: „Mit Auszeichnung“)
seit 01/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und aus benutzten Werken entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Halle/Saale, den 08.10.2002

Sylvia Franke