

**Das Cd-induzierbare *crp*-Gen aus dem terrestrischen  
Oligochaeten *Enchytraeus*: Genomische Organisation  
und Bedeutung für die Cd-Detoxifizierung**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Steffen Tschuschke  
aus Wuppertal

Düsseldorf  
2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Koreferent: Prof. Dr. H. Greven

Tag der mündlichen Prüfung: 03.Juli 2001

## Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs "Toxikologie und Umwelthygiene" angefertigt und gemeinsam von Herrn Professor Dr. Frank Wunderlich und Herrn Prof. Dr. Hartmut Greven betreut. Die experimentellen Arbeiten wurden in der Abteilung für Molekulare Parasitologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Wunderlich und Herrn Prof. Dr. Greven danke ich besonders herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreiche Betreuung und die grosszügige Unterstützung der experimentellen Arbeiten.

Bei Herrn Dr. H.-P. Schmitt-Wrede bedanke ich mich ganz besonders herzlich für seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, für die vielen wertvollen Anregungen sowie für die gründliche Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Olaf Stamm danke ich für die ungezählten Gespräche, Tips und Ratschläge, die mir im Verlauf meiner Arbeit sehr geholfen haben.

Bei Herrn Predrag Marinovski bedanke ich mich für seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragen rund um den Computer.

Frau Dr. Jutta Begerow, Abteilung Analytische Chemie, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf, danke ich für die Hilfe bei der Atomabsorptionsspektrometrie.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Parasitologie möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich für die ausserordentlich gute Zusammenarbeit und ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Meiner Frau Nicole danke ich von ganzem Herzen für ihr Verständnis und für ihre liebevolle Unterstützung in den vergangenen Jahren. Meiner kleinen Tochter Emma danke ich für ihre Fröhlichkeit, die mir die Arbeit immer wieder erleichtert hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Cadmium in der Umwelt	1
1.2	Aufnahme von Cadmium in Zellen	2
1.3	Biochemische Aspekte der Toxizität von Cadmium	3
1.4	Detoxifizierung von Schwermetallen	5
1.5	Das CRP-Protein aus <i>Enchytraeus buchholzi</i>	9
1.6	Zielsetzung	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Chemikalien und Enzyme	12
2.2	Lösungen und Puffer	12
2.3	Versuchstiere	14
2.4	Bakterienstämme, Hefestämme und Vektoren	15
2.5	Isolation genomischer DNA aus <i>E. buchholzi</i>	15
2.6	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	16
2.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	16
2.8	Radioaktive Markierung von DNA	16
2.9	DNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierung	16
2.10	Transformation von <i>E. coli</i>	16
2.11	Präparation von Plasmid-DNA	17
2.12	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	17
2.13	Enzymatische Modifikation von DNA	17
2.13.1	Restriktion	17
2.13.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	17
2.13.3	Ligation von DNA	18
2.14	Polymerase Kettenreaktion	18
2.14.1	Primer	18
2.14.2	Plasmid-PCR	18
2.14.3	Genomische PCR	18
2.14.4	'Genomic Walking'	20
2.14.5	Klonierung von PCR-Produkten	20
2.15	DNA-Sequenzanalyse	20
2.15.1	Sequenzierprimer	21
2.15.2	Sequenzierung mit Thermo Sequenase	22
2.15.3	Computeranalyse von Sequenzdaten	22
2.16	<i>in vitro</i> -Mutagenese	22
2.16.1	Oligonukleotide für die Mutagenese	22
2.16.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
2.16.3	Mutagenese	23
2.17	Heterologe Expression des CRP in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.18	Transformation von Hefe	25

<b>2.19</b>	<b>Erstellung von Wachstumskurven</b>	<b>25</b>
<b>2.20</b>	<b>Bestimmung des Cadmium-Gehaltes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>25</b>
<b>2.21</b>	<b>Radioaktive Markierung des CRP in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>26</b>
<b>2.22</b>	<b>Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen</b>	<b>26</b>
<b>2.23</b>	<b>Proteinbestimmung nach Bradford</b>	<b>26</b>
<b>2.24</b>	<b>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen und 'Western Blot'</b>	<b>27</b>
2.24.1	SDS-PAGE	27
2.24.2	Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.24.3	Coomassie-Brilliant-Blue Anfärbung von Proteinen	27
2.24.4	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran	27
2.24.5	Immundetektion	28
<b>2.25</b>	<b>Lokalisation des CRP in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>28</b>
2.25.1	Immunfluoreszenz	28
2.25.2	Anfärbung des Zellkerns	29
2.25.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>Molekulare Charakterisierung des <i>crp</i>-Gens</b>	<b>30</b>
3.1.1	Organisation des <i>crp</i> -Gens	30
3.1.2	Analyse der Exon- und Intron-Bereiche des <i>crp</i> -Gens	35
3.1.3	Vergleich des <i>crp</i> -Gens mit Metallothionein-Genen aus Eukaryoten	42
3.1.4	DNA-Methylierung im Bereich des <i>crp</i> -Gens.	46
<b>3.2</b>	<b>Sequenzvergleiche zwischen dem CRP-Protein und Metallothioneinen</b>	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>Heterologe Expression des CRP-Proteins in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>52</b>
3.3.1	Vermittlung von Cadmiumresistenz durch das CRP in DTY167	53
3.3.2	Lokalisation des heterolog exprimierten CRP-Proteins in DTY167	55
<b>3.4</b>	<b>Heterologe Expression von CRP-Deletionsklonen in DTY167</b>	<b>57</b>
3.4.1	Klonierungsstrategie für die Expression der CRP-Deletionsklone	57
3.4.2	Nachweis der Expression von CRP-Deletionsklonen in DTY167	59
3.4.3	Wachstumsvergleiche von CRP-Deletionsklonen in DTY167	61
3.4.4	Cadmium-Akkumulation in Hefezellen	64
<b>3.5</b>	<b>Mutagenese des CRP-Proteins</b>	<b>66</b>
3.5.1	Einfluss von Mutationen in Repeat-Übergängen auf die Vermittlung der Cadmium-Resistenz	66
3.5.2	Einfluss von Mutationen im Repeat 4 des CRP auf die Vermittlung der Cadmium-Resistenz	69

<b>4 Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1 Das Cadmium-induzierbare <i>crp</i> -Gen aus <i>Enchytraeus buchholzi</i>	73
4.2 Vergleich von CRP und Metallothioneinen	79
4.3 Vermittlung einer Cadmium-Resistenz durch das CRP in <i>S. cerevisiae</i>	82
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>90</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>108</b>

## Abkürzungen

A, C, G, T, U	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil
(A, C, G, T, U)TP	Adenosin-, Cytidin-, Guanosin-, Thymidin-, Uracil 5'-Triphosphat
AS	Aminosäure
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cd	Cadmium
cDNA	komplementäre DNA
d(A, C, G, T)TP	2'-Desoxyadenosin-, 2'-Desoxycytidin-, 2'-Desoxyguanosin-, 2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
HRP	'Horse Radish' Peroxidase
IR	Infrarot
IgG	Immunglobulin G
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
M	Molarität
mA	Milliampere
MCS	'multi cloning site'
MRE	'metal responsive element'
mRNA	'messenger' RNA
MT	Metallothionein
μCi	Mikrocurie (3,7 x 10 <sup>7</sup> Zerfälle pro Sekunde)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(Hydroxylmethyl)Aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
Ü/N	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht

# 1 Einleitung

## 1.1 Cadmium in der Umwelt

Schwermetalle stellen aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften und ihrer Akkumulation in der Nahrungskette eine grosse Gefahr für viele Ökosysteme und Lebewesen dar. Natürlicherweise liegen Schwermetalle im Mineralbestand der Erdkruste verteilt vor. Durch physikalische und chemische Verwitterung werden sie freigesetzt und treten so in geregelte biogeochemische Kreisläufe ein. Die industrielle Förderung und Verarbeitung von Schwermetallen sowie die Nutzung fossiler Brennstoffe steigern die natürlichen Stoffumsätze vor allem bei selten vorkommenden Schwermetallen wie Cadmium in erheblichem Umfang [Ayers, 1992; Schimming, 1992]. Vor allem Böden stellen in diesem Zusammenhang aufgrund ihrer Kationenbindungsfähigkeit eine Senke dar, in der es als Folge der erhöhten Umsätze zu einer anthropogen bedingten Akkumulation von Schwermetallen kommt. So finden sich beispielsweise 80 bis 90 % des emittierten Cadmiums initial in den Böden wieder [Adriano, 1986; Fiedler, 1993]. Die bedingt durch die zunehmend sauren Niederschläge abnehmenden pH-Werte in den Böden mobilisieren die gebundenen Schwermetalle und bedrohen so die Stabilität vieler Ökosysteme [Wieser, 1979; Kahle und Breckle, 1992; van Straalen und Bergema, 1995].

Ein Schwermetall, welches bei sauren Bedingungen in grossem Umfang mobilisiert wird, ist Cadmium [Fiedler, 1993]. Cadmium kommt mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,1 bis 0,5 mg/kg in der Erdkruste überwiegend in Zink-, Blei- und Kupfer-haltigen Gesteinen vor. In Sedimentgesteinen und marinen Ablagerungen können auch Cadmium-Gehalte von bis zu 500 mg/kg erreicht werden [WHO, 1992a]. Auf natürlichem Wege werden durch Verwitterung von Gesteinen, vulkanischen Aktivitäten oder grossflächige Waldbrände pro Jahr etwa 800 bis 1000 t Cadmium emittiert. Der mit 8000 bis 10000 t weitaus grössere Anteil an der jährlichen Emission von Cadmium ist anthropogenen Ursprungs [Nriagu und Pacyna, 1988; WHO, 1992a]. Vor allem durch die metallverarbeitende Industrie, durch Müllverbrennungsanlagen und intensive Landwirtschaft erfolgte in den letzten Jahrzehnten ein massiv gesteigerter Eintrag von Cadmium in die Umwelt. Es gelangt dabei in die Atmosphäre oder wird durch Abwässer sowie Festdepositionen global und regional umverteilt [Stöppler, 1991; WHO, 1992a; Foulkes, 2000].

Das in den Böden angereicherte Cadmium wird von Pflanzen in gelöster Form über die Wurzel aufgenommen und zum grössten Teil auch in diesem Organ gespeichert [WHO, 1992b]. Die Aufnahme von Cadmium durch Mensch und Tier erfolgt vor allem über die Nahrung aber auch über das Trinkwasser und die Atemwege. Das Cadmium wird zum überwiegenden Teil in stoffwechselaktiven und exkretorischen Organen wie beispielsweise der Leber und Niere von Säugetieren, der Mitteldarmdrüse bei Mollusken, dem Fettkörper bei Insekten oder dem Chloragoggewebe bei Oligochaeten akkumuliert [Ireland, 1981; Dallinger und Wieser, 1984; Posthuma und van Straalen, 1993]. Hinsichtlich der Verweildauer des Cadmiums in den Organismen zeigen sich grosse Unterschiede. Während das aufgenommene Cadmium in der Leber von Menschen eine Halbwertszeit von deutlich mehr als 10 Jahren hat, wird bei Invertebraten wie dem Springschwanz *Orchesella cincta* oder dem Oligochaeten *Enchytraeus buchholzi* eine im Vergleich zur Gesamtlebensdauer rasche Exkretion des aufgenommenen Cadmiums festgestellt [van Straalen *et al.*, 1987; Stöppler, 1991; Posthuma *et al.*, 1992; Willuhn *et al.*, 1996]. Als Folge einer Cadmium-Belastung treten bei Pflanzen Chlorosen und Nekrosen sowie eine

Hemmung des Wurzelwachstums auf [Dauderer, 1990; Kahle und Breckle, 1992]. Bei einer chronischen Belastung mit Cadmium kann es bei Vertebraten zu Nieren- und Leberfunktionsstörungen sowie Lungen- und Knochenschädigungen kommen [Stöppler, 1991; Strubelt *et al.*, 1996; Quig, 1998]. In den vergangenen Jahren rückt Cadmium als potentielles Kanzerogen vor allem für Lungen- und Prostatakrebs immer mehr in den Blickpunkt der Tumorforschung [Waal-kes, 2000]. Oligochaeten reagieren auf subletale Cadmiumkonzentrationen mit einem verminderten Wachstum, der Abschnürung von Segmenten und einer erniedrigten Reproduktionsrate [Willuhn, 1994; Edwards und Bohlen, 1996]. Für *Lumbricus* und andere Invertebraten wie die Muscheln *Crassostrea virginica* oder *Mytilus edulis* werden immuntoxische Wirkungen des Cadmiums beschrieben [Coles *et al.*, 1995; Suzuki und Cooper, 1995; Oubella, 1997; Galloway und Depledge, 2001]. Einige Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* reagieren auf eine subletale Cadmium-Belastung des umgebenden Mediums mit einem stark reduzierten Zellvolumen sowie einer verringerten Reproduktionsrate [Romandini *et al.*, 1992]

## 1.2 Aufnahme von Cadmium in Zellen

Unter biologischen Gesichtspunkten werden die Schwermetalle in vier Klassen eingeteilt [Foulkes, 2000]: Einziger Vertreter der Klasse A ist das Eisen, welches in relativ hohen Konzentrationen in den Zellen vorliegt und eine essentielle Bedeutung für viele physiologische Vorgänge in den Zellen hat. In die Klasse B werden Schwermetalle wie Strontium oder Lanthan eingeteilt, die nicht essentiell für die Lebensvorgänge sind und in niedrigen Dosen keine oder nur geringe toxische Wirkungen zeigen. Die dritte Klasse C enthält Elemente wie Zink, Kupfer oder Nickel, die als Spurenelemente essentiell für die Zellen sind, in hohen Konzentrationen jedoch toxisch wirken. In die Klasse D werden die Schwermetalle eingeteilt, die keine biologische Bedeutung haben und bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen toxisch wirken. Neben Quecksilber und Blei fällt in diese Gruppe auch Cadmium.

Da eine Diffusion von Cadmium-Ionen durch die Plasmamembran aufgrund der durch die positive Ladung bedingten grossen Hydrathülle ausgeschlossen ist, muss die Aufnahme von Cadmium in die Zellen über andere Mechanismen erfolgen. Für das toxische und nicht-essentielle Schwermetall existieren keine spezifischen Transportsysteme in den Plasmamembranen. Das divalente Kation nutzt aus diesem Grund sowohl aktive als auch passive Transportmechanismen, die ansonsten von den Zellen für die Aufnahme von essentiellen Spurenelementen genutzt werden. In den Zellen von Vertebraten und Invertebraten sind die genauen Mechanismen der Cadmium-Aufnahme noch nicht vollständig aufgeklärt. Fest steht jedoch, dass mehrere parallele Transportwege existieren, die unter anderem abhängig vom Zelltyp und dem jeweiligen Gewebe sind [Foulkes, 2000]. Weit verbreitet ist dabei die Aufnahme von Cadmium über Spannungs-kontrollierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [Hinkle, 1992].  $\text{Cd}^{2+}$  kann aber auch über Anionen-Kanäle in Form von anionischen Komplexen aus Karbonat-, Bikarbonat-, Hydroxyl- oder Chloridionen aufgenommen werden [Foulkes, 2000]. Pflanzen nehmen Cadmium grösstenteils über die Zellen der Wurzeln auf. Dabei werden unter anderem die Carrier-Systeme für die Aufnahme von essentiellen Kationen wie Eisen oder Calcium genutzt. So wird beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der Expression des Eisen(II)-Transporters IRT1 und der Cadmium-Aufnahme in *Arabidopsis thaliana* beobachtet [Briat und Lebrun, 1999]. Im heterologen Hefesystem zeigen sich Eisen-Transporter der Nramp-Genfamilie (natural resistance associated macrophage protein) von *Arabidopsis* (*AtNramp*) für eine Cd-Akkumulation in den Zellen ver-

verantwortlich [Thomine *et al.*, 2000]. Ebenso wie in tierischen Zellen kann der Einstrom von Cadmium in pflanzliche Zellen jedoch auch über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Carrier erfolgen [Clemens *et al.*, 1998].

Die Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigen bei einer Belastung mit Cadmium sehr schnell irreversible Schädigungen. So wird bei einigen Stämmen bei einer Cadmium-Konzentration von 0,5 mM innerhalb von 5 Minuten ein 90%iger Abfall der Lebensfähigkeit der Zellen einer Kultur beobachtet [Gadd und Mowll, 1983]. Die Cadmium-Aufnahme durch die Zellen muss demnach sehr schnell erfolgen. Tatsächlich werden innerhalb von weniger als 3 Minuten nach Beginn der Cadmium-Intoxikation 73 % der gesamten Cadmium-Aufnahme erreicht [Volesky *et al.*, 1993]. Die Aufnahme ist dabei abhängig von dem Glucoseangebot im Medium und erfolgt demnach überwiegend über aktive Transport-Systeme. Auch bei den Hefen werden Transportsysteme genutzt, die normalerweise für die Aufnahme von essentiellen Metall-Ionen zur Verfügung stehen [Blackwell *et al.*, 1995]. Die partielle Hemmung des Cadmium-Einstroms durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen deutet auf eine Nutzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen hin. Daneben werden auch Metall-Transportproteine der Plasmamembran für die Aufnahme von Cadmium genutzt. So zeigen sich der niedrig-affine Fe(II)-Transporter FET4 und der Mangan-Transporter SMF1 für die Aufnahme von Cadmium in die Hefezellen verantwortlich [Dix *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997].

Zusammenfassend bleibt hinsichtlich der zellulären Aufnahme eines toxischen Schwermetalls wie Cadmium festzuhalten, dass bei allen Lebewesen mehrere Transportwege nebeneinander existieren, die primär auf die Aufnahme essentieller Spurenelemente ausgerichtet sind. Die Zellen stehen somit vor dem Problem, intern den lebenswichtigen Gehalt an Spurenelementen aufrecht zu erhalten ohne gleichzeitig einen nicht mehr tolerierbaren Zustrom an toxischen Schwermetallen zuzulassen. Die effektive Regulation dieser Vorgänge stellt einen ersten Schutzmechanismus vor der toxischen Wirkung von Schwermetallen wie Cadmium dar. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte in diesem Zusammenhang ein Gen identifiziert werden, welches in einen solchen Regulationsvorgang involviert ist. Mutationen in dem *bsd2*-Gen führen zu einem unkontrollierten Einstrom von Schwermetall-Ionen über die Mangan-Transporter SMF1 und SMF2 in die Zellen [Liu *et al.*, 1997]. Das zugehörige BSD2-Protein ist im endoplasmatischen Retikulum der Zellen lokalisiert und erkennt Metall-beladene SMF-Transporter, die daraufhin bevorzugt dem proteolytischen Abbau in den Vakuolen zugeführt werden. Eine solche posttranslationale Kontrolle minimiert effektiv die Akkumulation toxischer Schwermetalle in den Hefezellen [Liu und Culotta, 1999].

### 1.3 Biochemische Aspekte der Toxizität von Cadmium

Eine Vielzahl der toxischen Eigenschaften des Cadmiums beruhen auf seiner Fähigkeit, mit den Molekülen biologischer Systeme direkt Komplexe oder Cluster auszubilden, die zu Funktionsbeeinträchtigungen oder zum kompletten Funktionsverlust der betroffenen Strukturen führen. Ein zweiter wichtiger Aspekt der Toxizität betrifft die indirekten Schädigungen der Zellen, die auf der Ausbildung von freien Radikalen und dem damit ausgelösten oxidativen Stress beruhen. Im folgenden sollen die toxischen Effekte des Cadmiums näher erläutert werden.

Die oxidativen Auswirkungen einer Cadmiumvergiftung haben ihre Ursache vor allem in der Fähigkeit der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen, andere zweiwertige Kationen wie  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  sehr effektiv aus ihren Bindungen in Proteinen zu verdrängen, wodurch es zu einer Anreicherung dieser Ionen im Cytosol der Zellen kommt. Die Übergangsmetalle Eisen und Kupfer besitzen unge-

paarte Elektronen und sind dadurch in der Lage, durch die Reduktion von freiem Sauerstoff die Bildung von Superoxid-Ionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu generieren. Diese Moleküle bilden den Ausgangspunkt für die Entstehung von Hydroxylradikalen ( $\cdot OH$ ), die für den Grossteil oxidativer Schädigungen in biologischen Systemen verantwortlich sind [Imlay *et al.*, 1988; Quig, 1998; Briat und Lebrun, 1999]. Die Radikal-Ionen zerstören durch Lipidperoxidation Membranstrukturen und beeinflussen so die Kompartimentierung und den Ionenhaushalt in den Zellen. Vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind von der Lipidperoxidation betroffen. So zeigen in Laborversuchen Hefezellen mit einem erhöhtem Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Cadmium [Howlett und Avery, 1997]. Verschärft wird die indirekte oxidative Wirkung von Cadmium durch die inhibitorische Wirkung des Schwermetalls auf die antioxidativen Prozesse in den Zellen. So besitzt Cadmium eine hohe Affinität zu Glutathion (GSH), wodurch einerseits der Gehalt an freien, reaktiven  $Cd^{2+}$ -Ionen in den Zellen verringert wird, andererseits jedoch weniger GSH als Radikalfänger zur Verfügung steht [Quig, 1998]. Durch Schädigung von beteiligten Enzymen kann der Glutathion-Metabolismus gestört werden, was zusätzlich zu einem verringerten GSH-Level in den Zellen führt [Dierickx, 1982; Briat und Lebrun, 1999]. Nicht nur Membranstrukturen, auch Proteine werden durch die Cadmium-induzierten freien Radikale oxidiert [Stadtman, 1993]. Vor allem die Aminosäuren Histidin, Arginin, Lysin, Prolin, Methionin und Cystein stellen dabei die Angriffspunkte dar. Als Folge der Oxidation werden die geschädigten Proteine bevorzugt von Proteasen abgebaut. Bestätigt wird die wichtige Rolle oxidativer Prozesse im Verlauf einer Cadmium-Intoxikation durch Superoxid-Dismutase- und Glutathion-defiziente Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, die eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp-Stamm zeigen [Brennan und Schiestl, 1996].

Neben den überwiegend indirekten oxidativen Effekten liegen die toxischen Eigenschaften des Cadmium auch in direkten Wechselwirkungen mit zellulären Strukturen begründet. So besitzt Cadmium eine hohe Affinität zu freien Sulfhydrylgruppen von Proteinen. Die Bindung der Ionen beeinflusst die biologische Aktivität der betroffenen Proteine, was zu Beeinträchtigungen verschiedener Stoffwechselwege wie beispielsweise des Glutathion-Metabolismus oder der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten über den Pentosephosphat-Weg führen kann [Vallee und Ulmer, 1972; Strubelt *et al.*, 1996]. Ähnliche Auswirkungen hat die bereits angesprochene Verdrängung anderer zweiwertiger Kationen wie Zink oder Kupfer aus ihren Bindungsstellen in Proteinen. Zudem beeinflusst Cadmium durch die Verdrängung anderer Kationen aus Komplexen den Mineralhaushalt der Zellen und stört so zusätzlich die metabolischen Prozesse in den Zellen.

Im ersten Kapitel wurde die potentielle Rolle von Cadmium als Kanzerogen bereits angesprochen. Cadmium wirkt in genotoxischen Laborversuchen schwach mutagen und führt nur beim Einsatz hoher Dosen zu Einzelstrangbrüchen in der DNA [Bolognesi *et al.*, 1999; Waalkes, 2000]. Im Mutagenitätstest nach Ames mit *Salmonella thyphimurium* reagiert Cadmium dementsprechend negativ [Brennan und Schiestl, 1996]. Die kanzerogenen Eigenschaften des Cadmiums sind viel mehr auf Wechselwirkungen mit DNA-Reparaturmechanismen und auf eine verstärkende Wirkung hinsichtlich der Genotoxizität direkter Mutagene zurückzuführen [Beyersmann und Hechtenberg, 1997]. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Induktion von oxidativem Stress in den Zellen, welcher mutagene Veränderungen der DNA nach sich ziehen kann [Imlay und Linn, 1988].

## 1.4 Detoxifizierung von Schwermetallen

Obwohl Cadmium und andere Schwermetalle über die beschriebenen Mechanismen bereits bei geringen Konzentrationen toxisch wirken, sind viele Organismen in der Lage, auch bei höheren Schwermetall-Belastungen der Umgebung zu überleben und die Metalle in beträchtlichem Umfang zu akkumulieren [Daunderer, 1990; Posthuma und van Straalen, 1993; Goyer, 1995; Edwards und Bohlen, 1996]. Es müssen demnach in den Zellen effektive Schutzmechanismen gegen eine Schwermetall-Vergiftung existieren. Die Abwehrmechanismen lassen sich dabei grundsätzlich in vier Kategorien einteilen, die in den eukaryotischen Organismen hinsichtlich ihrer Bedeutung jedoch unterschiedlich gewichtet sein können: (I) Synthese komplexbildender Proteine oder Peptide, welche die freien Schwermetall-Ionen binden und somit in eine biologisch inaktive Form überführen. (II) Expression von Proteinen, die als Pumpen für Metall-Thiolat-Komplexe oder freie Ionen fungieren. (III) Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche Gene induzieren, die direkt in die Schwermetall-Detoxifizierung oder in spezifische Reparaturmechanismen eingebunden sind. (IV) Aktivierung proteolytischer Abbauwege.

Eine sehr grosse Bedeutung im Rahmen der Schwermetall-Detoxifizierung kommt den komplexbildenden Proteinen und Peptiden zu. Als wichtigste Proteine sind dabei die Metallothioneine (MT) zu nennen. Das erste Metallothionein wurde 1957 aus der Pferdeniere isoliert [Margoshes und Vallee, 1957]. Seitdem konnten Metallothioneine in nahezu allen eukaryotischen Organismen wie Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen oder Hefen aber auch einigen prokaryotischen Organismen charakterisiert werden [Schäffer und Kägi, 1991; Turner und Robinson, 1995]. Diese cytoplasmatischen, niedermolekularen (6-7 kDa) Proteine zeichnen sich durch das Fehlen aromatischer Aminosäuren sowie durch einen aussergewöhnlich hohen Cysteingehalt von etwa 30 % aus. Die Cysteinreste sind in charakteristischen Cys-Cys- oder Cys-X-Cys-Motiven angeordnet [Kojima und Hunziger 1991; Moffatt und Denizéau, 1997]. Metallothioneine aus Vertebraten werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Klasse I Metallothioneine (MT-I) zeigen die grösste Übereinstimmung mit dem ursprünglichen MT aus der Pferdeniere. Sie werden ebenso wie die weniger stark konservierten Klasse II Metallothioneine (MT-II) in allen Organen und Geweben von Säugern gefunden. Klasse III und IV Metallothioneine (MT-III, MT-IV) werden dagegen spezifisch in bestimmten Zelltypen wie beispielsweise in neuronalen Zellen oder verschiedenen Epithelzellen exprimiert. Innerhalb der Vertebraten sind die Metallothioneine hinsichtlich ihrer Struktur stark konserviert und bestehen aus einer N-terminalen  $\beta$ -Domäne mit neun Cysteinresten und einer C-terminalen  $\alpha$ -Domäne mit elf Cysteinresten [Ghoshal und Jacob, 2000; Vasak und Hasler, 2000]. Die Metallothioneine der Invertebraten können in Grösse und Struktur differieren, sind jedoch durch den hohen Cysteingehalt und homologe Sequenzmotive im Vergleich mit den Metallothioneinen aus Vertebraten gekennzeichnet [Hamer, 1986]. So weisen beispielsweise die Metallothioneine der Schnecke *Helix pomatia* grosse Ähnlichkeiten zu den Klasse I MT der Säuger auf, während die Metallothioneine der Oligochaeten aus nur einer Domäne mit stärker abweichender Aminosäureabfolge bestehen [Dallinger *et al.*, 1993; Dallinger, 1996]. Die Cysteinreste der MT bilden keine intramolekularen Disulfidbrücken aus, sondern sind über ihre freien Sulfhydrylgruppen an der Komplexbildung von Metall-Ionen beteiligt. Aus dieser Tatsache ergeben sich die bisher bekannten biologischen Funktionen dieser Proteine. Da in vielen Zellen in begrenztem Umfang eine konstitutive Expression der MT beobachtet werden kann und die Proteine essentielle Schwermetalle wie Kupfer oder Zink binden, wird ihnen eine Rolle im Metabolismus dieser Spurenele-

mente zugeschrieben [Brady, 1982; Schäffer und Kägi, 1991; Vallee, 1991]. Bestätigt wird diese Annahme durch Versuche mit MT-Knock-out-Mäusen, die sehr sensitiv auf Störungen des Zink-Haushaltes reagieren [Kelly *et al.*, 1996]. Im Mittelpunkt der Funktionalität von Metallothioneinen steht jedoch ihre Beteiligung an den detoxifizierenden Mechanismen in den Zellen [Cherian und Goyer, 1978; Nordberg, 1989]. So wird eine gesteigerte Expressionsrate der MT unter anderem sehr effektiv durch Schwermetalle wie Cadmium, Quecksilber oder Kupfer induziert [Samson und Gedamu, 1998; Jacob *et al.*, 1999]. Der erhöhte Gehalt an Metallothioneinen im Cytosol führt zu einer gesteigerten Sequestrierung der freien toxischen Schwermetalle in den Zellen. Damit übereinstimmend zeigen MT-Knock-out-Mäuse eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Intoxikationen mit Cadmium. Auch Hefestämme, die das spezifische Kupfer-MT von *Saccharomyces cerevisiae* konstitutiv exprimieren, weisen eine stark erhöhte Resistenz gegenüber Cadmium auf [Ecker *et al.*, 1986; Masters *et al.*, 1994].

Neben den ubiquitär vorkommenden Metallothioneinen sind vor allem in Hefen und in Pflanzen kleine Peptide wie Glutathion (GSH) oder die auf Glutathion basierenden Phytochelatine an der Sequestrierung freier Schwermetall-Ionen im Cytosol beteiligt [Zenk, 1996; Perego und Howell, 1997]. Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) liegt in seiner reduzierten Form in hoher Konzentration in Hefezellen vor. Die nach der Bindung von Cadmium gebildeten Bis-Glutathion-Cadmium-Komplexe ( $\text{CdGS}_2$ ) werden über spezielle Pumpen in die Vakuole transportiert. Glutathion hat in den Zellen eine grosse Bedeutung als Radikalfänger. Es bietet demnach zusätzlich einen wichtigen Schutz vor den durch die Schwermetalle ausgelösten oxidativen Stressfaktoren [Penninckx, 2000].

Die cysteinreichen Phytochelatine (PC), die ausschliesslich in Pflanzen und in Hefen wie *Candida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* vorkommen, sind aus mehreren repetitiven  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Dipeptiden mit terminalem Glycinrest ( $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ,  $n = 2-11$ ) aufgebaut [Mehra *et al.*, 1988; Kneer *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1992; Coblenz und Wolf, 1994; Cobbett, 2000]. Die Synthese der Phytochelatine erfolgt nicht wie die der Metallothioneine über mRNA-Translation sondern enzymatisch aus Glutathion mit Hilfe der Phytochelatin-Synthase. Es wird dabei jeweils die  $\gamma$ -Glu-Cys-Einheit eines Glutathion-Moleküls auf ein entsprechendes  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ -Akzeptor-Molekül übertragen. Phytochelatine bilden wie Glutathion mit den Schwermetall-Ionen Komplexe aus, die ebenfalls in die Vakuole transportiert werden [Steffens *et al.*, 1986; Cobbett, 2000].

Die bisher überwiegend in Hefen charakterisierten vakuolären Transportpumpen für Schwermetall-Glutathion- und Phytochelatin-Komplexe stellen einen zweiten wichtigen Mechanismus zur Detoxifizierung von Schwermetallen dar. Die meisten Transporter gehören dabei zur Familie der ABC-Transporter (ATP binding cassette), die den Mg-ATP getriebenen Transport von Peptiden, Zuckern, Ionen und lipophilen Substanzen über Membranen entgegen eines Konzentrationsgefälles katalysieren [Ishikawa *et al.*, 1996; Rea, 1998]. Ein gut untersuchtes Beispiel für die Beteiligung eines solchen Transporters an der Sequestrierung von Schwermetall-Ionen ist der in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifizierte 'yeast cadmium factor' (YCF1), welcher nahe mit dem humanen 'multidrug resistance-associated protein' (MRP1) verwandt ist [Szczycka *et al.*, 1994]. Das in der Membran der Vakuole lokalisierte Protein zeigt sich für den Transport der bereits angesprochenen Bis-Glutathion-Cadmium-Komplexe in die Vakuole verantwortlich [Li *et al.*, 1997]. Auch Phytochelatin-Cadmium-Komplexe (PC-Cd) werden in Vakuolen transportiert. So konnte in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* das *htm1* (heavy metal tolerance 1) Gen charakterisiert werden, welches für einen Transporter der ABC-Familie

codiert. Dieser ist ebenso wie YCF1 in der Membran der Vakuolen lokalisiert und für die Translokation von PC-Cd-Komplexen in die Vakuole verantwortlich [Ortiz *et al.*, 1995]. Ähnliche Mechanismen mit verwandten Transportern finden sich auch für die Phytochelatine im Pflanzenreich [Vogeli-Lange und Wagner, 1990; Salt und Rauser, 1995]. Der vakuoläre Transport von Schwermetall-Peptid-Komplexen aus dem Cytosol scheint in den Pflanzen und Hefen ein Schlüsselprozess bei der Detoxifizierung von Schwermetallen zu sein. So zeigen Zellen, die zwar einen physiologischen Gehalt an Glutathion oder Phytochelatinen aufweisen, bei Verlust der zugehörigen Transporter eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium [Ortiz *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997]. Auch in höheren Organismen gibt es Hinweise darauf, dass möglicherweise zelluläre Transportmechanismen bei der Detoxifizierung von Schwermetallen eine Rolle spielen. In dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* führen Mutationen in den für ABC-Transporter codierenden *mrp* (multidrug resistance-associated protein) oder *mdr* (multidrug resistance) Genen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cadmium [Broeks *et al.*, 1996]. In YCF1-defizienten, Cd-hypersensitiven *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen vermittelt der heterolog exprimierte humane MRP-Transporter eine Cadmium-Resistenz [Tommasini *et al.*, 1996].

Der Transport von Schwermetallen kann auch über energieabhängige Ausstropmpumpen erfolgen. Diese Effluxpumpen zählen bei prokaryotischen Zellen zu den wichtigsten Detoxifizierungsmechanismen von Schwermetallen. Es handelt sich dabei um ATPasen oder chemiosmotische Kationen/Protonen-Antiporter, welche die toxischen Ionen wieder aus der Zelle herausschleusen [Silver und Phung, 1996]. Auch in einigen eukaryotischen Zellen kann ein Teil der Schwermetall-Ionen über Efflux-Prozesse wieder aus der Zelle heraus transportiert werden. So kontrolliert das *cad2*-Gen (*cadmium-resistant gene*) aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches für einen mutierten Kupfer-Transporter codiert, den intrazellulären Cadmium-Gehalt über ein spezifisches Effluxsystem [Shiraishi *et al.*, 2000].

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf Schutzmechanismen gegen Schwermetalle betrifft die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche an der Induktion von Genen beteiligt sind, die direkt oder indirekt in die protektiven Vorgänge in den Zellen involviert sind. Aus den bisherigen Ausführungen ergibt sich dabei eine grosse Bedeutung für Transkriptionsfaktoren, die an der Expression von Metallothionein-Genen beteiligt sind. Die Transkription von MT-Genen wird durch eine Reihe regulatorischer Promotor-Elemente kontrolliert. Von besonderer Bedeutung für die schnelle Induzierbarkeit der Metallothioneine durch Schwermetalle sind regulatorische Sequenzabschnitte im 5'-Bereich der Gene, die als 'metal responsive elements' (MRE) bezeichnet werden, an welche Metall-regulierte Transkriptionsfaktoren binden können [Palmiter *et al.*, 1987; Samson und Gedamu, 1998; Miles *et al.*, 2000]. Der am besten untersuchte Faktor ist das MTF-1 aus Mensch (hMTF-1) und Maus (mMTF-1). Es handelt sich dabei um ein Zinkfinger-Protein vom C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typ mit sechs Zinkfingern, das nicht transkriptionell reguliert wird. Als Regulationsmechanismus wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem MTF-1 bei Abwesenheit von Metallen komplexiert mit einem MT-Transkriptions-Inhibitor (MTI) vorliegt [Radtke *et al.*, 1993; Heuchel *et al.*, 1994; Palmiter *et al.*, 1994]. In Gegenwart von Metall-Ionen dissoziiert MTI vom MTF-1 ab und ermöglicht so die Interaktion von MTF-1 mit den MREs in den Promotoren der Metallothionein-Gene. Sinkt der Gehalt an freien Ionen in den Zellen bedingt durch die Bildung der Metall-Thiolat-Komplexen in den Metallothioneinen wieder ab, bilden sich erneut MTF-1/MTI-Komplexe, die eine Reduktion des Transkriptions-Levels nach sich ziehen. Das Kupfer-Thionein aus *S. cerevisiae* wird durch den CUP2/ACE1-Transkriptionsfaktor kontrolliert. Das 22 kDa grosse Protein besteht aus einer N-terminalen, DNA-bindenden Domäne mit insgesamt

zwölf Cysteinresten in Cys-X-Cys- bzw. Cys-X-X-Cys-Anordnung und einer C-terminalen, die Transkription aktivierenden Domäne [Furst *et al.*, 1988; Szczycka und Thiele, 1989]. Die Regulation der Transkription des Kupfer-Thioneins erfolgt über die direkte Interaktion von Kupfer mit der DNA-bindenden Domäne. Die Kupfer-Ionen werden über die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste komplexiert und beeinflussen so die Faltung der Domäne dahingehend, dass eine Bindung des Proteins an die 'CUP1 upstream activation sequence' des Gens erfolgen kann, wodurch eine Transkription des Gens ermöglicht wird [Buchman *et al.*, 1989]. Nicht nur Metallothionein-Gene werden durch Metall-regulierte Transkriptionfaktoren kontrolliert. So erfolgt die transkriptionelle Aktivierung des *ycf1*-Gens für den vakuolären Transporter in *S. cerevisiae* über den Transkriptionsfaktor yAP-1, einem Mitglied der bZip-Familie (basic domain leucine Zipper) [Wemmie *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1997]. yAP-1 bindet an regulatorische Sequenzabschnitte, die als 'yAP-1 response elements' (YRE) bezeichnet werden. Bisher konnten in der Hefe zusätzlich zu *ycf1* neun weitere Cadmium-responsive Gene identifiziert werden, die über den yAP-1-Faktor kontrolliert werden. Neben dem Gen für die Glutamyl-Cystein-Synthase (GSH1), welche an der Biosynthese von Glutathion beteiligt ist, gehören dazu auch die Gene für die Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD2), die Thio-Peroxidase (TSA1) und für das Thioredoxin (TRX2) [Wu und Moye-Rowley, 1994; Vido *et al.*, 2001]. Metall-responsive Transkriptionsfaktoren sind demnach nicht nur in die Regulation von Genen involviert, die zur Sequestrierung von Schwermetallen beitragen. Sie kontrollieren auch Gene, die in Schutzmechanismen gegen die durch Schwermetall-Intoxikationen ausgelösten Folgeschäden wie oxidativem Stress eingebunden sind.

Schwermetalle können auch direkt Einfluss auf die Aktivität von Enzymen nehmen und so zur Regulation der Detoxifizierungsmechanismen beitragen. Als Beispiel sei in diesem Zusammenhang die PC-Synthase erwähnt, welche Phytochelatine aus Glutathion-Vorstufen synthetisiert. Das Enzym liegt nur bei Anwesenheit von Schwermetall-Ionen wie Cadmium, Blei, Zink oder Kupfer in seiner aktiven Form vor. Die Synthese von Phytochelatinen unterliegt demnach einem Autoregulationsmechanismus, bei dem die Produkte durch Komplexierung der aktivierenden Schwermetall-Ionen den Umfang der Reaktion kontrollieren. So ist es möglich, sehr schnell und effizient auf plötzliche Änderungen der Schwermetall-Konzentration in den Zellen zu reagieren [Cobbett, 2000].

Ein vierter Aspekt zellulärer Abwehrmechanismen gegen Schwermetalle betrifft die proteolytischen Abbauege der beschädigten Proteine (Kap. 1.3). Ein in eukaryotischen Zellen weit verbreitetes System der Proteolyse besteht in der Markierung der Proteine mit Ubiquitin. Das kleine Protein Ubiquitin (8,5 kDa) wird dabei in drei Reaktionsschritten kovalent an mehrere spezifische Lysinreste der zum Abbau bestimmten Proteine gebunden. Derart markierte Proteine werden anschliessend in den cytosolischen, aus mehreren Untereinheiten aufgebauten Proteasomen abgebaut. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf einer Cadmium-Intoxikation zu einer effektiven Induktion von Genen kommt, die am Ubiquitin-System beteiligt sind. Hefestämme mit Enzymdefekten in der Ubiquitin-Konjugation bzw. unvollständigen Proteasomen zeigen zudem eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium [Jungmann, *et al.*, 1993]. Beide Tatsachen deuten darauf hin, dass die schnelle und effektive Beseitigung beschädigter Proteine einen wichtigen Mechanismus bei der Vermittlung einer Cadmium-Resistenz in den Hefen darstellt. Ein weiterer proteolytischer Schutzmechanismus betrifft den Schwermetall-induzierten Abbau von Transportproteinen der Plasmamembran in den Vakuolen. So wird der Zink-Transporter ZRT1 aus *S. cerevisiae* bei hohen Zink-

Konzentrationen im umgebenden Medium internalisiert und in der Vakuole degradiert [Gitan *et al.*, 1998]. Solche posttranslationalen Regulationsmechanismen bei der Aufnahme von Schwermetallen, die auch für andere Transportproteine der Hefen gezeigt werden konnten, stellen einen ersten wirksamen Schutzmechanismus der Zellen im Verlauf einer Schwermetall-Belastung dar [Ooi *et al.*, 1996; Liu und Cullotta, 1999].

### 1.5 Das CRP-Protein aus *Enchytraeus buchholzi*

Mit der Entdeckung der tragenden Rolle, die Metallothioneine unter anderem bei der Homöostase und der Sequestrierung von Schwermetallen spielen, wurde das Interesse an weiteren Schwermetall-bindenden Proteinen geweckt. Sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten konnten in diesem Zusammenhang mehrere verschiedene MT-ähnliche Proteine nachgewiesen werden, die sich im Molekulargewicht sowie durch abweichende Cysteingehalte, höhere Anteile an Glycin und dem Auftreten aromatischer Aminosäuren von den Metallothioneinen unterscheiden [Ireland, 1981; Stone und Overnell, 1985; Bauer-Hilty *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1989; Nejmeddine *et al.*, 1992]. Die meisten dieser Proteine wurden bisher durch proteinanalytische Methoden isoliert und identifiziert. Mit der Isolierung der CRP-mRNA (cystein-rich protein) aus dem Oligochaeten *Enchytraeus buchholzi* gelang erstmals die molekulare Charakterisierung einer mRNA, welche für ein Cadmium-induzierbares, cysteinreiches, 25 kDa Nicht-Metallothionein-Protein kodiert [Willuhn *et al.*, 1994b].

Die überwiegend terrestrisch vorkommenden Enchytraeiden gehören neben den Lumbriciden zu den häufigsten einheimischen Oligochaeten. Sie sind in fast jedem Bodentyp, besonders jedoch in Wiesen-, Acker- und Waldböden in zum Teil sehr hohen Populationsdichten (5000 bis 100000 Individuen pro m<sup>2</sup>) zu finden. Mit einem Biomasseanteil von bis zu 10 % gehören sie zu den charakteristischen Elementen der Mesofauna des Bodens. Besonders in sauren Böden kommen einige Enchytraeenarten in grosser Zahl vor. So finden sich in den Sauerhumuswäldern Mitteleuropas bis zu 200000 Individuen pro m<sup>2</sup>. Das Auftreten von Enchytraeiden und Lumbriciden ist häufig antagonistisch. In kalkreichen, schwach sauren Böden überwiegen Lumbriciden, in sauren Böden dominieren die Enchytraeiden [Didden, 1993; Westheide und Müller, 1995]. Übereinstimmend mit den beobachteten hohen Populationsdichten in sauren Böden, in welchen es zu einer besonders intensiven Mobilisierung von Schwermetallen kommt (Kap. 1.1), konnte in Toxizitätstests gezeigt werden, dass einige Enchytraeen-Arten auch in einer extrem Cadmium-belasteten Umgebung überleben können [Römbke, 1989, Willuhn *et al.*, 1994a]. Es müssen demnach bei den Enchytraeen effektive Entgiftungsmechanismen existieren, die ein Überleben auch bei hohen Cadmium-Expositionen ermöglichen.

In Laborversuchen wurde beobachtet, dass die Enchytraeen im Vergleich mit Lumbriciden in grossem Umfang Cadmium akkumulieren und dieses in Cadmium-freier Umgebung wieder ausscheiden [Rüther und Greven, 1990; Willuhn *et al.*, 1996]. Für *Enchytraeus buchholzi* konnte als Antwort auf eine Cadmium-Belastung die Expression einer für ein cysteinreiches Nicht-Metallothionein-Protein (CRP) kodierenden mRNA nachgewiesen werden [Willuhn *et al.*, 1994b]. Das deduktiv aus der cDNA-Sequenz abgeleitete CRP-Protein besteht aus 251 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Der Cysteingehalt im CRP liegt bei 27 %. Das Protein weist acht, aus je 31 Aminosäuren aufgebaute repetitive Einheiten mit je neun Cysteinresten auf, von denen sechs in Cys-Cys- bzw. Cys-X-Cys-Segmenten ähnlich wie bei den Metall-bindenden Domänen der Metallothioneine angeordnet sind. Diese strukturellen Merkmale

und der hohe Cysteingehalt des CRP entsprechen den Eigenschaften Schwermetall-bindender Proteine. Von den Metallothioneinen unterscheidet sich das CRP unter anderem durch sein höheres Molekulargewicht sowie durch das Auftreten von Histidin in der Aminosäuresequenz. Die Induktion des unter normalen Bedingungen nicht exprimierten CRP-Proteins erfolgt sehr sensitiv und spezifisch durch Cadmium [Willuhn *et al.*, 1996]. Diese Tatsache sowie die aus der deduzierten Aminosäuresequenz abgeleiteten Metall-bindenden Eigenschaften lassen eine Einbindung des Proteins in den Detoxifizierungsmechanismus bei *E. buchholzi* vermuten. Unterstützt wird diese Annahme durch die zeitliche Korrelation des Auftretens der CRP-mRNA und der Akkumulation von Cadmium in den Tieren. Die Regulation des CRP erfolgt wie bei den Metallothioneinen auf Transkriptionsniveau. Im Promotor des *crp*-Gens finden sich viele regulatorischen Sequenzmotive wie 'metal responsive elements' (MREs), die auch in den Promotoren der Metallothionein-Gene gefunden werden. Hinweise auf eine Beteiligung dieser Motive an der Regulation des *crp*-Promotors konnten über Reporterger- und Gelretentions-Analysen ermittelt werden [Koewius, 1998]. Im Unterschied zum CRP werden die MT in den meisten Zellen jedoch konstitutiv exprimiert. Eine Erhöhung der basalen Transkriptionsrate erfolgt bei den Metallothionein-Genen im Gegensatz zum *crp* als Reaktion auf mehrere verschiedene exogene Stimuli wie Schwermetalle, Hormone, cytotoxische Stoffe und oxidativen Stress [Samson und Gedamu, 1998].

## 1.6 Zielsetzung

Die bekannten Schwermetall-bindenden Nicht-Metallothionein Proteine konnten bislang nur über proteinanalytische Methoden identifiziert werden. Es liegen keinerlei Informationen über die zugehörigen Gene, vorhandene Regulationsmechanismen oder die Funktionalität der Proteine vor. Das CRP-Protein aus *Enchytraeus buchholzi* bildet dabei eine Ausnahme. Für das CRP wurde über Northern Blot Analysen ein spezifisches Transkriptionsmuster festgestellt. Der 5'-flankierende Bereich des Cadmium-induzierten *crp*-Gens wurde kloniert und auf seine regulatorischen Eigenschaften hin untersucht. Dabei wurden strukturelle Parallelen zu den Promotoren von Metallothionein-Genen festgestellt. Die vorliegende Arbeit verfolgte unter anderem das Ziel, mit dem *crp*-Gen erstmals die genomische Organisation eines Gens aufzuklären, welches für ein Schwermetall-bindendes Nicht-Metallothionein Protein kodiert. Es sollte untersucht werden, ob neben den strukturellen Ähnlichkeiten auf Proteinniveau und den vergleichbaren Sequenzmotiven in den Promotoren auch Parallelen in der genomischen Organisation zwischen dem *crp*-Gen und Metallothionein-Genen bestehen. Zudem stellte sich die Frage, inwieweit die repetitive Charakteristik der cDNA auch im Aufbau des zugehörigen Gens zu finden ist. Eine Besonderheit des CRP besteht in seiner fast ausschliesslichen Induktion der Genexpression durch Cadmium. In einem bereits bekannten Fragment des *crp*-Gens finden sich in einem Intronbereich 11 repetitive Einheiten, in denen Konsensussequenzen für MREs lokalisiert sind [Koewius, 1998]. Solche Elemente mit Enhancer-Motiven können auch ausserhalb des Promotors zur Regulierbarkeit von Genen beitragen. Die Charakterisierung des *crp*-Gens ist demnach für die weitere Aufklärung der Regulation der Expression sowie der Funktion des CRP von Interesse.

Die bisherigen Erkenntnisse über das CRP deuten auf eine Einbindung des Proteins in den Cadmium-Detoxifizierungsprozess von *E. buchholzi* hin. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Nachweis eines durch das CRP-Protein vermittelten protektiven Effektes im Verlauf einer Cd-Vergiftung erbracht werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt

werden, welche Bedeutung die abgeleiteten strukturellen Eigenschaften des Proteins für dessen Funktion haben. Dazu wurden das CRP sowie spezifische Deletions- und Mutationsklone in dem Cadmium-hypersensitiven Hefestamm DTY167 exprimiert und hinsichtlich der Fähigkeit zu einer Resistenzvermittlung bei Cadmium-Belastung der Zellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

- Megaprime DNA-Labeling Kit; Nylonmembran Hybond-N; Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP; ECL- und ECL Plus System: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- BIO-RAD Protein Assay: BIORAD, München
- Agarose: Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
- Agar; Hefeextrakt; Trypton; Pepton: Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
- 2-Mercaptoethanol; TRIZOL: GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe
- Petrischalen für Gewebekultur und Mikrobiologie: Greiner, Solingen; Waldeck, Münster
- TOP 10 Zellen: Invitrogen, Groningen, NL
- Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis-System: Promega, Heidelberg
- Agarase; Expand High Fidelity PCR-System: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
- RotiBlue; RotiLoad-Puffer (4x): Roth, Karlsruhe
- Nitrozellulosemembran Protan BA 85: Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
- Prestained SDS Molecular Weight Marker Mixtur: Sigma, Deisenhofen
- Oligonukleotide/Primer: MWG Biotech, Ebersberg; GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein
- Qiagen Plasmid-DNA Isolation Kit; Qiaprep Spin Plasmid Kit; Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen Blood and Cell Culture Genomic DNA Purification Kit: Qiagen, Hilden
- NucleoSpin Plasmid Kit: Macherey-Nagel, Düren
- Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie: Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, München; Invitrogen, Groningen, Niederlande; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg; USB, Bad Homburg
- Radiochemikalien: ICN, Meckenheim; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- sonstige Laborchemikalien (p. a.): Acros Organics, Geel, Belgien; Baker, J. T., Deventer, Niederlande; Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf; Fluka, Neu-Ulm; Grüssing GmbH, Filsum; Janssen Chimica, Geel, Belgien; Merck, Darmstadt; National Diagnostics, Atlanta, Georgia, U.S.A.; Riedel-de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen

### 2.2 Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzung folgender Lösungen wird im Text nicht näher erläutert:

Acrylamid Stock (AA/Bis):	29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N-Methylenbisacrylamid in H <sub>2</sub> O
Blotpuffer ('Western Blot'):	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % Methanol, pH 8,3 in H <sub>2</sub> O
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH in H <sub>2</sub> O

Denhardts (50x):	5 g Ficoll 400; 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g BSA (Fraction V) ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Dropout Solution (10x):	200 mg L-Adenin-Hemisulfat; 200 mg L-Arginin-HCl; 200mg L-Histidin-HCl x H <sub>2</sub> O; 300mg L-Isoleucin; 1000 mg L-Leucin; 300 mg L-Lysin-HCl; 200 mg L-Methionin; 500 mg L-Phenylalanin; 2000 mg L-Threonin; 200 mg L-Tryptophan; 300 mg L-Tyrosin; 1500 mg L-Valin; 200 mg L-Uracil ad 1 l H <sub>2</sub> O. Durch Weglassen bestimmter Aminosäuren in der entsprechenden 10 x Dropout Solution kann das gewünschte Minimalmedium zur Selektion von Hefen hergestellt werden (Kap.2.17).
DTT (1 M):	3,09 g in 20 ml 0,01 M Na-Acetat, pH 5,2, sterilfiltrieren
Harnstoff-Lysispuffer (8 M):	8 M Harnstoff; 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, pH 8,0; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O
Hefe-Lysis-Puffer:	0,3 M Sorbitol; 50 mM MOPS, pH 7,5; 10 mM NaN <sub>3</sub>
High-Salt-Puffer:	1 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O
Hybridisierungslösung:	6x SSC; 0,5 % SDS; 100 µg/ml denaturierte fragmentierte Heringssperma-DNA in H <sub>2</sub> O
Laufpuffer (SDS-PAGE):	0,025 M Tris-Base; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS in H <sub>2</sub> O
LB-Medium:	1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt in H <sub>2</sub> O, pH 7,5
LB-Agar:	LB-Medium mit 2 % Agar
Low-Salt-Puffer:	200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O
Nährlösung:	1 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 0,25 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 0,25 g KNO <sub>3</sub> ; 0,25 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 40 mg FeSO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O; mit 0,5 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> auf pH 5,0 einstellen; sterilfiltrieren
Neutralisierungslösung:	1 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl in H <sub>2</sub> O
NZY-Medium:	5 g NaCl; 2 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 5 g Hefeextrakt; 10 g NZ-Amin ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,5
NZY-Agar:	NZY-Medium mit 2 % Agar
PBS <sup>-</sup> -Puffer (1x):	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,15 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,2-7,4
Ponceau S:	0,5 % Ponceau S; 1 % Eisessig in H <sub>2</sub> O
Prähybridisierungslösung:	6x SSC; 2x Denhardts; 0,1 % SDS; 100 µg/ml denaturierte fragmentierte Heringssperma-DNA in H <sub>2</sub> O
RotiBlue-Färbelösung:	20 ml Roti-Blue 5x-Konzentrat; 20 ml Methanol; 60 ml H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer (4x):	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS in H <sub>2</sub> O
SD-Medium: (Synthetic minimal Medium)	6,7 g Difco yeast nitrogen base without amino acids; 182,2 g Sorbitol ad 860 ml H <sub>2</sub> O, pH 5,8; autoklavieren; Zugabe von 100 ml der jeweiligen 10 x Dropout Solution und 40 ml 50 % Glucose
SD-Platten:	SD-Medium mit 15 – 20 g Agar/l
Sequenzgel-Lösung:	32 ml SequaGel XR Monomerlsg. (19:1 AA zu Bis); 8 ml SequaGel XR Puffer; 300 µl 10 % APS

SOC-Medium:	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O; 20 mM Glucose in H <sub>2</sub> O
Sorbitolpuffer:	40 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 40 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 6,5; 1,2 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O
SSC (20x):	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 in H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (40x):	1,6 M Tris; 1,33 M Natriumacetat; 0,04 M EDTA in H <sub>2</sub> O, pH 8,0
TBE-Puffer (5x):	0,445 M Tris; 0,445 M Borsäure; 0,01 M EDTA in H <sub>2</sub> O, pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,0; 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O
TFB1-Puffer:	30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 100 mM RbCl <sub>2</sub> ; 15 % Glycerin, pH 5,8 mit 1 M Essigsäure
TFB2-Puffer:	10 mM MOPS, pH 6,5; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM RbCl <sub>2</sub> ; 15 % Glycerin, pH 6,5 mit 1 M KOH
Transferlösung:	3 M NaCl; 8 mM NaOH, pH 11,40-11,45 in H <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS in H <sub>2</sub> O
Trypanblau-Färbelösung:	0,25 % Trypanblau in sterilem H <sub>2</sub> O, filtrieren
TST-Puffer (1x):	0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,05 % Tween-20 in H <sub>2</sub> O
YPAD-Medium:	20 g Difco Peptone; 10 g Hefeextrakt ad 960 ml H <sub>2</sub> O, pH 5,8; 40 mg Adeninsulfat; autoklavieren; Zugabe von 40 ml 50 % Glucose
YPAD-Platten:	YPAD-Medium mit 15 – 20 g Agar/l

Es wurde ausschließlich Milli Q-Wasser verwendet. Alle Bakterien- und Hefemedien wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Die für die Selektion in LB-Medium oder auf LB-Platten zugesetzten Antibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

Ampicillin:	50 µg/ml
Chloramphenicol:	30 µg/ml
Tetrazyklin	12,5 µg/ml

### 2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Oligochaeten der Art *Enchytraeus cf. buchholzi* [VEJD. 1879]. Diese stammten aus einer Laborzucht von Herrn Prof. Dr. Hartmut Greven (Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, HHU Düsseldorf). Die Haltung der Enchytraeen erfolgte in 150 mm Petrischalen auf einem Kulturboden bei 20 °C im Dunkeln. Der Kulturboden setzte sich aus 100 g Weißtorf, 50 g Bentonit, 100 g Kalk und 10 g Quarzsand in etwas H<sub>2</sub>O zusammen. Als Weißtorf wurde Hochmoortorf von den Torfwerken Hülskamp verwendet, dessen grobe Bestandteile vor der Verwendung durch ein feines Sieb abgetrennt wurden. Der Torf wurde zur Auskeimung eventuell vorhandener Pilzsporen Ü/N bei 37°C inkubiert und anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert. Der Kulturboden wurde einmal in der Woche mit sterilem Milli Q-Wasser angefeuchtet und die Tiere mit in Nährlösung gequollenen Haferflocken gefüttert.

## 2.4 Bakterienstämme, Hefestämme und Vektoren

### Bakterienstämme: *E. coli* DH5 $\alpha$

F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-arfF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1 (Gibco BRL, Karlsruhe) [Hanahan, 1983]

### *E. coli* TOP10

F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL Str<sup>R</sup> endA1 nupG (Invitrogen, Groningen, NL)

### *E. coli* JM109

endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44  $\lambda$ <sup>-</sup>  $\Delta$ (lac-proAB) [F<sup>-</sup>traD36 proA+B+ lac/qZ $\Delta$ M15] (Promega, Madison, USA)

### *E. coli* ES1301 *mutS*

lacZ53 mutS201::Tn5 thyA36 rha-5 metB1 deoC IN(rrnD-rrnE) (Promega, Madison, USA)

### Hefestämme: DTY165 (Stamm SEY6210)

MAT $\alpha$  ura3-52 leu2-3,-112 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 lys2-801 suc2- $\Delta$ 9 [Li *et al.*, 1997]

### DTY167 (Stamm JW53F)

MAT $\alpha$  ura3-52 leu2-3,-112 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 lys2-801 suc2- $\Delta$ 9 ycf1::hisG [Li *et al.*, 1997]

### Vektoren:

**pALTER-1** (Promega, Madison, USA)

**pRS425** [Mumberg *et al.*, 1994]

**pCR-XL-TOPO** (Invitrogen, Groningen, NL)

**pcDNA 2.1** (Invitrogen, Groningen, NL)

**pGEM-T Easy** (Promega, Madison, USA)

## 2.5 Isolation genomischer DNA aus *E. buchholzi*

Die Isolation und Aufarbeitung genomischer DNA aus *E. buchholzi* erfolgte mit Hilfe des 'Qiagen Blood and Cell Culture Genomic DNA Purification' Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers zur Isolation genomischer DNA aus Geweben. Es wurden dabei pro Säule 100 mg Würmer eingesetzt.

## 2.6 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch mit einem Beckman Spektrophotometer DU 640. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde nach Sambrook *et al.* [1989] berechnet.

## 2.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese in einer horizontalen Flachbettkammer nach der Methode von Sambrook *et al.* [1989]. Als Elektrophoresepuffer und für die Gelherstellung wurden 1 x TBE-Puffer oder 1 x TAE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Gellösung wurde die DNA gefärbt. Als Längenstandard dienten 1 µg EcoRI/HindIII doppelt restringierte λ-DNA bzw. bei kleineren Fragmenten 1 µg pUC-Mix Marker.

## 2.8 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte durch 'random priming' mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP in Anlehnung an die Methode von Feinberg und Vogelstein [1984]. Die Markierungsreaktion erfolgte unter Verwendung des 'Megaprime DNA Labelling' Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurden 40 ng DNA und 50 µCi [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (10 µCi/µl, spez. Aktivität > 3000 Ci/mmol) eingesetzt. Nach der Synthese wurden nicht eingebaute Nukleotide über eine Elutip D-Säule (Schleicher und Schuell, Dassel) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die so markierte und gereinigte DNA wurde vor der Verwendung zur Hybridisierung (Kap 2.9) für 10 min denaturiert

## 2.9 DNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierung

Der Transfer der im Agarosegel aufgetrennten DNA (Kap. 2.7) auf eine Nylonmembran (HybondTM-N, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte nach der Methode von Chomczynski [1992] durch abwärts gerichteten Kapillartransfer in alkalischem Transferpuffer (3 M NaCl, 8 mM NaOH, pH 11,40 bis 11,45) für 2 h. Vor dem Transfer wurde das Gel für 1 h in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH sowie für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran für 20 min mit 0,2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8) neutralisiert und für 20 min bei 80 °C gebacken. Die Membran wurde nun für die Hybridisierung gegen radioaktiv markierte Sonden (Kap. 2.8) eingesetzt. Zunächst wurde dabei die Membran für 3 h in Prähybridisierungslösung bei 65 °C inkubiert. Für die Hybridisierung wurde diese durch die Hybridisierungslösung ersetzt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (Kap. 2.8) erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C. Die Membran wurde danach nacheinander für 30 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS und für 30 min bis 2 h in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Die Exposition der Membran erfolgte auf Kodak Biomax MS Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei -80°C.

## 2.10 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden 'subcloning efficiency'-DH5α-Zellen (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) oder 'One Shot TOP10 chemically competent' *E. coli*-

Zellen (Invitrogen, Groningen, NL) verwendet. Die Transformation erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Im Anschluß wurden die Ansätze auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgebracht und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## **2.11 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des 'QIAprep Spin Plasmid Purification' Kits (Qiagen, Hilden) oder des 'NucleoSpin Plasmid' Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben der Hersteller. Hierzu wurden Einzelkolonien in 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte dann aus 3 ml der stationären Kultur. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das 'Plasmid Midi' Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA wurde dabei aus einer 25 ml-Übernachtskultur nach den Angaben des Herstellers isoliert und aufgearbeitet.

## **2.12 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde in Abhängigkeit von der Größe des gewünschten Fragmentes ein 0,8-2%iges TAE-Agarosegel mit einem Fenster aus gleichprozentiger 'low melting point'-Agarose (FCM, Biozym, Hess. Oldendorf) eingesetzt. Nach dem Einlaufen der gewünschten Fragmente in dieses Fenster wurden sie unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und durch Verdau mit dem Enzym  $\beta$ -Agarase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert. Alternativ wurde zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen das 'QIAquick Gel Extraction' Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. In beiden Fällen wurde zur Bestimmung der Konzentration der isolierten DNA 1/10 des Probenvolumens in einem Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration durch Vergleich mit den Markerbanden abgeschätzt.

## **2.13 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.13.1 Restriktion**

Für die Restriktion von DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für die jeweilige Restriktionsendonuklease gewählt. Die Restriktionen erfolgten für 2 h oder über Nacht.

### **2.13.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die Dephosphorylierung von DNA erfolgte mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase (USB, Bad Homburg) für 1 h bei 37 °C nach den Angaben des Herstellers. Durch 15minütige Inkubation bei 65 °C wurde die Dephosphorylierungsreaktion abgestoppt und die DNA anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, gefällt, abzentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen.

### 2.13.3 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Molekülen in einen modifizierten Vektor erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 5 oder 10 µl über Nacht bei 4 - 16 °C. Jeweils 1 µl der Ligationsansätze wurde für die Transformation in *E. coli*-Zellen (Kap.2.10) verwendet.

## 2.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PTC 150-16 oder PTC 150-25 MiniCycler der Firma MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt.

### 2.14.1 Primer

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die jeweiligen Primerpaare mit Hilfe der Programme PC/Gene Version 6.7 (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) und Oligo 4.1-Primer Analysis Software (National Biosciences Inc., Plymouth, U.S.A.) ausgewählt. Die Primer sollten eine Länge zwischen 15 und 35 Basen aufweisen und einen GC-Gehalt zwischen 40 % und 60 % besitzen. Es wurde darauf geachtet, daß die Primer nicht komplementär zueinander und keine Selbstkomplementarität aufweisen. Am 3'-Ende sollten die Primer einen GC-'Clamp' besitzen und möglichst keine 'Repeats' bzw. Purin- oder Pyrimidin-Abschnitte aufweisen [Kawasaki, 1991]. Die Berechnung der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>-Wert) der Primer erfolgte nach der Formel:  $69,3\text{ °C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt}) - 650/n$  (MWG Biotech, Ebersbach, pers. Auskunft). Es wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Primerpaare für die verschiedenen PCR-Ansätze eingesetzt.

### 2.14.2 Plasmid-PCR

Für die Amplifikation eines Fragmentes von einem Plasmid wurden 20 ng Plasmid-DNA, je 300 nM der beiden sequenzspezifischen Primer, 200 µM dNTP-Mix, 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase sowie 1 x PCR-Puffer in einem Volumen von 100 µl eingesetzt und mit 70 µl Mineralöl überschichtet. Der Ansatz wurde für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Danach folgte ein 35maliger Zyklus von 30 sec Denaturierung bei 95°C, 1minütigem 'Annealing' bei der entsprechenden Temperatur des eingesetzten Primerpaares und 2minütiger Kettenverlängerung bei 72°C. Eine 8 minütige Elongation bei 72°C beendete die Reaktion. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Amplifikation wurde 1/10 eines solchen Reaktionsansatzes in einem 1 - 1,5 %igem TBE-Agarosegel aufgetrennt (Kap. 2.7).

### 2.14.3 Genomische PCR

Ziel der genomischen PCR war es, möglichst große Fragmente des *crp*-Gens aus genomischer DNA von *Enchytraeus buchholzi* zu amplifizieren. Es kamen dabei das 'Expand High Fidelity' PCR System und das 'Expand Long Distance' PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) zum Einsatz. Die Reaktionen wurden in 50 µl Reaktionsansätzen mit 200 ng genomischer DNA als Templat, je 300 nM der jeweils eingesetzten Primer (Kap. 2.14.1), 200 µM dNTP-Mix, 1 x PCR-Puffer und 3,75 U „Expand High Fidelity“ DNA-Polymerase-Mix durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt: Auf eine 5minütige Denaturierung folgten zunächst 9 Zyklen aus 30 sec Denaturierung bei 95°C, 1minütigem 'Annealing'

2 °C unterhalb der optimalen Temperatur für das eingesetzte Primerpaar und anschließender 12minütiger Elongation bei 72°C. Für die darauf folgenden 30 Zyklen wurde die jeweils optimale 'Annealing'-Temperatur für das Primerpaar gewählt. Ausserdem wurde die Elongationszeit von 12 Minuten mit jedem Zyklus um je 20 Sekunden verlängert. Eine 8minütige Kettenverlängerung bei 72°C beendete die Reaktion. Die PCR-Reaktionen wurde auf 1%-ige Agarosegele aufgetragen (Kap. 2.7) und spezifische Amplifikationsprodukte durch 'Southern Blot'-Analysen bestimmt. Die Klonierung der aus dem Gel eluierten Fragmente (Kap. 2.12) erfolgte wie in Kap. 2.14.5 beschrieben.

**Tabelle 2.1 Übersicht über die verwendeten Primer.** [A] Primer für Plasmid-PCR. [B] Primer für genomische PCR [C] Primer für 'Genomic Walking'. Angegeben sind jeweils die Sequenzen der Oligonukleotide, ihre Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) und der GC-Gehalt (in %). Angehängte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

**A**

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> -Wert	GC-Gehalt
CRPcDNA 142+Sall	5'-ACG TCC <u>CGT CGA CAA</u> TGG CAT CAC ACG C-3'	71,0 °C	60,7 %
CRPcDNA 265+Sall	5'-GGA <u>GTC GAC</u> AAT GTG CCC GTG TGG TTC TCA C-3'	72,2 °C	58,1 %
CRPcDNA 894-Sall	5'-CGT CCC <u>GTC GAC</u> TTA GGC GCA GCA GGT-3'	72,6 °C	66,7 %
CRPcDNA 451+Sall	5'-AGC TCC <u>CGT CGA CAA</u> TGT GCT CCT GTG GTT C-3'	72,2 °C	58,1 %
CRPcDNA 543-Sall	5'-AGC TCC <u>CGT CGA CTT</u> AAT CTT CAA CTC CAC A-3'	68,2 °C	48,4 %
CRPcDNA 636-Sall	5'-ACG TCC <u>CGT CGA CTT</u> AGC CAA CAA CTC C-3'	69,5 °C	57,1 %
CRPcDNA 367+Sall	5'-ACG TCC <u>CGT CGA CAA</u> TGG GTT CTC AAT GCA A-3'	69,5 °C	51,6 %
CRPcDNA 615-Sall	5'-ACG TCC <u>CGT CGA CTT</u> AGG TAC AGC AAC CCT T-3'	70,8 °C	54,8 %
CRPcDNA 646+Sall	5'-ACG TCC <u>CGT CGA CAA</u> TGG GGT CAC AGT GCA C-3'	73,5 °C	61,3 %
CRPcDNA+536	5'-TTG AAG ATT GCC CAT GTG GTC CAA GCT GC-3'	68,1 °C	51,7 %
CRPcDNA-814	5'-TGT CGC ACT TAG GAG CAC AAC ATC CTT GAG-3'	68,1 °C	50,0 %
CRPcDNA-721	5'-TTC CAC ATT TAG GAG TGC AGC ATC CTT TGC TGC-3'	69,5 °C	48,5 %
CRPcDNA+629	5'-TTG TTG GCT GCC CAT GCG GGT CAC AGT GCA C-3'	73,5 °C	61,3 %

**B**

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> -Wert	GC-Gehalt
GPCR-1	5'-AAT CAA CCA ATC GCA GAA CAT CTA ACA AAA-3'	61,3 °C	33,3 %
GPCR-2	5'-ACA AGA ATA AAC TTA CTG TCG CAC TTA GGA-3'	62,6 °C	36,7 %
GPCR-3	5'-TCC TAA GTG CGA CAG TAA GTT TAT TCT TGT-3'	62,6 °C	36,7 %
GPCR-5	5'-GTG CAA GTT ACT GCT CAG TGA TTC TGA ATT-3'	64,0 °C	40,0 %
GPCR-8	5'-GGG CGA TCA GTT CCC AGT CCA ACA TTA GTC G-3'	70,8 °C	54,8 %
CRPcDNA-573	5'-CTC ACA CTT GCA GCT TGG ACC ACA TGG GCA-3'	70,9 °C	56,7 %
CRPcDNA+629	5'-TTG TTG GCT GCC CAT GCG GGT CAC AGT GCA C-3'	73,5 °C	61,3 %
CRPcDNA-1386	5'-AAA CAA TCC ATC ACA GAA TCA ATA AAA GAT AA-3'	59,2 °C	25,0 %

**C**

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> -Wert	GC-Gehalt
AP-1	5'-GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'	65,0 °C	48,1 %
AP-2	5'-AAT AGG GCT CGA GCG GC-3'	57,6 °C	64,7 %
GPCR-4	5'-TGC ACC TCG TTA CAT CTC TGA TAT CAG TTA-3'	64,0 °C	40,0 %
GPCR-7	5'-TGT TTC AGT TGA AGA TTG CC ATG TGG TCC-3'	66,8 °C	46,7 %
GPCR-6	5'-CTC AAT ATC ATG CTA GTG TAG TGG ATA GCA CTG G-3'	68,3 °C	44,1 %
GPCRcDNA+1036	5'-GTT TCT GAA GTG CTCCTA CTA TTC ACT GAC-3'	65,4 °C	43,3 %

#### 2.14.4 'Genomic Walking'

Diese Methode ermöglicht es, unbekannte Bereiche aus einem Genom mit Hilfe von Adaptoren zu amplifizieren. Die Versuche wurden in Anlehnung an Siebert *et al.* [1995] durchgeführt. Dabei wird genomische DNA mit 'blunt-end'-schneidenden Restriktionsenzyme verdaut anschließend mit 15 mM (4-Nukleotid-Restriktionsschnittstellen) bzw. 5 mM (6-Nukleotid-Restriktionsschnittstellen) eines speziellen 5'-überhängenden Adaptors ligiert. Dieser Adaptor wird durch das 'Annealen' der beiden folgenden Oligonukleotide (je 45 µM) bei 80°C mit einer Temperaturverringerng von 1 °C pro 15 min auf 4°C hergestellt: Adop 1: 5'-CTAATACGACTCACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'; Adop 2: PO<sub>4</sub>-5'-ACCTGCCCA-3-NH<sub>2</sub>. Die so konstruierten Bibliotheken aus Bsh 1236I, DraI, Ecl 136I, Eco 47III, EcoRV, PvuII, RsaI, ScaI, SmaI, SspI und StuI restringierter genomischer DNA von *E. buchholzi* wurden von Frau Dr. Heike Koewius (Abteilung für Molekulare Parasitologie, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Für die PCR-Reaktionen wurde das 'Expand High Fidelity' PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) mit je 1 µl der verschiedenen genomischen Bänke als Templat eingesetzt. Dazu kamen je 300 nM des Adaptor-Primers AP-1 und des genspezifischen CRP-Primers (Kap. 2.14.1), 200 µM dNTP-Mix, 1 x PCR-Puffer und 3,75 U 'Expand High Fidelity' DNA-Polymerase-Mix. Als Reaktionsbedingungen wurde eine Zweischnitt-PCR gewählt: Auf eine 5minütige Denaturierung folgten dabei 35 Zyklen aus 30 sec Denaturierung bei 95°C sowie 8 min 'Annealing' und Elongation bei 68°C. Den Abschluß der Reaktion bildete ein 15minütiger Elongationsschritt bei 72°C. 1/100 dieses Ansatzes wurde als Templat für eine 'nested'-PCR mit Hilfe des gleichen PCR Systems unter den gleichen Bedingungen eingesetzt. In dieser Reaktion wurden je 300 nM des Primers AP-2 und des zweiten weiter 3'-seitig gelegenen genspezifischen CRP-Primers (bei Amplifikation in 3'-Richtung des *crp*-Gens) bzw. weiter 5'-seitig gelegenen genspezifischen CRP-Primers (bei Amplifikation in 5'-Richtung des *crp*-Gens) (Kap. 2.14.1) verwendet. Jeweils 1/5 beider PCR-Reaktionen wurde auf einem 1 - 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt und spezifische Amplifikationsprodukte durch 'Southern Blot'-Analysen bestimmt. Die Klonierung der aus dem Gel eluierten Fragmente (Kap. 2.12) erfolgte wie in Kap. 2.14.5 beschrieben.

#### 2.14.5 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden das 'TOPO TA Cloning'-Kit (Invitrogen, Groningen, NL) sowie das 'pGEM-T Easy Vector' System (Promega, Heidelberg) nach den Angaben der Hersteller eingesetzt. Jeweils 2 µl der Ligationsansätze wurden für die anschließende Transformation in TOP10-Zellen (Invitrogen, Groningen, NL) bzw. 'subcloning efficiency'-DH5- $\alpha$ -Zellen (Gibco BRL, Eggenstein) (Kap. 2.10) verwendet.

### 2.15 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von klonierter DNA erfolgte nicht-radioaktiv nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* [1977] mit Hilfe des automatischen DNA-Sequenzierers LICOR 4000 der Firma MWG Biotech (Ebersbach).

### 2.15.1 Sequenzierprimer

Sequenzspezifische 5'-IR-gekoppelte Sequenzierprimer (MWG Biotech, Ebersberg) wurden mit dem PC/Gene-Programm (Version 6.7), 'PCRPLAN' (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) und dem Programmpaket Oligo 4.1-Primer Analysis Software (National Biosciences Inc., Plymouth, U.S.A.) ausgewählt. Die Berechnung der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>-Wert) der Sequenzierprimer erfolgte nach der Formel:  $69,3 \text{ °C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt}) - 650/n$  (MWG Biotech, Ebersbach, pers. Auskunft). In Tabelle 2.2 sind die eingesetzten Sequenzierprimer aufgeführt.

**Tabelle 2.2 Übersicht über 5'-IR-gekoppelte Sequenzierprimer.** Angegeben sind die Sequenzen der Oligonukleotide, ihre Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) und der GC-Gehalt (in %).

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> -Wert	GC-Gehalt
M13 Reverse	5'-CGA GAA ACA GCT ATG AC-3'	50,4 °C	47,1 %
M13 Forward	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	51,7 °C	56,3 %
T7-Promotor	5'-ATT ATG CTG AGT GAT ATC CC-3'	53,2 °C	40,0 %
SP 6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3'	49,1 °C	30,0 %
PRS424-5'	5'-TCC TCG AAT ATG CCC TGC AGG AAT-3'	62,7 °C	50,0 %
PRS424-3'	5'-GTA GAG CGA TGT GGG GGA GGG CGT-3'	69,6 °C	66,7 %
G-CRP-1 5'A	5'-AAA GAC ATT GTG CAC ACA ACG ACG C-3'	58,4 °C	45,5 %
G-CRP-1 5'B	5'-GAG GAA TTT CTT CAC CAG ATC-3'	55,9 °C	42,9 %
G-CRP-1 5'C	5'-TCA CGC TCT AAG CTA TCT AAT-3'	54,0 °C	38,1 %
G-CRP-1 5'D	5'-TGT GCA GTT CCC ATA AGC AGT-3'	57,9 °C	47,6 %
G-CRP-1 5'E	5'-GTG CTC TGC CAA GTG GGT AGC-3'	63,7 °C	61,9 %
G-CRP-1 5'F	5'-GCA AGT TAC TGC TCA GTG ATT C-3'	58,4 °C	45,5 %
G-CRP-1 5'G	5'-ATT TCC TGC ATA TGA TGG ACG-3'	55,9 °C	42,9 %
G-CRP-1 3'A	5'-GCG TTG TGT GCA CAA TGT CTT T-3'	58,4 °C	45,5 %
G-CRP-1 3'B	5'-GAT CTG GTG AAG AAA TTC CTC-3'	55,9 °C	42,9 %
G-CRP-1 3'C	5'-ATT AGA TAG CTT AGA GCG TGA-3'	54,0 °C	38,1 %
G-CRP-1 3'D	5'-ACT GCT TAT GGG AAC TGC ACA-3'	57,9 °C	47,6 %
G-CRP-1 3'E	5'-GCT ACC CAC TTG GCA GAG CAC-3'	63,7 °C	61,9 %
G-CRP-1 3'F	5'-GAA TCA CTG AGC AGT AAC TTG C-3'	58,4 °C	45,5 %
G-CRP-2 5'A	5'-GTG AGC GCC TAG GCT CCA GAA-3'	63,7 °C	61,9 %
G-CRP-2 5'B	5'-GAG GAT TCA CTG AGA AAT GTA-3'	54,0 °C	38,1 %
G-CRP-2 5'C	5'-GGC TTA CTC ATT TAT TAA CTA-3'	50,1 °C	28,6 %
G-CRP-2 3'A	5'-TTC TGG AGC CTA GGC GCT CAC-3'	63,7 °C	61,9 %
G-CRP-2 3'B	5'-TAC ATT TCT CAG TGA ATC CTC-3'	54,0 °C	38,1 %
G-CRP-2 3'C	5'-CAC ACA GGT CGT CGC TGT TCC-3'	63,7 °C	61,9 %
G-CRP-3 5'A	5'-GCT CAA GAC TCT TCA TCT GGG-3'	59,8 °C	52,4 %
G-CRP-3 5'B	5'-GTT ACA ATG ATT TAC TAA CGC-3'	52,0 °C	33,3 %
G-CRP-4 5'A	5'-TGA TGC CTG ACC TTT CTG GCG-3'	61,8 °C	57,1 %
G-CRP-4 5'B	5'-TCT GTG ATG TTC CTC CAC A-3'	54,5 °C	47,4 %
G-CRP-4 5'C	5'-GTG CTC GCA CCA ACA TTG AC-3'	59,4 °C	55,0 %
G-CRP-4 5'D	5'-GTG GAT CAG TAG ATG CTG AG-3'	57,3 °C	50,0 %
G-CRP-4 5'E	5'-CAT ATA TAC TGT TCT TTC ATC C-3'	52,8 °C	31,8 %
G-CRP-4 3'A	5'-GGA GCC AGT AGC GAA GTC AG-3'	61,4 °C	60,0 %
G-CRP-4 3'B	5'-CTA TCT ATA TGC TCT ATC AG-3'	51,2 °C	35,0 %
G-CRP-4 3'C	5'-CAG TAA TAT GTT ACA TAT GC-3'	49,1 °C	30,0 %
G-CRP-4 3'D	5'-TCA CAC TTA CAT CCT GAA CC-3'	55,3 °C	45,0 %
G-CRP-4 3'E	5'-TCC AAT TAT GAT GAT GGA TG-3'	51,2 °C	35,0 %
G-CRP-4 3'F	5'-GAA CTC AGC ATC TAC TGA TCC-3'	57,9 °C	47,6 %

### 2.15.2 Sequenzierung mit Thermo Sequenase

Für die Sequenzreaktion wurden das 'Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing-kit with 7-deaza-dGTP' (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sowie Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff (IRD800)-gekoppelte Primer (MWG Biotech, Ebersbach; Kap. 2.15.1) verwendet. Pro Reaktion wurden dabei 20 µl Plasmid-DNA (0,1 µg/µl) und 4 µl 5'-IR-gekoppelte Primer (0,2 – 0,4 pmol/µl) gemischt und je 6 µl dieses Ansatzes zu je 2 µl des jeweiligen A, C-, G- oder T-Nukleotid-Mixes gegeben und anschließend mit Mineralöl überschichtet. Die Sequenzreaktion erfolgte dann in einem PTC 100 Thermocycler (MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf). Dabei folgten auf eine 5minütige Denaturierung bei 94 °C 30 Zyklen von Primer-'Annealing' und Strangsynthese (1 min, 50, 55 oder 60 °C) sowie Denaturierung (30 sec, 94 °C). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 µl Formamid-Ladungspuffer abgestoppt. Die IR-markierten DNA-Fragmente wurden in 40 cm langen, 0,4 mm dünnen 6%igen Gelen aus modifiziertem Polyacrylamid (Ultra Pure Sequagel XR, National Diagnostics; Atlanta, USA) mit 8M Harnstoff in 1x TBE-Puffer bei 1500 V und 50 °C aufgetrennt und in Echtzeit über eine Laser-Photomultiplier-Einheit detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software BaseimageIR 4.0 von Licor (MWG Biotech, Ebersbach).

### 2.15.3 Computeranalyse von Sequenzdaten

Nukleinsäure- und deduzierte Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Programme FASTA, BLITZ und BLAST mit den Datenbanken EMBL und SwissProt verglichen [Smith and Waterman, 1981; Pearson und Lipman, 1988; Altschul *et al.*, 1990]. Zwei bekannte DNA- oder Protein-Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme 'Blast 2 sequences' ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) [Tatusova und Madden, 1999], LALIGN ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) [Huang und Miller, 1991] und CLUSTALW ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) [Thompson *et al.*, 1994] gegeneinander abgeglichen. Repetitive DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms CENSOR in der REPBASE-Datenbank identifiziert ([www.girinst.org](http://www.girinst.org)) [Jurka *et al.*, 1996]. Putative Bindungsstellen für Proteine in DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm MatInspector V2.2 [Quandt *et al.*, 1995] in der Transfac-Datenbank ([www.transfac.gdf.de](http://www.transfac.gdf.de)) und der 'motif library' ([www.motif.genome.ad.jp](http://www.motif.genome.ad.jp); Bioinformatics Center, Kyoto University, Japan) detektiert [Heinmeyer *et al.*, 1998; Wingender *et al.*, 2000].

## 2.16 *in vitro*-Mutagenese

### 2.16.1 Oligonukleotide für die Mutagenese

Für die *in vitro*-Mutagenese wurden 5'-seitig phosphorylierte Oligonukleotide mit einer Gesamtlänge von 23 bis 25 Basen gewählt. Die jeweils auszutauschende Base lag dabei in der Mitte der Oligonukleotide, so daß sie beidseitig von 10 bis 12 korrekten Basenpaaren umgeben war. Damit sollte sichergestellt werden, daß es unter den gewählten Bedingungen zu einer möglichst optimalen Bindung des jeweiligen Oligonukleotides an die zu mutierende komplementäre Stelle in der CRP-cDNA kommt. Die Berechnung der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>-Wert) der mutagenen Oligonukleotide erfolgte nach der Formel: 69,3 °C + (0,41 x GC-Gehalt) – 650/n (MWG Biotech, Ebersbach, pers. Auskunft).

**Tabelle 2.3 Übersicht über die mutagenen Oligonukleotide.** Angegeben sind die Sequenzen der Oligonukleotide, ihre Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) und der GC-Gehalt (in %).

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> -Wert	GC-Gehalt
Amp Repair	5'-GTT GCC ATT GCT GCA GGC ATC GTG GTG-3'	69,5 °C	59,3 %
Amp Knockout	5'-GTT GCC ATT GCG GCA TCG TGG TGT CAC-3'	69,5 °C	59,3 %
Tet Repair	5'-GCC GGG CCT CTT GCG GGA TAT CGT CCA-3'	72,6 °C	66,7 %
Tet Knockout	5'-GCC GGG CCT CTT GCG GGC GTC CAT TCC -3'	75,0 °C	74,1 %
CRP-R4 Cys 1	5'-GAG TCG ACA ATG AGC TCC TGT GGT T-3'	64,6 °C	52,0 %
CRP-R4 Cys 3	5'-ACA ATG TGC TCC AGT GGT TCA GGA-3'	62,7 °C	50,0 %
CRP-R4 Cys 7	5'-TGT GGT TCA GGA AGT AAG TGT GAG A-3"	51,0 °C	44,0 %
CRP-R4 Cys 9	5'-TCA GGA TGT AAG AGT GAG AAG GGA-3'	63,0 °C	48,0 %
CRP-R4 Cys 14	5'-GAG AAG GGA GAG AGT AAG CCA GGT T-3'	54,0 °C	52,0 %
CRP-R4 Cys 18	5'-GTA AGC CAG GTA GTA CCA AGC GA-3'	62,4 °C	52,2 %
CRP-R4 Cys 22	5'- GTA CCA AGC GAA GCT GTG GTA CTA -3'	62,7 °C	50,0 %
CRP-R4 Cys 23	5'-ACC AAG CGA TGC AGT GGT ACT AAA-3'	61,0 °C	45,8 %
CRP-R4 Cys 27	5'-GTG GTA CTA AAA GTG GAG TTG AAG-3'	59,3 °C	41,7 %
CRPcDNA 548	5'-TTG AAG ATT GCC TAT GTG GTC GTC CAA G-3'	61,3 °C	44,0 %
CRPcDNA 727	5'-TGT GGA ATG CAG AAC TGC CCG TGT G-3'	66,3 °C	56,0 %

## 2.16.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die *in vitro*-Mutagenese (*E. coli* JM109 und *E. coli* ES1301 *mutS*, Kap. 2.4) erfolgte modifiziert nach der von Hanahan [1985] beschriebenen Rubidiumchlorid-Methode. Es wurde zunächst eine 2,5 ml-Übernachtskultur in LB-Medium angezogen. Aus dieser Kultur wurde eine 250 ml-Kultur in LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> angeimpft, die bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurde. Diese Kultur wurde abzentrifugiert (4500 x g, 4 °C, 5 min) und in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 4 °C wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4500 x g, 4 °C, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer aufgenommen. Nach einer 60minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert (100 µl), in einem Trockeneis/Isopropanol-Gemisch schnell eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.16.3 Mutagenese

Für die *in vitro*-Mutagenese-Reaktionen wurde das 'Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis'-System der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Dieses System beruht auf der site directed Mutagenese nach Hutchinson *et al.* [1978]. Dabei werden synthetische Oligonukleotide eingesetzt (Kap. 2.16.1), die komplementär zu dem gewünschten Bereich einer einzelsträngigen Templat-DNA mit Ausnahme der zu mutierenden Base in der Mitte des Oligonukleotides sind. Nach Hybridisierung von Templat-DNA und Oligonukleotid wird durch eine DNA-Polymerase der komplementäre DNA-Strang synthetisiert, Phosphodiesterbindungen an den Einzelstrangbrüchen werden durch die DNA-Ligase geknüpft. Die so entstandene circulaire Plasmid-DNA wird zur Stabilisierung der eingeführten Mutation in einen *mutS*<sup>-</sup>-*E. coli*-Stamm transformiert. Das in dieser Arbeit eingesetzte System bot durch den Einsatz einer Selektion über die Antibiotika Ampicillin und Tetracyclin die Möglichkeit, positiv mutagene Klone effizient zu detektieren. Dabei wurden bei der Mutagenese-Reaktion zusätzlich 'Knockout'- bzw 'Repair'-Oligonukleotide (Kap. 2.16.1) eingesetzt, die durch eingeführte Punktmutationen zu einem

Wechsel in der Antibiotika-Resistenz des verwendeten pALTER-1 Vektors (Kap. 2.4) führten. Die anschließende Selektion auf die jeweils wiederhergestellte Antibiotika-Resistenz des Vektors ermöglichte eine Kontrolle der Reaktionseffizienz und damit ein gezieltes 'Screening' von potentiell positiven Klonen.

Für jeweils zehn Mutagenese-Reaktionen wurden initial insgesamt 2 µg doppelsträngige Plasmid-DNA eingesetzt. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Behandlung mit 0,2 M NaOH und 200 µM EDTA in einem Gesamtvolumen von 20 µl (5 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 2 M Ammoniumacetat, pH 4,6 versetzt, ethanolisch gefällt, abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die so denaturierte DNA konnte nun für die Mutagenese-Reaktion eingesetzt werden. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl jeweils 10 µl DNA, 0,25 pmol 'Repair'-Oligonukleotide, 0,25 pmol 'Knockout'-Oligonukleotide und 1,25 pmol des gewünschten mutagenen Oligonukleotides in Annealing-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl) gemischt. Die Reaktionsansätze wurden für 5 Minuten bei 75 °C inkubiert und anschließend zur Anlagerung der Oligonukleotide langsam auf 22 °C abgekühlt (1 °C pro Minute; PTC 150-25 MiniCycler; Biozym, Hess. Oldendorf). Im Anschluß daran wurden je 3 µl 10fach Synthese-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM dNTP; 10 mM ATP; 20 mM DTT), 5 U T4 DNA Polymerase, 2 U T4 DNA Ligase zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Synthese des Zweitstranges und die Ligation erfolgte für 90 Minuten bei 37 °C. Für die Transformation in 100 µl kompetente *E. coli* ES1301 *mutS*-Zellen (Kap. 2.16.2) wurden 1,5 µl der Reaktionsansätze eingesetzt. Auf eine 10minütige Inkubation auf Eis folgte dabei ein Hitzeschock (42 °C, 45 sec) und eine weitere Inkubation auf Eis (2 min). Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium und einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurden je 500 µl der Transformationsansätze in 4,5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte wie in Kapitel 2.11 angegeben. Anschließend wurden 5 bis 10 ng der Plasmid-DNA in *E. coli* JM109-Zellen nach dem oben beschriebenen Protokoll transformiert. Die Ansätze wurden auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgebracht und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Analyse der mutagenen Klone erfolgte nach der Präparation der Plasmid DNA (Kap. 2.11) durch Sequenzierung (Kap. 2.15).

## **2.17 Heterologe Expression des CRP in *Saccharomyces cerevisiae***

Die Expression des CRP-Proteins und der CRP-Deletions- bzw. Mutationsklone in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des Vektors pRS424 [Mumberg *et al.*, 1994]. Die Proteinexpression kann dabei über den vorgeschalteten *MET25*-Promotor gesteuert werden. Das gewünschte Protein wird bei Abwesenheit des Repressors Methionin exprimiert [Rönicke *et al.*, 1997].

Die Klonierung der über Plasmid-PCR amplifizierten (Kap. 2.14.2) und entsprechend modifizierten CRP-Fragmente (Kap. 2.13) erfolgte ungerichtet über die Sall-Schnittstelle des Vektors. Korrekt orientierte Klone wurden durch Sequenzanalyse identifiziert (Kap. 2.15). Die Expressionsversuche wurden in SD-Medium ohne Leucin (Selektion auf Plasmid-haltige Zellen) und Methionin durchgeführt.

## 2.18 Transformation von Hefe

Die Herstellung von kompetenten Hefezellen und die anschließende Transformation von pRS425 in Hefezellen erfolgte mit Hilfe von Lithiumacetat (LiOAc) nach der Methode von Gietz und Woods [1994]. Dazu wurden zunächst einige Hefekolonien in steriles Wasser überführt, kurz abzentrifugiert und in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat überführt. Nach einer 5minütigen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen erneut kurz abzentrifugiert und anschließend transformiert. Es wurden dazu 240 µl PEG (50 %), 36 µl LiOAc (1 M), 50 µl Heringssperma-DNA (2 mg/ml), 5 µl Plasmid-DNA (0,1 µg/µl) und 20 µl H<sub>2</sub>O auf das Zellpellet gegeben. Nach der Resuspendierung des Pellets wurde der Ansatz für 20 min bei 42 °C inkubiert. Nach der folgenden kurzen Zentrifugation wurde das Zellpellet in 250 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf selektiven SD-Agar-Platten ausgebracht. Die Platten wurden für zwei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert.

## 2.19 Erstellung von Wachstumskurven

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden zunächst 5ml-Vorkulturen in Cadmium-freien SD-Medium ohne Leucin und Methionin angesetzt, die 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert wurden. Aus diesen Vorkulturen wurden dann die Cadmium-haltigen Hauptkulturen ebenfalls in SD-Medium ohne Leucin und Methionin angeimpft. Die Zugabe von Cadmium erfolgte dabei über eine 0,1 M CdCl<sub>2</sub>-Stammlösung. Bei den Wachstumsversuchen in der logarithmischen Phase betrug dabei das Kulturvolumen 40 ml. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Nach 16 h wurde eine erste Probe (500 µl) zur Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (Beckman Spektrophotometer DU 640) entnommen. Die Entnahme weiterer Proben erfolgte dann im 2 h-Rhythmus nach 18, 20, 22, und 24 h. Abschließend wurden nach 40 und 48 h Proben entnommen. Versuche zur Bestimmung der Cadmium-Grenzkonzentration wurden in SD-Medium ohne Leucin und Methionin in einem Kulturvolumen von 20 bzw. 7 ml durchgeführt. Die erste Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen erfolgte 24 h nach dem Animpfen der Hauptkulturen. Weitere Messungen folgten nach 48 und 72 h.

## 2.20 Bestimmung des Cadmium-Gehaltes in *Saccharomyces cerevisiae*

In Cadmium-freien SD-Medium ohne Leucin und Methionin wurden Vorkulturen (5 ml) angesetzt, die 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert wurden. Die Vorkulturen wurden danach in 200 ml Cadmium-haltiges SD-Medium ohne Leucin und Methionin überführt. Diese Kulturen wurden bis zum Erreichen der mid-log Phase schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Nach Bestimmung der genauen Zellzahl in den Kulturen mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurden  $5 \times 10^8$  Zellen abgenommen, abzentrifugiert (4000 x g, 4 °C, 5 min) und in 100 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es folgten 7 Waschschrte mit insgesamt 500 ml H<sub>2</sub>O. Danach wurden die Zellen unter Vakuum (Speed Vac) lyophilisiert. Mit Hilfe einer Analysenwaage erfolgte anschließend die genaue Gewichtsbestimmung der Zellpellets. Die Bestimmung der Cadmiumkonzentrationen erfolgte in der Abteilung Analytische Chemie im Medizinischen Institut für Umwelthygiene Düsseldorf mittels elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) mit Zeeman-Untergrundkompensation unter Verwendung des Gerätes 4100 ZL (PerkinElmer, Wellesley, USA).

## 2.21 Radioaktive Markierung des CRP in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die radioaktive Markierung des CRP in den Hefezellen wurden in Cadmium-freien SD-Medium ohne Leucin und Methionin zunächst Vorkulturen (5 ml) angesetzt, die 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert wurden. Aus diesen Vorkulturen wurden durch 1 : 10-Verdünnung 2 ml-Kulturen (SD-Medium ohne Leucin und Methionin) angeimpft, denen je 50 µCi [<sup>35</sup>S]-L-Cystein (spez. Aktivität 1075 Ci/mmol) zugesetzt wurde. Diese radioaktiven Kulturen wurden für 16 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 10000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C), mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 150 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM DTT resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe von Glasperlen (Ø 0,5 mm), die der Zellsuspension zugesetzt wurden. Die Ansätze wurden für 5 min auf höchster Stufe gevortext. Die so aufgeschlossenen Zellextrakte wurden abgenommen, in ein Eppendorfgesäß überführt und die Zelltrümmer für 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 150 µl 2fach Ladungspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM Natriumthioglykolat; 10 % Mercaptoethanol; 20 % Glycerin, 0,004 % Bromphenolblau) versetzt. Je 35 µl dieser Proben wurden auf 18%ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgele (Gelgröße 12,5 x 14 cm) aufgetragen (Kap. 2.24.2). Nach dem Lauf wurden die Gele auf einem Gelrockner unter Vakuum für 2-3 h bei 60 °C getrocknet. Die Exposition erfolgte auf einseitig beschichteten [<sup>35</sup>S]-sensitiven Kodak BIOMAX MR Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei -80 °C.

## 2.22 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Hefekulturen wurden 5 ml SD-Medium mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und diese bis in die mid-log-Phase bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Jeweils 4 ml einer solchen Kultur wurden für 1 min bei 10000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C), einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, in 300 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert, in ein kleines Reagenzglas überführt, mit Glasperlen (Ø 0,5 mm) bis knapp unter dem Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt und für 5 min auf höchster Stufe gevortext. Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes zur Proteinbestimmung (Kap.2.23) abgenommen, der Rest mit 100 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die so aufgeschlossenen Zellextrakte wurden abgenommen, in ein Eppendorfgesäß überführt und die Zelltrümmer für 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1xRotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Jeweils 20 µg dieser Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

## 2.23 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen wurde mit Hilfe des BioRad-Protein-Assay (BioRad, München) auf Grundlage der Bradford-Reagenz [Bradford, 1976] bestimmt. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz mit 790 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl des zu bestimmenden Proteinextraktes in einer Einwegküvette gemischt. Die Extinktion dieser Mischung wurde nach 5 min bei 595 nm (Beckman Spektrophotometer DU 640) gemessen. Als Eichkurve diente dabei die Extinktion definierter Proteinmengen (0; 1 ; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 und 20 µg BSA/ml).

## **2.24 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen und 'Western Blot'**

### **2.24.1 SDS-PAGE**

Die Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli [1970]. Dazu wurde die ‚Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell‘ Apparatur (BioRad, München) benutzt. Die Gelgröße beträgt in diesem System 8 x 10 cm. Es wurden Trenngele mit 15 % Polyacrylamid verwendet. Die Konzentration der Sammelgele betrug einheitlich 4,5 % Polyacrylamid. Die Auftrennung erfolgte bei 40 mA für ca. 2 – 2,5 h. Als Molekulargewichtsstandard wurde der ‚Prestained SDS Molecular Weight Marker Mix‘ (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

### **2.24.2 Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte in Anlehnung an die SDS-PAGE (Kap. 2.24.1), mit der Ausnahme, dass an Stelle von SDS in den verwendeten Puffern 50 mM Natriumthioglykolat verwendet wurde. Zum Schutz der Proben vor Oxidation erfolgte vor Beladung ein Gellauf bei 120 V für 2 h.

### **2.24.3 Coomassie-Brilliant-Blue Anfärbung von Proteinen**

Die Anfärbung der in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine (Kap. 2.24.1) erfolgte mit Hilfe der koloidalen Coomassie-Färbelösung RotiBlue (Roth, Karlsruhe). Dazu wurde das Gel nach dem Lauf vorsichtig von den Glasplatten abgehoben und Ü/N in der Färbelösung sanft geschüttelt. Durch nicht-kovalente Anlagerung des Farbstoffs an die Proteine bildet sich dabei ein wasserunlöslicher Komplex. Nach der Inkubation in der Färbelösung wurde das Gel in H<sub>2</sub>O überführt und für 1 – 2 h leicht geschüttelt. Die Empfindlichkeit der Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue liegt bei 0,3 – 1 µg pro Bande.

### **2.24.4 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.24.1) wurden die Proteine nach der Semi-Dry-Methode auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet [Kyhse-Anderson, 1984]. Zwischen zwei Kohlenstoffplatten (Biometra Fast Blot, Göttingen) wird dabei ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, welches bei hohen Feldstärken zu einem effektiven Transfer der Proteine auf die Membran führt. Der Transfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte zwischen mehreren, in Blotting-Puffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) bei einer Stromstärke von 45 mA für 2 h. Nach dem Blotten wurden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran durch Ponceau S (0,2 % Ponceau S in 3%iger Trichloressigsäure) reversibel angefärbt. Die anschließende Entfärbung erfolgte durch leichtes Schütteln in Leitungswasser.

### 2.24.5 Immundetektion

Nach der Überprüfung des Proteintransfers durch Anfärbung mit Ponceau S (Kap. 2.24.4) wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (monoklonaler Maus-anti-cMyc AK, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; 0,2 µg/ml in TST-Puffer) für 2 h bei Raumtemperatur. Im Anschluß daran wurde die Membran für 3 x 10 min in TST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus, 'Horse Radish' Peroxidase- (HRP-)gekoppelt, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA; 1 : 25000 in TST-Puffer) erfolgte danach für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend für 2 x 5 min in TST-Puffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt nun durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL Western Blotting Detektionssystems (Amersham Pharmacia, Freiburg) in Anlehnung an Roswell und White [1978]. Gleiche Volumina der Detektionsreagentien 1 und 2 wurden dazu gemischt und auf die Membran gegeben (0,125 ml/cm<sup>2</sup>). Nach 1 min wurde die Flüssigkeit abgenommen, die Membran 1 x kurz mit TST gespült und anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien gelegt. Die Exposition erfolgte auf einem ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 5 – 15 min bei Raumtemperatur. Zum Nachweis der Auftragung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren wurde anschließend eine zweite Immundetektion durchgeführt. Dazu wurde die Membran zunächst mit 'Stripping'-Puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,7; 2 % SDS; 100 mM Mercaptoethanol) behandelt, um die Antikörper der ersten Detektion zu entfernen. Im Anschluß daran erfolgte eine zweite Immundetektion mit einem anti-Aktin (I-19) Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; 0,2 µg/µl in TST-Puffer, 1 h, Raumtemperatur). Als Zweitantikörper wurde ein HRP-gekoppelter Kaninchen-anti-Ziege Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; 1 : 25000 in TST-Puffer) eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte dann nach dem oben beschriebenen Schema.

## 2.25 Lokalisation des CRP in *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.25.1 Immunfluoreszenz

2–3 OD<sub>600</sub>-Einheiten von exponentiell wachsenden Kulturen der zu untersuchenden Hefezellen wurden durch Zugabe von Formaldehyd auf eine Endkonzentration von 5 % eingestellt und anschließend für 4 h bei 30 °C fixiert [Pringle *et al.*, 1991]. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1 min, 3000 rpm, Heraeus Untertischzentrifuge) und in 1 ml Sorbitolpuffer (40 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,2 M Sorbitol; pH 6,5) aufgenommen. Die Sphaeroplastierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 10 µl Lyticase (10 mg/ml), 10 µl 1 M DTT und 30 µl β-Glucuronidase für 30 min bei 37 °C. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) und in 1 ml Sorbitolpuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 10 µl Triton X-100 (10 %) und 5 min Inkubation auf einem Rocker bei RT wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) und wiederum in 1 ml Sorbitolpuffer aufgenommen. 40 µl der Zellsuspension wurde auf einen Polylysin-beschichteten Objekträger ausgebracht und für 1 min angetrocknet. Nach 4maligem Waschen des Objekträgers mit PBS wurde dieser kurz mit 20 µl PBS/BSA (1 mg/ml) äquilibriert. Anschließend wurden 60-70 µl der Primärantikörperlösung

(polyklonaler Kaninchen-anti-cMyc AK, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; 1 µg/ml in PBS/BSA) aufgetropft. Nach 90minütiger Inkubation bei RT in einer Feuchtekammer wurde der Objektträger erneut 4 x mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden 20 µl der Sekundäran-tikörperlösung aufgetropft (Ziege-anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt, Sigma Deisenhofen; 1 : 100 in PBS/BSA). Die Inkubation erfolgte für 90 min bei RT in einer Feuchtekammer im Dunkeln. Anschließend wurde der Objektträger 4 x mit PBS gewaschen. Die so behandelten Hefezellen wurden in einer 1:1 Mischung (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg) sowie einer Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) auf dem Objektträger eingebettet

### **2.25.2 Anfärbung des Zellkerns**

Für die Anfärbung des Zellkerns in den Hefezellen wurden die Zellen wie in Kap. 2.25.1 beschrieben shaeroplastiert. Nach dem Permeabilisieren der Membranen wurden die Zellen in 1 ml Sorbitolpuffer (Kap. 2.25.1) mit 0,1 mg/ml RNase A aufgenommen und für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) und auf Polylysin-beschichteten Objektträgern ausgebracht (Kap. 2.25.1). Nach Behandlung mit Primär- und Sekundäran-tikörpern wurden die Zellen schließlich in einer 1:1-Mischung (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg), die eine Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) und 5 µg/ml Propidiumiodid enthielt, eingebettet.

### **2.25.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie**

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT ('Confocal Laser Scanning Microscope Unit', Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz des Farbstoffes Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser, die von Propidiumiodid bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Molekulare Charakterisierung des *crp*-Gens

Einleitend wurden die strukturellen und die daraus möglicherweise abzuleitenden funktionellen Ähnlichkeiten zwischen dem CRP und den Metallothioneinen bereits angesprochen. Die Organisation von Metallothionein-Genen vor allem aus Vertebraten ist inzwischen sehr gut untersucht [Hamer 1986; Samson und Gedamu, 1998]. Über die genomische Organisation anderer Schwermetall-bindender Proteine liegen bislang noch keine Erkenntnisse vor. In der vorliegenden Arbeit sollte die Exon/Intron-Verteilung des *crp*-Gens aufgeklärt werden und das Gen auf strukturellen Eigenschaften hin untersucht werden.

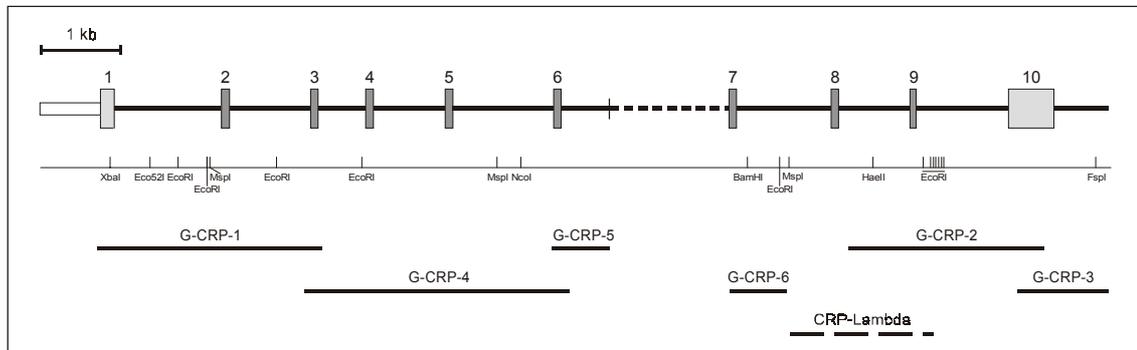
##### 3.1.1 Organisation des *crp*-Gens

Wie 'Southern Blot'-Analysen mit genomischer DNA zeigen, liegt das *crp*-Gen in wenigen, möglicherweise nur einer Kopie im Genom von *E. buchholzi* vor [Willuhn *et al.*, 1996]. Durch Screening einer partiellen genomischen Bibliothek im Vektor  $\lambda$  ZAP II konnte ein genomisches Fragment des CRP mit einer Grösse von 1861 bp detektiert werden (Abb. 3.1) [Koewius, 1998]. Dieses Fragment enthält zwei Exons mit einer Grösse von 93 bzw. 81 bp aus dem kodierenden Bereich der CRP-cDNA. Die im Vergleich zur Grösse der CRP-cDNA (1474 bp) kleinen Exons und das mit 908 bp sehr grosse Intron weisen auf eine Gesamtlänge des Gens von über 10 kbp hin. Die Amplifizierung und Klonierung des Gens erfolgte mit Hilfe genomischer PCR und über die Methode des 'Genomic Walking'. Die eingesetzten PCR-Primer wurden dabei aus der cDNA, der Promotor-Sequenz des *crp*-Gens [Koewius, 1998] sowie aus den Sequenzinformationen der jeweils neu ermittelten Genbereiche abgeleitet. Es wurden insgesamt sechs genomische, sich überlappende Fragmente detektiert, von denen vier über genomische PCR (G-CRP-1, G-CRP-2, G-CRP-4 und G-CRP-6) und zwei über 'Genomic Walking' (G-CRP-3 und G-CRP-5) amplifiziert wurden. Als Templat für die Fragmente des 'Genomic Walking' dienten Adaptor-ligierte Bibliotheken aus Bsh1236I (G-CRP-3) und EcoRV (G-CRP-5) restringierter genomischer DNA (Kap. 2.14.4). Die PCR-Fragmente wurden kloniert und die Sequenz von Strang und Gegenstrang bestimmt. Die Sequenzen in den einzelnen Überlappungsbereichen waren dabei identisch. In den Fragmenten enthaltene Exons wurden durch Abgleich mit der CRP-cDNA identifiziert. Eine Auflistung der einzelnen Fragmente mit genauen Längenangaben und den eingesetzten Primerpaaren ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

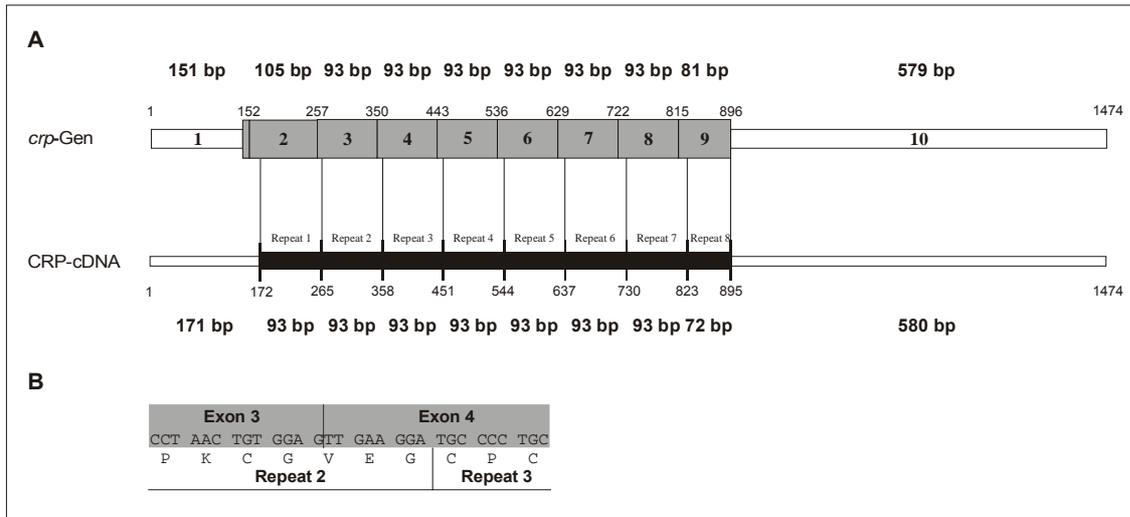
**Tabelle 3.1 Übersicht über die genomischen Fragmente mit den zugehörigen Primerpaaren.** Die Bezeichnung der PCR-Fragmente entspricht den in Abbildung 3.1 dargestellten Fragmenten. Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer sind in Kapitel 2.14.1 aufgeführt.

PCR-Fragment	Amplifikation über	Primerpaar	Fragmentgrösse
G-CRP-1	Genomische PCR	GPCR-1 / GPCR-2	2850 bp
G-CRP-2	Genomische PCR	GPCR-3 / CRPcDNA-1386	2480 bp
G-CRP-3	'Genomic Walking'	GPCR-4 / AP-1 CRPcDNA+1036 / AP-2	1148 bp
G-CRP-4	Genomische PCR	GPCR-5 / CRPcDNA-573	3360 bp
G-CRP-5	'Genomic Walking'	GPCR-6 / AP-1 GPCR-7 / AP-2	728 bp
G-CRP-6	Genomische PCR	CRPcDNA+629 / GPCR-8	719 bp

Das *crp*-Gen weist insgesamt zehn Exons und neun Introns auf (Abb. 3.1). Die Grösse der Exons variiert dabei zwischen 81 bp für Exon 9 und 579 bp für Exon 10. Über einen 'Ribonuclease protection assay' (RPA) konnte bereits der Haupt-Transkriptionsstartpunkt des *crp*-Gens identifiziert werden [Koewius, 1998]. Er liegt 162 bp strangaufwärts des Startkodons. Im Exon 1 (172 bp) finden sich demnach der gesamte 5'-nichtkodierende Bereich der CRP-mRNA sowie die ersten zehn Basen nach dem Start des offenen Leserasters. Die Exons 2 bis 9 umfassen den Rest des kodierenden Bereiches der CRP-mRNA, wobei Exon 9 mit der ersten Base des Stopkodons endet. Der gesamte 3'-nichtkodierende Bereich mit dem Polyadenylierungssignal (Pos. 4088-4093 im 3'-Bereich des Gens, siehe Anhang) ist dann im letzten Exon zu finden. Das Exon 2 ist aus 105 bp, die Exons 3 bis 8 sind einheitlich aus jeweils 93 bp aufgebaut. Beim Vergleich der Exonstruktur des Gens mit der Struktur der CRP-cDNA fällt auf, dass auch die repetitiven Einheiten des CRP bis auf das letzte, verkürzte Repeat (72 bp) genau 93 bp umfassen. Obwohl sie die gleiche Anzahl an Basen aufweisen, sind die mittleren Exons mit den Repeats der cDNA jedoch nicht deckungsgleich. Das Repeat 1, welches einen Grossteil der Sequenz des zweiten Exons (105 bp) enthält, ist um 20 bp strangabwärts gegenüber der ersten Base des Exons versetzt (Abb. 3.2). Die Repeats 2 bis 8 (je 93 bp) korrespondieren entsprechend mit den Exons 3 bis 9, sind mit ihrer ersten Base aber jeweils um 8 bp strangabwärts versetzt. Dieses Muster führt dazu, dass jedes der mittleren Exons für die letzten 8 bp des jeweils vorhergehenden Repeats und für die ersten 85 bp des darauffolgenden Repeats kodiert (Abb. 3.2). Die Aufteilung der Exons im *crp*-Gen weist also ein repetitives Muster auf, welches jedoch nicht direkt mit dem Repeatmuster der cDNA zu korrelieren ist, sondern im Kernbereich des Gens um jeweils 8 bp strangabwärts versetzt ist.



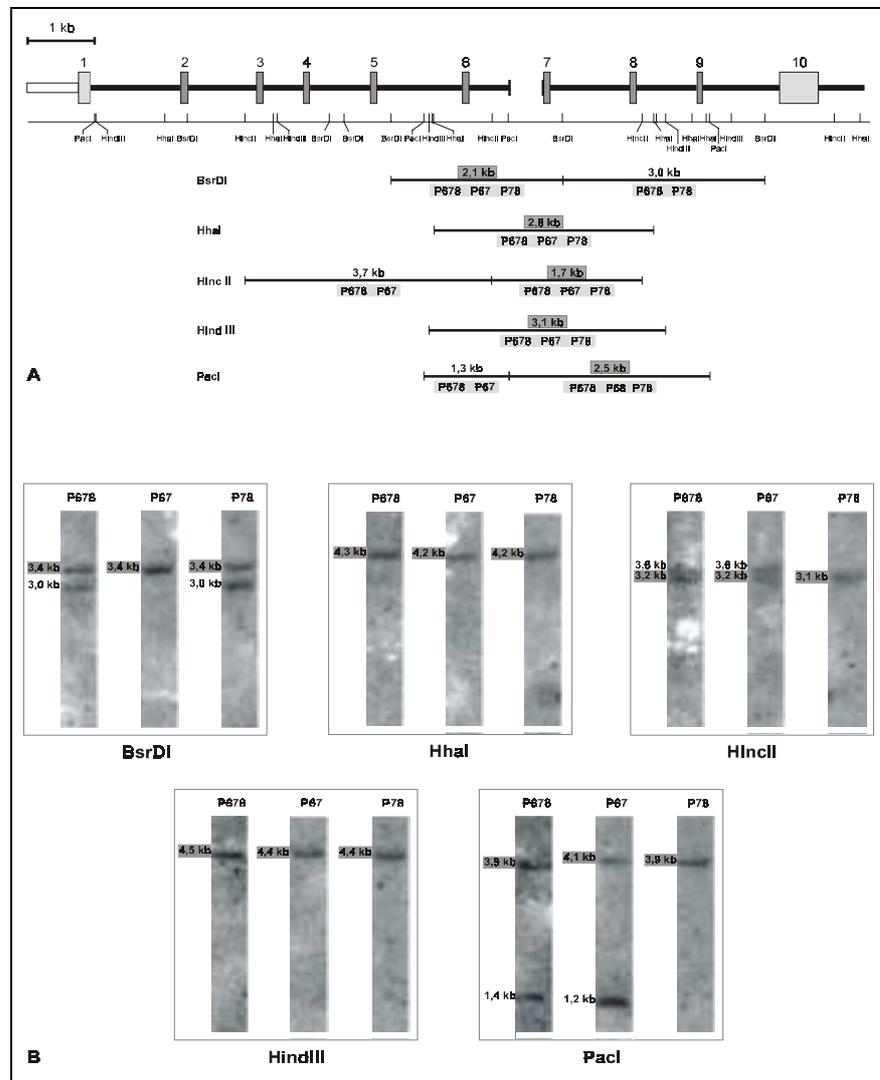
**Abbildung 3.1 Genomische Organisation des *crp*-Gens.** Dargestellt ist das Schema der genomischen Organisation des *crp* mit dem zugehörigen Promotorbereich [Koewius, 1998], welcher vor dem ersten Exon durch eine längliche Box hervorgehoben ist. Die Exons sind entsprechend der Lage in der CRP-cDNA von 1 bis 10 durchnummeriert. Die kodierenden Bereiche sind dabei dunkelgrau, die nicht-kodierenden Bereiche der Exons 1 und 10 hellgrau unterlegt. Die Lage und relative Grösse der einzelnen PCR-Fragmente ist durch waagerechte Balken dargestellt. Gestrichelt dargestellt ist ein Gen-Fragment des CRP (1861 bp), welches in der Abteilung für Molekulare Parasitologie durch Screening einer partiellen genomischen Bibliothek im Vektor  $\lambda$  ZAP II detektiert wurde [Koewius, 1998]. Die gestrichelte Unterbrechung zwischen den Exons 6 und 7 deutet den Bereich des sechsten Introns an, für den keine exakten Angaben über Sequenz und Grösse vorliegen (Abb. 3.3). Zusätzlich angegeben sind die Positionen ausgewählter Restriktionsschnittstellen. Die gesamte Nukleinsäuresequenz der bekannten Bereiche ist im Anhang aufgeführt. Die Nummerierung erfolgt dabei jeweils separat für den 5'-Bereich des Gens vom Transkriptionsstart bis zum Abbruch in Intron 6 und für den 3'-Bereich des Gens beginnend mit der ersten Base des Exon 7 bis in den 3'-flankierenden Bereich des Gens.



**Abbildung 3.2 Vergleich der Exons im *crp*-Gen mit den Repeats der CRP-cDNA. [A]** Dargestellt ist das Exonmuster des *crp*-Gens ohne die Intron-Bereiche im Vergleich zur Repeatstruktur der CRP-cDNA. Für die Repeats der cDNA ist jeweils die Position der ersten Base sowie die Gesamtgrösse der einzelnen Elemente angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit beziehen sich auch die entsprechenden Angaben für die Exons des Gens auf die Basen-Position in der cDNA. **[B]** Die Nukleinsäure- und deduzierte Aminosäuresequenz am Übergang von Exon 3 nach 4 sowie von Repeat 2 nach 3 ist beispielhaft für die übrigen Übergänge im Kernbereich des Gens angegeben.

Die Grösse der vollständig charakterisierten Introns im *crp*-Gen liegt zwischen 598 bp für Intron 3 und 1359 bp für Intron 1. Die genauen Angaben zu den einzelnen Intron- und Exon-Bereichen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. In dem Fragment G-CRP-5 ist die Sequenz für die ersten 628 Basen des 5'-Bereichs von Intron 6 enthalten. Die Versuche zur Amplifikation des restlichen Teils dieses Introns bis zum Exon 7 mit Primerpaaren aus den angrenzenden Bereichen führten jedoch nicht zum Erfolg, so dass die vollständige Sequenz und damit die exakte Zahl der Basenpaare dieses Introns nicht bekannt sind. Das PCR-Fragment G-CRP-6 bildet den Anschluss an den 5'-Bereich des Gens (Abb. 3.1). Als 5'-Primer kam für dieses Fragment der Primer CRPcDNA+629 zum Einsatz, welcher genau mit dem determinierten 5'-Ende des Exons 7 endet, so dass über den 5'-seitig angrenzenden Intronbereich einschliesslich des Exon/Intron-Übergangs keine Sequenzinformationen vorliegen. Durch Southern Analysen wurde die Gesamtgrösse des sechsten Introns bestimmt. Dazu wurden jeweils 30 µg genomischer DNA aus *E. buchholzi* mit den Restriktionsenzymen BsrDI, HhaI, HincII, HindIII und PacI verdaut. Je 10 µg dieser Ansätze wurden über Agarosegele aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit drei verschiedenen Sonden aus dem mittleren Bereich des *crp*-Gens. Die Sonden umfassten zum einen die Exons 6, 7 und 8 (P678), die Exons 6 und 7 (P67) sowie die Exons 7 und 8 (P78). Die durch den Einsatz von drei Sonden bedingten unterschiedlichen Hybridisierungsereignisse sollten eine genaue Verifizierung der Grösse des fehlenden Intron-Bereiches sicherstellen (Abb. 3.3). Die Sonden wurden mit Hilfe spezifischer Primer (P678: CRPcDNA+536 / CRPcDNA-814; P67: CRPcDNA+536 / CRPcDNA-721; P78: CRPcDNA+629 / CRPcDNA-814) (Kap. 2.14.1) über Plasmid-PCR aus der CRP-cDNA amplifiziert. Aus den bekannten Sequenzbereichen des *crp*-Gens wurde für die eingesetzten Restriktionsenzyme ein Restriktionsmuster erstellt, anhand dessen die Fragmentgrössen für die einzelnen Hybridisierungsereignisse abgeleitet wurden (Abb. 3.3 A). Dabei wurde angenommen, dass sich keine weiteren Schnittstellen in dem unbe-

kannten Bereich befinden. Aus der Differenz der anhand bekannter Sequenzbereiche erwarteten Fragmentgrößen mit den im 'Southern Blot' detektierten Banden ergibt sich die Größe des fehlenden Fragments aus Intron 6.



**Abbildung 3.3 'Southern Blot'-Analysen zur Verifizierung der Größe des Intron 6. [A]** Schematische Darstellung des *crp*-Gens mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BsrDI, HhaI, HincII, HindIII und PacI. Die erwarteten Fragmente in dem zu untersuchenden Bereich des Gens sind für die einzelnen Enzyme durch Balken dargestellt. Zusätzlich sind die entsprechenden Fragmentgrößen angegeben. Unter den jeweiligen Balken sind die Sonden angegeben, mit denen die Fragmente detektiert werden. Die Sonde P678 umfasst die Exons 6, 7 und 8 des *crp*-Gens. Analog dazu weisen die Sonden P67 bzw. P78 die Sequenzen für die Exons 6 und 7 bzw. 7 und 8 auf. **[B]** Bandenmuster der 'Southern Blots' für die einzelnen Restriktionsenzyme mit den unterschiedlichen Sonden. Je 30 µg genomische DNA aus *E. buchholzi* wurde mit den Restriktionsenzymen BsrDI, HhaI, HincII, HindIII und PacI restringiert. Die Restriktionsansätze wurden auf drei Agarosegele aufgeteilt (je 10 µg), nach dem Lauf auf Nylonmembranen transferiert und gegen die <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonden P678, P67 bzw. P78 über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Die Membranen wurden anschließend für 2 h bei 65 °C in 0,1 X SSC/0,1 % SDS gewaschen. Die Exposition der Membranen erfolgte bei -80 °C mit Verstärkerfolie. Als Längenstandard diente jeweils EcoRI/HindIII doppelt restringierte λ-DNA. Grau unterlegt sind die Banden, die das gesuchte Fragment beinhalten. Sie entsprechen den grau unterlegten Fragmenten in der schematischen Darstellung, die den gesuchten Teil des Gens überspannen. Die Differenz zu der Größe der detektierten Bande ergibt die Größe für den fehlenden Bereich von Intron 6.

Gemäss der ermittelten Bandenmuster existiert für keines der eingesetzten Restriktionsenzyme eine zusätzliche Schnittstelle in dem zu bestimmenden Bereich des Gens. Die Grösse des gesuchten Fragments konnte so mit Hilfe aller fünf Reaktionsansätze ermittelt werden. Für die Restriktion genomischer DNA mit BsrDI wurden beispielsweise zwei Fragmente in dem fraglichen Bereich erwartet, die eine Grösse von mindestens 2,1 kb sowie 3,0 kb aufweisen. Das 2,1 kb Fragment überspannt dabei den unbekanntem Bereich des Gens und sollte von allen drei eingesetzten Sonden detektiert werden. Das 3,0 kb-Fragment liegt 3'-seitig des fraglichen Bereiches und sollte nur von den Sonden P678 und P78 detektiert werden (Abb. 3.3 A). Im 'Southern Blot' ist dieses 3,0 kb Fragment wie erwartet durch die Hybridisierung mit beiden Sonden auf der entsprechenden Höhe zu erkennen (Abb. 3.3 B). In den Spuren aller eingesetzten Sonden ist zudem jeweils eine Bande auf der Höhe von 3,4 kb erkennbar, bei der es sich um das 2,1 kb Fragment inklusive des unbekanntem Bereichs von Intron 6 handeln muss. Es ergibt sich demnach eine Grösse von 1,3 kb für den fehlenden Intron-Bereich des *crp*-Gens. Die Auswertung der Hybridisierungsereignisse für die übrigen Restriktionsenzyme erfolgte nach gleichem Schema (Abb. 3.3 B). Dabei zeigt sich ein einheitliches Bild hinsichtlich des zu bestimmenden Bereiches zwischen Exon 6 und Exon 7. Übereinstimmend konnte bei allen Ansätzen eine Grösse zwischen 1,3 kb und 1,6 kb ermittelt werden. Berücksichtigt man zusätzlich das bereits bekannte 628 bp-Fragment aus dem 5'-Bereich des Introns, so ergibt sich für Intron 6 eine Gesamtgrösse von 2,0 kb bis 2,3 kb. Damit ist das sechste Intron das grösste Intron im *crp*-Gen.

**Tabelle 3.2 Exon/Intron-Übergänge im *crp*-Gen.** Exonsequenzen sind in Grossbuchstaben, Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Da nur ein Teil von Intron 6 detektiert wurde, kann die genaue Grösse des Introns sowie die Sequenz des Übergangs zu Exon 7 nicht angegeben werden. 'Southern Blot'-Analysen ergaben für diesen Bereich eine Grösse von etwa 2,0 kb bis 2,3 kb.

Exon	Exongrösse	5'-Spleißdonor	Intron	Introngrösse	3'-Spleißakzeptor
1	172 bp	ATGGCATCACgtaagtttct	1	1359 bp	atgtatttagACGCTCATGC
2	105 bp	AGCTGTGGAGgtaataacca	2	1036 bp	tgttaaacagTGGCAGGCTG
3	93 bp	AAGTGTGGAGgtaatgttta	3	598 bp	gttggttcagTTGAAGGATG
4	93 bp	CAAGTGTGGAgtaacaatttt	4	910 bp	tgtgatacagTGGCAGGCTG
5	93 bp	AAATGTGGAGgtgagtcaaa	5	1319 bp	tttgtttcagTTGAAGATG
6	93 bp	AAGTGTGGAGgtaggactct	6	2,0 – 2,3 kb	-----TTGTTGGCTG
7	93 bp	AAATGTGGAAgtaggtttct	7	1194 bp	tgttgaacagTGCAGGACTG
8	93 bp	AAGTGCACAgtaagtttat	8	908 bp	ctatctgtagACGTAAACTG
9	81 bp	TGCTGCGCCTgtaagtgcac	9	1152 bp	taaattgcagAAATGCTGGT
10	579 bp	-	-	-	-

Die in den 'Southern Blot'-Analysen mit den drei Sonden festgestellte Übereinstimmung zwischen erwarteter und detektierter Bandenverteilung bestätigt die aus den einzelnen PCR-Fragmenten (Tab. 3.1) abgeleitete Struktur des *crp*-Gens (Abb. 3.1). Fasst man die Ergebnisse der PCR-Amplifizierung und der 'Southern Blot'-Analysen zusammen, so ergibt sich für das *crp*-Gen eine Gesamtgrösse von 12,0 kb bis 12,3 kb. Von seinem Umfang her liegt es damit in dem eingangs abgeschätzten Rahmen. Die zusammengesetzte Nukleinsäuresequenz

des *crp*-Gens ist im Anhang dargestellt. Dabei ist das Gen in die beiden Bereiche 5'- und 3'-seitig der 1,3 kb bis 1,6 kb grossen Sequenzlücke im Intron 6 aufgeteilt. Der zusammengesetzte 5'-Bereich weist ab Transkriptionsstart 6499 bp, der 3'-Bereich 4819 bp auf. Davon entfallen 710 bp auf den 3'-flankierenden Bereich des Gens.

Die Exon/Intron-Übergänge im *crp*-Gen entsprechen den Konsensus-Sequenzen, die für das Spleissen genutzt werden können [Breathnach und Chambon, 1981; Stephens und Schneider, 1992]. Dabei ist für die 5'-Spleißstelle die Konsensus-Sequenz AG/gtragt und für die 3'-Spleißstelle die Sequenz yag/GT (r = A oder G; y = T oder C) vorgegeben. Die unveränderlichen Basen sind jeweils unterstrichen. Sowohl die unveränderlichen Basen G und T der 5'-Spleißstelle als auch die Basen A und G der 3'-Spleißstelle finden sich in allen bekannten Intronsequenzen des *crp*-Gens (Tab 3.2).

### 3.1.2 Analyse der Exon- und Intron-Bereiche des *crp*-Gens

Hinsichtlich des Aufbaus des Genoms und der Organisation von Genen in *E. buchholzi* liegen bisher keine Informationen vor. Die Beschreibung des *crp*-Gens stellt somit die erste Charakterisierung eines Gens aus diesem Organismus dar. Im folgenden sollen die charakteristischen Eigenschaften der Exon- und Intron-Bereiche des *crp* herausgestellt werden.

**Tabelle 3.3 Darstellung der Exon/Intronübergänge im *crp*-Gen hinsichtlich der Exon- und Intronphasen.** Angegeben sind die 5'- und 3'-Bereiche der Exons mit den jeweils angrenzenden Intron-Bereichen. Die Sequenzangaben für die Exons sind in Grossbuchstaben mit deduzierter Aminosäure-Sequenz angegeben. Die Sequenzabfolge der jeweils ersten 10 bp der angrenzenden Intron-Bereiche sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Exon (3')	Intron	Exon (5')
[1] ATG GCA TCA C/ M A S	(1) gtaagtttct.....atgtatttag	[2] /AC GCT CAT GCT H A H A
[2] AGC TGT GGA G/ S C G	(2) gtaaatacca.....tgtaaacag	[3] /TG GCA GGC TGC V A G C
[3] AAG TGT GGA G/ K C G	(3) gtaatgttta.....gttgttcag	[4] /TT GAA GGA TGC V E G C
[4] AAG TGT GGA G/ K C G	(4) gtacaatttt.....tgtgatacag	[5] /TG GCA GGC TGC V A G C
[5] AAA TGT GGA G/ K C G	(5) gtgagtcaaa.....tttgtttcag	[6] /TT GAA GAT TGC V E D C
[6] AAG TGT GGA G/ K C G	(6) gtaggactct.....-----	[7] /TT GTT GGC TGC V V G C
[7] AAA TGT GGA A/ K C G	(7) gtaggtttct.....tgttgaacag	[8] /TG CAG GAC TGC M Q D C
[8] AAG TGC GAC A/ K C D	(8) gtaagtttat.....ctatctgtag	[9] /AC GTA AAC TGC N V N C
[9] TGC TGC GCC T/ K C D	(9) gtaagtgcac.....taaattgcag	[10] /AA ATG CTG GTC stop - - -

Die Zahl der Exons im *crp*-Gen liegt mit zehn deutlich über den Werten, die im Schnitt sowohl für Vertebraten- als auch für Invertebraten-Gene angegeben werden [Deutsch und Long, 1999]. Demnach besitzen die Gene in *Drosophila* 3,5 Exons. Die Gene in *C. elegans* dagegen sind aus durchschnittlich 5,2 Exons aufgebaut. Auch Gene im humanen Genom liegen ebenso wie die Gene der Maus mit durchschnittlich 5,0 bzw. 4,4 Exons in diesem Rahmen. Die Exons im *crp*-Gen gehören bis auf das erste Exon zu der Klasse der  $3N$  Exons, einer Klasse von Exons, die in Eukaryoten am häufigsten zu finden ist (Tab. 3.4) [Tomita *et al.*, 1996; Kriventseva und Gelfand, 1999]. In  $3N$  Exons ist die Zahl der enthaltenen Basenpaare unabhängig vom Leseraster durch drei teilbar. Das erste Exon des *crp*-Gens gehört mit seiner Grösse von 172 bp zur Klasse der  $3N+2$  Exons, die eine durch zwei teilbare Anzahl an Basenpaaren aufweisen. Eine weitere Einteilung von Exons ist hinsichtlich ihrer Kodon-Phasen an den Grenzen zu den Introns möglich. Sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende eines Typ 00 Exons weisen beispielsweise komplette, nicht unterbrochene Kodons auf. Typ 11 Exons beginnen dagegen mit den beiden letzten Basen eines Kodons und enden an ihrem 3'-Ende mit der ersten Base des folgenden Kodons. Entsprechend dieser Einteilung existieren insgesamt 9 verschiedene Exon-Typen von 00 bis 22 [Tomita *et al.*, 1996]. Die Exons 2 bis 9 der kodierenden Region des *crp* gehören dieser Nomenklatur nach zu den Exons vom Typ 11 (Tab. 3.3). Die 3'-Seite des ersten Exons als auch die 5'-Seite des letzten Exons sind ebenfalls vom Typ 1. Am häufigsten kommen sowohl bei den Invertebraten (27 %) als auch bei den Vertebraten (29 %) Exons vom Typ 00 vor. Typ 11 Exons wie im *crp* sind bei den bisher bekannten Genen anderer Invertebraten nur zu 11 % vertreten und liegen damit in der Häufigkeit an sechster Stelle aller neun Möglichkeiten. In Vertebraten treten die Typ 11 Exons dagegen am zweithäufigsten auf. Bei Säugern sind etwa ein Drittel der Exons vom Typ 11 und damit von allen Typen am häufigsten in den Genen vertreten [Tomita *et al.*, 1996].

	$3N$	$3N+1$	$3N+2$
Primaten	47 %	27 %	26 %
Nager	44 %	28 %	28 %
Säuger	56 %	25 %	19 %
<i>H. sapiens</i>	45 %	29 %	27 %
Vertebraten	46 %	27 %	27 %
Invertebraten	40 %	32 %	28 %
<i>Drosophila</i>	37 %	30 %	33 %
Pflanzen	44 %	26 %	30 %
<i>A. thaliana</i>	49 %	25 %	26 %

**Tabelle 3.4 Relative Häufigkeit der einzelnen Exonklassen in Eukaryoten.** Exons der Klasse  $3N$  weisen eine durch drei teilbare Länge auf. Klasse  $3N+1$  Exons besitzen durch eins teilbare Längen, Klasse  $3N+2$  Exons sind durch zwei teilbar [nach Tomita *et al.*, 1996, Kriventseva und Gelfand, 1999].

Aus der Zahl der Exons ergibt sich die im Vergleich zu anderen eukaryotischen Genen ebenfalls überdurchschnittliche Anzahl von Introns im *crp*-Gen. Während im *crp* 9 Introns zu finden sind, besitzen die Gene anderer Invertebraten wie *Drosophila* durchschnittlich 2,5 Introns. Gene aus *C. elegans* weisen einen Intron Gehalt von 4,2 auf. Die humanen Gene liegen mit 4 Introns ebenfalls in diesem Bereich (Tab. 3.5). Obwohl die Unterschiede hinsichtlich der absoluten Zahl der Introns zwischen Vertebraten und Invertebraten nicht sehr gross sind, so unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Länge sehr stark (Tab. 3.5). In humanen Genen kommen auf 1 kb kodierende Sequenz 6,8 kb Intronsequenz. Bei *Drosophila* und *C. elegans* ist mit Werten von 0,7 kb bzw. 1,0 kb Intron pro kb kodierende Sequenz das Verhältnis deutlich kleiner. Berücksichtigt man die Zahl der Introns, so besitzen die Gene in *Drosophila* verglichen mit

*C. elegans* weniger, dafür aber im Durchschnitt grössere Introns (Tab. 3.5). Das *crp*-Gen zeigt im Vergleich ein vor allem für Invertebraten-Gene untypisches Muster. Im *crp*-Gen kommen auf 753 bp kodierende Sequenz etwa 9,4 kb nichtkodierende Sequenz, die sich auf 8 Introns verteilt. Für das Verhältnis zwischen nichtkodierenden und kodierenden Bereichen ergibt sich im *crp*-Gen demnach ein Wert von etwa 12,5. Dieser Wert liegt deutlich über den Verhältnissen, die sich für Gene aus *C. elegans* (1) und *Drosophila* (0,7) aber auch für humane Gene (6,8) ergeben (Tab. 3.5). Die Durchschnittsgrösse der vollständig sequenzierten Introns des *crp* liegt bei 1060 bp und damit doppelt so hoch wie in den Genen von *Drosophila* (564 bp) oder *C. elegans* (467 bp) (Tab. 3.5). Das *crp*-Gen zeichnet sich demnach durch eine verhältnismässig grosse Anzahl relativ langer Introns aus. Dies steht im Gegensatz zu anderen Genen aus Invertebraten, die im Durchschnitt weniger und deutlich kleinere Introns aufweisen [Deutsch und Long, 1999]. Bei der Grössenverteilung der Introns innerhalb des *crp*-Gens ist keine Tendenz hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme zum 3'-Ende des Gens hin zu beobachten. Die Introns sind bezüglich ihrer Grösse ungleichmässig im Gen verteilt (Abb. 3.1; Tab. 3.2). Betrachtet man die Introns des *crp* in Bezug auf ihre Insertion zwischen die kodierenden Bereiche, so fällt auf, dass alle Introns nach der ersten Base eines Kodons eingefügt sind (Tab. 3.3). Sie gehören damit zu den Phase 1 Introns. Gemäss dieser Einteilung erfolgt die Insertion von Phase 0 Introns genau zwischen zwei Kodons des kodierenden Bereichs, während Phase 2 Introns nach der zweiten Base eines Kodons eingefügt sind. Phase 0 Introns sind der bei allen eukaryotischen Organismen am häufigsten zu findende Typ. Sowohl bei Vertebraten wie auch bei Invertebraten sind die im *crp* vorkommenden Phase 1 Introns durchschnittlich am zweithäufigsten vertreten [Tomita *et al.*, 1996, Kriventseva und Gelfand, 1999].

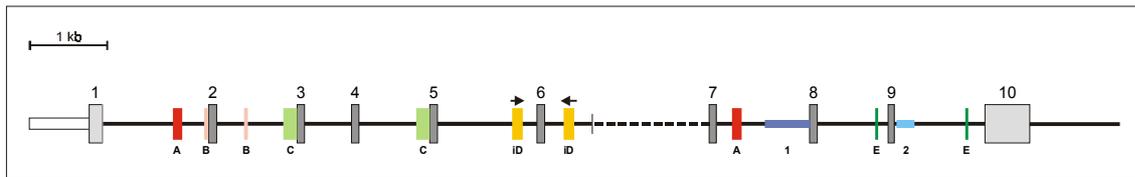
**Tabelle 3.5 Durchschnittliche Anzahl der Introns pro Gen und die Introngrössen pro kb kodierenden Sequenz in eukaryotischen Modellorganismen** [nach Deutsch und Long, 1999].

Spezies	Anzahl der Introns pro Gen	Durchschnittsgrösse der Introns	Gesamtgrösse der Introns pro kb kodierende Sequenz
Mensch	4,0	3413 bp	6,8 kb
Maus	3,1	1321 bp	3,3 kb
<i>Drosophila</i>	2,5	564 bp	0,7 kb
<i>C. elegans</i>	4,2	467 bp	1,0 kb
<i>S. pombe</i>	2,2	93 bp	0,3 kb
<i>crp</i>	9	1060 bp (ohne Intron 6)	9,4 kb pro 753 bp

Mit Hilfe des Programmes 'Blast 2 sequences' für den Abgleich zweier bekannter Nukleinsäuresequenzen [Tatusova und Madden, 1999] wurden die einzelnen Introns des *crp*-Gens gegen den zusammengesetzten Gesamtklon abgeglichen, um mögliche Sequenzwiederholungen in den Introns zu detektieren. Es konnten dabei insgesamt fünf repetitive Einheiten sowie zwei DNA-Abschnitte mit mehreren direkt aufeinanderfolgenden Repeats in den verschiedenen Introns identifiziert werden (Abb. 3.4 A). Es finden sich in allen Introns des *crp*-Gens verschiedene Sequenzwiederholungen, einzig in Intron 4 tritt kein repetitives Element auf. Mit 99 % homologer Basenpaare zeigt ein 121 bp langes Fragment aus den Introns 1 und 7 die grösste Übereinstimmung (Repeat A; Abb. 3.4 B). Mit einem Abstand von etwa 6,5 kb sind diese beiden Sequenzwiederholungen am weitesten voneinander entfernt. Die anderen repetitiven Einheiten sind entweder in benachbarten Introns zu finden (Repeat B, iD und E) oder wie im Fall von Repeat C lediglich durch ein weiteres Intron getrennt (Abb. 3.4 A). Repeat C ist mit

174 bp die längste repetitive Sequenzeinheit. Sie weist eine Identität von 85 % bei insgesamt vier deletierten Basenpaaren auf. Es fällt auf, dass die beiden Einheiten dieses Repeats nicht wie die übrigen mitten in den Introns positioniert sind, sondern beide Fragmente beinhalten die Sequenz für die 3'-Spleißstelle und reichen somit direkt an die nachfolgenden Exons 3 bzw. 5 heran. Neben den vier direkten Repeats findet sich auch eine invertierte Sequenzwiederholung (iD), welche flankierend um das sechste Exon in den Introns 5 und 6 positioniert ist. Dieses invertierte Repeat hat eine Länge von 140 bp und weist bei insgesamt drei Deletionen eine Identität von 85 % auf.

**A**



**B**

Repeat	Größe	Identität	Sequenzvergleich
A	121 bp	99 %	1042 ctgaatgatatgctgtaattgattaattcaagtgttatgtagcacgtgaagaggaaaac 289 ctgaatgatatgctgtaattgattaattcaagtgttatgtagcacgtgaagaggaaagac 1103 ggaagatagagatgaatggagacgttatataccatgatggacctgcctgtaggctgtgca 350 ggaagatagagatgaatggagacgttatataccatgatggacctgcctgtaggctgtgca
B	54 bp	81 %	1478 aaatattttgataaatgatattaactgaattggttccgatggtttatgtatttag 1999 aaatattttgataattgattaagctggattggttttggatattttatttatttag
C	174 bp	85 %	2501 aaaataatatcaatgacttcatgtaattaatattaatcatttacacctattgatcaa 4195 aaacataatattaataatttaattgtaatttatattaatcatttacacctattgatcaa 2561 agatatctgtaatttcttgaatttaatttatttaaatagttatat-tttttatactta 4255 agacatctgt-attttttttaatttaattgattt-agcacttctgatcattttatactta 2620 ttgaagaaagtcttttc-gacatctgtagtgtttatttaattttgttaaacag 4313 ttgaagaaaggctttttgacatctgtaatttgtttatttaattttgtgatagac
iD	140 bp	85 %	5399 aaaagctggtaaagctaagggtta--atatacagtttctcactcgaaagcgatgtcagtg 6196 aaaagctagtaaagctaattgtaaacagatcagtttctcactcgaaagcgaagtcagtg 5457 cggtcgagcccaggatttgaaccccgcacaatccgtc-cgcagtcgagtatcttactgac 6136 cgggtgagcccaggatttgaaccccgcacatactgatccgcagtggaatatcttaccgac 5516 ttcgctactggctccagcca 6076 atcgccaatggctccagcca
E	38 bp	89 %	2129 tcagaaagggcatttcggttggtgagcgcctaggctcca 3287 tcacaaagggcgttcggttggtgaacgactaggctcca

**Abbildung 3.4 Repetitive Elemente im *crp*-Gen.** [A] Schematische Darstellung des *crp*-Gens. Die Position der einzelnen Repeats ist in farbigen Boxen dargestellt. Zusammengehörige Elemente sind farblich gleich gestaltet. Die Pfeile über den Fragmenten iD deuten die invertierte Nukleinsäuresequenz an. Die länglichen Boxen in Intron 7 und 9 entsprechen Sequenzabschnitten mit direkt aufeinanderfolgenden repetitiven Einheiten (Abb. 3.5). [B] Sequenzvergleiche der repetitiven Elemente des *crp*-Gens. Jeweils identische Nukleinsäuren sind grau unterlegt. Die Bezeichnung der einzelnen Repeats entspricht der in [A] verwendeten Nomenklatur. Die angegebenen Positionen der einzelnen Fragmente beziehen sich auf ihre Lage im 5'- oder 3'-Abschnitt des Gens (siehe Anhang).

Neben den Repeats, die an verschiedenen Stellen des *crp*-Gens positioniert sind, finden sich in den Introns 7 und 9 Sequenzabschnitte mit direkt aufeinanderfolgenden repetitiven Einheiten (Abb. 3.5). In Intron 9 sind ab der Position 2415 (3'-Bereich des *crp*-Gens) im Anschluss an das Exon 9 insgesamt sieben je 33 bp umfassende, nahezu sequenzidentische Fragmente positioniert (Abb. 3.5 B). Eine Untersuchung dieser Fragmente mit Hilfe der 'motif library' (Bioinformatics Center, Kyoto University, Japan) basierend auf der Transfac Datenbank [Wingender *et al.*, 2000] ergab keine Sequenzauffälligkeiten für diesen Abschnitt. In dem bereits von Koewius [1998] beschriebenen repetitiven Fragment im Intron 7 (Abb. 3.5 A), welches in Position 739 im 3'-Bereich des Gens beginnt und insgesamt 552 bp bis in das Exon 8 umfasst, sind dagegen Kern-Konsensus-Sequenzen für 'metal responsive elements' (MRE: TGCRCNC) lokalisiert (Abb. 3.5 A) [Samson und Gedamu, 1998]. Enhancer-Elemente wie die MREs können eine verstärkende Wirkung hinsichtlich der Transkriptionsrate von Genen haben [Goodbourn, 1990]. Die verstärkende Wirkung solcher Sequenz-Motive, die unter anderem auch in Intron-Bereichen von Genen liegen können, ist dabei unabhängig von ihrer Orientierung und der Entfernung vom Promotor [Pirrota, 1990; Kamakaka, 1997]. Die Ergebnisse von Reporter-Gen-Assays mit dem repetitiven Sequenzabschnitt aus Intron 7 deuten auf seine Funktion als regulatorisches Sequenzmotiv hin, welches verstärkend auf die Aktivität des *crp*-Promotors wirkt [Koewius, 1998].



**Abbildung 3.5 Nukleinsäuresequenzen der direkt aufeinanderfolgenden repetitiven Abschnitte 1 und 2 im *crp*-Gen.** Die jeweils angegebenen Positionen in den einzelnen Fragmenten beziehen sich auf ihre Lage im 3'-Abschnitt des Gens (siehe Anhang). **[A]** Repetitive Einheit 1 im Intron 7 [nach Koewius, 1998]. Die identischen Nukleinsäuren der einzelnen Elemente sind grau unterlegt. Die Konsensus-Sequenz für die MREs ist unterstrichen. In der letzten repetitiven Einheit ist die Sequenz für Exon 8 in Grossbuchstaben angegeben. **[B]** Repetitive Einheit 2 im Intron 9. Die identischen Nukleinsäuren der jeweils 33 bp grossen Elemente sind grau unterlegt.

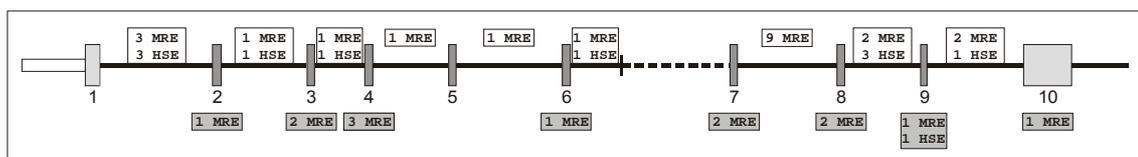
Mit Hilfe des Programms CENSOR wurde die Sequenz des *crp*-Gens durch Vergleich mit der Datenbank REPBASE nach konservierten repetitiven Elementen eukaryotischer Genome abgesucht [Jurka *et al.*, 1996]. Dabei konnten insgesamt fünf Fragmente identifiziert werden, welche ausschliesslich in den Intronbereichen des Gens zu finden sind. Im ersten Intron (Pos. 567 bis 862) findet sich ein Teil der Konsensus-Sequenz eines L2A-Elements, einem

nicht-LTR-Retrotransposon aus der LINE-Familie (long interspersed nucleotide element), welches besonders häufig in Säuger-Genomen zu finden ist [Smit und Riggs, 1995]. Bei einem Überlappungsbereich von 300 bp sind 62 % der Basenpaare identisch (Abb. 3.6). Im zweiten Intron (Pos. 1971 bis 2139) findet sich eine 66%ige Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz für ZAPHOD, einem autonomen DNA-Transposon aus Säugern. Zudem sind in Intron zwei noch Teile der Konsensus-Sequenzen für *Skipper*, einem LTR (long terminal repeat)-Retrotransposon aus dem Einzeller *Dictyostelium* (Pos. 2086 bis 2605, 67 % Identität) sowie für das humane DNA-Transposon MER3 (Pos. 2097 bis 2134, 89 % Identität) zu finden (Abb. 3.6) [Jurka, 1990; Leng *et al.*, 1998]. Die Sequenz des *Skipper*-Fragments im *crp*-Gen ist invertiert und wird von zwei Insertionen (120 bp und 109 bp) sowie einer Deletion (11 bp) unterbrochen. Die Konsensus-Sequenzen der drei repetitiven Elemente im Intron zwei überlappen sich in dem Bereich von Position 2086 bis 2139. Im 3'-Bereich des *crp*-Gens ist mit HMSBEAGLE aus *Drosophila* ein weiteres Fragment eines LTR-Retrotransposons aus einem Invertebraten-Genom lokalisiert [Snyder *et al.*, 1982]. Das Fragment findet sich im Intron acht (Pos. 1501 bis 1874) und weist eine 73%ige Übereinstimmung zur Konsensus-Sequenz auf. Auch dieses Element wird von einer Insertion (214 bp) unterbrochen (Abb. 3.6). Einige Transposon-Elemente sind Teil der direkten Repeats in den Intronbereichen des *crp*-Gens (Abb. 3.4). So überlappen im zweiten Intron das ZAPHOD-Element mit dem Repeat B ( Pos. 1999 bis 2053) und *Skipper* mit Teilen des Repeats C (Pos. 2527 bis 2605).

<b>L2A</b>	
<i>crp</i>	5' 567 cttgatctctcggccgctcttgataccattgatcacaatatctcttggaacgctcttctctctcgttcta
L2A	1950 cttgacctatcagcagcatcttgacacagttgatcactcccctcctctctgaaacacttctctc---acttg
<i>crp</i>	5' 637 gtgttctgttaattgttcttgattggttttctcctatctga-tggatcgttctt-ctagtgtgaaagtg
L2A	2017 gcttccaggacaccacactctcttggttttctcctacctcactggccgctccttctcagctc-cctttg
<i>crp</i>	5' 705 atggagtaacatctcttc-gccttctcacttaagatgggtgctcctcaaggctccgttcttggtcctatc
L2A	2086 ctgg-ttctcctcatctcccgcactctnaacgt-tggagtgccccagggctcagtccttggacctctt
<i>crp</i>	5' 774 ctctttaacctctatgcaaacac-ccctaagcactctaatctctctcattctcttgatcatgaactattt
L2A	2154 ctcttctctatctacac-tcaactccctgggtgatctcatccagctctatggctttaaataccatctatat
<i>crp</i>	5' 843 gctgatgacactcaaatgta
L2A	2223 gctgatgactcccaaattta
<b>Skipper</b>	
<i>crp</i>	5' 2086 atataaaaa---atttaatttaatttaatt--taatttaatt---taatttaaatcttctgtagtttg
<i>Skipper</i>	1114 atataaaaaatttataaataaatttaattttataaatttaattttataaatttaaat-tataaattt--
<i>crp</i>	5' 2148 tcttgatagtgcaagttactgctcagtgattctgaattcatttttgaagtaagcattatagtaggaat
<i>Skipper</i>	-----
<i>crp</i>	5' 2218 aaaatacatattattctgtaacttcacaagtgtaatgatttgcattttaattatgtagttt-gtttatat
<i>Skipper</i>	1047 -----aattatataaatttaatttaatt
<i>crp</i>	5' 2287 tcataagcagctcttttgttgatgctgtaagtcctaaagctatatgaat-ttaaaatagggttgcaatttt
<i>Skipper</i>	1025 tatttaatttaatttaatttaatttgaataatataaataagtaataatataatggtt--aactgt
<i>crp</i>	5' 2356 gattgcagatgttttactatttgaactttatataagaatttattatttttgttaaatattatatttttctg
<i>Skipper</i>	957 tattccactaatataatttttttgggtgctttatattatttaattgataataaatattat-----
<i>crp</i>	5' 2426 tttatgagattaatccatcagtttaactattgttaatttctcgcataatgatggacgtagttttcaatatac
<i>Skipper</i>	-----
<i>crp</i>	5' 2496 atattaaaaataatataatgacttcatgtaattaaatataaatcatttacacctatttgatcaagata
<i>Skipper</i>	895 -----cttaa-attatttttaattataacaatggcctc-aatata
<i>crp</i>	5' 2566 tctgtaatttctttga-aattta-----atttatttaaatagttat
<i>Skipper</i>	858 actgttattccactaataatttatattggtgctcttatttaact-gttat

ZAPHOD	
<i>crp</i>	5' 1971 aatgtca--tttatttatcaaatatacatcaaatattttgatatttgattaa-gctggattgtttttggg
ZAPHOD	761 aatttcagctttatttaaataaattttgatttaaaanttttatattt-attaattataaatttgattttgc
<i>crp</i>	5' 2038 attttatttatttagatgctcaagttcattaccttcctcagatgtagaataatataaaaatttaattta
ZAPHOD	830 cttttaatt-ttaata-gataaattttgaatatttt----aga-aaaaaaaaacatataaagtaaa--tatt
<i>crp</i>	5' 2108 ttaatttta-atttaatttaatttaaatctttg
ZAPHOD	891 taaattttacatttactttaattttacatttttg
MER3	
<i>crp</i>	5' 2097 ttttaatttaatttaatttttaatttaatttaatttaaat
MER3	132 ttttaattttatttttaatttttaatttaatttaatttaaat
HMSBEAGLE	
<i>crp</i>	3' 1501 tattattcgtagtagtagtattatctttattattattactattattatatcctccacttcctgtgacttt
HMSBEAGLE	797 tattattattatta-tattattat-tataatattattattattattatat-----
<i>crp</i>	3' 1571 gcgcgttgatgaatccactttactacaatcaccaaagcgcataaatttgctaaattggataaaaagcc
HMSBEAGLE	-----
<i>crp</i>	3' 1641 atgtatagaagtcactgaaatgctacagtaaaggctccaattacgagttgagtaataaaaatctttct
HMSBEAGLE	-----
<i>crp</i>	3' 1711 tgttttccttggtatagtatataccctctaatagcgtctatgaagctttagaatttttttaacat-tta
HMSBEAGLE	845 -----ttttattattattatta
<i>crp</i>	3' 1780 ttgcttaattatgtctaatattata-tagt-tttttatattacttattacta-agtaatacact-tatt
HMSBEAGLE	861 ttagtattattattattattattatattattattattattattatta-ttattattacattattattattatt
<i>crp</i>	3' 1846 gctattatttgattgtatcctggttgat
HMSBEAGLE	930 actattattattttattattattattgat

**Abbildung 3.6 Vergleich von Transposon-Fragmenten im *crp*-Gen mit den Konsensus-Sequenzen aus der REPBASE-Datenbank [Jurka *et al.*, 1996].** Mit Hilfe des Programmes Censor wurde die Sequenz des *crp*-Gens mit der Datenbank REPBASE verglichen. Die Reihenfolge der aufgeführten Fragmente entspricht der Reihenfolge ihres Auftretens im *crp*-Gen. Die vor den Positionen aufgeführten 5'- und 3'-Angaben beziehen sich auf die 5'- bzw. 3'-Sequenz des Gens (siehe Anhang): L2A (nicht-LTR Retrotransposon, 300 bp, 62 % Identität); *Skipper* (LTR-Retrotransposon, 302 bp, 67 % Identität); ZAPHOD (autonomes DNA-Transposon, 173 bp, 66 % Identität); MER3 (DNA-Transposon, 38 bp, 89 % Identität); HMSBEAGLE (LTR-Retrotransposon, 165 bp, 73 % Identität). Insertionen sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.



**Abbildung 3.7 Verteilung von potentiellen Enhancer-Elementen im *crp*-Gen.** Schematische Darstellung des *crp*-Gens mit potentiellen Enhancer-Elementen. Die Anzahl der jeweiligen Motive ist in den weissen Kästen über den Intron-Bereichen bzw. in den grau unterlegten Kästen unter den Exons aufgeführt. Die Motive wurden durch Abgleich der Sequenz des gesamten *crp*-Gens gegen die Transfac-Datenbank mit Hilfe des Programmes MatInspector V2.2 [Quandt *et al.*, 1995] detektiert.

Die Exon- und Intron-Bereiche des *crp*-Gens wurden mit Hilfe des auf der Datenbank Transfac basierenden Programmes MatInspector V2.2 [Quandt *et al.*, 1995] auf das Vorkommen von potentiellen Enhancer-Sequenzmotiven hin untersucht. Dabei findet sich zwar keine vergleichbare Anhäufung von MREs wie in Intron 7, es ist jedoch in jedem Intron mindestens eine MRE-Konsensus-Sequenz lokalisiert, wobei die Anhäufung von drei MREs in Intron 1 auf-

fällt. Bemerkenswert ist zudem die Tatsache, dass auch in den vergleichsweise kurzen Exon-Bereichen Konsensus-Sequenzen für MREs zu finden sind. In den Exons 3, 7 und 8 sind zwei, im Exon 4 sogar drei MREs lokalisiert. Während in den übrigen Exons jeweils ein MRE vorhanden ist, weisen die Exons 1 und 5 keine MREs auf (Abb. 3.7). Neben den MRE-Motiven sind vor allem in den Intron-Bereichen des *crp*-Gens Konsensus-Sequenzen für 'heat shock elements' (HSE) lokalisiert. Diese bestehen aus mindestens zwei aufeinanderfolgenden invertierten repetitiven Elementen der Sequenzabfolge NGAAN [Xiao *et al.*, 1991; Bonner *et al.*, 1994]. Im *crp*-Gen sind insgesamt 10 Konsensus-Sequenzen für HSE in sechs der neun Introns zu finden (Abb. 3.7). Auffällig ist dabei die Anhäufung der HSE in den Introns 1 und 8, in denen jeweils drei dieser Elemente lokalisiert sind. Die übrigen HSE verteilen sich auf die Introns 2, 3, 6 und 9. In dem beschriebenen Enhancer-Element des Introns 7 mit seinen neun MREs befinden sich keine HSE-Konsensus-Sequenzen.

### 3.1.3 Vergleich des *crp*-Gens mit Metallothionein-Genen aus Eukaryoten

Einleitend wurde bereits die strukturelle Ähnlichkeit des aus der cDNA deduzierten CRP-Proteins mit den metallbindenden Domänen von Metallothioneinen beschrieben. Im folgenden soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob auch hinsichtlich der genomischen Organisation Ähnlichkeiten zwischen dem *crp* und Genen für Metallothioneine aus anderen eukaryotischen Organismen bestehen. Bis auf das intronlose Metallothionein-Gen aus dem Einzeller *Tetrahymena pyriformis* sind alle bisher bekannten MT-Gene aus mindestens zwei Exons aufgebaut. Bei den Vertebraten weisen die Gene ausschliesslich eine 3 Exon/2 Intron-Struktur auf ['Intron Exon-Knowledge base' (IE-Kb; <http://intron.bic.nus.edu.sg/iekb>); Sakharkar *et al.*, 2000]. Bei den Invertebraten findet sich daneben beispielsweise bei *C. elegans* und *Drosophila* eine 2 Exon/1 Intron Struktur. Drei Gene der Metallothionein-Isoformen 2A, 2B und 2C aus *Lumbricus rubellus* besitzen mindestens vier Exon-Bereiche.

Der Vergleich des *crp*-Gens mit den eukaryotischen Metallothionein-Genen ergibt trotz der grundsätzlich unterschiedlichen Grössen der Gene und einer abweichenden Anzahl von Exons und Introns einige Gemeinsamkeiten. Bei den MT-Genen ist unabhängig von ihrer Struktur der gesamte 5'-nichtkodierende Bereich sowie ein vergleichsweise kleiner Teil des offenen Leserasters im ersten Exon enthalten. Die meisten Exons werden dann nach der ersten Base eines Kodons von dem ersten Intron unterbrochen (Typ 1). Diese für MT-Gene typische Aufteilung ist auch beim ersten Exon des *crp*-Gens zu beobachten, dessen 3'-Ende ebenfalls vom Typ 1 ist (Kap. 3.1.1). Die mittleren Exons des *crp* sind in Übereinstimmung mit den vergleichbaren Exons der MT-Gene aus Vertebraten und Invertebraten Klasse 3N, Typ 11 Exons. Die Übereinstimmung im Exontyp ist auch für das 5'-Ende der jeweils letzten Exons zu beobachten (Typ 1). In den MT-Genen mit einer 3 Exon/2 Intron-Struktur sind die mittleren Exons, welche ausschliesslich Sequenzen für den kodierenden Bereich enthalten, kleiner als die vergleichbaren Exons des *crp*-Gens (93 bp; Kap. 3.1.1). Ausnahmen mit grösseren Exons finden sich in dem betreffenden Bereich lediglich bei einigen Genen aus Invertebraten [Khoo und Patel, 1999; IE-Kb]. Im Unterschied zum *crp*-Gen, bei dem der gesamte 3'-nichtkodierende Bereich ohne kodierenden Anteil im zehnten und letzten Exon zu finden ist, enthalten die letzten Exons der MT-Gene neben dem 3'-nichtkodierenden Bereich zumeist noch einen Grossteil der kodierenden Region. Bei MT-Genen aus Vertebraten ist beispielsweise die Sequenz für die gesamte  $\alpha$ -Domäne des Proteins ab der Hinge-Region im letzten Exon zu finden. Eine solche direkte

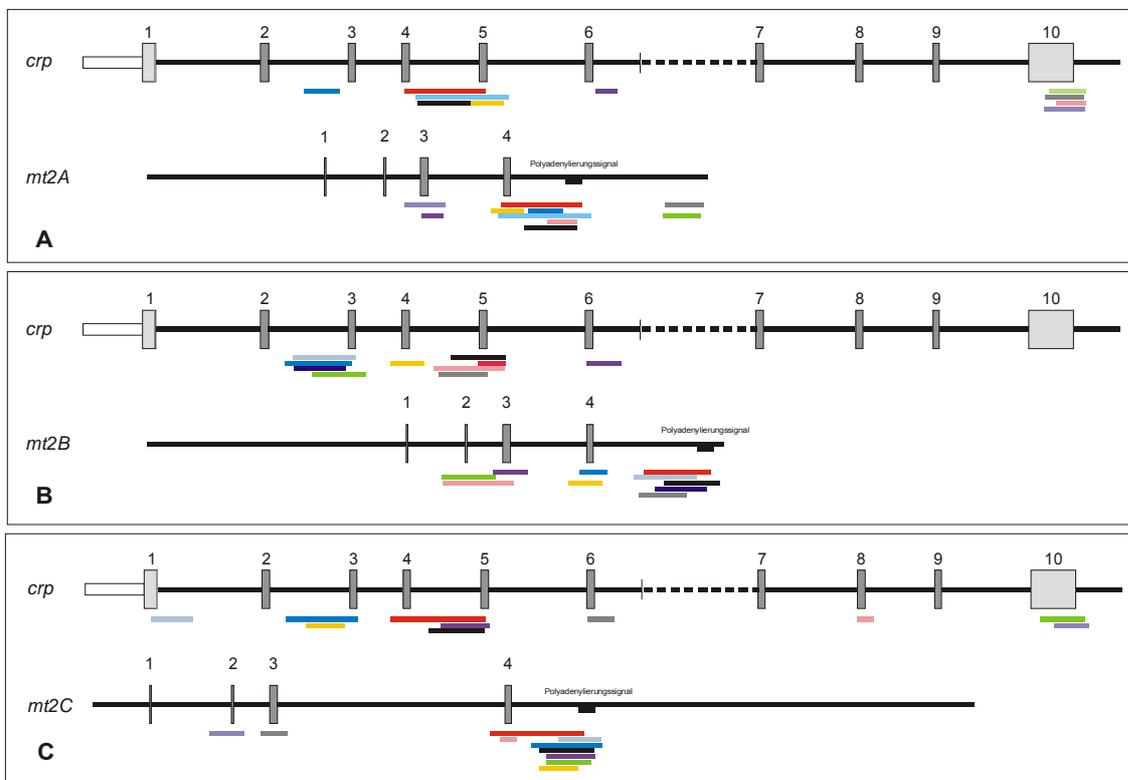
Übereinstimmung zwischen der Exonaufteilung innerhalb des Gens und dem strukturellen Aufbau des zugehörigen Proteinproduktes ist beim *crp*-Gen nicht zu beobachten (Kap. 3.1.1). Betrachtet man die Introns der Metallothionein-Gene (Tab. 3.6), so stellt man unabhängig von der Exon/Intron-Struktur bei Vertebraten und Invertebraten eine starke Konservierung der Introns hinsichtlich ihrer Phasen fest. Sie weisen überwiegend eine Phase 1 Struktur auf. Demgegenüber stehen die MT-Gene aus Pflanzen, bei denen fast ausschliesslich Phase 2 Introns zu beobachten sind. Alle Introns im *crp*-Gen sind in Übereinstimmung mit denen der Vertebraten und Invertebraten Phase 1 Introns (Tab. 3.3; Tab. 3.6). Die Introns im *crp* sind jedoch zwei bis dreimal so gross wie die durchschnittlichen Introns der meisten ausgewerteten MT-Gene (Tab. 3.6) [IE-Kb, Sakharkar *et al.*, 2000].

**Tabelle 3.6 Vergleich von Metallothionein-Genen aus verschiedenen taxonomischen Gruppen.** Die Daten wurden der 'Intron Exon-Knowledge base' (IE-Kb; <http://intron.bic.nus.edu.sg/iekb>) [Sakharkar *et al.*, 2000] entnommen. Die Sequenzen für die MT-Gene aus *L. rubellus* wurden der EMBL-Datenbank (AJ299434; AJ299435; AJ299436) entnommen. Bei der Berechnung der Werte für das *crp* blieb das nicht vollständig charakterisierte Intron 6 (Abb. 3.3) unberücksichtigt.

MT aus	Anzahl der Gene	Zahl der Introns	Ø Grösse der Introns	Min. Grösse der Introns	Max. Grösse der Introns	Verteilung der Intronphasen
Vertebrata (ohne Mammalia)	5	10	384 bp	81 bp	1387 bp	Phase 0: 0 % Phase 1: 100 % Phase 2: 0 %
Mammalia	26	52	519 bp	129 bp	2563 bp	Phase 0: 2, % Phase 1: 96 % Phase 2: 2 %
Pflanzen	13	18	225 bp	75 bp	634 bp	Phase 0: 0 % Phase 1: 6 % Phase 2: 94 %
Invertebrata	14	19	468 bp	57 bp	1291 bp	Phase 0: 5 % Phase 1: 90 % Phase 2: 5 %
<i>L. rubellus</i>	3	9	985 bp	450 bp	2953 bp	Phase 0: 0 % Phase 1: 100 % Phase 2: 0 %
<i>crp</i>	1	8	1060 bp	598 bp	1359 bp	Phase 0: 0 % Phase 1: 100 % Phase 2: 0 %

Metallothioneine aus den *E. buchholzi* phylogenetisch nahestehenden Organismen wie den Oligochaeten *Lumbricus* oder *Eisenia* sind zwar beschrieben, zugehörige Gene wurden bisher jedoch nicht strukturell analysiert [Stürzenbaum *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2000]. In den EMBL-Datenbanken ist die genomische Sequenz für drei Gene der Metallothionein-Isoformen 2A, 2B und 2C aus *Lumbricus rubellus* veröffentlicht (*mt2A* - AJ299434; *mt2B* - AJ299435; *mt2C* - AJ299436). Diese Gene, welche für Metallothionein-Proteine mit je 78 Aminosäuren kodieren, bestehen aus mindestens vier Exons mit kodierenden Sequenzen sowie drei Introns. Da keine Informationen hinsichtlich der 5'- und 3'-nichtkodierenden Bereiche sowie deren Exon-Verteilung vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Genen noch weitere

Exons enthalten sind. Die kodierenden Bereiche sind in allen drei Genen im gleichen Muster auf die Exons verteilt. Die ersten beiden Exons haben mit 22 bzw. 27 bp einen recht kleinen Anteil an der kodierenden Sequenz. Das dritte Exon, welches ausschliesslich Informationen aus dem kodierenden Bereich enthält, ist mit 99 bp in dieser Hinsicht das grösste Exon. Im vierten Exon sind 86 bp aus der kodierenden Region enthalten. Die mittleren Exons 2 und 3 sind in Übereinstimmung mit den mittleren Exons des *crp*-Gens jeweils Klasse 3N Exons vom Typ 11. Die Intron-Bereiche der MT-Gene sind weniger konserviert. Ihre Grösse schwankt zwischen 450 bp und 2953 bp. Alle drei Gene weisen trotz der unterschiedlichen Introngrössen ein gleiches Verteilungsmuster auf. So sind die grössten der drei Introns jeweils zwischen den Exons 3 und 4 positioniert. Die mittleren Introns zwischen Exon 2 und 3 sind in allen drei Genen am kleinsten. In Übereinstimmung mit den Metallothionein-Genen aus anderen Vertebraten und dem *crp*-Gen gehören die Introns zu den Phase 1 Introns (Tab. 3.6). Eine schematische Darstellung der drei Metallothionein-Gene aus *L. rubellus* ist Abbildung 3.8 zu entnehmen.



**Abbildung 3.8 Vergleich des *crp*-Gens mit den Genen für die Metallothioneine 2A, 2B und 2C aus *Lumbricus rubellus*.** Die Sequenzen der MT-Gene wurden mit Hilfe des Programmes LALIGN [Huang und Miller, 1991] gegen das *crp*-Gen abgeglichen. Dargestellt sind jeweils zehn Bereiche mit den höchsten Übereinstimmungen (50 bis 60 %). Die farbigen Balken kennzeichnen die einander entsprechenden Bereiche in den jeweils abgeglichenen Genen. Die Länge der Balken ist dabei proportional zum Überlappungsbereich. **[A]** Abgleich des *crp*-Gens mit dem *mt2A*-Gen. **[B]** Abgleich des *crp*-Gens mit dem *mt2B*-Gen. **[C]** Abgleich des *crp*-Gens mit dem *mt2C*-Gen.

Mit Hilfe des Programmes LALIGN [Huang und Miller, 1991] wurde die bekannte Sequenz des *crp*-Gens mit den Sequenzinformationen der einzelnen MT-Gene aus *Lumbricus* verglichen. Dabei zeigt sich, dass in bis zu 1,2 kb langen Abschnitten der Gene Sequenzübereinstimmungen zwischen 50 % und 60 % bestehen. Die Übereinstimmungen betreffen dabei sowohl die Exon- als auch die Intron-Bereiche. Im Hinblick auf das Verteilungsmuster ergeben

sich bei den Abgleichen mit den einzelnen Metallothionein-Genen Unterschiede. Beim Vergleich des *mt2A* mit dem *crp* finden sich Sequenzabschnitte aus dem Bereich des vierten Exons mit angrenzendem 3'-Bereich des MT-Gens vor allem in der Umgebung des vierten und fünften Exons des *crp*-Gens wieder. Übereinstimmungen bestehen auch mit dem 3'-nichtkodierenden Bereich im Exon 10 des *crp* (Abb. 3.8 A). Der Vergleich mit dem *mt2B* ergibt vor allem Übereinstimmungen für Gen-Abschnitte im Bereich des dritten, vierten und fünften Exons des *crp*. Die korrespondierenden Sequenzabschnitte sind dabei im Bereich der Exons 2, 3 und 4 sowie im 3'-angrenzenden Bereich des *mt2B*-Gens zu finden (Abb. 3.8 B). Eine ähnliche Verteilung ist auch beim Abgleich des *crp* mit dem *mt2C* zu beobachten. Die Homologien zum *crp* sind im *mt2C*-Gen jedoch hauptsächlich auf den Bereich des vierten Exons und den 3'-angrenzenden Bereich beschränkt (Abb. 3.8 C).

**Tabelle 3.7 Vergleich der Exons 3 und 4 der Metallothionein-Gene *mt2A*, *mt2B* und *mt2C* aus *L. rubellus* mit den kodierenden Exons des *crp*-Gens.** Die Sequenzen der jeweiligen Exons der MT-Gene wurden mit Hilfe des Programms LALIGN [Huang und Miller, 1991] gegen die CRP-cDNA abgeglichen. Angegeben sind die ermittelten Identitäten zwischen den einzelnen Bereichen sowie die Grösse des Überlappungsbereiches. Die drei besten Ergebnisse der jeweiligen Abgleiche sind grau unterlegt.

	<i>crp</i> Exon 2	<i>crp</i> Exon 3	<i>crp</i> Exon 4	<i>crp</i> Exon 5	<i>crp</i> Exon 6	<i>crp</i> Exon 7	<i>crp</i> Exon 8	<i>crp</i> Exon 9
<i>mt2A</i> Exon 3	59,7 % (72 bp)	54,5 % (77 bp)	63,0 % (92 bp)	59,8 % (92 bp)	71,4 % (63 bp)	56,2 % (80 bp)	57,0 % (79 bp)	61,0 % (77 bp)
<i>mt2A</i> Exon 4	60,7 % (61 bp)	55,4 % (74 bp)	62,3 % (77 bp)	63,9 % (83 bp)	53,9 % (76 bp)	62,7 % (75 bp)	61,7 % (81 bp)	-
<i>mt2B</i> Exon 3	59,7 % (72 bp)	-	62,0 % (92 bp)	59,6 % (93 bp)	69,8 % (63 bp)	60,5 % (81 bp)	57,7 % (78 bp)	60,0 % (75 bp)
<i>mt2B</i> Exon 4	59,0 % (61 bp)	55,4 % (74 bp)	62,3 % (77 bp)	66,3 % (83 bp)	56,6 % (76 bp)	60,0 % (75 bp)	61,7 % (81 bp)	-
<i>mt2C</i> Exon 3	58,5 % (94 bp)	54,5 % (77 bp)	62,3 % (89 bp)	62,3 % (77 bp)	68,6 % (70 bp)	57,5 % (80 bp)	54,8 % (62 bp)	61,9 % (63 bp)
<i>mt2C</i> Exon 4	62,3 % (61 bp)	57,7 % (78 bp)	62,8 % (78 bp)	65,1 % (83 bp)	56,4 % (78 bp)	59,5 % (79 bp)	63,0 % (81 bp)	60,9 % (81 bp)

Die Exons 3 und 4 der Metallothionein-Gene aus *L. rubellus* weisen nicht nur strukturelle Ähnlichkeiten zu den *crp*-Exons auf, mit 99 und 86 bp liegen sie auch hinsichtlich ihrer Grösse im Bereich der Exons für die kodierende Region im *crp*-Gen (93 bzw. 81 bp). Vor dem Hintergrund der vorhandenen Sequenzhomologien zwischen den Genen wurden mögliche Zusammenhänge zwischen den Exons der MT-Gene und der Exon-Verteilung im *crp* untersucht. Dabei ergibt sich ein auffälliges Muster. Die jeweils höchsten Übereinstimmungen werden sowohl beim Abgleich mit den dritten als auch den vierten Exons der jeweiligen MT-Gene in Bereichen der cDNA beobachtet, die sich mit dem Exon-Muster im *crp*-Gen decken. Die ermittelten Identitäten liegen für die einzelnen Abschnitte zwischen 55 % und 70 %. Die grössten Ähnlichkeiten mit den jeweils längsten überlappenden Bereichen bestehen dabei durchgehend zu Abschnitten der CRP-cDNA, die den Exons 4 und 5 des Gens entsprechen (Tab. 3.7). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Abgleiche zwischen den Genen, bei denen vor allem mit Sequenzabschnitten aus den *mt2A*- und *mt2C*-Genen Übereinstimmungen zu den entsprechenden Genabschnitten im *crp* festgestellt wurden (Abb. 3.8). Noch deutlicher wird die Ähnlichkeit der Exons des *crp*-Gens und der MT-Gene aus *L. rubellus*, wenn man die Exons gemäss dem Leseraster der Proteine translatiert und anschliessend mit dem Programm

ClustalW [Thompson *et al.*, 1994] gegeneinander abgleicht (Abb. 3.9). Auf Aminosäure-Ebene sind so Homologien bis zu 53 % und Ähnlichkeiten bis zu 77 % für die translatierten Exons des *crp*-Gens und die Exons der MT-Gene zu beobachten. Dabei ergeben die Abgleiche mit den vierten Exons der MT-Gene durchschnittlich höhere Werte als die Abgleiche mit den dritten Exons, bei denen zudem auch eine Insertion innerhalb des Translationsmusters der *crp*-Exons zu beobachten ist (Abb. 3.9). Bis auf zwei Ausnahmen im Exon 2 des *crp*-Gens sind alle neun Cysteinreste der übrigen Exons im Vergleich zu den dritten Exons der MT-Gene konserviert. Gleiches gilt für den Abgleich mit den jeweils vierten Exons der MT-Gene. Dort sind alle acht vorkommenden Cysteinreste konserviert (Abb. 3.9).

	Abgleich mit translatiertem Exon 3	Abgleich mit translatiertem Exon 4
<i>mt2A</i>	--EGSACAC--SKCRCPKDDCAPNCKKLCADAQCG	----AGSCGAACKCAAGSCASGCKKGCCGD----
<i>mt2B</i>	--EGSACAC--SKCRCPKDDCAPNCKKLCADAQCG	----AGSCGAACKCAAGSCASGCKKGCCGD----
<i>mt2C</i>	--EGSTCAC--SKCRCPKDDCLPNCKKLCADAQCG	----AGSCGAACKCAAGSCASGCKKGCCAD----
<i>crp</i> Exon 2	AHAEAHCGCGTECHCPKGS CGSGCGTSTTA--GSCG	AHAEAHCGCGTECHCPKGS CGSGCGTSTTAGSCG
<i>crp</i> Exon 3	----AGCPCGSHCKCEKGECKRRGCSKGCCT--PKCG	----AGCPCGSHCKCEKGECKRRGCSKGCCTPKCG
<i>crp</i> Exon 4	----EGCPCGSOQCKCEKGECKKGCKEGCCA--PKCG	----EGCPCGSOQCKCEKGECKKGCKEGCCAPKCG
<i>crp</i> Exon 5	----AGCSGSGCKCEKGECKEPGCTKRCCG--TKCG	----AGCSGSGCKCEKGECKEPGCTKRCCGTKCG
<i>crp</i> Exon 6	----EDCPCGSPCKCEKGDCKVNCSKGCCT--PKCG	----EDCPCGSPCKCEKGDCKVNCSKGCCTPKCG
<i>crp</i> Exon 7	----VGCPCGSOQCTCEKGSCKKGCCKGCCT--PKCG	----VGCPCGSOQCTCEKGSCKKGCCKGCCTPKCG
<i>crp</i> Exon 8	----QDCPCGSHCKCEKGSCEKGCCTQGCCA--PKCD	----QDCPCGSHCKCEKGSCEKGCCTQGCCAPKCD
<i>crp</i> Exon 9	----VNCKCGSSRCCEKGTCTPSCAQTCCA-----	----VNCKCGSSRCCEKGTCTPSCAQTCCA-----
	* * . * * * . * . *	* * * . * * * * . *

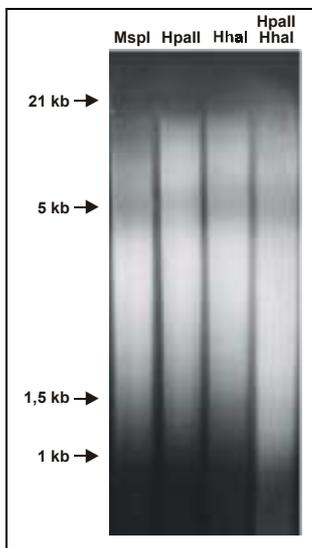
**Abbildung 3.9** Abgleich der translatierten Exons 3 und 4 der Metallothionein-Gene aus *Lumbricus rubellus* mit den translatierten Exons des *crp*-Gens. Die Exons wurden gemäss dem offenen Leseraster der Proteine translatiert und mit dem Programm ClustalW [Thompson *et al.*, 1994] gegeneinander abgeglichen. Homologe Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet und dunkelgrau unterlegt. Verwandte Aminosäuren sind mit einem Punkt gekennzeichnet und hellgrau unterlegt.

### 3.1.4 DNA-Methylierung im Bereich des *crp*-Gens

Fast alle Methylgruppen, die an eukaryotische DNA angefügt werden, finden sich in der Position 5 der Cytosinreste (5-Methylcytosin, 5<sup>m</sup>C) des Dinukleotids 5'-CG-3' (CpG) [Wolffe und Matzke, 1999]. Durch Restriktionsanalysen sollte das Methylierungsmuster des Genoms von *E. buchholzi* bestimmt werden. Die dazu eingesetzten Isoschizomere MspI und HpaII schneiden jeweils an der Erkennungssequenz CCGG mit dem Unterschied, dass MspI die Zielsequenz ungeachtet des jeweiligen Methylierungszustandes am zweiten Cytosin schneidet, während HpaII nur die unmethylierte Zielsequenz restringiert. Für beide Enzyme ergibt sich so trotz identischer Erkennungssequenzen je nach Methylierungsgrad der DNA ein unterschiedliches Fragmentmuster [Cedar *et al.*, 1979]. HhaI besitzt die Erkennungssequenz GCGC und ist ebenso wie HpaII ein methylierungssensitives Restriktionsenzym.

Je 5 µg genomischer DNA der Enchytraeen wurden mit MspI, HpaII, HhaI sowie doppelt mit HpaII und HhaI verdaut. Die Restriktionsansätze wurden nach dem Verdau über ein Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Spuren aller vier Restriktionsansätze weisen eine Fragmentverteilung zwischen 1 kb und 20 kb auf, wobei die meisten DNA-Fragmente in einem Grössenbereich von 1,5 kb bis 4 kb zu finden sind. Innerhalb dieser Verteilung sind jedoch leichte Unterschiede zwischen den Spuren zu beobachten. So zeigen die Ansätze mit HpaII und HhaI im Vergleich zu MspI in einem Bereich zwischen 5 kb und etwa 20 kb eine etwas intensivere Färbung unter UV-Licht als der vergleichbare Bereich bei MspI. Dies deutet auf eine grössere Anzahl von Fragmenten in diesem Bereich hin. Es müssen demnach

methylierte CpG-Dinukleotide in den CCGG bzw. GCGC Erkennungssequenzen vorliegen, die dazu führen, dass beim Einsatz der methylierungssensitiven Restriktionsenzyme im Vergleich zum MspI grössere Fragmente entstehen. Beim Doppelverdau mit HpaII und HhaI ist in Übereinstimmung mit dem ermittelten Muster für die einzelnen Enzyme im Vergleich zu MspI ebenfalls eine Anhäufung von Fragmenten im Grössenbereich von 5 kb bis 20 kb zu beobachten. Die restlichen DNA-Fragmente des Doppelverdaus sind jedoch wie erwartet etwas kleiner als in den Vergleichspuren und zeigen eine Häufigkeitsverteilung zwischen 1 kb und 3,5 kb (Abb. 3.10). Die Ergebnisse der Restriktionsanalysen zeigen, dass das Genom von *E. buchholzi* teilweise methyliert ist. Die beim Einsatz der methylierungssensitiven Restriktionsenzyme beobachtete relativ schwache Verschiebung der Restriktionsmuster zu grösseren Fragmenten lässt einen Anteil methylierter Cytosine in CpG-Dinukleotiden von deutlich unter 50 % vermuten. Das Genom von *E. buchholzi* ist damit hinsichtlich seines Methylierungsmusters in die Gruppe der Klasse B Genome einzuordnen [Tweedie *et al.*, 1997].



**Abbildung 3.10** Fragmentverteilung genomischer DNA von *Enchytraeus buchholzi* nach Verdau mit den Restriktionsenzymen MspI, HpaII und HhaI. Je 5 µg genomischer DNA aus *E. buchholzi* wurden mit den Restriktionsenzymen MspI, HpaII, HhaI sowie HpaII/HhaI restringiert, über ein 0,8%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (0,5 µg/µl). Als Längenstandard diente EcoRI/HindIII doppelt restringierte λ-DNA.

Die methylierten CpG-Dinukleotide sind in den Genomen der Eukaryoten nicht gleichmässig verteilt. In den Klasse C Genomen der Vertebraten liegt eine ungleichmässig verteilte Methylierung vor. Während in weiten Teilen des Genoms die CpG-Dinukleotide deutlich unterrepräsentiert sind, existieren Abschnitte von durchschnittlich einigen hundert Basenpaaren, in denen die CpG-Dinukleotide bis zu zehnmal häufiger vorkommen als in den übrigen Teilen des Genoms. Diese CpG-Inseln sind grösstenteils nicht methyliert und vor allem in den 5'-flankierenden Bereichen von konstitutiv exprimierten Genen zu finden [Aissani und Bernardi, 1991a, b]. Bei den nur teilweise methylierten Genomen von Invertebraten ergibt sich ein Muster, bei dem sich kürzere, stark methylierte Bereiche mit langen Domänen unmethylierter DNA abwechseln [Tweedie *et al.*, 1997]. Untersucht man das *crp*-Gen hinsichtlich der vorhandenen CpG-Dinukleotide, so stellt man eine ungleichmässige Verteilung fest (Tab. 3.8). Mit Ausnahme des Exon sechs finden sich in allen Exonbereichen des Gens CpG-Dinukleotide in zum Teil sehr hohen Dichten. Den höchsten Gehalt weisen dabei die benachbarten Exons 8 und 9 mit 6,5 bzw. 7,4 CpG pro 100 bp auf. In Exon 1 ist dagegen nur eine CpG-Dublette zu finden, was einer relativen Dichte von 1,3 CpG pro 100 bp entspricht. In den meisten Introns treten trotz eines niedrigen GC-Gehaltes vergleichsweise häufig CpG-Dinukleotide auf. Ausnahmen bilden

dabei die direkt aufeinander folgenden Introns 2, 3 und 4, die mit 8, 4 und 2 CpG nur wenige Dubletten enthalten. Die Abschnitte der Introns zwei und vier weisen dabei mit 26 bzw. 24 % den niedrigsten GC-Gehalt im *crp*-Gen auf. Die meisten CpG-Dinukleotide sind in den Introns 1 (26 CpG; 3,8 CpG pro 100 bp), 5 (32 CpG; 4,9 CpG pro 100 bp), 8 (21 CpG; 4,6 CpG pro 100 bp) und 9 (27 CpG; 4,7 CpG pro 100 bp) enthalten. Im 5'-flankierenden Promotor-Bereich des Gens finden sich in 770 Basenpaaren bei einem GC-Gehalt von 34 % 17 CpG-Dinukleotide, was einer Dichte von 4,4 CpG pro 100 bp entspricht. Bei Betrachtung der Verteilung der CpG-Dinukleotide im *crp*-Gen fällt auf, dass am Anfang und am Ende des Gens sowohl in den Exons als auch in den Intron-Bereichen vergleichsweise hohe CpG-Dichten zu finden sind, während im mittleren Abschnitt des Gens von Intron 2 bis Intron 7 mit Ausnahme von Intron 5 die CpG-Dichte sehr niedrig ist (Tab. 3.8).

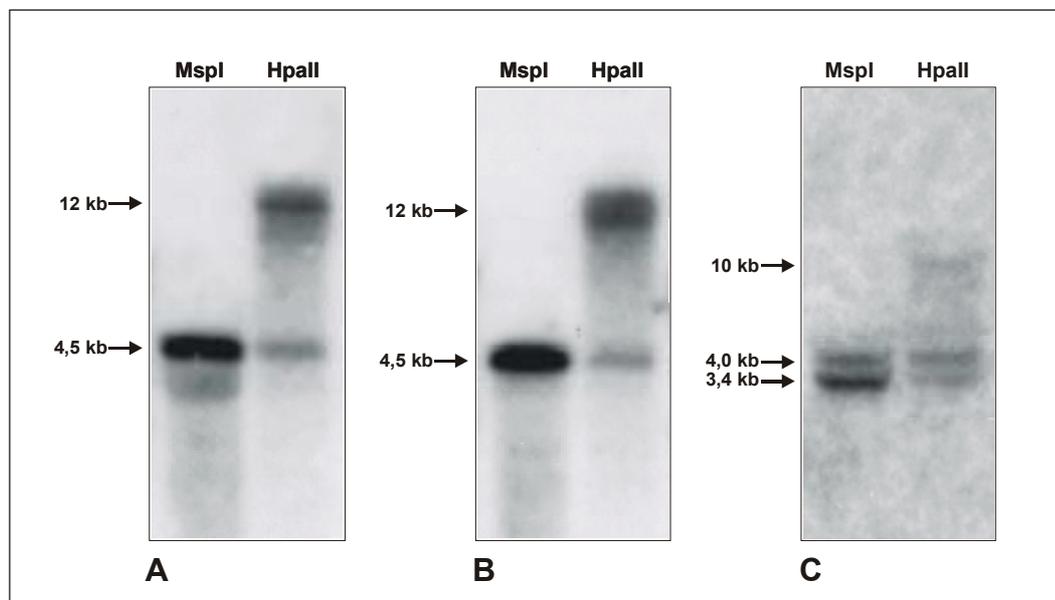
**Tabelle 3.8 Verteilung von CpG-Dinukleotiden im *crp*-Gen.** Aufgeführt sind neben der Gesamtzahl der CpG-Dinukleotide in den einzelnen Exon- und Intronbereichen sowie im Promotor die Grösse, der GC-Gehalt der jeweiligen Abschnitte und die relative CpG-Dichte bezogen auf jeweils 100 bp. Die für das nicht vollständig bekannte Intron 6 angegebenen Werte beziehen sich auf ein 628 bp-Fragment aus dem 5'-Bereich des Introns (Kap. 3.1.1) und sind in Klammern angegeben. In der letzten Spalte sind die Werte für den 3'-flankierenden Bereich des Gens angegeben.

	<i>crp</i> -Prom	Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Exon 3	Intron 3	Exon 4	Intron 4	Exon 5	Intron 5
Grösse	770 bp	151bp	1359 bp	105 bp	1036 bp	93 bp	598 bp	93 bp	910 bp	93 bp	1319 bp
GC	34 %	30 %	35 %	59 %	26 %	53 %	33 %	55 %	24 %	52 %	36 %
CpG	17	1	26	3	8	1	4	1	2	1	32
<b>Dichte</b>	<b>4,4</b>	<b>1,3</b>	<b>3,8</b>	<b>5,7</b>	<b>1,5</b>	<b>2,2</b>	<b>1,4</b>	<b>2,2</b>	<b>0,4</b>	<b>2,2</b>	<b>4,9</b>

	Exon 6	Intron 6	Exon 7	Intron 7	Exon 8	Intron 8	Exon 9	Intron 9	Exon 10	3' flank.
Grösse	93 bp	(628 bp)	93 bp	1197 bp	93 bp	908 bp	81 bp	1161 bp	579 bp	710 bp
GC	47 %	(32 %)	52 %	38 %	54 %	32 %	53 %	31 %	27 %	29 %
CpG	-	(13)	1	16	3	21	3	27	13	12
<b>Dichte</b>	-	<b>(4,1)</b>	<b>2,2</b>	<b>2,7</b>	<b>6,5</b>	<b>4,6</b>	<b>7,4</b>	<b>4,7</b>	<b>4,5</b>	<b>3,4</b>

Der Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide des *crp*-Gens und seiner flankierenden Abschnitte wurde durch 'Southern Blot'-Analysen mit MspI und HpaII restringierter genomischer DNA untersucht. Es wurden je 10 µg entsprechend verdauter DNA über Agarosegele aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte zum einen mit einer Sonde, die den gesamten Promotor-Bereich [Koewius, 1998] des Gens enthält, um so mögliche Methylierungen im 5'-flankierenden Bereich des Gens zu erfassen. Zur Detektion von C<sup>m</sup>CGG Sequenzen im *crp*-Gen wurde die gesamte CRP-cDNA als Sonde eingesetzt. Die Hybridisierung gegen die Promotor-Sonde ergibt bei MspI-verdauter DNA ein starkes Signal auf einer Höhe von 4,5 kb (Abb. 3.11 A). Die erste MspI-Schnittstelle nach dem Transkriptionsstart liegt im *crp*-Gen bei 1,4 kb. Die nächste MspI-Erkennungssequenz im 5'-flankierenden Bereich des Gens muss demnach etwa 3 kb strangaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen. Die mit HpaII verdaute DNA zeigt dagegen ein anderes Hybridisierungsmuster. Zwar ist dort ebenfalls eine Bande bei 4,5 kb erkennbar, diese ist jedoch deutlich schwächer als die vergleichbare MspI-Bande. Als zusätzliches Signal tritt ein Fragment mit einer Grösse von etwa 12 kb auf (Abb. 3.11 A). Die beobachtete Bandenverschiebung bei MspI

und HpaII verdauter DNA weist auf eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden in dem betreffenden Bereich des *crp*-Gens und der 5'-angrenzenden Region hin. Auffällig ist ein ebenfalls bei HpaII verdauter DNA auftretendes schwaches Signal bei 4,5 kb. Demnach müssen in dem untersuchten Bereich des Genoms unterschiedliche Methylierungszustände der DNA existieren. Bei der Hybridisierung der Restriktionsansätze mit der cDNA-Sonde tritt ein ähnliches Bandenmuster auf. Bei MspI werden zwei Banden auf einer Höhe von 3,4 kb und 4 kb detektiert (Abb. 3.11 C). Dieses Bandenmuster deckt sich mit der Fragmentverteilung, die aufgrund der bekannten Erkennungssequenzen für MspI unter Berücksichtigung der ermittelten Grösse für Intron 6 erwartet wurde (Kap. 3.1.1). Auch bei HpaII verdauter DNA erscheinen schwache Signale auf der Höhe von 3,4 kb und 4 kb (Abb. 3.11 C), die auf die bereits angesprochenen Unterschiede im Methylierungsstatus des betroffenen Bereichs im Genom hindeuten. Als zusätzliche Bande tritt bei HpaII ein schwaches Signal mit einer Grösse von etwa 10 kb auf, was auf die Methylierung von CpG-Dinukleotiden im *crp*-Gen schliessen lässt. Vergleicht man die relativen Unterschiede in den Signalstärken der cDNA mit denen des Promotors, so scheint der Methylierungsgrad im Gen jedoch nicht so hoch zu sein wie im 5'-flankierenden Bereich.

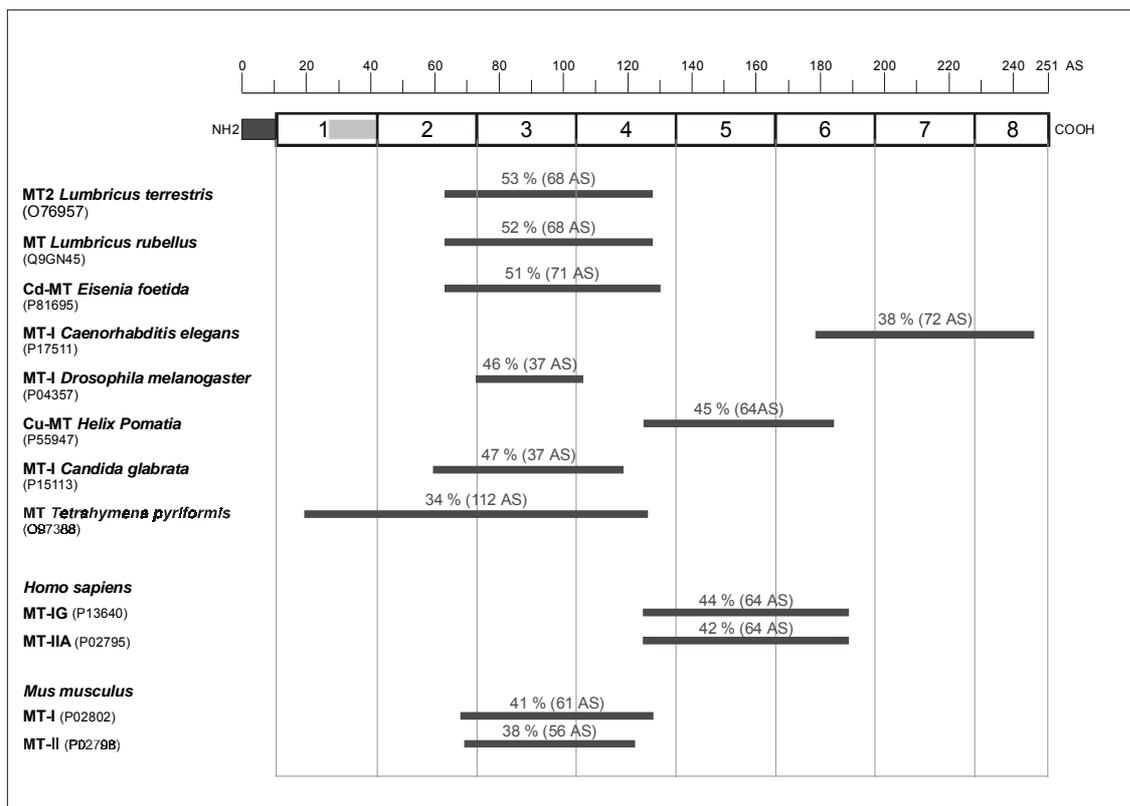


**Abbildung 3.11 'Southern Blot'-Analysen zum Methylierungsstatus des *crp*-Gens.** Je 10 µg genomische DNA aus *Enchytraeus buchholzi* wurde mit den Restriktionsenzymen MspI und HpaII restringiert, in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und gegen <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonden aus dem Promotorbereich bzw. der CRP-cDNA über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Die Membranen wurden anschliessend für 2 h bei 65 °C in 0,1 X SSC/0,1 % SDS gewaschen. Die Exposition der Membranen erfolgte bei -80 °C mit Verstärkerfolie. Als Längenstandard diente jeweils EcoRI/HindIII doppelt restringierte λ-DNA. **[A]** Hybridisierung von DNA aus Cd-unbehandelten Enchytraeen (-Cd) gegen den Promotorbereich des *crp*-Gens. **[B]** Hybridisierung von DNA aus Cd-behandelten (6 d, 3 mg/l) Enchytraeen (+Cd) gegen den Promotorbereich des *crp*-Gens. **[C]** Hybridisierung von DNA aus Cd-unbehandelten Enchytraeen gegen die CRP-cDNA.

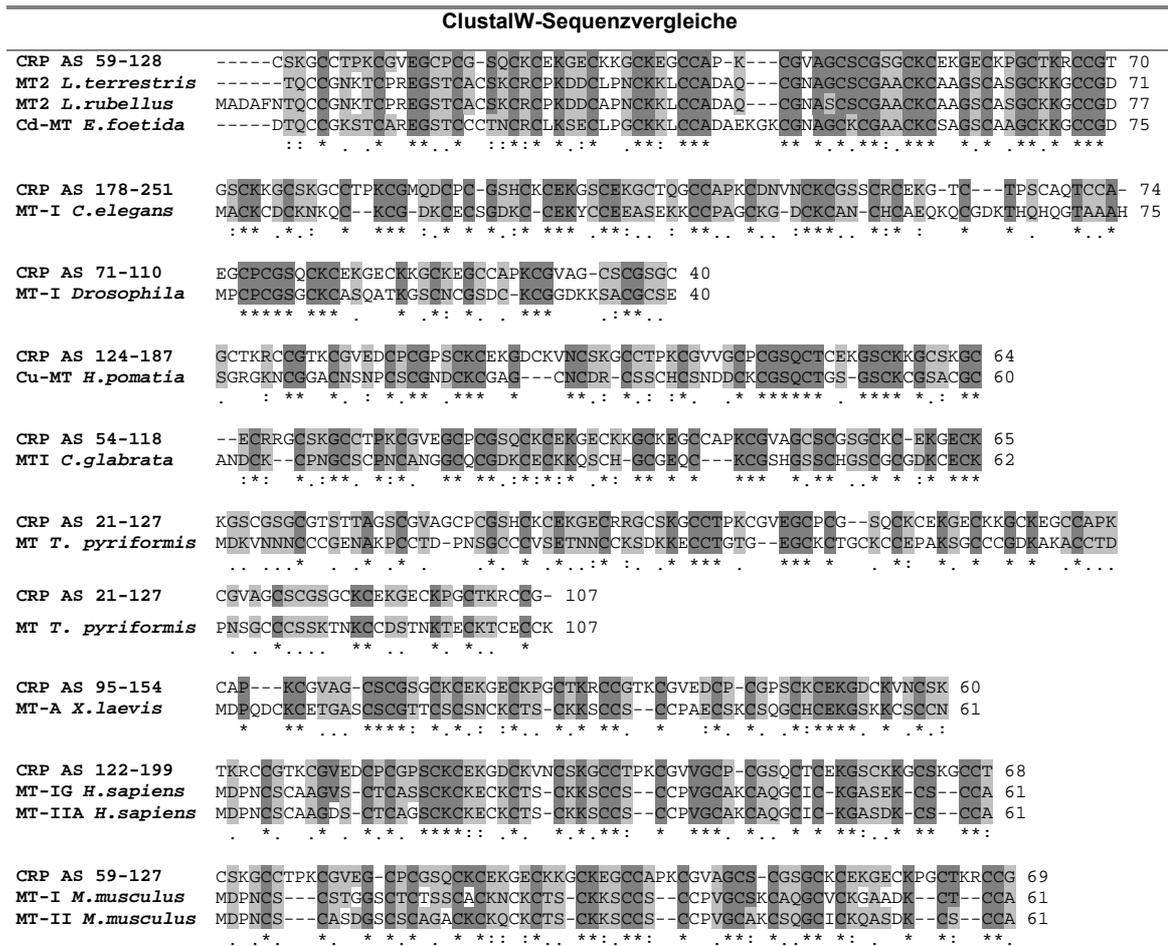
Möglicherweise steht die auffällige Verteilung von CpG-Dinukleotiden im *crp*-Gen und deren teilweise Methylierung in einem Zusammenhang mit der Transkriptionskontrolle des Gens. Durch 'Southern Blot'-Analysen mit DNA aus Cadmium-behandelten Enchytraeen sollte untersucht werden, ob der durch das Cadmium ausgelöste physiologische Stress zu einer Änderung im Methylierungsmuster des *crp*-Gens führt. Genomische DNA aus Tieren, die 6 Tage lang einer Cd-Belastung im subletalen Bereich von 3 mg/l ausgesetzt waren, wurde mit MspI und HpaII verdaut und gegen die Sonde des Promotor-Bereichs hybridisiert. Es ergibt sich dabei kein Unterschied in der Fragmentverteilung im Vergleich zu DNA aus Cd-unbehandelten Tieren (Abb. 3.11 B). Das Methylierungsmuster in dem untersuchten Genombereich bleibt demnach von den physiologischen Änderungen durch die Cadmium-Belastung unberührt.

### 3.2 Sequenzvergleiche zwischen dem CRP-Protein und Metallothioneinen

Der Abgleich des CRP-Proteins gegen die SWALL-Protein-Datenbank mit Hilfe des Programmes Fasta3 [Pearson und Lipman, 1988; Pearson, 1990] ergibt unter anderem Ähnlichkeiten zu verschiedenen Metallothioneinen. Mit Hilfe des Programmes LALIGN [Huang und Miller, 1991] wurde das CRP-Protein gegen die Sequenzen ausgewählter Metallothioneine aus Vertebraten und Invertebraten abgeglichen.



**Abbildung 3.12 Schematische Darstellung der Identitäten von Metallothioneinen zu Bereichen des CRP-Proteins.** Die Sequenzen ausgewählter Metallothioneine (SWALL) wurden mit Hilfe des Programms LALIGN [Huang und Miller, 1991] gegen das gesamte CRP-Protein abgeglichen. In Balken dargestellt sind die jeweils besten Identitäten der Metallothioneine mit dem überlappenden Bereich des CRP-Proteins. In Klammern über den Balken ist die Größe des überlappenden Bereiches angegeben. Die Accession-Nummern der EMBL-Datenbank sind unter den jeweiligen Metallothioneinen angegeben.



**Abbildung 3.13 Vergleich der Metallothioneine mit den zugehörigen überlappenden Bereichen des CRP-Proteins.** Ausgewählte Metallothioneine wurden mit dem Programm ClustalW [Thompson *et al.*, 1994] gegen die besten Überlappungsbereiche des CRP abgeglichen (Abb. 3.12). Identische Aminosäuren sind mit einem Sternchen gekennzeichnet und dunkelgrau unterlegt. Stark verwandte Aminosäuren sind mit einem Doppelpunkt gekennzeichnet und hellgrau unterlegt. Verwandte Aminosäuren sind mit einem einzelnen Punkt gekennzeichnet und ebenfalls hellgrau unterlegt.

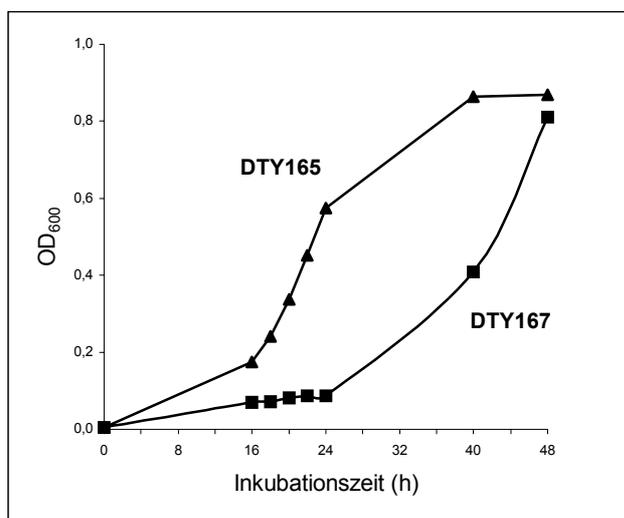
Mit etwa 50%igen Sequenzidentitäten zeigen sich die grössten Ähnlichkeiten zwischen den Repeats 3 und 4 des CRP und den Metallothioneinen der phylogenetisch nahe stehenden Oligochaeten *Lumbricus* und *Eisenia* (Abb. 3.12) [Stürzenbaum *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2000]. Insbesondere der carboxyterminale Bereich der MT weist dabei hohe Übereinstimmungen in der AS-Sequenz im Vergleich zu dem entsprechenden Bereich des CRP-Proteins auf (Abb. 3.13). Sehr hohe Identitäten zu den Repeats 3 und 4 des CRP zeigen auch die MT anderer Invertebraten wie *Drosophila* (46 %) oder *Candida* (47 %). Das Cu-Metallothionein aus der Schnecke *Helix pomatia* weist mit 45 % eine hohe Identität zum CRP auf, allerdings erstreckt sich dabei die beste Überlappung auf das Repeat 5 und seine angrenzenden Bereiche. Das MT-I aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* weist mit 37 % eine vergleichbar niedrige Identität zum CRP auf, die sich auf eine Region um das siebente Repeat erstreckt. Das mit 107 AS aussergewöhnlich grosse MT-Protein aus dem Einzeller *Tetrahymena pyriformis* zeigt eine 34 %ige Identität zu den ersten vier Repeats des CRP. Die für die humanen Metallothionein-Isoformen I und II ermittelten Identitäten liegen mit Werten von 44 % bzw. 42 % in einem Rahmen, der auch für viele Invertebraten MT beobachtet wird. Der

Rahmen, der auch für viele Invertebraten MT beobachtet wird. Der Überlappungsbereich mit den besten Ergebnissen erstreckt sich dabei wie bei *H. pomatia* auf das Repeat 5. Dagegen finden sich die besten Werte beim Sequenzabgleich mit den Maus-MT I und II (41 % und 38 % Identität) in einem Bereich des dritten und vierten Repeats, welcher auch zu den meisten MT aus Invertebraten die grössten Ähnlichkeiten aufweist (Abb. 3.12).

Über das Programm ClustalW [Thompson *et al.*, 1994] wurden die einzelnen Metallothioneine mit den jeweils korrespondierenden Bereichen des CRP-Proteins abgeglichen (Abb. 3.13). Dabei wird deutlich, dass bei allen Metallothioneinen vor allem die Cysteinreste im Vergleich zu den korrespondierenden Abschnitten des CRP-Proteins konserviert sind. Aber auch Aminosäuren wie Lysin, Serin und und Glycin weisen sowohl bei den MT aus Invertebraten als auch aus Mensch und Maus starke Konservierungen beim Vergleich mit dem CRP auf.

### 3.3 Heterologe Expression des CRP-Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*

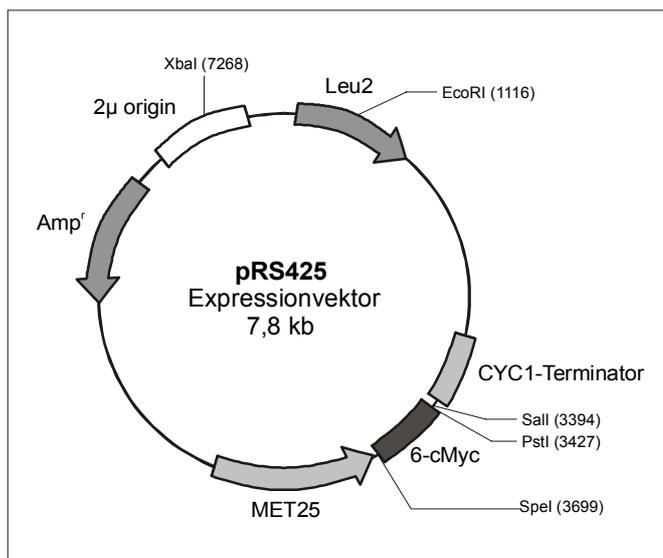
Die spezifische Induzierbarkeit des *crp*-Gens durch Cadmium [Willuhn *et al.*, 1996] und die strukturellen Ähnlichkeiten des aus der cDNA deduzierten CRP-Proteins mit anderen Schwermetall-bindenden Proteinen wie Metallothioneinen (Kap. 1.5; Kap. 3.2) deuten auf eine Einbindung des CRP in den Cadmium-Detoxifizierungsprozess von *E. buchholzi* hin. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis einer Funktionalität des CRP-Proteins hinsichtlich einer Cd-Intoxikation erbracht werden und die Bedeutung der charakteristischen strukturellen Eigenschaften des Proteins aufgeklärt werden.



**Abbildung 3.14** Wachstumsvergleich zwischen den Hefestämmen DTY165 (Wildtyp) und DTY167 ( $\Delta ycf1$ ) bei einer Cadmiumkonzentration von 40  $\mu\text{M}$ . Je 40 ml SC-Medium mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die erste Probenentnahme erfolgte zu Beginn der log-Phase nach 16 h. Die Optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt.

Da keine geeigneten Versuchssysteme wie beispielsweise Zelllinien aus *E. buchholzi* zur Verfügung stehen, wurden die Untersuchungen im heterologen Hefe-System durchgeführt. Für den Nachweis der Funktionalität von Metallothioneinen oder anderen Proteinen, die in den Detoxifizierungsprozess von Schwermetallen eingebunden sind, stellt die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* ein geeignetes Untersuchungssystem dar [Ecker *et al.*, 1986; Chernaik und Huang, 1991; Cody und Huang, 1994; Tommasini *et al.*, 1996; Clemens *et al.*, 1998]. Für die Expression des CRP-Proteins wurde der Cd-hypersensitive *S. cerevisiae*-Stamm DTY167 verwendet [Li *et al.*, 1996]. In diesem Hefestamm liegt das für den 'yeast cadmium factor' codie-

rende *ycf1*-Gen durch eine Fusion mit dem *hisG*-Gen in inaktiver Form vor. Aus diesem Grund zeigt der YCF1-defiziente Stamm DTY167 unter Cadmium-Belastung ein im Vergleich zum isogenen Wildtyp-Stamm DTY165 stark eingeschränktes Wachstum (Abb. 3.14). Die Verdopplungszeit einer Kultur von DTY165-Zellen beträgt bei der subletalen Cadmium-Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  in SC-Medium bei 30 °C 4,6 Stunden. Für eine Kultur von DTY167-Zellen verdoppelt sich dieser Wert auf 9,0 Stunden. In Cd-freiem SC-Medium zeigt die Inaktivierung des *ycf1*-Gens im Vergleich zum Wildtyp keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von DTY167. Durch den weitgehenden Verlust der Cadmiumtoleranz stellt der Hefestamm DTY167 somit ein geeignetes Versuchssystem für die Untersuchung der angesprochenen Fragestellungen dar.



**Abbildung 3.15 Vektorkarte pRS425-Expressionsvektors [nach Mumberg *et al.*, 1994].** Dargestellt ist die schematische Vektorkarte. Die Expression wird über den *MET25*-Promotor reguliert. Über die Restriktionschnittstellen *SpeI* und *PstI* wurde 5'-seitig der MCS zusätzlich die Sequenz für ein 6-cMyc-Tag einkloniert. Die Selektion in den Hefezellen erfolgt über das *LEU2*-Gen. Darüberhinaus enthält der Vektor ein 2 $\mu$  'origin of replication' und ein Ampicillinresistenz-Gen.

Für die Expression des CRP-Proteins in *S. cerevisiae* wurde der auf dem Plasmid p425 basierende Vektor pRS425 eingesetzt (Abb. 3.15) [Mumberg *et al.*, 1994], welcher von Herrn Gregor Jansen (Institut für Mikrobiologie, HHU Düsseldorf) in modifizierter Form zur Verfügung gestellt wurde. Die Expression unterliegt in diesem Vektor der Kontrolle des durch Methionin reprimierten *MET25*-Promotors. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschliesslich in Methionin-freiem Medium durchgeführt, um eine optimale und vergleichbare Expression des CRP in den Hefezellen zu gewährleisten. Der kodierende Bereich der CRP-cDNA wurde durch PCR amplifiziert und über die *Sall*-Schnittstelle der MCS ungerichtet in den Vektor kloniert. Durch Sequenzierung wurden korrekt orientierte Klone im richtigen Leseraster identifiziert. Durch ein in den Vektor zusätzlich einkloniertes N-terminales 6-cMyc-Tag (9 kDa) erfolgte die Expression des CRP als Fusionsprotein, welches über Immundetektion mit anti-cMyc Antikörpern nachgewiesen werden konnte.

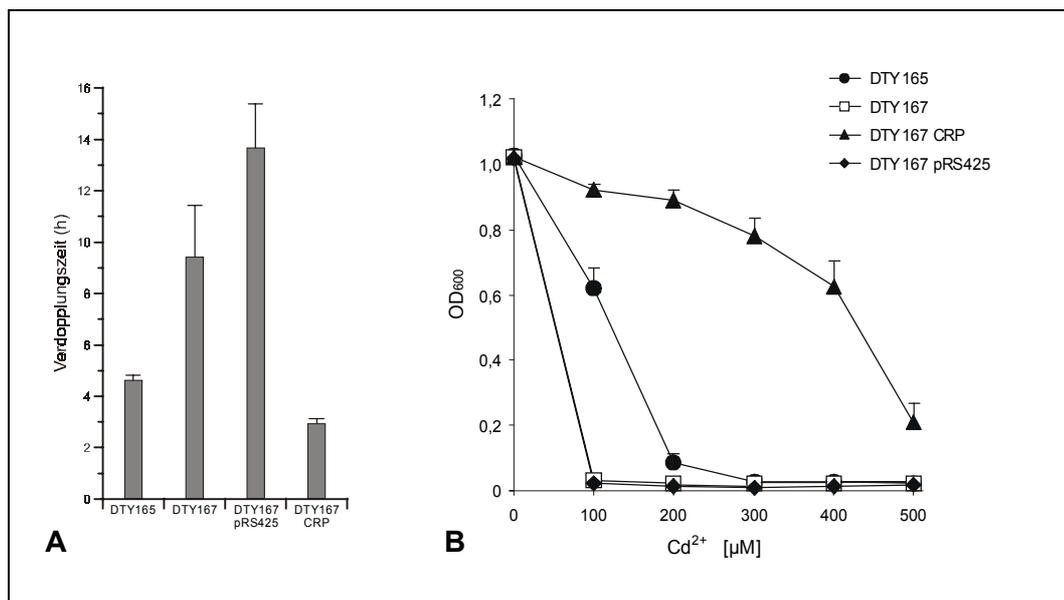
### 3.3.1 Vermittlung von Cadmiumresistenz durch das CRP in DTY167

Wie in Abbildung 3.14 erkennbar ist, zieht der Verlust des *ycf1*-Gens in dem Hefestamm DTY167 selbst bei einer geringen Cadmium-Belastung im Vergleich zum Wildtyp DTY165 ein stark verzögertes Wachstum nach sich. Durch die Expression des CRP in DTY167 sollte nun überprüft werden, ob das Protein in der Lage ist, in den Cd-hypersensitiven Hefezellen im Verlauf einer Cd-Intoxikation einen protektiven Effekt zu vermitteln. Wachstumsverglei-

che bei der subletalen Cadmium-Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  zeigen, dass die Verdopplungszeit von 9,4 h für DTY167 Kulturen auf 2,9 h für DTY167-Kulturen, in denen das CRP exprimiert wird (DTY167 CRP), sinkt (Abb. 3.16 A). Die CRP-exprimierenden Zellen wachsen demnach um Faktor 3,2 schneller als die DTY167-Zellen. Die für die Kontrolle der Expression des pRS245 Vektors in DTY167 Zellen (DTY167 pRS425) ermittelte Verdopplungszeit liegt bei 13,65 h. Demgegenüber wachsen die DTY167 CRP Kulturen sogar um Faktor 4,7 schneller. Das im Vergleich zu den DTY167 Kulturen verzögerte Wachstum der DTY167 pRS425 Kontrollkulturen ist auf die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zurückzuführen. Während die DTY167 Kulturen in einem Vollmedium auf Sorbitbasis angezogen werden, erfolgt die Kultur von DTY167 pRS425 Zellen zur Selektion auf Vektor-haltige Zellen und zur Induktion des *MET25*-Promotors in einem Minimalmedium auf Sorbitbasis ohne die Aminosäuren Leucin und Methionin. Bei einer zusätzlichen Cadmium-Belastung machen sich die dadurch bedingten Änderungen im Stoffwechsel der Zellen in einem langsameren Wachstum bemerkbar. Die aufgeführten Daten verdeutlichen den durch das CRP vermittelten effektiven Schutz für die Cd-hypersensitiven DTY167 Zellen bei einer Belastung mit Cadmium. Die DTY167 CRP Kulturen wachsen bis zu fünfmal schneller als die entsprechenden Kontrollkulturen. Wachstumsvergleiche mit dem Wildtypstamm DTY165 zeigen, dass der durch das CRP bedingte protektive Effekt sogar noch grösser ist als der Effekt, der durch den Entgiftungsmechanismus des intakten endogenen YCF1-Faktors in den Hefezellen vermittelt wird. Bei 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wurde für DTY165 Kulturen eine Verdopplungszeit von 4,6 h ermittelt (Abb. 3.16 A). DTY167 CRP Kulturen zeigen demnach ein im Vergleich zu DTY165 Kulturen um Faktor 1,5 verbessertes Wachstum.

Noch deutlicher wird die protektive Wirkung des CRP, wenn man das Wachstum der verschiedenen Kulturen bei steigender Cadmiumbelastung vergleicht (Abb. 3.16 B). Es wurden Kulturen von DTY165, DTY167, DTY167 CRP (CRP exprimierende Zellen) und DTY167 pRS425 (Kontrolle mit Ausgangsvektor pRS425 ohne CRP) in SC-bzw. SD-Medium (ohne Leucin und Methionin) bei 30 °C bei Cd-Konzentrationen von 0, 100, 200, 300, 400 und 500  $\mu\text{M}$  inkubiert. Nach 72 Stunden wurde für die jeweiligen Kulturen die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Für DTY167 und DTY167 pRS425 kann dabei schon ab einer Cadmium-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  kein Wachstum der Kulturen mehr festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorangegangenen Wachstumsversuche, bei denen schon bei subletalen Cd-Konzentrationen von 40  $\mu\text{M}$  für DTY167 ein stark eingeschränktes Wachstum zu beobachten ist. Der Verlust des YCF1 in den Zellen macht sich dementsprechend bei steigenden Cadmium-Konzentrationen noch stärker bemerkbar. CRP-exprimierende DTY167-Kulturen zeigen dagegen auch bei steigender Cadmium-Belastung gute Wachstumsraten. Bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  werden nach 72 h mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,92 noch 90 % der Optischen Dichte von entsprechenden Kontrollkulturen ohne Cadmium erreicht. Ein Abfall in der Optischen Dichte ist erst bei einer Cadmium-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,21 nach 72 h werden dann nur noch etwa 20 % des für die zugehörige Kontrollkultur bestimmten Wertes erreicht. Dieser Versuchsansatz bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse, bei denen ein durch das CRP bedingter protektiver Effekt im Verlauf einer Cadmium-Belastung in dem Hefestamm DTY167 festgestellt wurde. Vergleicht man die ermittelten Werte für DTY165 und DTY167 CRP (Abb. 3.16 B), so ist wie zuvor ein verbessertes Wachstum von CRP-exprimierenden DTY167-Kulturen gegenüber den Wildtyp-Kulturen zu beobachten. Die Wildtyp-Kulturen zeigen bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  noch eine Optische Dichte, die nach 72 h mit 0,62 etwa 40 % unter dem Wert der Kontrollkultur ohne Cd-Belastung liegt. Dieser Wert wird bei DTY167 CRP

erst bei 400  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  erreicht. Ab einer Cadmium-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  ist bei DTY165-Kulturen kein Wachstum mehr zu beobachten. Bei dieser Cadmium-Konzentration weist DTY167 CRP mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,78 nach 72 h noch eine Optische Dichte auf, die nur etwa 25 % unter dem Kontrollwert liegt. Bei steigenden Cadmiumkonzentrationen wirkt sich der schützende Effekt des CRP-Proteins in den Hefezellen demnach noch stärker auf das Wachstum der Kulturen aus. Die Ergebnisse für die Kontrolle der Expression des 6-cMyc-Tag des Vektors pRS425 in DTY167 (DTY167 pRS245) machen deutlich, dass die beobachteten Effekte nicht auf einen Vektor-Artefakt zurückzuführen sind. Die Vermittlung einer Cadmium-Resistenz in den Cd-hypersensitiven DTY167 Zellen ist vielmehr ursächlich auf die Expression des CRP-Proteins zurückzuführen.

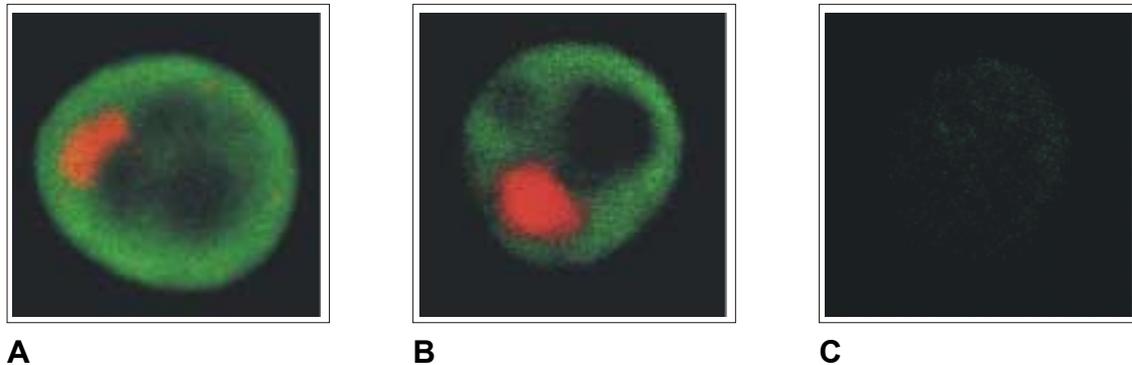


**Abbildung 3.16 Vermittlung einer Cadmiumresistenz durch das CRP in DTY167. [A]** Verdopplungsraten von Kulturen der Hefestämme DTY165, DTY167 und des CRP-exprimierenden Hefestammes DTY167 (DTY167 CRP). Je 40 ml SC-Medium (DTY165, DTY167) bzw. SD-Medium ohne Leucin und Methionin (DTY167 pRS425, DTY167 CRP) mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Zu Beginn der log-Phase nach 16 h erfolgte die erste Probenentnahme. Die Optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogrammes MS Excel wurden die Verdopplungsraten für die jeweiligen Kulturen bestimmt. **[B]** Wachstum von DTY165, DTY167, DTY167 pRS425 und DTY167 CRP bei verschiedenen Cadmiumkonzentrationen. Je 7 ml SC-Medium (DTY165, DTY167) bzw. SD-Medium ohne Leucin und Methionin (DTY167 CRP, DTY167 pRS425) mit 0, 100, 200, 300, 400 und 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach 72 h wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt.

### 3.3.2 Lokalisation des heterolog exprimierten CRP-Proteins in DTY167

Nach dem Nachweis der Vermittlung einer Cadmium-Toleranz durch das CRP in dem Cd-hypersensitiven Hefestamm DTY167 (Kap. 3.3.1) wurde zur weiteren Charakterisierung der Funktionalität des Proteins die zelluläre Verteilung des heterolog exprimierten CRP in DTY167 überprüft. Die in dem Vektor pRS425 vorhandene Sequenz für ein 6-cMyc-Tag ermöglicht den Nachweis eines exprimierten Proteins über Immundetektion des N-terminal fusionierten Tags. Diese Möglichkeit des Nachweises wurde für die Lokalisation des CRP in den Hefezellen genutzt. Sphaeroplastierte Zellen wurden dazu auf Polylysin beschichtete Objektträger aufgetropft,

mit anti-cMyc Primärantikörpern inkubiert und mit den entsprechenden FITC gekoppelten Sekundärantikörpern behandelt. Ein vorausgegangener Verdau mit RNase A und die Einbettung in Propidiumiodid-haltigem Medium ermöglichten eine Anfärbung des Zellkerns der Hefezellen. Nach dem Einbetten wurden die Zellen mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie ausgewertet.



**Abbildung 3.17 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zur Lokalisation des CRP in DTY167.** 2-3 OD<sub>600</sub>-Einheiten logarithmischer Kulturen von **[A]** DTY167 CRP in Cadmium-freiem SD-Medium (ohne Leucin und Methionin), **[B]** DTY167 CRP in SD-Medium (ohne Leucin und Methionin) mit 20 µM CdCl<sub>2</sub> sowie **[C]** DTY167 in Cadmium-freiem SC-Medium (als Kontrolle für unspezifische Kreuzreaktionen des eingesetzten Antikörpers) wurden mit Hilfe von Lyticase, Glucuronidase und Triton X-100 sphaeroplastiert und mit 0,1 mg/ml RNase A behandelt. Die Zellen wurden auf Polylysin beschichtete Objektträger aufgetropft und anschliessend mit Primärantikörperlösung (polyklonaler Kaninchen-anti-cMyc AK, 1 µg/ml in PBS/BSA, 60 µl) sowie mit Sekundärantikörperlösung (Ziege-anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt, 1 : 100 in PBS/BSA, 20 µl) inkubiert. Die Einbettung der Zellen erfolgte in einer 1:1-Mischung (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg), die eine Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) und zur Lokalisation des Zellkerns 5 µg/ml Propidiumiodid enthielt. Die Fluoreszenz des Farbstoffes Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser, die von Propidiumiodid bei einer Wellenlänge von 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zellen wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt.

Für die in Cd-freiem Medium angezogenen Hefezellen zeigt sich eine gleichmässige Verteilung des CRP-Proteins im Cytoplasma (Abb. 3.17 A). Die in der Mitte der Zellen erkennbare Vakuole ist frei von CRP. Eine anderweitige vesikelartige Anhäufung des CRP-Proteins ist nicht erkennbar. Die beschriebene Verteilung ändert sich auch nicht bei Anzucht der Zellen in SD-Medium mit 20 µM CdCl<sub>2</sub> (Abb. 3.17 B). Ein möglicherweise Cd-beladener Zustand des CRP führt demnach zu keiner Änderung der Kompartimentierung des Proteins in den Zellen. Die in den Zellen befindliche Menge an CRP-Protein scheint bei beiden Zuständen annähernd gleich zu sein. Die als Kontrolle für unspezifische Kreuzreaktionen des eingesetzten anti-cMyc Antikörpers eingesetzten DTY167 Zellen (Abb. 3.17 C) zeigen keine Fluoreszenz, so dass die in den beiden anderen Ansätzen beobachtete Fluoreszenz ausschliesslich auf das exprimierte CRP zurückzuführen ist. In Zusammenhang mit den einleitend erwähnten strukturellen Merkmalen des CRP-Proteins und den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Ergebnissen der Wachstumsversuche ist anhand dieser Daten eine mögliche Funktion des Proteins so vorstellbar, dass das CRP die im Cytoplasma der Hefezellen vorliegenden freien Cd<sup>2+</sup>-Ionen über die Sulfhydrylgruppen seiner Cysteinreste ähnlich den MT komplexiert und diese so in eine für die Zelle unschädliche Form überführt [Vasak und Hasler, 2000]. Das Cd-CRP wird dann im Cytoplasma der Zel-

len gelagert, da es scheinbar zu keinem nennenswerten Transport des Cd-CRP aus den Hefezellen oder zu einer Ablagerung in speziellen Vesikeln oder der Vakuole kommt.

### 3.4 Heterologe Expression von CRP-Deletionsklonen in DTY167

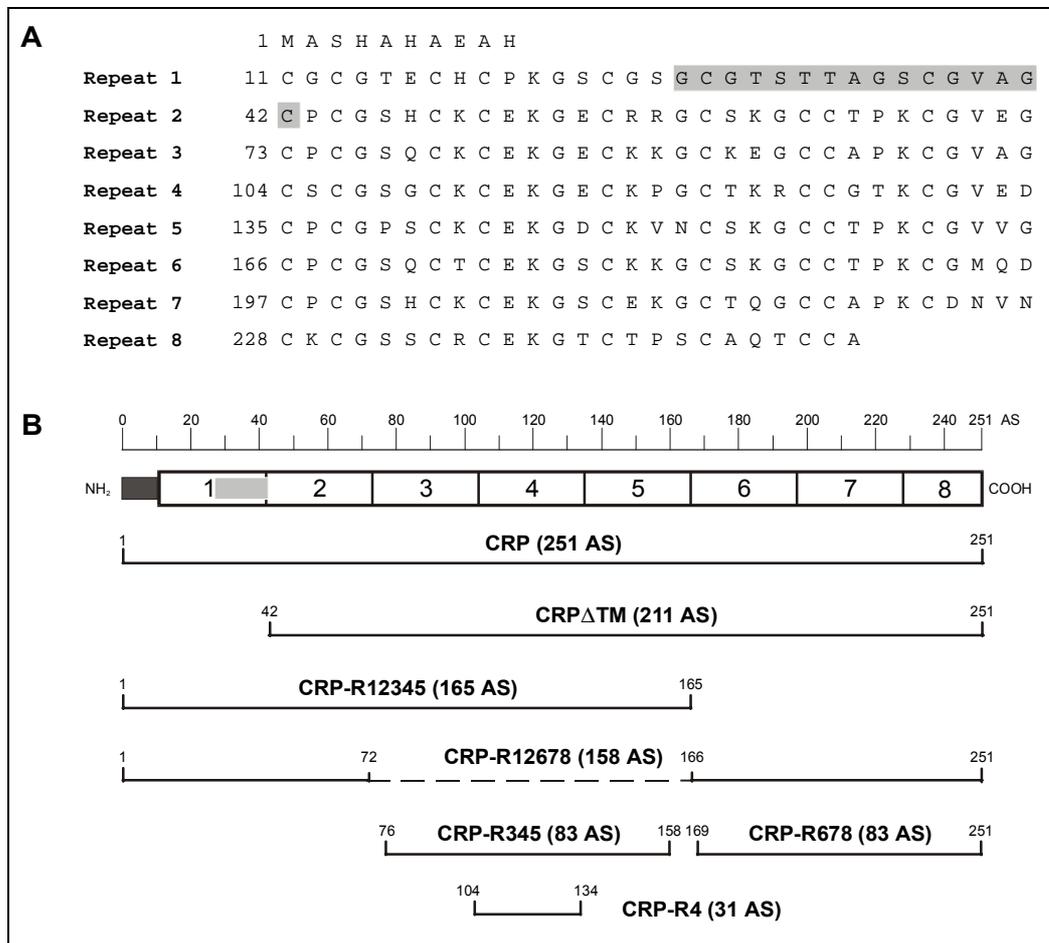
Die in Kapitel 3.3 dargelegten Ergebnisse zeigen die Vermittlung einer Cadmium-Resistenz in dem Cd-hypersensitiven Hefestamm DTY167 durch das CRP, die sogar die beobachtete Cd-Toleranz des zugehörigen isogenen Wildtyp-Stammes DTY165 mit intaktem *ycf1*-Gen übersteigt. Der in den Hefezellen im Verlauf einer Cd-Intoxikation durch das CRP vermittelte Schutzmechanismus muss demnach sehr effektiv sein. Bei Betrachtung der deduzierten strukturellen Eigenschaften des CRP-Proteins fallen die acht repetitiven Einheiten mit ihren 9 Cysteinresten auf, von denen je 6 in Cys-Cys- bzw. Cys-X-Cys-Segmenten ähnlich wie bei den metallbindenden Domänen der Metallothioneine aufgebaut sind (Abb. 3.18 A) [Schäffer und Kägi, 1991]. Eine der nachgewiesenen Funktionen der MT besteht in der Komplexierung freier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen über die Sulfhydrylgruppen der charakteristisch angeordneten Cysteinreste und die dadurch bedingte Bildung von Cd-Thiolat-Clustern, wodurch den Zellen ein Schutz im Verlauf einer Cd-Intoxikation verliehen wird [Brady, 1982; Klaassen *et al.*, 1999]. Wie bereits in Kapitel 3.3.2 angesprochen, könnte der für das CRP beobachtete protektive Effekt in den Hefezellen aufgrund der Ähnlichkeiten zu den MT auf einen analogen Mechanismus zurückzuführen sein. Da das CRP im Gegensatz zu den MT jedoch nicht aus 2 Domänen, sondern aus mehreren repetitiven Einheiten aufgebaut ist, ergeben sich hinsichtlich einer Aufklärung der Funktionalität des CRP-Proteins weitere Fragestellungen: Besitzen möglicherweise Teile des Proteins bei der vermuteten Komplexierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen grössere Bedeutung als andere? Wie wirkt sich der Verlust der potentiellen Transmembran-Domäne aus? Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Zahl der exprimierten Repeats und dem protektiven Effekt im Verlauf einer Cd-Intoxikation? Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden verschiedene Deletionsklone des CRP hergestellt und bei unterschiedlichen Cadmium-Belastungen in DTY167 Zellen exprimiert.

#### 3.4.1 Klonierungsstrategie für die Expression der CRP-Deletionsklone

Für die Expression in DTY167 wurden insgesamt sechs CRP-Deletionsklone hergestellt. Diese wurden mit Hilfe spezifischer Primer (Kap. 2.14.1) über Plasmid-PCR amplifiziert und über die Sall Restriktions-Schnittstelle der MCS ungerichtet in den Vektor pRS425 kloniert. Korrekt orientierte Klone im richtigen Leseraster wurden durch Sequenzierung identifiziert und auf einen möglichen Rasterverschub hin überprüft.

Der mit 211 Aminosäuren längste Deletionsklon ist CRP $\Delta$ TM von AS-Position 42 bis 251 des CRP-Proteins, bei dem die am N-terminalen Ende des Proteins gelegene potentielle Transmembran-Domäne deletiert wurde. Anhand dieses Klons sollte eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Domäne in dem heterologen Hefesystem überprüft werden. Der nächstgrösste Deletionsklon ist mit 165 Aminosäuren der Klon CRP-R12345, bei dem mit den AS von 1 bis 165 die ersten 5 Repeats des CRP-Proteins kloniert wurden. Dieses Fragment sollte einen Vergleich zu dem Deletionsklon CRP-R12678 bieten, bei dem durch einen PCR-Artefakt mit den Primern CRPcDNA142+Sall und CRPcDNA894-Sall die Nukleinsäuresequenzen für die Repeats 1, 2, 6, 7 und 8 zusammengefügt wurden. Dieser Klon umfasst translatiert insgesamt 158 Aminosäuren, die sich aus Fragmenten mit den Aminosäuren 1 bis 72 sowie 166 bis 251 des CRP-Proteins zusammensetzen. Die beiden Deletionsklone unterscheiden sich demnach in den

letzten 3 repetitiven Einheiten des CRP und erlauben so Aussagen zu der Bedeutung des Austausches von repetitiven Elementen aus dem Kernbereich des Proteins gegen Repeats vom carboxyterminalen Ende des CRP mit seinem verkürzten achtem Repeat.



**Abbildung 3.18 Schematische Übersicht über die Klonierungsstrategie für CRP-Deletionsklone für die Expression in DTY167. [A]** Aminosäuresequenz des aus der CRP-cDNA deduzierten CRP-Proteins [Willuhn *et al.*, 1994b]. Grau unterlegt ist die potentielle Transmembran-Domäne des Proteins. **[B]** Strukturelle Darstellung des CRP-Proteins [nach Willuhn, 1994] mit den entsprechenden Deletionsklonen. Schwarz unterlegt ist eine  $\alpha$ -Helix, grau unterlegt ist die potentielle Transmembranhelix.

Für die Expression von Fragmenten mit nur drei Repeats wurden die Deletionsklone CRP-R345 und CRP-R678 ausgewählt. Das Fragment CRP-R345 besteht aus 83 Aminosäuren von AS-Position 76 bis 158. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit CRP-R678 mit seinem um 7 AS verkürzten achtem Repeat wurde auch das Repeat 5 im Fragment CRP-R345 um sieben Aminosäuren verkürzt und endet mit der Aminosäure Threonin in Position 158. Der Deletionsklon CRP-R678 besteht ebenso wie CRP-R345 aus 83 Aminosäuren, umfasst jedoch die AS 169 bis 251 des CRP-Proteins. Die Translation dieser Deletionsklone beginnt jeweils erst mit der an Position vier gelegenen Aminosäure Glycin der Repeats 3 bzw. 6. Für die Expression nur einer repetitiven Einheit wurde das vierte Repeat aus dem Kernbereich des CRP-Proteins ausgewählt. Dieser CRP-R4 benannte Klon besteht aus 31 Aminosäuren der Position 104 bis 134 des CRP-Proteins. Die Expression dieses Fragmentes erfolgte nicht in dem Vektor pRS425 mit 6-cMyc-Tag, sondern in einem modifizierten pRS425-Vektor, bei dem die über die Restriktion

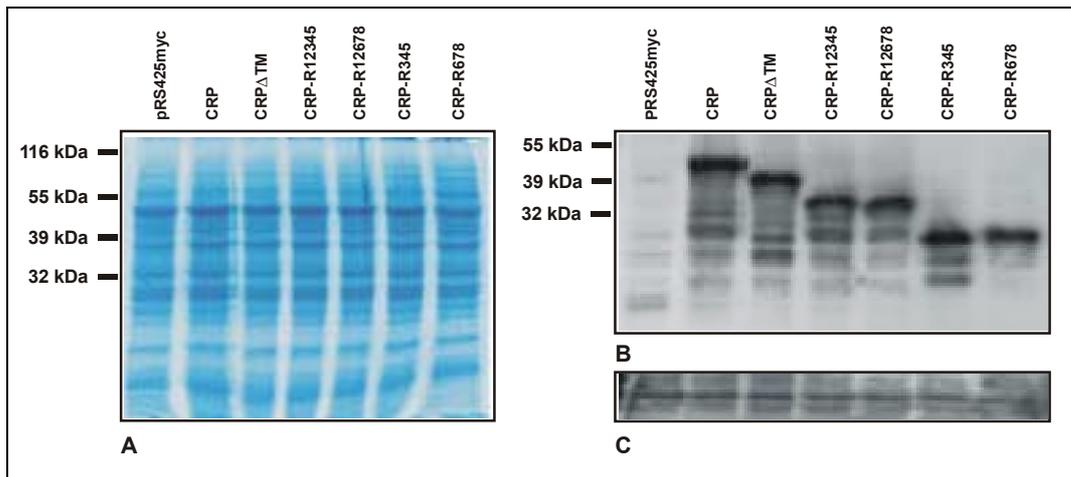
tionschnittstellen *SpeI* und *PstI* eingefügte Sequenz für das cMyc-Tag herausgeschnitten wurde (Abb. 3.15). So konnte bei den späteren Expressionsversuchen eine mögliche funktionale Störung des nur 3 kDa grossen CRP-R4-Fragmentes durch das etwa 9 kDa grosse fusionierte Tag ausgeschlossen werden. Eine schematische Übersicht über die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

### 3.4.2 Nachweis der Expression von CRP-Deletionsklonen in DTY167

Vor der Durchführung von Wachstumsversuchen mit den einzelnen CRP-Deletionsklonen in DTY167 wurde die korrekte Expression der gewünschten Proteinprodukte über Immundetektion mit anti-cMyc-Antikörpern überprüft. Durch die 'Western Blot'-Analysen sollten zudem gleich hohe Expressionslevel in den Zellen nachgewiesen werden, um auszuschliessen, dass mögliche Unterschiede bei den protektiven Effekten der verschiedenen CRP-Fragmente auf eine unterschiedlich starke Expression in den Zellen zurückzuführen sind. Für den Nachweis der CRP-Fragmente wurden Proteinextrakte aus den Kulturen hergestellt und je 20 µg der Proben über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Überprüfung des Expressionslevels wurde ein Gel zunächst mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt (Abb. 3.19 A). In keiner der aufgetragenen Hefeextrakte sind dabei gegenüber der Kontrolle Banden erkennbar, die auf ein zusätzlich exprimiertes Proteinprodukt hinweisen. Der Expressionslevel ist demnach in allen Kulturen trotz vollständiger Induktion des *MET25*-Promotors durch Anzucht in Methionin-freiem SD-Medium so niedrig, dass er unter der Nachweisgrenze von Coomassie-Brilliant-Blue (0,3 - 1 µg pro Bande) liegt. Der relativ niedrige Expressionslevel ist für die zu evaluierenden Fragestellungen von Vorteil, da die CRP-Fragmente unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors nicht überexprimiert werden und so in möglicherweise unphysiologisch hohen Konzentrationen in den Hefezellen vorliegen, welche die Stoffwechselbedingungen in den Hefezellen negativ beeinflussen könnten. Die Proteinsynthese in den Zellen wird nicht ausschließlich auf die Expression der Fremdproteine ausgerichtet, so dass die Fitness der Zellen hoch genug ist, um einen Einfluss von Stressfaktoren wie Cadmium untersuchen zu können. Für die 'Western Blot'-Analysen wurden die über die SDS-PAGE aufgetrennten Hefeextrakte auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und mit einem Maus-anti-cMyc Primärantikörper und einem HRP-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper detektiert. Dabei zeigt sich ein für die einzelnen Deletionsklone erwartetes Expressionsmuster (Abb. 3.19 B). Mit abnehmender Zahl der exprimierten CRP Repeats nimmt auch die Grösse der detektierten Fragmente ab. Für das gesamte CRP-Protein erscheint eine Bande bei etwa 45 kDa, die etwa 10 kDa über dem erwarteten Bereich liegt. Nach Willuhn [1994b] tritt bei der Translation der CRPmRNA im Fluorogramm der SDS-PAGE eine Bande von 35 kDa auf, die ebenfalls um 10 kDa höher liegt als die für das CRP erwartete Molekülmasse von 25 kDa. Die elektrophoretische Mobilität cysteinreicher Proteine ist in der SDS-PAGE aufgrund von Konformationsänderungen durch intramolekulare Bindungen zwischen den Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste häufig nicht proportional zu ihrer tatsächlichen Molekülmasse [Aoki *et al.*, 1986]. Diese Tatsache und die Berücksichtigung des fusionierten cMyc-Tags (etwa 9 kDa) führen zu den beobachteten Molekulargewichten der CRP-Fragmente in der SDS-PAGE. Für CRP-R12345 wird so beispielsweise eine Bande bei etwa 35 kDa detektiert. Auch die Banden für die übrigen cMyc-Tag fusionierten Deletionsklone liegen in den erwarteten Bereichen (Abb. 3.19 B). Für den Deletionsklon CRP-R4 konnte kein Nachweis über eine Immun-

detektion mit anti-cMyc-Antikörpern erfolgen, da dessen Expression aus den in Kapitel 3.4.1 angesprochenen Gründen im Vektor pRS425 ohne cMyc-Tag Sequenz erfolgte.

Durch die Nachbehandlung der Nitrocellulosemembran mit einem Ziege-anti-Aktin (I-19) Primär- und dem zugehörigen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Auftragung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren nachgewiesen (Abb. 3.19 C). Somit zeigt die für die einzelnen CRP-Fragmente detektierte gleichmäßige Signalstärke, dass der Expressionslevel für die verschiedenen Deletionsklone in allen DTY167 Kulturen auf gleichem Niveau liegt.



**Abbildung 3.19 Nachweis der Expression der verschiedenen CRP-Deletionsklone in DTY167.** [A] Auftrennung von Proteinextrakten aus DTY167 Zellen über SDS-PAGE. Jeweils 20 µg der folgenden Extrakte wurden auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen: DTY167 pRS425 (Kontrolle), DTY167 CRP, DTY167 CRP $\Delta$ TM, DTY167 CRP-R12345, DTY167 CRP-R12678, DTY167 CRP-R345, DTY167 CRP-R678. Die Färbung des Gels erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blue. Als Grössenstandard wurden 5 µg des 'Prestained' SDS-Markers (196, 116, 90, 70, 55, 38 und 32 kDa; Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. [B] 'Western Blot'-Analyse der Proteinextrakte aus DTY167 Zellen. Die wie in [A] aufgetrennten Hefeextrakte wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem Maus-anti-cMyc Primärantikörper und einem HRP-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blotting Detektionssystems. Die Exposition erfolgte auf einem ECL Hyperfilm für 5 min bei Raumtemperatur. [C] Nachbehandlung des 'Western Blots' aus [B] mit einem Ziege-anti-Aktin (I-19) Primärantikörper und einem HRP-gekoppelten anti-Ziege Sekundärantikörper zum Nachweis der Auftragung gleicher Proteinmengen.

Das aus der CRP-cDNA deduzierte CRP-Protein weist einen Cysteingehalt auf, der mit 27 % in dem für Metallothioneine beobachteten Bereich von etwa 30 % liegt [Hamer, 1986; Willuhn *et al.*, 1994b]. Durch eine radioaktive Markierung des in den Hefezellen exprimierten CRP mit [ $^{35}$ S]-L-Cystein sollte indirekt der hohe Cysteingehalt des Proteins nachgewiesen werden, der für die beobachtete Funktionalität des Proteins von entscheidender Bedeutung ist. Neben dem gesamten CRP-Protein wurde auch der Deletionsklon CRP-R345 in DTY167 Zellen mit [ $^{35}$ S]-L-Cystein markiert. Für die Markierung wurden die entsprechenden Kulturen in SD-Medium (2 ml) mit 50 µCi [ $^{35}$ S]-L-Cystein (spez. Aktivität 1075 Ci/mmol) für 16 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden Kulturen mit DTY167 (in SC-Medium) und DTY167 pRS425 Zellen mitgeführt. Die Zell-Lysate mit den markierten Proben wurden über 18%ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgels aufgetrennt und nach dem Trocknen der Gele auf [ $^{35}$ S]-sensitiven Röntgenfilmen exponiert.

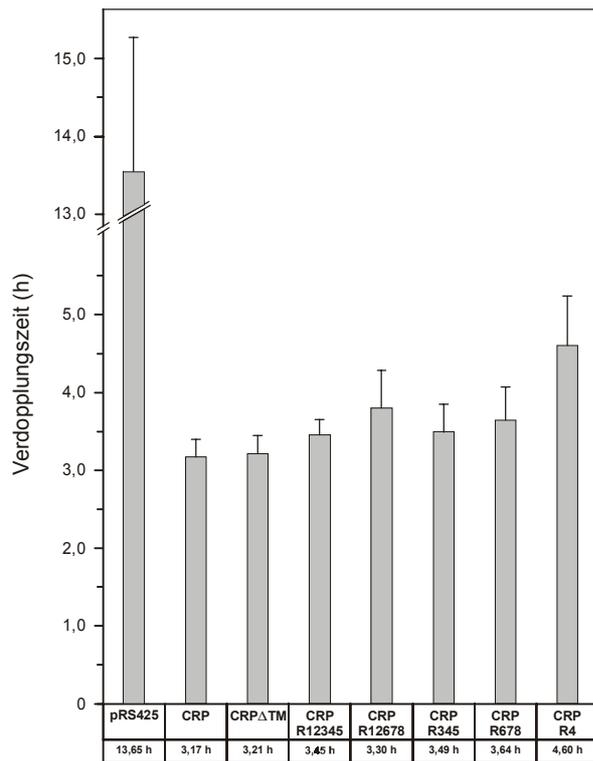
Auf dem Autoradiogramm treten in den Kontrollspuren keine spezifischen Signale auf (Abb. 3.20). In den Spuren von DTY167 CRP und CRP-R345 sind dagegen deutliche Signale zu erkennen. Das gesamte CRP-Protein erscheint dabei als relativ kompakte Bande in einem höheren Bereich des Gels. Das Signal für CRP-R345 ist dagegen im unteren Bereich des Gels zu finden und erscheint über einen weiten Bereich des Gels verschmiert. Dies kann durch einen teilweise proteolytischen Abbau des markierten Proteins im Verlauf der Probenaufbereitung zustande gekommen sein, so dass auch Teilprodukte des Fragmentes detektiert werden. Die erzielten Ergebnisse bestätigen den hohen Cysteingehalt des deduzierten CRP-Proteins. Der durchschnittliche Cysteingehalt von Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae* liegt bei 1,21 % [Miseta und Sutora, 2000]. Dies zeigt sich als Hintergrund in den aufgetragenen Hefeextrakten (Abb. 3.20). Das heterolog exprimierte CRP tritt dagegen aufgrund seines hohen Cysteingehaltes als deutliches Signal in den entsprechenden Spuren auf.



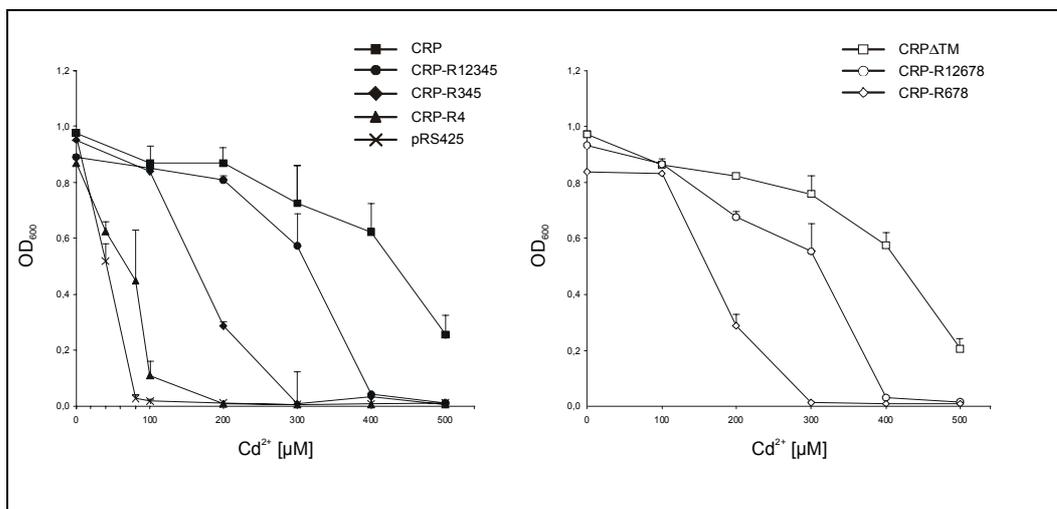
**Abbildung 3.20 Markierung von CRP-Fragmenten in DTY167 mit [<sup>35</sup>S]-Cystein.** Für die radioaktive Markierung wurden die Klone DTY167 CRP und DTY167 CRP-R345 eingesetzt. Als Kontrollen dienten DTY167 und DTY167 pRS425. Die Klone wurden in einem Kulturvolumen von 2 ml in SD-Medium ohne Leucin und Methionin bzw. SC-Medium (DTY167) mit 50 µCi [<sup>35</sup>S]-L-Cystein (spez. Aktivität 1075 Ci/mmol) für 16 h bei 30 °C inkubiert und anschliessend mit Glasperlen aufgeschlossen. Je 35 µl der markierten Proben wurden über ein 18%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Exposition des getrockneten Gels erfolgte auf einseitig beschichteten [<sup>35</sup>S]-sensitiven Kodak BIOMAX MR Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei -80 °C.

### 3.4.3 Wachstumsvergleiche von CRP-Deletionsklonen in DTY167

Nachdem der gleichmässige Expressionslevel für die verschiedenen Deletionsklone in den Hefezellen nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.4.2), wurden die CRP-Fragmente hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Vermittlung einer Cd-Resistenz in DTY167 miteinander verglichen. Die in Abbildung 3.21 dargestellten Verdopplungsraten bei der subletalen Cd-Konzentration von 40 µM deuten an, dass eine Abhängigkeit zwischen dem durch das CRP vermittelten protektiven Effekt und der Zahl der exprimierten Repeats besteht. DTY167 CRP-Kulturen zeigen mit einer Verdopplungszeit von 3,17 h das beste Wachstum aller getesteten Klone, während DTY167 CRP-R4 mit 4,6 h die längste Generationszeit aufweist (Abb. 3.21). DTY167 CRP-Kulturen wachsen somit um Faktor 1,45 schneller als DTY167 CRP-R4-Kulturen. Im Vergleich mit der Kontrollkultur DTY167 pRS425 zeigt jedoch selbst der nur ein CRP-Repeat exprimierende Klon noch einen deutlichen protektiven Effekt bei einer Cd-Belastung. DTY167 CRP-R4-Kulturen wachsen um Faktor 3 schneller als die Kontrollkulturen mit einer Generationszeit von 13,65 h.



**Abbildung 3.21 Verdopplungsraten der CRP-Deletionsklone in DTY167 bei 40  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>.** Die Wachstumsversuche wurden mit den in Abbildung 3.18 aufgeführten Deletionsklonen sowie dem gesamten CRP-Protein durchgeführt. Als Kontrolle dienten DTY167 pRS425 Zellen. Je 40 ml SD-Medium ohne Leucin und Methionin mit 40  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die erste Probenentnahme erfolgte zu Beginn der log-Phase nach 16 h. Die Optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogrammes MS Excel wurden die Verdopplungsraten für die jeweiligen Kulturen bestimmt.



**Abbildung 3.22 Wachstum der Deletionsklone des CRP-Proteins in DTY167 bei steigenden Cadmium-Konzentrationen.** Die Wachstumsversuche wurden mit den in Abbildung 3.18 aufgeführten Deletionsklonen sowie dem gesamten CRP-Protein (DTY167 CRP) durchgeführt. Als Kontrolle dienten DTY167 pRS425 Zellen. Je 7 ml SD-Medium ohne Leucin und Methionin mit 0, 100, 200, 300, 400 und 500  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Für die Vektorkontrolle und DTY167 CRP-R4 wurden zusätzliche Kulturen bei 40 und 80  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> inkubiert. Nach 72 h wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt

Der Verlust der potentiellen Transmembran-Domäne im Deletionsklon CRP $\Delta$ TM wirkt sich bei der getesteten subletalen Cd-Belastung nicht aus. Die DTY167 Zellen mit dem zugehörigen Klon weisen mit einer Generationszeit von 3,21 nur ein geringfügig verlangsamtes Wachstum gegenüber DTY167 Zellen mit dem gesamten CRP-Protein auf (Abb. 3.21). Ein leichter

Abfall in der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum gesamten CRP-Protein wird bei der Expression von fünf bzw. drei repetitiven Einheiten beobachtet. So verlängert sich die Generationszeit für DTY167 Zellen mit CRP-R12345 Fragmenten um 17 min auf 3,45 h, die mit CRP-R345 verlängert sich um 20 min auf 3,49 h. Die Verdopplungszeiten für die Klone CRP-R12678 und CRP-R678 liegen mit 3,8 bzw. 3,64 h etwas über den Werten für die Vergleichsklone CRP-R12345 und CRP-R345. Die Unterschiede in den Generationszeiten bei der subletalen Cd-Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  sind mit Ausnahme von dem für Fragment CRP-R4 ermittelten Wert insgesamt jedoch nicht gross genug, um verlässliche Schlüsse hinsichtlich der Bedeutung einzelner Repeats oder von Bereichen des CRP-Proteins bei der Cd-Detoxifizierung in den Hefezellen ziehen zu können.

Schon beim Nachweis der Vermittlung einer Cadmiumresistenz durch das CRP in DTY167 Zellen (Kap. 3.3.1) konnte ein deutlicher Effekt bei hohen Cadmiumkonzentrationen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die Kulturen mit den einzelnen Deletionsklonen ebenfalls steigenden Cadmium-Konzentrationen ausgesetzt. Dabei bestätigt sich die bereits angedeutete Abhängigkeit des durch das CRP vermittelten protektiven Effekts von der Zahl der exprimierten repetitiven Einheiten (Abb. 3.22). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei der subletalen Cadmiumkonzentration zeigen DTY167 CRP- sowie DTY167 CRP $\Delta$ TM-Kulturen auch bei zunehmender Cadmium-Belastung das beste Wachstum aller Deletionsklone. Zwischen den beiden Fragmenten ist nach 72 h bei keiner der getesteten Cadmium-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied im Wachstum festzustellen. Scheinbar ist die potentielle Transmembran-Domäne ohne Bedeutung für die Funktionalität des Proteins im heterologen Hefesystem. Auch das mit dem Verlust der Transmembran-Domäne einhergehende Fehlen des ersten Repeats hat keinen Einfluss auf den schützenden Effekt. Zeigen mit Ausnahme von CRP-R4 alle Deletionsklone bei 100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> nach 72 h mit einer Optischen Dichte bei 600 nm von etwa 0,85 noch etwa 90 % des Wachstums der jeweils zugehörigen Kontrollkulturen ohne Cadmiumbelastung, so werden die Unterschiede im Wachstum ab einer Cadmium-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  deutlicher (Abb. 3.21). Am auffälligsten reagieren bei dieser Konzentration die Fragmente CRP-R345 und CRP-R678. Sie zeigen mit einer OD<sub>600</sub> von je 0,29 nur noch etwa 33 % des Wachstums von Kulturen, die das gesamte CRP exprimieren. DTY167 CRP erreicht vergleichbare OD<sub>600</sub>-Werte erst bei 500  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>. Ab einer Cadmium-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  ist weder für CRP-R345- noch CRP-R678-Kulturen ein Wachstum zu beobachten. Die erste Veränderung im Wachstum der Kulturen mit den Deletionsklonen CRP-R12345 und CRP-R12678 zeigt sich bei 300  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>. Die Kulturen weisen mit einer Optischen Dichte von 0,57 und 0,55 einen 21 bzw. 24%igen Abfall im Vergleich zu dem Wert für DTY167 CRP auf. Bei 400  $\mu\text{M}$  ist kein Wachstum von DTY167 CRP-R12345- und CRP-R12678-Kulturen mehr zu beobachten. Im Vergleich dazu weisen bei dieser Cadmium-Konzentration DTY167 Kulturen mit dem gesamten CRP-Protein und dem Deletionsklon CRP $\Delta$ TM nach 72 h noch 64 bzw. 58 % der Optischen Dichte ihrer zugehörigen Kontrollen ohne Cadmium-Belastung auf. Einen Abfall im Wachstum zeigen die beiden Deletionsklone erst bei einer Cd-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  (Abb. 3.22). Für DTY167 CRP wurde im Rahmen anderer Versuchsansätze bei einer Konzentration von 750  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> kein Wachstum mehr festgestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei subletalen Cd-Belastungen sind für den Deletionsklon CRP-R4 bei steigenden Cadmium-Konzentrationen die stärksten Beeinträchtigungen im Wachstum zu beobachten. Bei 100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> weist die Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,11 nur noch 13 % der Optischen Dichte von DTY167 CRP auf. Ab 200  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> zeigen die

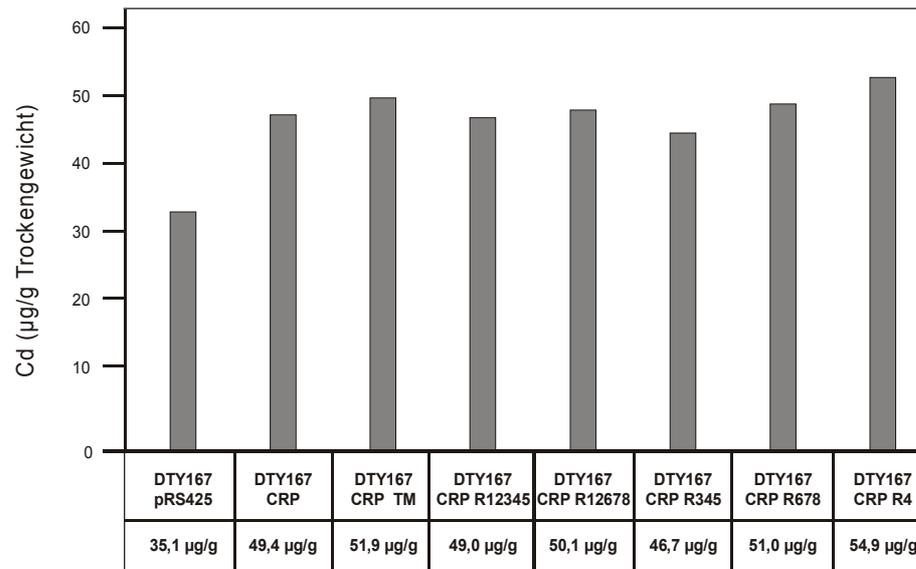
Kulturen kein Wachstum mehr. Der oben beobachtete protektive Effekt des vierten CRP Repeats im Hefestamm DTY167 lässt sich jedoch bei einer Cadmium-Konzentration von 80  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  nachweisen. Dort wachsen CRP-R4-exprimierende DTY167-Kulturen mit einer Optischen Dichte von 0,45 nach 72 h um Faktor 16,5 besser als die DTY167 pRS425 Kontrollen (Abb. 3.22).

Die Ergebnisse der verschiedenen Wachstumsversuche machen deutlich, dass die Anzahl der exprimierten CRP-Repeats in direktem Zusammenhang mit dem erzielten protektiven Effekt in den Cd-hypersensitiven Hefezellen steht. Der beobachtete Effekt nimmt mit steigenden Cadmium-Konzentrationen deutlich zu. In den Hefezellen besteht eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl an repetitiven Einheiten und dem vermittelten Schutz bei einer Cd-Intoxikation. Eine unterschiedlich grosse Bedeutung einzelner Bereiche des CRP Proteins für die Funktionalität ist nicht erkennbar.

#### **3.4.4 Cadmium-Akkumulation in Hefezellen**

Die Auswertung der Versuche zum Wachstum von CRP-exprimierenden Cd-hypersensitiven Hefezellen sowie die Lokalisation des Proteins in den Zellen deuten darauf hin, dass der durch das CRP-Protein vermittelte protektive Effekt bei einer Cd-Belastung über die Komplexbildung freier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen durch die Sulfhydrylgruppen der charakteristisch angeordneten Cysteinreste gesteuert wird. Bestätigt wird diese Annahme durch die beobachtete Korrelation zwischen der Anzahl der exprimierten repetitiven Einheiten des CRP und dem Umfang der vermittelten Cd-Toleranz in DTY167. Darauf basierend wurde überprüft, inwieweit es zu einer CRP-bedingten Anreicherung von Cadmium in den Hefezellen im Vergleich zu Kontrollzellen ohne CRP kommt. Zudem wurde eine Abhängigkeit des Cadmium-Gehaltes in den Zellen von der Anzahl der exprimierten repetitiven Einheiten des CRP untersucht. Dazu wurden Kulturen der verschiedenen Deletionsklone in DTY167 bis zum Erreichen der mid-log Phase in Cd-haltigem SD-Medium bei 30 °C inkubiert. Die Zellpellets wurden lyophilisiert, getrocknet und der Cadmium-Gehalt anschliessend über elektrothermale Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) bestimmt.

Bei Zellen, die unter subletalen Bedingungen bei 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  angezogen wurden, weisen alle Deletionsklone Cd-Gehalte auf, die über dem für die Kontrolle DTY167 pRS425 bestimmten Wert von 35,1  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht liegen (Abb. 3.23). Die für die CRP-Deletionen ermittelten Cd-Gehalte schwanken zwischen 46,7  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht für DTY167 CRP-R345 und 54,9  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht für DTY167 CRP-R4. Es ist kein Zusammenhang zwischen dem Cd-Gehalt in den Zellen und der Anzahl der exprimierten repetitiven Einheiten festzustellen. Im Gegenteil weist der Klon CRP-R4 mit nur einem Repeat den höchsten Cadmium-Gehalt bei Wachstum der Kulturen unter subletalen Bedingungen auf. Die ermittelte Differenz im Cadmium-Gehalt zwischen der Kontrolle und den CRP-exprimierenden Zellen kann darauf zurückgeführt werden, dass die Cd-sensitive Kontrollkultur bei einer niedrigeren Cd-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  angezogen wurden, um ein zeitlich vergleichbares Wachstum bis in die mid-log Phase zu erreichen. Möglicherweise zieht die geringere Cadmium-Konzentration im Medium einen geringeren Transport von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in die Zellen und somit einen niedrigeren Cadmium-Gehalt nach sich. Die Unterschiede im Cadmium-Gehalt zwischen den Deletionsklonen des CRP-Proteins und der Kontrolle sind also nicht ursächlich durch das CRP bedingt, sondern können auf die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zurückgeführt werden.



**Abbildung 3.23 Akkumulation von Cadmium in DTY167 Zellen mit CRP-Deletionsklonen.** DTY167 Kulturen mit den in Abbildung 3.17 aufgeführten Deletionsklonen, dem gesamten CRP Protein (DTY167 CRP) sowie der DTY167 pRS425 Kontrolle wurden in Cadmium-haltigem ( $40 \mu\text{M CdCl}_2$ ) SD-Medium bis zum Erreichen der mid-log Phase bei  $30^\circ\text{C}$  schüttelnd inkubiert. Die Inkubation der DTY167 pRS425 Kontrolle erfolgte bei  $20 \mu\text{M CdCl}_2$ . Nach dem Lyophilisieren und der genauen Gewichtsbestimmung der Zellpellets wurden die Cadmium-Konzentrationen mittels elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) bestimmt.

Für weitere Versuche, bei denen der Cadmium-Gehalt nach einer Inkubation an der Cadmium-Grenzkonzentration bestimmt werden sollte, wurden neben dem gesamten CRP-Protein Fragmente mit abnehmender Repeatzahl ausgewählt. Die eingesetzten Kulturen wurden in SD-Medium bei folgenden Cadmium-Konzentrationen inkubiert: DTY167 CRP bei  $400 \mu\text{M CdCl}_2$ , DTY167 CRP-R12345 bei  $300 \mu\text{M CdCl}_2$ , DTY167 CRP-R345 bei  $200 \mu\text{M CdCl}_2$  und DTY167 CRP-R4 bei  $60 \mu\text{M CdCl}_2$ . Im Vergleich zum Wachstum unter subletalen Bedingungen weisen dabei alle Klone erhöhte Cadmium-Gehalte auf (Tab. 3.9). So steigert sich der Wert für DTY167 CRP von  $49,4 \mu\text{g/g}$  Trockengewicht bei  $40 \mu\text{M CdCl}_2$  auf  $321,3 \mu\text{g/g TG}$  bei  $400 \mu\text{M CdCl}_2$ . Bei einer Verzehnfachung der externen Cadmium-Konzentration erhöht sich demnach der Cadmium-Gehalt in den Zellen um Faktor 6,5. Für DTY167 CRP-R12345 wird bei 7,5fach erhöhter externer Cadmium-Konzentration sogar ein um Faktor 8,2 gesteigerter Cadmium-Gehalt in den Zellen bestimmt. Die Inkubation in  $200 \mu\text{M CdCl}_2$  vergrößert den Cadmium-Gehalt in DTY167 CRP-R345 Zellen um Faktor 3,7. DTY167 CRP-R4-Zellen, die unter subletalen Bedingungen den höchsten Cd-Gehalt aufwiesen, steigern diesen Wert bei Inkubation bei  $60 \mu\text{M CdCl}_2$  um Faktor 1,2 auf  $66,8 \mu\text{g/g TG}$ . Die Erhöhung der Cd-Konzentration im umgebenden Medium scheint bei den getesteten Kulturen zu einem erhöhten Cd-Einstrom zu führen und daraus resultierend zu einem höheren Cd-Gehalt in den Zellen. Eine Abhängigkeit des ermittelten Cd-Gehaltes von der Zahl der exprimierten Repeats ist jedoch auch bei diesem Versuchsansatz nicht zu beobachten. Würde diese Korrelation bestehen, so müsste die Kultur mit dem gesamten CRP-Protein den höchsten Cd-Gehalt aufweisen, zumal diese der höchsten Cd-Konzentration im Medium ausgesetzt war. Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern die DTY167 CRP-R12345 Kulturen weisen den höchsten Cd-Gehalt auf (Tab. 3.9).

**Tabelle 3.9 Cadmium-Gehalt von DTY167 Zellen mit CRP-Deletionsklonen bei verschiedenen Cadmiumkonzentrationen.** DTY167 Kulturen mit den Klonen CRP, CRP-R12345, CRP-R345 sowie CRP-R4 wurden bei der entsprechenden CdCl<sub>2</sub>-Grenzkonzentration in SD-Medium bis zum Erreichen der mid-log Phase bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach dem Lyophilisieren und der genauen Gewichtsbestimmung der Zellpellets wurden die Cadmium-Konzentrationen mittels elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) bestimmt.

Deletionsklon	DTY167 CRP	DTY167 CRP-R12345	DTY167 CRP-R345	DTY167 CRP-R4
Cadmiumgehalt im Medium	400 µM	300 µM	200 µM	60 µM
Cadmiumgehalt (µg/g Trockengewicht)	321,3	403,6	175,3	66,8

### 3.5 Mutagenese des CRP-Proteins

Metallothioneine als ubiquitär im Tier- und Pflanzenreich vorkommende Proteine weisen auffällige Konservierungen hinsichtlich ihrer Aminosäure-Sequenz auf. Einen evolutionär besonders hohen Konservierungsgrad zeigen dabei die charakteristisch angeordneten Cysteinreste [Kägi, 1991]. Der Austausch von einzelnen Cysteinen gegen andere Aminosäuren führt in vielen Fällen zu Einschränkungen hinsichtlich der Metall-Bindungsfähigkeit der MT oder zum völligen Verlust der Funktionalität des Proteins [Chernaik und Huang, 1991; Cismowski und Huang, 1991]. Aber auch andere Aminosäuren wie Lysin, Arginin oder Serin weisen hinsichtlich ihrer Position in der Polypeptidkette der MT einen hohen Konservierungsgrad auf [Kägi, 1991; Emoto *et al.*, 1996]. Die Funktionalität der Metallothioneine kann auch durch den Austausch dieser Aminosäuren beeinträchtigt werden [Cody und Huang, 1994].

Die strukturellen Ähnlichkeiten des CRP mit den Metallothioneinen wurden im Zusammenhang mit der Funktionalität des CRP-Proteins im heterologen Hefesystem bereits angesprochen (Kap. 3.3.1, Kap. 3.4.3). Wie auch bei den MT tritt innerhalb der repetitiven Einheiten des CRP-Proteins keine Abweichung in der Anordnung der 9 Cysteinreste auf. Aber auch andere Aminosäuren wie Lysin, Prolin, Glutamat oder Glycin weisen hinsichtlich ihrer Positionen in den Repeats einen hohen Konservierungsgrad auf. Die für Metallothioneine vorliegenden Daten legen die Vermutung nahe, dass auch im CRP der Austausch von Cysteinresten oder anderer konservierter Aminosäuren die Funktionalität des Proteins beeinflussen könnte. Durch gezielt in das CRP eingeführte Mutationen sollte diese Fragestellung beantwortet werden.

#### 3.5.1 Einfluss von Mutationen in Repeat-Übergängen auf die Vermittlung der Cadmium-Resistenz

Bei Metallothioneinen aus Säugern ist das Lysin-Motiv in der Hinge-Region zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne hoch konserviert [Hamer, 1986]. Auch beim CRP-Protein fallen Konservierungen im Bereich der Übergänge zwischen den repetitiven Einheiten auf (Tab. 3.10). Neben den Cysteinresten sind vor allem die Aminosäuren Glycin, Prolin und Valin in diesen Bereichen stark konserviert. Analysen von Willuhn [1994] zeigen in dem ansonsten hydrophilen Protein jeweils am Beginn und am Ende der Repeats stark hydrophobe Bereiche. Möglicherweise kommt den Repeat-Übergängen eine wichtige Funktion hinsichtlich der korrekten Faltung des Proteins zu. Es ist denkbar, dass die konservierten Übergänge unter anderem zu den sterischen Voraussetzungen beitragen, die für die mögliche Bildung der Metall-Thiolat-Cluster im CRP nötig sind. Die Untersuchung dieser Fragestellungen erfolgte durch gezielten Austausch von Aminosäuren in den Übergängen zwischen den Repeats 4 und 5 sowie 6 und 7 und der

anschliessenden Expression der Mutationsklone im Cd-hypersensitiven Hefestamm DTY167 mit Hilfe des Vektors pRS425. Die gewünschten Mutationen wurden durch 'site directed'-Mutagenese mit Hilfe von mutagenen Oligonukleotiden in die CRP-cDNA eingebracht (Kap. 2.16). Die Basenaustausche wurden durch Sequenzierung überprüft.

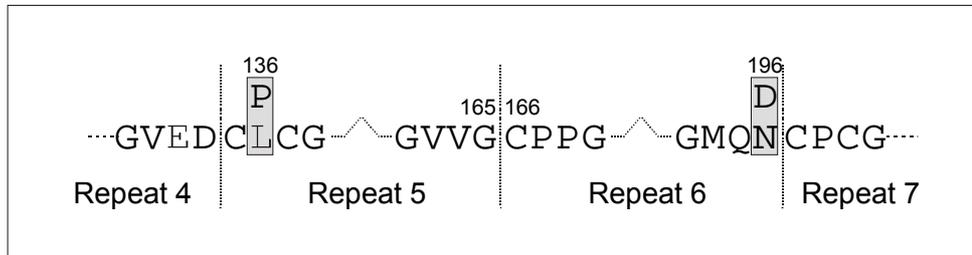
**Tabelle 3.10 Repeatübergänge im CRP.** Dargestellt sind jeweils die letzten und ersten vier Aminosäuren der Übergänge zwischen den einzelnen Repeats im CRP-Protein mit der zugehörigen Nukleinsäuresequenz.

Repeatübergang	Nukleinsäure- und deduzierte Aminosäuresequenz
1 / 2	253 GGA GTG GCA GGC / TGC CCG TGT GGT 38 <b>G V A G C P C G</b>
2 / 3	346 GGA GTT GAA GGA / TGC CCC TGC GGT 69 <b>G V E G C P C G</b>
3 / 4	439 GGA GTG GCA GGC / TGC TCC TGT GGT 100 <b>G V A G C S C G</b>
4 / 5	532 GGA GTT GAA GAT / TGC CCA TGT GGT 131 <b>G V E D C P C G</b>
5 / 6	625 GGA GTT GTT GGC / TGC CCA TGC GGG 162 <b>G V V G C P P G</b>
6 / 7	718 GGA ATG CAG GAC / TGC CCG TGT GGT 193 <b>G M Q D C P C G</b>
7 / 8	811 GAC AAC GTA AAC / TGC AAG TGT GGC 224 <b>D N V N C K C G</b>

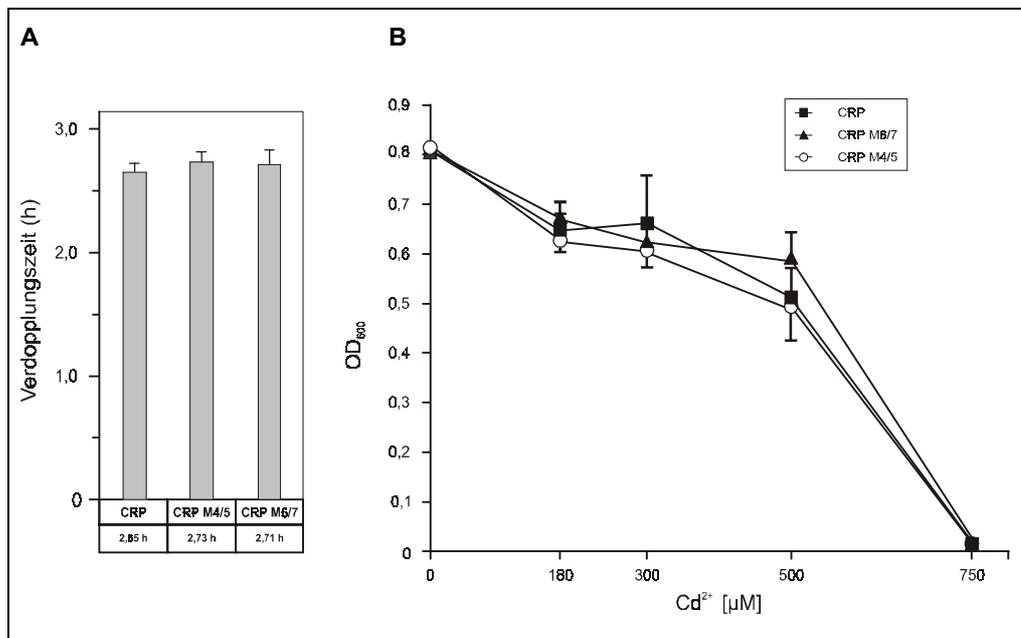
Mit seinem für die ersten fünf Übergänge typischen (GVED/CPCG)-Motiv wurde für die erste Mutation der Übergang vom vierten zum fünften Repeat im Kernbereich des Proteins ausgewählt (Tab. 3.10). Dabei kam es zum Austausch von Prolin gegen Leucin (Abb. 3.24). Die Aminosäure Prolin ist durch seine sekundäre Aminogruppe sehr hydrophil und übt dadurch einen deutlichen Einfluss auf die Architektur von Proteinen aus. Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften ist sie häufig in den Knicken gefalteter Proteinketten zu finden [Creighton, 1993]. Der Austausch von Prolin gegen die hydrophobe Aminosäure Leucin sollte aus diesem Grund einen Einfluss auf die Faltung des CRP-Proteins haben. Dieser erste Mutationsklon wird im folgenden CRP-M4/5 benannt. Eine weitere Mutation wurde in einem zweiten Klon am Repeatübergang von sechs nach sieben eingeführt. Das carboxyterminale Ende des sechsten Repeats zeigt in seiner Aminosäuresequenz deutliche Abweichungen von den übrigen repetitiven Einheiten (Tab. 3.10). In diesem Bereich wurde das negativ geladene Aspartat gegen sein ungeladenes Derivat Asparagin ausgetauscht (Abb. 3.24). Auch diese Mutation sollte die Faltung der Proteinkette und damit möglicherweise die Funktion des Proteins beeinflussen. Dieser zweite Mutationsklon wird im folgenden CRP-M6/7 benannt.

Wie schon bei den vorhergehenden Wachstumsversuchen (Kap. 3.3.1, Kap. 3.4.3) wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurde bei der subletalen Cd-Konzentration von 40 µM die Generationszeit für die Mutationsklone in DTY167 im Vergleich zum Wildtyp-CRP bestimmt. Zum anderen wurden die Klone einer steigenden Cadmium-Belastung ausgesetzt. Bei den Versuchsansätzen zeigen sich jedoch keine Unterschiede im Wachstum zwischen beiden Mutationsklonen und dem Wildtyp-CRP. Die Generationszeiten sind mit 2,73 h für DTY167 CRP-M4/5 und 2,71 h für DTY167 CRP-M6/7 nahezu identisch mit dem für den Wildtyp DTY167 CRP ermittelten Wert von 2,65 h (Abb. 3.25 A). Auch bei steigender Cadmium-Belastung sind keine signifikanten Unterschiede im Wachstum der beiden Mutationsklone im Vergleich zum Wildtyp CRP festzustellen (Abb. 3.25 B). Die eingeführten

Mutationen an den Repeat-Übergängen haben demnach keinen Einfluss auf den protektiven Effekt des CRP für die Cd-hypersensitiven Hefezellen im Verlauf einer Cadmium-Intoxikation. Die für das CRP angenommene Bildung von Cadmium-Thiolat-Clustern scheint durch die sterischen Änderungen in der Polypeptidkette nicht nachweisbar beeinflusst zu werden.



**Abbildung 3.24 Mutation der Repeat-Übergänge 4/5 und 6/7 im CRP-Protein.** Dargestellt sind jeweils die letzten vier Aminosäuren von den carboxyterminalen Enden der Repeats 4 bis 6 sowie die ersten vier Aminosäuren der nachfolgenden Repeats 5 bis 7. Grau unterlegt sind die mutierten Bereiche mit den entsprechenden AS-Austauschen. Die ausgetauschten ursprünglichen AS stehen über den neu eingeführten AS.



**Abbildung 3.25 Wachstum der Mutationsklone CRP-M4/5 und CRP-M6/7 in DTY167 bei verschiedenen Cadmium-Konzentrationen.** **[A]** Verdopplungsraten der Mutationsklone CRP-M4/5 und CRP-M6/7 in DTY167 bei 40 µM CdCl<sub>2</sub>. Als Vergleich diente das Wildtyp CRP-Protein in DTY167 Zellen (CRP). Je 40 ml SD-Medium ohne Leucin und Methionin mit 40 µM CdCl<sub>2</sub> wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die erste Probenentnahme erfolgte zu Beginn der log-Phase nach 16 h. Die Optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogrammes MS Excel wurden die Verdopplungsraten für die jeweiligen Kulturen bestimmt. **[B]** Wachstum der Mutationsklone CRP-M4/5 und CRP-M6/7 in DTY167 bei steigenden Cadmiumkonzentrationen. Als Vergleich diente das Wildtyp CRP-Protein in DTY167 Zellen (CRP). Je 7 ml SD-Medium ohne Leucin und Methionin mit 0, 180, 300, 500 und 750 µM CdCl<sub>2</sub> wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach 72 h wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt

Bei Betrachtung der in diesem Versuchsansatz ermittelten Generationszeit von 2,65 h für DTY167 CRP fällt auf, dass dieser Wert von den in Kapitel 3.3.1 (2,9 h) und Kapitel 3.4.3 (3,17 h) angegebenen Zeiten für diesen Klon abweicht. Ähnliches gilt für die  $OD_{600}$  bei 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  nach 72 h im Vergleich zu Kapitel 3.4.3. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden über den Zeitraum von etwa 2 Jahren unter vergleichbaren Kulturbedingungen durchgeführt. Die Bedingungen waren jedoch von experimentell bedingten Variabilitäten wie vom Einsatz verschiedener Chargen des entsprechenden SD-Mediums und der  $\text{CdCl}_2$ -Stammlösung beeinflusst. Diese und andere Faktoren können unterschiedliche Wachstumsraten nach sich ziehen. Um eine Vergleichbarkeit der ermittelten Werte zu gewährleisten, wurden die jeweiligen Versuchsreihen parallel unter gleichen Kulturbedingungen durchgeführt.

### 3.5.2 Einfluss von Mutationen im Repeat 4 des CRP auf die Vermittlung der Cadmium-Resistenz

Das vierte Repeat des CRP-Proteins (Abb. 3.26) zeigt bei der Expression in dem Cd-hypersensitiven Hefestamm DTY167 einen protektiven Effekt bei einer Cd-Belastung der Zellen (Kap. 3.4.3). Durch die Herstellung von Mutationsklonen, bei denen jeweils ein Cystein im CRP-R4 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde und der anschließenden Expression der Klone in DTY167 unter Cd-Belastung, sollte die Bedeutung der einzelnen Cysteinreste für die Vermittlung einer Cadmium-Resistenz untersucht werden. Die gewünschten Mutationen wurden wie bereits bei den Repeat-Übergängen (Kap. 3.5.1) durch 'site directed'-Mutagenese mit Hilfe von mutagenen Oligonukleotiden in das Fragment CRP-R4 eingebracht (Kap. 2.16). Der jeweils erfolgte Basenaustausch wurde durch Sequenzierung überprüft. Für die Expression in den Hefen wurde der Vektor pRS425 ohne N-terminales cMyc-Tag verwendet (Kap. 3.4.1). Die Mutationsklone werden im folgenden nach der Aminosäureposition des ausgetauschten Cysteins im CRP-R4 benannt (Abb. 3.26). So steht beispielsweise CRP-R4C18 für den Austausch des Cysteins an der Position 18 in der Polypeptidkette des vierten CRP-Repeats. Die Vermittlung der Cadmium-Resistenz durch die CRP-R4-Mutationsklone wurde sowohl bei subletalen als auch bei Cadmium-Belastungen im toxischen Bereich untersucht. Für den subletalen Bereich wurde bei dieser Versuchsreihe die Generationszeit bei einer Cadmium-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  bestimmt. Das Wachstum an der Cd-Grenzkonzentration erfolgte bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ .

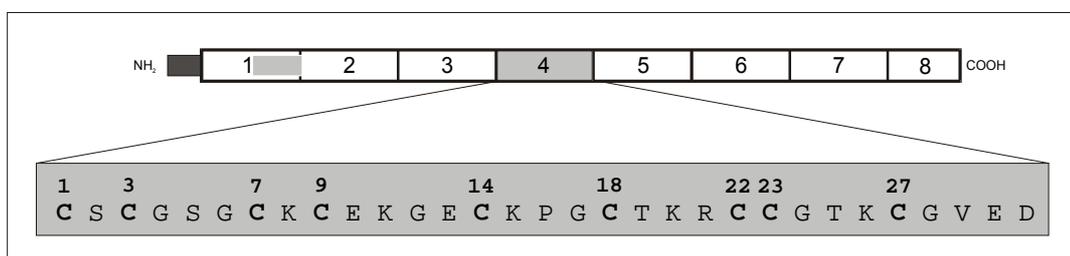
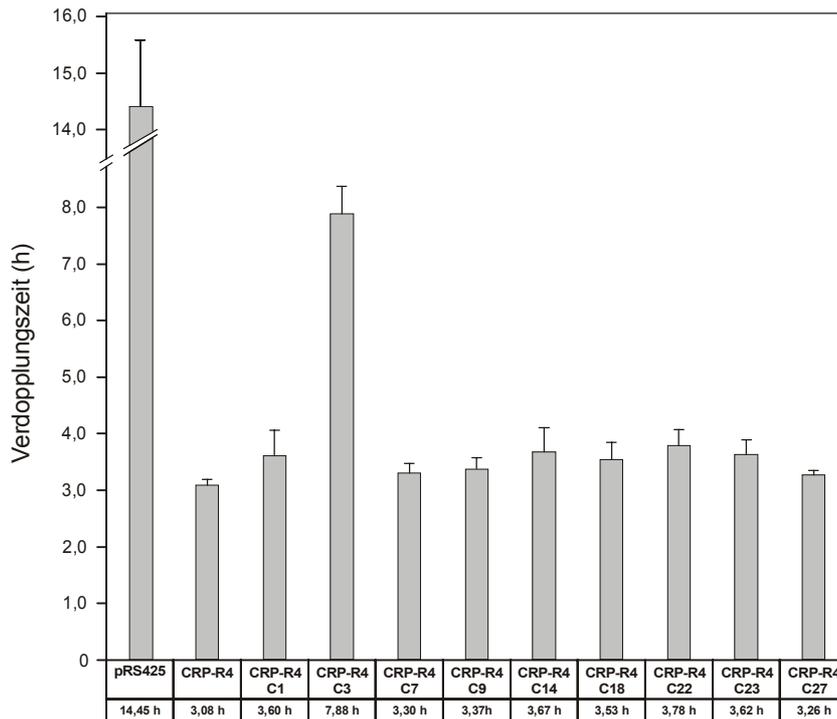


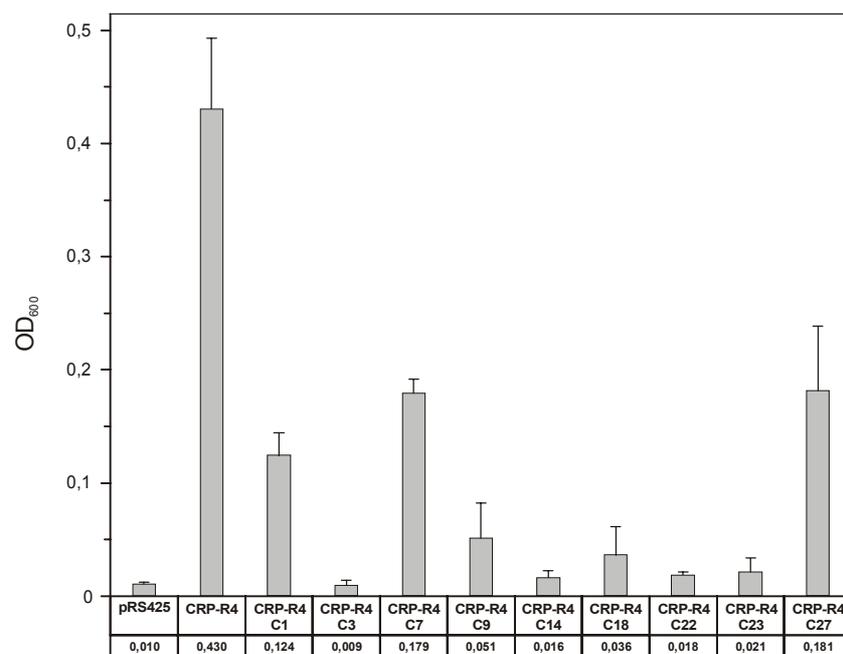
Abbildung 3.26 Schematische Darstellung des CRP-Proteins und der Sequenz des Repeats 4 mit Position der einzelnen Cysteinreste in der Polypeptidkette [nach Willuhn, 1994].



**Abbildung 3.27 Verdopplungsraten der einzelnen Mutationsklone des CRP-Repeat 4 in DTY167 bei 30 µM CdCl<sub>2</sub>.** Als Vergleich diente das Wildtyp CRP-R4 in DTY167 Zellen (CRP-R4). Je 40 ml SD-Medium ohne Leucin und Methionin mit 30 µM CdCl<sub>2</sub> wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die erste Probenentnahme erfolgte zu Beginn der log-Phase nach 16 h. Die Optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogrammes MS Excel wurden die Verdopplungsraten für die jeweiligen Kulturen bestimmt.

Die Ergebnisse beider Versuchsansätze ergeben ein weitgehend einheitliches Bild für die Bedeutung der einzelnen Cysteinreste bei der Vermittlung des protektiven Effektes durch das CRP-R4 in DTY167 Zellen. Auffällig ist, dass keiner der Mutationsklone den schützenden Effekt des Wildtyps CRP-R4 erreicht. So zeigt CRP-R4 mit einer Generationszeit von 3,08 h bei 30 µM CdCl<sub>2</sub> das schnellste Wachstum aller Klone (Abb. 3.27). Auch bei 100 µM CdCl<sub>2</sub> erreicht CRP-R4 nach 72 h mit 0,43 die höchste Optische Dichte bei 600 nm aller Kulturen (Abb. 3.28). Alle Cysteinreste haben offenbar eine so grosse Bedeutung für die Funktion des vierten Repeats, dass sich der Verlust jedes einzelnen Cysteins grundsätzlich negativ hinsichtlich der Cadmium-Detoxifizierungseigenschaften des Fragmentes auswirkt. Die in diesem Versuchsteil ermittelte Optische Dichte für DTY167 CRP-R4 liegt mit 0,43 über den für denselben Klon beobachteten Wert von 0,11 bei Versuchsansätzen zur Expression der CRP-Deletionsklonen (Kap. 3.4.3). Dies ist auf die bereits in Kapitel 3.5.1 aufgeführten experimentellen Variabilitäten zurückzuführen. Beim Vergleich der einzelnen Mutationsklone untereinander sind Unterschiede im Wachstum der einzelnen Kulturen erkennbar, die auf eine unterschiedliche Bedeutung der einzelnen Cysteinreste schliessen lassen. Am auffälligsten ist dabei der Klon CRP-R4C3. Dieser zeigt bei 30 µM CdCl<sub>2</sub> eine Generationszeit von 7,88 h, was einer Erhöhung um Faktor 2,5 gegenüber dem CRP-R4 und durchschnittlich um Faktor 2 gegenüber den übrigen Mutationsklonen entspricht (Abb. 3.27). Dennoch scheint CRP-R4C3 bei subletalen Cd-Konzentrationen einen protektiven Effekt zu haben, da die Generationszeit dieses Klons bei 30 µM CdCl<sub>2</sub> nur halb so lang ist wie der für die Vektorkontrolle DTY167 pRS425 ermittelte Wert. Bei 100 µM

CdCl<sub>2</sub> ist jedoch bei DTY167CRP-R4C3 ebenso wie bei der Vektorkontrolle kein Wachstum mehr zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigen sich beim Verlust der Cysteinreste 7 und 27 die geringsten Auswirkungen auf die Funktion des CRP-Fragmentes (Abb. 3.27; Abb. 3.28). Für diese beiden Klone ist mit Verdopplungszeiten von 3,3 bzw. 3,26 h das schnellste Wachstum aller Mutationsklone bei 30 µM CdCl<sub>2</sub> zu beobachten. Auch bei der Cd-Grenzkonzentration von 100 µM weisen beide Klone mit jeweils 0,18 die höchste Optische Dichte aller Mutationsklone auf. Anhand der für die Verdopplungszeit und das Wachstum an der Cd-Grenzkonzentration ermittelten Daten lassen sich die Cysteinreste hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Cd-Detoxifizierung in zwei Gruppen einteilen: Zum einen Cysteinreste, deren Austausch zwar zur Beeinträchtigung in der Funktion des CRP-R4 führt, bei denen die Mutationsklone jedoch sowohl bei subletalen als auch bei höheren Cadmium-Konzentrationen begrenzt in der Lage sind, eine Cadmium-Toleranz in den DTY167 Zellen zu vermitteln. Zu dieser Gruppe sind die Cysteinreste an den Positionen 1, 7, 9 und 27 zu zählen (Abb. 3.29). Auf der anderen Seite stehen die Cysteinreste, die bei subletalen Cd-Konzentrationen zwar zu einem Schutz in den Zellen beitragen, deren Fehlen aber bei 100 µM CdCl<sub>2</sub> zum völligen Verlust der Cd-Toleranz in den Zellen führt (Abb. 3.29). Diese Gruppe umfasst die Cysteine an den Positionen 3, 14, 18, 22 und 23, wobei der Effekt bei Verlust des Cystein 3 am stärksten ausfällt.



**Abbildung 3.28** Wachstum der einzelnen Mutationsklone des CRP-Repeat 4 in DTY167 bei 100 µM CdCl<sub>2</sub>. Als Vergleich diente Wildtyp CRP-R4 in DTY167 Zellen (CRP-R4). Je 7 ml SD-Medium ohne Leucin und Methionin mit 100 µM CdCl<sub>2</sub> wurden aus 24 h-Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,005 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach 72 h wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 600 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 bestimmt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass jeder der hergestellten Mutationsklone im Vergleich zum Wildtyp CRP-R4 unterschiedlich starke Beeinträchtigungen bei der Vermittlung einer Cadmium-Toleranz in DTY167 aufweist. Je nach Position des Cystein-Austausches wird die Konformation des CRP-R4 möglicherweise so beeinflusst, dass eine stabile Komplexierung von Cd<sup>2+</sup>-Ionen beeinträchtigt ist. Dies macht sich für die Zellen vor allem bei Cadmium-



## 4 Diskussion

Für den terrestrischen Oligochaeten *Enchytraeus buchholzi* wird eine beachtliche Toleranz gegenüber dem toxischen Schwermetall Cadmium beobachtet. In diesem Zusammenhang konnte eine mRNA detektiert werden, die für das cysteinreiche CRP-Protein kodiert [Willuhn *et al.*, 1994a, b]. Das aus der zugehörigen cDNA deduzierte Protein besitzt strukturelle Eigenschaften, die ansonsten bei Schwermetall-bindenden Proteinen und Peptiden wie den ubiquitär vorkommenden Metallothioneinen und den pflanzlichen Phytochelatinen zu finden sind. Dazu zählen der hohe Cysteingehalt sowie die Anordnung der Cysteinreste in Cys-Cys- bzw. Cys-X-Cys-Segmenten. Die Regulation des Gens erfolgt auf Transkriptionsniveau, wobei eine schnelle und spezifische Induktion des nicht konstitutiv exprimierten Gens durch Cadmium zu beobachten ist [Willuhn *et al.*, 1996]. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wird eine Einbindung des CRP-Proteins in die Mechanismen der Detoxifizierung von Cadmium bei *E. buchholzi* vermutet. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Annahme insofern bestätigt werden, als dass das CRP sehr effektiv in der Lage ist, eine Cadmium-Resistenz in Cd-hypersensitiven Hefezellen zu vermitteln. Der Umfang der Resistenzvermittlung hängt dabei von der Zahl der exprimierten repetitiven Einheiten des Proteins ab. Zudem konnte die genomische Struktur des zugehörigen *crp*-Gens aufgeklärt werden. Damit wird zum ersten Mal ein Gen für ein Schwermetall-bindendes Nicht-Metallothionein-Protein beschrieben.

### 4.1 Das Cadmium-induzierbare *crp*-Gen aus *Enchytraeus buchholzi*

Hinsichtlich des Genoms oder der Struktur einzelner Gene von *E. buchholzi* liegen bislang keine Informationen vor. Auch aus den phylogenetisch nahestehenden Lumbriciden sind nur wenige Gene charakterisiert, so beispielsweise Gene für einige Untereinheiten des Hämoglobin [Jhiang *et al.*, 1988; Jhiang und Riggs, 1989; Suzuki und Riggs, 1993] oder Aktin [Lewken und Weber, 1996]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird mit dem Cadmium-induzierbaren *crp*-Gen erstmals ein Gen aus einem Enchytraeiden strukturell analysiert.

Das *crp*-Gen ist bei einer Gesamtgröße von etwa 12,0 kb bis 12,3 kb aus insgesamt zehn Exons aufgebaut. Exon eins und Exon zehn beinhalten jeweils den gesamten 5'- bzw. 3'-nichtkodierenden Bereich der korrespondierenden CRP-cDNA. Die Exons zwei bis neun umfassen bis auf die ersten 10 bp den gesamten kodierenden Bereich der cDNA. Eine Besonderheit der CRP-cDNA besteht in ihrer repetitiven Struktur, die sich aus der Aminosäuresequenz des abgeleiteten CRP-Proteins ergibt. Jede repetitive Einheit kodiert dabei für 31 Aminosäuren und weist dementsprechend 93 bp auf. Eine Ausnahme bildet das verkürzte letzte Repeat, welches aus 72 bp besteht. Wie bei der CRP-cDNA findet sich auch bei der Exonverteilung im *crp*-Gen eine repetitive Struktur. So sind die Exons drei bis acht aus dem Kernbereich des Gens ebenfalls aus jeweils 93 bp aufgebaut. Sie korrespondieren mit den Repeats drei bis sieben der CRP-cDNA. Allerdings sind die Exons jeweils um 8 bp gegenüber dem Beginn der Repeats strangaufwärts versetzt. Gleiches ist bei dem verkürzten achten Repeat der cDNA und dem zugehörigen Exon neun (81 bp) zu beobachten. Jedes Exon aus dem Kernbereich des Gens ist demnach an zwei repetitiven Elementen der cDNA beteiligt.

Typischerweise zeigen die Gene aus Vertebraten im Vergleich zu den Genen anderer Eukaryoten wie Invertebraten, Pflanzen oder Pilzen Unterschiede in ihrer Exon/Intron-Struktur. Während die Mehrzahl der Vertebraten-Gene relativ kleine Exons und grosse Introns aufweist,

findet sich bei den niederen eukaryotischen Organismen mit vergleichsweise kleinen Introns bei grösseren Exons ein umgekehrtes Verhältnis. [Hawkins, 1988; Deutsch und Long, 1999]. Das *crp*-Gen mit seinen von grossen Introns umgebenen kleinen Exons zeigt demnach ein Exon/Intron-Muster, welches eher typisch für Vertebraten-Gene ist. Ausnahmen hinsichtlich der Grösse bilden beim *crp* die begrenzenden Exons eins und zehn, welche mit 172 bp und 579 bp deutlich grösser als die übrigen acht Exons sind. Ein solches Muster, bei dem die internen Exons tendentiell kleiner als die 5'- und 3'-terminalen Exons sind, ist bei den meisten eukaryotischen Genen zu finden [Robbersson *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1996].

Die Exon/Intron-Struktur eines Gens hat einen grossen Einfluss auf die Effektivität der Spleissvorgänge an der prä-mRNA. So sind grosse Exons (>500 bp) inkompatibel für den Spleissapparat, wenn sie von grossen Introns umgeben sind [Sterner *et al.*, 1996]. Auch die Länge der Introns kann für die initiale Erkennung der Spleiss-Stellen durch das Spleissosom limitierend wirken. Introns von weniger als 70 bp werden in Säugern, die sich durch relativ grosse Introns auszeichnen, nicht oder nur selten gespleisst. Solche Introns werden in Invertebraten wie *C. elegans* oder *Drosophila*, deren Gene durch kurze Intron-Sequenzen gekennzeichnet sind, sehr effektiv aus prä-mRNAs herausgeschnitten [Mount *et al.*, 1992]. Es müssen demnach in den verschiedenen Organismen speziell an die Charakteristik der vorherrschenden Genstrukturen angepasste Spleissmechanismen existieren. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass Introns aus *S. cerevisiae* oder *Nicotiana tabacum* in menschlichen Zellextrakten zwar effektiv gespleisst werden, umgekehrt dies jedoch nicht der Fall ist [Langford *et al.*, 1983; Ruskin *et al.*, 1986; Wiebauer *et al.*, 1988]. Dagegen werden prä-mRNAs aus Säugern effektiv in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* prozessiert [Kaufer *et al.*, 1985]. Es ist zu vermuten, dass auch in *E. buchholzi* spezifische Spleissmechanismen existieren. Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt das *crp*-Gen, so ist festzustellen, dass die Exon/Intron-Übergänge den Konsensus-Sequenzen entsprechen, die generell für das Spleissen genutzt werden können [Breathnach und Chambon, 1981; Stephens und Schneider, 1992]. Übereinstimmend mit vielen Introns anderer Invertebraten und Pflanzen weisen die Introns im *crp*-Gen mit etwa 70 % einen hohen AT-Gehalt auf. Dies erleichtert die Spleissvorgänge, da die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA erschwert wird und somit die Spleissfaktoren einen leichteren Zugang zu ihren Erkennungssequenzen in den Introns haben [Csank *et al.*, 1990]. Im Fall des *crp*-Gens ist dies aufgrund der sehr langen Intronsequenzen von möglicherweise entscheidender Bedeutung. Bestätigt wird der Einfluss des AT-Gehaltes in den Introns auf die Prozessierung von prä-mRNAs durch die Beobachtung, dass bei den grundsätzlich GC-reicheren Introns der Vertebraten besonders am 3'-Ende Pyrimidin-reiche Regionen mit einem hohen T-Anteil zu finden sind [Csank *et al.*, 1990]. Der im Vergleich zu den Introns mit etwa 55 % deutlich höhere GC-Gehalt in den kodierenden Exons des *crp*-Gens erleichtert durch eine bessere Differenzierbarkeit der Exon/Intron-Struktur die Prozessierung der prä-mRNA. Die vor allem für Invertebraten-Gene sehr langen Introns des *crp* und die überdurchschnittlich grosse Anzahl an Exons deuten auf die nicht-konstitutive Expression des Gens hin, da konstitutiv exprimierte Gene wie unter anderem die an der Schwermetall-Homöostase beteiligten Metallothionein-Gene häufig eine insgesamt kompaktere Genstruktur mit deutlich kleineren Introns aufweisen [Hamer 1986; Bernardi, 1995; Carels und Bernardi, 2000].

In Übereinstimmung mit dem repetitiven Aufbau der CRP-cDNA und der charakteristischen Exonstruktur weisen auch die Introns des *crp*-Gens eine Reihe von sich wiederholenden

Sequenzelementen auf. Die repetitiven Strukturen lassen sich dabei in drei Gruppen einteilen. Als erstes finden sich vier Fragmente mit direkten Sequenzwiederholungen und eine invertierte repetitive Einheit. Die Länge der Repeats reicht dabei von 38 bp bis 174 bp. Sie weisen Sequenzhomologien von 81 % bis 99 % auf. Zumeist sind die Repeats in benachbarten Introns gelegen. Eine Ausnahme bildet das Repeat A, bei dem sich die beiden Sequenzmotive in den Introns eins und sieben befinden und somit etwa 6,5 kb voneinander entfernt liegen.

Die zweite Gruppe repetitiver Strukturen im *crp*-Gen besteht aus mehreren direkt aufeinander folgenden Sequenzwiederholungen in den Introns sieben und neun. Im neunten und letzten Intron des *crp*-Gens sind sieben je 33 bp umfassende, grösstenteils sequenzidentische Fragmente positioniert. Im Intron sieben befinden sich elf repetitive Elemente mit einer Kern-Konsensus-Sequenz für MREs ('metal responsive elements'). In Reporter-gen-Assays konnte eine Enhancer-Wirkung dieser regulatorischen Sequenzmotive nachgewiesen werden [Koewius, 1998]. Über Gelretentions-Analysen wurde die Bindung Cadmium-spezifischer Transkriptionsfaktoren an die in den Fragmenten enthaltenen MREs gezeigt. Aus diesem Grund wurden die Exon -und Intronbereiche des *crp*-Gens auf das Vorkommen weiterer potentieller Enhancer-Sequenzmotive hin untersucht. Dabei finden sich sowohl in den Exons als auch den Introns weitere Konsensus-Sequenzen für MREs. Auffällig ist dabei vor allem das Vorkommen von je drei MREs im ersten Intron und im vierten Exon sowie das Auftreten von je zwei dieser Elemente im Intron acht und in den Exons drei, sieben und acht. Neben den Motiven für MREs sind überwiegend in den Intron-Bereichen Konsensus-Sequenzen für HSE ('heat shock elements') lokalisiert. An die konservierte DNA-Sequenz der HRE binden 'heat shock transcription'-Faktoren (HSF), die sehr effektiv die Expression von Genen induzieren, welche in die zellulären Schutzmechanismen gegen Hitzeschock, aber auch andere chemische und physiologische Stressfaktoren eingebunden sind [Wu, 1995; Santoro *et al.*, 1998]. Dementsprechend finden sich HSE hauptsächlich in den Promotoren von HSF-responsiven Genen, unter anderem auch in den Promotoren von Metallothionein-Genen [Tamai *et al.*, 1994]. Für das humane *mt-IIA*-Gen wurde eine Aktivierung durch Cadmium über HSE-bindende Faktoren nachgewiesen [Murata *et al.*, 1999]. Es ist demnach denkbar, dass auch in *E. buchholzi* spezifische Transkriptionsfaktoren durch Cadmium aktiviert werden, die über die Bindung an HSE-Elemente im *crp*-Gen Einfluss auf die Transkription des Gens nehmen. HSE-Konsensus-Sequenzen finden sich im Gegensatz zu den MRE überwiegend in den Intronbereichen. Eine Häufung wird mit jeweils drei Elementen in den Introns eins und acht festgestellt. Die beschriebene auffällige Verteilung von Konsensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren, die unter zellulären Stressbedingungen aktiviert werden und der Nachweis einer Enhancer-Aktivität des repetitiven Elements im Intron sieben legen den Schluss nahe, dass die Cadmium-induzierte Transkription des *crp*-Gens nicht ausschliesslich durch den Promotor gesteuert wird, sondern dass Enhancer-Elemente im Gen ebenfalls an der Aktivierung der Transkription beteiligt sind. Aufgrund der aussergewöhnlichen Häufigkeit der Motive kämen dabei neben Intron sieben vor allem die Introns eins (3 MRE, 3 HSE) und acht (2 MRE, 3 HSE) als bevorzugte Enhancer-Bereiche in Frage. Zur weiteren Aufklärung der regulativen Mechanismen bei der Expression des *crp*-Gens ist die funktionale Analyse dieser Bereiche notwendig.

Neben den beschriebenen *crp*-spezifischen repetitiven Strukturen finden sich im *crp*-Gen Konsensus-Sequenzen für DNA-Fragmente, die als repetitive Elemente auch in anderen Genomen beschrieben sind. Diese aufgrund ihrer Mobilität als transposable Elemente (TE) bezeichneten Strukturen werden nach ihrer Form der Transposition in DNA-Transposons oder

Retrotransposons eingeteilt. Die von invertierten Sequenzwiederholungen (TIRs - terminal inverted repeats) eingerahmten DNA-Transposons werden als DNA-Elemente ohne Amplifikation direkt im Genom umgelagert. Retrotransposons werden dagegen durch Transkription über RNA-Zwischenformen umgelagert, so dass es bei der Transposition zu einer Amplifikation der entsprechenden Elemente im Genom kommt. Die Einteilung der eukaryotischen Retrotransposons erfolgt in LTR (long terminal repeat)-Elemente, nicht-LTR-Elemente und retrovirale Elemente. Die LTR- und retroviralen Elemente werden von typischen Sequenzwiederholungen an den 5'- und 3'-Enden eingerahmt [Hardman, 1986; Girard und Freeling, 1999; Glöckner *et al.*, 2001]. Repetitive Elemente werden zumeist als "parasitäre" Sequenzen angesehen, haben aber einen starken Einfluss auf die Evolution des Genoms [Jurka, 1998]. Transpositionereignisse können zu spontanen Mutationen und zu einer Umverteilung von DNA-Informationen in den Genomen führen [Xiao und Peterson, 2000]. Einzelne Elemente haben so spezifische Funktionen in Protein-kodierenden Genen übernommen und sind an der Regulation und Expression dieser Gene beteiligt [Britten, 1997]. LTRs sind als Promotoren von Retroviren und retroviralen Elementen in der Lage, die Transkription benachbarter Sequenzen zu steuern [Banville und Boie, 1989]. Andere repetitive Elemente können Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren tragen, die dadurch die Transkription des zugehörigen Gens beeinflussen können [Piedrafita *et al.*, 1996; Szmulewicz *et al.*, 1998].

In den Introns eins, zwei und acht des *crp*-Gens finden sich Konsensus-Sequenzen für Fragmente von DNA-Transposons und LTR-Retrotransposons, die sowohl in Säuger- als auch in Invertebraten-Genomen beschrieben wurden. Am auffälligsten ist dabei das Element *Skipper*, bei dem es sich um ein LTR-Retrotransposon der Ty3/*gypsy*-Familie aus dem Einzeller *Dictyostelium* handelt [Leng *et al.*, 1998]. Dieses etwa 7000 bp grosse Element beinhaltet in drei offenen Leserastern die retroviralen *gag*-, *pol*- und *pro*-Gene. Die im zweiten Intron des *crp*-Gens gelegene invertierte Konsensus-Sequenz korrespondiert mit einem im 5' flankierenden Bereich des *gag*-Gens gelegenen Segment des *Skipper*-Fragments. Für die mit dem Retroelement verwandten Ty-Elemente aus *S. cerevisiae* konnten Enhancereigenschaften nachgewiesen werden [Girard und Freeling, 1999]. Möglicherweise besitzt das *Skipper*-Fragment im Intron zwei Promotoreigenschaften, welche die Transkription des Gens beeinflussen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch die Verteilung der übrigen repetitiven Elemente auf die Introns eins und acht, für die bereits aufgrund der Häufung von Konsensus-Sequenzen für Cadmium-induzierbare Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit von regulierenden Eigenschaften bei der Transkription des *crp*-Gens diskutiert wurde.

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden gehört zu den wichtigsten epigenetischen Modifikationen in den Genomen von Vertebraten. Sie wird dabei in den Organismen vor allem mit der Transkriptionskontrolle von Genen in Verbindung gebracht. So können methylierte CpG-Dinukleotide in Promotoren zur Repression der Transkription nachgeschalteter Gene beitragen [Bird *et al.*, 1995; Majumder *et al.*, 1999; Ghoshal *et al.*, 2000]. Die genomischen Methylierungsmuster werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt: Genome der Klasse A sind nicht methyliert und zeigen aus diesem Grund keinen Effekt beim Verdau mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen wie HpaII. Diese Gruppe umfasst einige Invertebraten wie beispielsweise *Drosophila* und *C. elegans* [Rae und Steele, 1979; Bird und Taggart, 1980]. Genome, die in die Klasse B eingeordnet werden, weisen nur teilweise Methylierungen auf. Der Anteil methylierter Cytosinreste in CpG-Dinukleotiden variiert dabei zwar von Spezies zu Spezies, liegt ge-

nerell jedoch unter 50 %. In dieser Gruppe finden sich ebenfalls ausschliesslich Invertebraten wie beispielsweise Vertreter der Anneliden, Mollusken oder Echinodermaten [Bird *et al.*, 1979; Bird und Taggart, 1980]. Die weitgehend methylierten Genome der Klasse C treten bei den Vertebraten auf, bei denen die Cytosinreste in 60 – 90 % der CpG-Dinukleotide methyliert sind [Tweedie *et al.*, 1997]. Durch Restriktionsanalysen mit den Isoschizomeren HpaII und MspI konnte eine schwache Methylierung des Genoms von *Enchytraeus buchholzi* nachgewiesen werden, die zu einer Einordnung in die Gruppe der Klasse B Genome führt. Anders als bei den weitgehend methylierten Genomen der Vertebraten, bei denen nicht-methylierte Bereiche vor allem in den nur einige 100 bp grossen CpG-Inseln zu finden sind, wechseln sich bei den nur teilweise methylierten Genomen von Invertebraten kürzere, stark methylierte Bereiche mit langen unmethylierten Domänen ab. Anhand von 'Southern Blot'-Analysen mit dem *crp*-Promotor und der CRP-cDNA wurde festgestellt, dass das *crp*-Gen mit seinem 5'-flankierenden Bereich in einem dieser methylierten Segmente des Genoms von *E. buchholzi* lokalisiert sein muss. Allerdings ist der Methylierungsstatus in dem untersuchten Teil des Genoms nicht einheitlich, da es neben dem beobachteten Bandenverschiebung für HpaII beim Einsatz von Gesamt-DNA auch zu gleichen Hybridisierungsereignissen bei den beiden eingesetzten Restriktionsenzymen kommt. Möglicherweise existieren auch bei Invertebraten wie *Enchytraeus* gewebsspezifische Unterschiede im Methylierungsmuster einzelner Gene, die vor allem für viele der nicht mit CpG-Inseln assoziierten Vertebraten-Gene beschrieben werden [Cedar, 1988; Bird, 1992].

Bei Vertebraten existieren mehrere Mechanismen, welche für die Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung verantwortlich sein können. So kann es durch die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in den Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren wie AP-2, c-Myc/Myn, E2F oder NF- $\kappa$ B zu einer Hemmung der Bindung dieser Faktoren an die DNA kommen [Singal und Ginder, 1999]. Dagegen sind andere Transkriptionsfaktoren wie Sp1 oder CTF nicht durch Methylierungen in ihren Erkennungssequenzen beeinflusst [Tate und Bird, 1993]. Ein zweiter Mechanismus der Transkriptionshemmung besteht in der direkten Bindung von Repressor-Proteinen an die methylierte DNA. Sehr gut charakterisiert sind dabei die beiden Faktoren MeCP-1 und MeCP-2 (methyl-CpG binding proteins) [Boyes und Bird, 1992; Razin, 1998; Kaludov und Wolffe, 2000]. Während MeCP-1 an mehrere symmetrisch angeordnete Methyl-CpGs bindet, ist MeCP-2 auch in der Lage, sich an einzelne CpG-Dinukleotide anzulagern. Daneben konnten in diesem Zusammenhang mittlerweile weitere Proteine identifiziert werden, die charakteristische Domänen der Methyl-CpG-bindenden Proteine aufweisen [Fujita *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000]. Ein dritter potentieller Mechanismus der Transkriptionshemmung liegt in der erhöhten Bindungsaffinität von Histonen an methylierte DNA, wodurch es zu einer dichteren Packung der Chromatinfasern und zu veränderten Transkriptionsmustern kommen kann [Singal und Ginder, 1999]. Der bei Vertebraten bestehende Zusammenhang zwischen der Reprimierung der Genexpression und der DNA-Methylierung im 5'-flankierenden Bereich der betroffenen Gene wird auch bei Metallothionein-Genen in verschiedenen Geweben und Organismen beobachtet [Compere und Palmiter, 1981; Cedar und Razin, 1990; Jahroudi *et al.*, 1990]. Der Einbau des nicht methylierbaren Cytosin-Analogons 5-Azacytidin (5-azaC) in die DNA der betroffenen Bereiche führt zu einer Induzierbarkeit der ursprünglich reprimierten MT-Gene [Stallings *et al.*, 1986; Price-Haughey *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1990].

Über die Funktion von DNA-Methylierungen bei Invertebraten und Pflanzen ist bislang nur wenig bekannt. In *Arabidopsis thaliana* wird die Methylierung von einigen Bereichen des Genoms ebenfalls mit der Transkriptionshemmung von assoziierten Genen in Verbindung

gebracht [Furner *et al.*, 1998]. Ähnliches gilt für die Pilze *Neurospora crassa* und *Ascobolus immersus*. Für diese beiden Organismen werden hinsichtlich der Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung Mechanismen in Zusammenhang mit Methyl-CpG-bindenden Proteinen diskutiert, die nicht die Initiation der Transkription, sondern die Elongation durch die RNA-Polymerase betreffen [Rhounim *et al.*, 1992; Barry *et al.*, 1993; Rountree und Selker, 1997]. In diesem Fall wären nicht nur die 5'-flankierenden Bereiche der Gene, sondern auch stromabwärts gelegene Abschnitte mit methylierten CpG-Dinukleotiden an einer Repression beteiligt.

Die nachgewiesene Methylierung des *crp*-Gens sowie die ungleichmässige Verteilung von CpG-Dinukleotiden innerhalb des Gens lassen die Vermutung zu, dass an der Kontrolle der Transkription des *crp* auch methylierungsspezifische Mechanismen beteiligt sind. Diese müssen in jedem Fall indirekter Natur sein, da sich durch eine Cadmium-Behandlung der Tiere keine Änderung im Methylierungsmuster ergibt. Wie könnten diese Mechanismen aussehen? Betrachtet man die Verteilung der CpGs im *crp*-Gen, so stellt man eine unterschiedliche Dichte in verschiedenen Bereichen des Gens fest. Im 5'- und im 3'-Abschnitt des Gens sind sowohl in den Exon- als auch in den Intron-Bereichen hohe CpG-Dichten zu finden. Dagegen ist die CpG-Dichte im mittleren Abschnitt des Gens von Intron zwei bis Intron sieben vergleichsweise niedrig. Möglicherweise befinden sich in den Abschnitten mit hoher CpG-Dichte Bindungsstellen für spezielle Methyl-CpG-bindende Proteine wie MeCP-1 oder MeCP-2, die ähnlich wie bei *Neurospora* eine Transkription des Gens verhindern. Durch Cadmium ausgelöste Konformationsänderungen in den Proteinen könnten zu einer Auflösung der DNA-Bindung führen, wodurch die Transkription des Gens ermöglicht würde. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass der MeCP-1-Komplex in Säugern neben der DNA-bindenden Domäne zwei Cysteinreiche Domänen (Cys-X-X-Cys) aufweist, deren Funktionalität bisher jedoch noch nicht aufgeklärt ist [Singal und Ginder, 1999]. Denkbar ist natürlich auch eine Bindung der MeCPs im Promotorbereich des Gens, welche eine Initiation der Transkription verhindern. Das unterschiedliche Methylierungsmuster im Bereich des *crp*-Gens lässt aber auch andere Mechanismen für die Funktion der DNA-Methylierung möglich erscheinen. Ausgehend von einer gewebsspezifischen Methylierung des *crp*-Gens könnte es in den betreffenden Geweben durch die Methylierung über die oben beschriebenen Mechanismen zu einer dauerhaften Reprimierung des Gens kommen. In anderen, möglicherweise besonders in Entgiftungsmechanismen involvierten Geweben wie dem Chloragog- oder dem Darmgewebe würde das *crp*-Gen in seiner unmethylierten Form vorliegen. Im Falle des durch Cadmium ausgelösten Stresses wäre die Expression des Gens dort sehr schnell induzierbar. Eine gewebsspezifische Expression wird bei den Metallothionein-Genen *smtb1* und *smta* des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* beobachtet, dessen Genom ebenfalls Methylierungen aufweist [Wilkinson und Nemer, 1987; Nemer *et al.*, 1991; Tweedie *et al.*, 1997].

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse der strukturellen Analyse des Cadmium-induzierbaren *crp*-Gens unter dem Gesichtspunkt der Transkriptionskontrolle, so lassen die vorhandenen spezifischen Strukturen wie die Konsensus-Sequenzen für MREs und HSEs im Gen, die repetitiven Elemente und das Methylierungsmuster des *crp*-Gens auf komplexe Mechanismen bei der Kontrolle des Gens schliessen. Es ist anzunehmen, dass die Expression des Gens nicht ausschliesslich über den Promotor gesteuert wird. Die erzielten Ergebnisse bieten so weitere Ansatzpunkte zur Aufklärung der Cadmium-spezifischen und möglicherweise gewebsspezifischen Expression des *crp*-Gens.

## 4.2 Vergleich von CRP und Metallothioneinen

Metallothioneine sind ubiquitär vorkommende Proteine, die in ihrer Proteinstruktur sowohl bei Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen und Pilzen vielfältige Konservierungen aufweisen. Auch hinsichtlich der genomischen Organisation der zugehörigen Gene bestehen zwischen den verschiedenen taxonomischen Gruppen auffällige Übereinstimmungen. Metallothionein-Gene von Säugern zeigen eine typische 3 Exon/2 Intron-Struktur, wobei die Exons in den verschiedenen Spezies weitgehend konserviert sind, die Introns in Grösse und Sequenzabfolge jedoch variieren können. Während das erste Exon den 5'-nicht-kodierenden Bereich sowie die Sequenz für die ersten 9 1/3 Aminosäuren umfasst, kodiert das zweite Exon für die Aminosäuren 9 bis 31 1/3. Im letzten Exon ist dann die Sequenz für die Aminosäuren 32 bis 61 (62) sowie der 3'-nichtkodierende Bereich der entsprechenden MT-mRNA zu finden [Karin und Richards 1982; Searle *et al.*, 1984; Peterson *et al.*, 1988; Samson und Gedamu, 1998; Ghoshal und Jacob, 2000]. Überträgt man die Exonstrukturen auf die Proteinebene, so kodieren die Exons 1 und 2 für die N-terminale  $\beta$ -Domäne einschliesslich der Hinge-Region zwischen den beiden Domänen. Die Sequenz für die komplette C-terminal gelegene  $\alpha$ -Domäne bis hin zum Stop-Kodon ist dann in Exon 3 enthalten. Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich bei den Introns der MT-Gene um Phase 1 Introns, die nach der ersten Base eines Kodons zwischen die Exons eingefügt sind. Die Metallothionein-Gene anderer Vertebraten zeigen ebenfalls die typische 3 Exon/2 Intron-Struktur der Säuger mit der charakteristischen Exon-Aufteilung in Bezug auf die Protein-Domänen [Kille *et al.*, 1993; Saint-Jacques *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996]. Auch die Introns entsprechen den Phase 1 Introns der Säuger, sind im Durchschnitt jedoch kleiner als diese.

In Übereinstimmung mit einigen strukturellen Unterschieden, die zwischen Metallothioneinen aus Vertebraten und Invertebraten bestehen, zeigen sich auch Abweichungen hinsichtlich der Organisation der zugehörigen Gene. So bestehen die *mtl* und *mtll*-Gene aus *C. elegans* aus 2 Exons, die jeweils durch ein Intron getrennt sind [Freedman *et al.*, 1993]. Das erste Exon enthält insgesamt 16 bp der kodierenden Region (5 1/3 AS). Der Rest (69 2/3 AS) der kodierenden Region wird in beiden Genen vom zweiten Exon kodiert. Obwohl die Metallothioneine MTo und MTn aus *Drosophila* mit 43 bzw. 40 AS deutlich kleiner als die MT aus *C. elegans* sind, weisen die zugehörigen Gene (*mto*, *mtn*) ebenfalls die 2 Exon/1 Intron-Struktur auf [Lange *et al.*, 1990; Silar *et al.*, 1990]. Auch bei *Drosophila* fällt der geringe Anteil der ersten Exons an der kodierenden Sequenz (7 1/3 AS *mtn*, 8 1/3 AS *mto*) auf. Fast die gesamte kodierende Region ist jeweils in den zweiten Exons enthalten. Die Introns der *Drosophila*-Gene entsprechen wie bei *C. elegans* Phase 1 Introns. Das Cadmium-Metallothionein-Gen aus dem Einzeller *Tetrahymena pyriformis*, welches für ein 107 bp grosses Proteinprodukt kodiert, ist dagegen intronlos [Piccinni *et al.*, 1999]. Das MT-Gen der Muschel *Perna viridis* weist die für die Vertebraten typische 3 Exon/2 Intron-Struktur mit Phase 1 Introns auf [Khoo und Patel, 1999]. Auch im Pflanzenreich sind Gene für Metallothioneine oder Metallothionein-ähnliche Proteine bekannt. So bestehen die Gene aus *Arabidopsis thaliana* aus zwei Exons und einem Intron [Zhou und Goldsbrough, 1995]. Zwischen die Exons der MT-Gene von Pflanzen sind die Intronsequenzen im Gegensatz zu den Genen von Vertebraten und Invertebraten als Phase 2 Introns eingefügt. Abweichend von den übrigen Invertebraten sind die Metallothionein-Gene aus *Lumbricus rubellus* aus mindestens 4 Exons aufgebaut.

Mit dem *crp* aus *Enchytraeus buchholzi* konnte erstmals ein Gen charakterisiert werden, welches für ein cysteinreiches Nicht-Metallothionein-Protein kodiert. Es stellt sich die Frage, ob beim Vergleich der Genstrukturen Hinweise auf einen ursprünglichen Zusammenhang zwischen dem *crp*-Gen und Metallothionein-Genen zu finden sind, die möglicherweise weiteren Aufschluss über die Funktionalität des CRP-Proteins geben könnten. Beim Vergleich der genomischen Strukturen ist festzustellen, dass trotz unterschiedlicher Grössen zwischen den zum Teil sehr stark konservierten Organisationsmustern der Metallothionein-Gene und einigen strukturellen Eigenschaften des *crp*-Gens tatsächlich Ähnlichkeiten zu finden sind. Dazu gehören die charakteristische Struktur der ersten Exons sowie die vergleichbaren Eigenschaften bezüglich der stark konservierten Exon-Typen und der Intron-Phasen. Auch die Grösse der kodierenden Exons im *crp*-Gen ist mit denen der MT-Gene vergleichbar. Die bei den MT-Genen aus Vertebraten zu beobachtende direkte Übereinstimmung zwischen der Exonaufteilung und der Struktur des Proteins ist beim *crp* nicht gegeben. Würde man jedoch die festgelegte Einteilung der Repeats im CRP-Protein entsprechend verschieben, wäre aufgrund der identischen Grössen von Exons und repetitiven Einheiten der cDNA auch für das *crp* eine direkte Übereinstimmung mit den Proteinstrukturen festzustellen. Besonders auffallend sind die Ähnlichkeiten des *crp*-Gens mit den Metallothionein-Genen *mt2A*, *mt2B* und *mt2C* aus *L. rubellus*, einem den Enchytraeen phylogenetisch nahestehenden Oligochaeten. Neben den Ähnlichkeiten in der Exon/Intron-Struktur ergibt ein Sequenzvergleich zwischen den Genen Übereinstimmungen zwischen 50 und 60 %, die sowohl die Exons, aber auch die angrenzenden Intron-Bereiche betreffen. Beim Vergleich der Exons drei und vier der MT-Gene mit der CRP-cDNA konnten die grössten Übereinstimmungen (55 % bis 70 %) in den Bereichen ermittelt werden, die dem Exon-Muster des *crp*-Gens entsprechen. Dementsprechend finden sich auch auf Aminosäure-Ebene zwischen den translatierten Exons der MT-Gene und dem *crp* Ähnlichkeiten von bis zu 77 %.

Welche Schlussfolgerungen sind nun aus den beschriebenen strukturellen Ähnlichkeiten des *crp*-Gens mit den Genen der Metallothioneine zu ziehen? Aufgrund des ubiquitären Auftretens von Metallothioneinen, die auch in den verwandten Oligochaeten *Lumbricus* oder *Eisenia* beschrieben wurden, ist es wahrscheinlich, dass in Enchytraeen unabhängig vom CRP-Protein Metallothioneine vorkommen. Dies gilt umso mehr, als dass auch in Oligochaeten die Metallothioneine in grossem Umfang in die Detoxifizierung von Schwermetallen eingebunden sind [Dallinger *et al.*, 2000]. Da das CRP durch seine Cadmium-spezifische Expression primär jedoch nur bei einer Cd-Belastung exprimiert wird, würde den Enchytraeen bei einer Vergiftung mit anderen Schwermetallen wie Blei oder Quecksilber ein wichtiger Entgiftungsmechanismus fehlen [Stürzenbaum *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2000; Scott-Fordsmann und Weeks, 2000]. Bestätigt wird diese Annahme durch die Detektion niedermolekularer, cysteinreicher Proteine in Enchytraeen Schwermetall-belasteter Böden, bei denen es sich möglicherweise um Metallothioneine handelt [Rüther, 1989]. Metallothionein-Gene können, wie beispielsweise bei einigen Säugern und *Drosophila*, in spezifischen Clustern auftreten [Peterson *et al.*, 1988; Silar *et al.*, 1990, West *et al.* 1990]. Bei *Drosophila* ist die Entstehung solcher Cluster durch Gen-Duplikationen nachgewiesen [Lange *et al.*, 1990]. Ausgangspunkt für die Entstehung des *crp*-Gens sind möglicherweise solche Duplikationen von Metallothionein-Genen. Die auftretenden spezifischen repetitiven Elemente im *crp*-Gen deuten auf rekombinante Umlagerungs- und Amplifikationsvorgänge innerhalb des Gens hin [Belfort und Perlman, 1995; Tarrío *et al.*, 1998]. Solche rekombinanten Ereignisse führten zur Bildung einer Exon-Struktur, die dem Leseraster

des CRP entspricht. Da alle kodierenden Exons im *crp*-Gen einheitlich Klasse 3N Exons sind, führt die Verschiebung oder Amplifikation der Exons nicht zu einem Rasterverschub [Tomita *et al.*, 1996]. In diesem Zusammenhang müssen auch die auffälligen Ähnlichkeiten der Exons des *crp* mit den Exons der MT-Gene aus den phylogenetisch nahestehenden Lumbriciden beachtet werden, die auf einen möglichen gemeinsamen Ursprung hindeuten. Rekombinante Vorgänge innerhalb von Gen-Clustern könnten auch die für Invertebraten-Gene ausserordentlich grossen Intron-Bereiche des *crp* erklären. Die Anhäufung von Konsensus-Sequenzen für Metall-responsive Transkriptionsfaktoren in einigen Intron-Bereichen des *crp*-Gens könnten so als Fragmente ursprünglicher Promotoren von MT-Genen gedeutet werden. Weitere Aufschlüsse im Hinblick auf die Ursprünge des *crp*-Gens führen demnach unter anderem über die Charakterisierung von Metallothioneinen und den zugehörigen Genen in *E. buchholzi*.

Sollte das *crp*-Gen evolutionär tatsächlich gemeinsame Ursprünge mit Metallothionein-Genen haben, so stellt sich die Frage, warum das Gen im Gegensatz zu den meisten MT-Genen nicht konstitutiv exprimiert und die Expression nur spezifisch durch Cadmium induziert wird. Veränderte Sequenzumgebungen in den zusammengelagerten Genabschnitten haben möglicherweise dazu geführt, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren für die ursprünglich basale Expression des Gens verhindert wird. Zudem ist zu beachten, dass auch bei den Metallothioneinen Unterschiede in der Induzierbarkeit durch Stressfaktoren in verschiedenen Geweben existieren können. Metallothioneine der Hefen sind beispielsweise nur durch Kupfer induzierbar, obwohl sie nachweislich auch protektive Effekte bei einer Cadmium-Intoxikation vermitteln [Ecker *et al.*, 1986; Zhou *et al.*, 1992]. Bedingt ist diese Spezifität durch den spezifischen Transkriptionsfaktor CUP2/ACE1, der in Abhängigkeit von Kupfer-Ionen an die spezielle 'CUP1 upstream activation'-Sequenz im Promotor des Gens bindet [Szczycka und Thiele, 1989]. Andere Metallothionein-Gene unterliegen Regulationsmechanismen, die in verschiedenen Geweben zu Unterschieden in der Induzierbarkeit führen. So kann die Expression der MT-Gene in Hoden von Ratten nicht durch Cadmium induziert werden, weshalb diese eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cadmium aufweisen [McKenna *et al.*, 1996]. Isoformen der humanen Metallothioneine I zeigen je nach Zelltyp unterschiedliche Expressionsmuster, für die unter anderem lange 5'- und 3' flankierende DNA-Segmente in den Bereichen der Metallothionein-Gene verantwortlich sind [Heguy *et al.* 1986; Palmiter *et al.*, 1993; Jahroudi *et al.*, 1990]. Eine gewebsspezifische Induzierbarkeit der unter normalen Bedingungen nicht exprimierten MT-Gene aus *C. elegans* wird über GATA-Elemente im Promotor und GATA-spezifische Transkriptionsfaktoren wie ELT-2 vermittelt [Moilanen *et al.*, 1999]. Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass hinsichtlich der Regulation der Expression von Metallothionein-Genen neben den einleitend erwähnten MREs und MTF-Transkriptionsfaktoren auch andere Mechanismen und Faktoren eine Rolle spielen müssen, die speziesspezifisch aber auch gewebsspezifisch sein können. In *E. buchholzi* können solche bereits diskutierten Mechanismen zu einer spezifischen Induktion des *crp*-Gens durch Cadmium führen.

Übereinstimmend mit den strukturellen Ähnlichkeiten auf genomischer Ebene zeigen Metallothioneine auch auf Proteinebene über Speziesgrenzen hinweg grosse Sequenzhomologien. So sind bei Metallothioneinen aus Säugern 56 % aller Aminosäurereste konserviert. Neben den insgesamt 20 Cysteinresten sind dabei vor allem Lysin, Serin und Arginin betroffen [Miles *et al.*, 2000]. Während die Säuger-MT aus 61 oder 62 AS aufgebaut sind, ist die Grösse der Metallothioneine bei den Invertebraten nicht so stark konserviert. Grössere MT mit 72 AS bis 78 AS finden sich beispielsweise bei Mollusken, *Lumbricus* oder *C.elegans.*, MT mit kürze-

ren AS-Ketten dagegen bei *Drosophila* oder *Neurospora crassa* [Kägi, 1991]. Das mit 25 AS kürzeste Metallothionein aus *Neurospora* weist dennoch starke Übereinstimmungen mit der  $\beta$ -Domäne der MT I aus Säugern auf [Miles *et al.*, 2000].

Durch direkte Sequenzvergleiche ausgewählter Metallothioneine aus Säugern, Invertebraten und Hefen mit dem CRP-Protein wurden die strukturellen Eigenschaften der Proteine miteinander verglichen. Mit bis zu 53 % Sequenzidentität bestehen zwischen den Metallothioneinen aus *Lumbricus* und *Eisenia* und den Repeats drei und vier des CRP-Proteins die grössten Übereinstimmungen. Von den 20 Cysteinresten in dem überlappenden Bereich befinden sich 18 in konservierten Positionen. Eine besondere Häufung identischer Aminosäuren im Vergleich zum CRP-Fragment ist dabei am C-terminalen Ende der Metallothioneine zu beobachten. Dies stellt eine interessante Parallele zu den MTs aus Säugern dar, bei denen die Mehrheit der konservierten Aminosäuren ebenfalls am carboxyterminalen Ende im Bereich der  $\alpha$ -Domäne zu finden ist [Klaassen *et al.*, 1999]. Neben den MT aus Oligochaeten zeigen auch andere MT hohe Sequenzidentitäten zum CRP. Während die Metallothioneine aus *Drosophila* und *Candida* ebenfalls mit den Repeats drei und vier des CRP überlappen, besitzt das Cu-Thionein aus *H. pomatia* die grössten Übereinstimmungen zu dem angrenzenden Repeat fünf. In diesem Bereich sind auch die etwas geringeren Übereinstimmungen zu den humanen Metallothioneinen IG und IIA zu finden. Nur eine sehr geringe Ähnlichkeit besteht zum MT-I aus *C. elegans*. Dies steht in Einklang mit phylogenetischen Vergleichen von MT aus terrestrischen Invertebraten, bei denen die MT aus *C. elegans* eine gesonderte Stellung einnehmen [Dallinger, 1996]. Bei den Abgleichen aller eingesetzter Metallothioneine sind neben den Cysteinresten übereinstimmend vor allem die Aminosäuren Serin, Lysin und Glycin in den Überlappungsbereichen konserviert. Eine solche Verteilung konservierter AS findet sich, wie oben beschrieben, grösstenteils auch beim Vergleich von Metallothioneinen verschiedener Spezies untereinander. Die strukturellen Ähnlichkeiten des CRP zu den MT aus allen untersuchten Organismen, die sich in ähnlicher Weise so auch zwischen den einzelnen Metallothioneinen finden, deuten auf funktionale Übereinstimmungen der Proteine hin. Dies dürfte vor dem Hintergrund des Expressionsmusters des *crp*-Gens besonders die Fähigkeit des CRP zur Komplexierung von Cadmium betreffen. Die starke Ähnlichkeit des CRP zu den Metallothioneinen der phylogenetisch nahestehenden Oligochaeten *Lumbricus* und *Eisenia*, die im Bereich der Ähnlichkeiten von Säuger-Metallothioneinen liegen, bestätigen die festgestellten Homologien auf genomischer Ebene und lassen einen gemeinsamen Ursprung der Proteine vermuten. Dies gilt umso mehr, als dass die Metallothioneine aus Oligochaeten beim Vergleich mit den MT anderer terrestrischer Invertebraten deutlich geringere Ähnlichkeiten aufweisen [Dallinger *et al.*, 2000].

#### **4.3 Vermittlung einer Cadmium-Resistenz durch das CRP in *S. cerevisiae***

Die Metallothioneine aus *Lumbricus* und *Eisenia* werden vor allem mit der Detoxifizierung von Schwermetallen wie Kupfer, Zink, Blei oder Cadmium und deren Akkumulation im Chloragog- bzw. Darmgewebe der Würmer in Verbindung gebracht [Dallinger *et al.*, 2000]. Wie durch direkte Sequenzvergleiche gezeigt werden konnte, bestehen zwischen den Metallothioneinen und dem CRP strukturelle Ähnlichkeiten, die auf vergleichbare Funktionen schliessen lassen. Durch die heterologe Expression des CRP in dem Cadmium-hypersensitiven Hefestamm DTY167 sollte untersucht werden, inwieweit das CRP in der Lage ist, in Zellen eine Resistenz gegenüber Cadmium zu vermitteln. In dem Hefestamm DTY167 liegt das für einen Glu-

tathion-Cadmium-Transporter kodierende Gen *ycf1* in inaktiver Form vor, wodurch der für die Cadmiumentgiftung in Hefen essentielle Transport der Ionen in die Vakuolen gestört ist [Li *et al.*, 1996]. Aus diesem Grund zeigt dieser Stamm bei einer Cadmium-Belastung im umgebenden Medium im Vergleich zum isogenen Wildtyp DTY165 ein stark eingeschränktes Wachstum. Die Expression des CRP dagegen vermittelt in DTY167 Zellen eine Cadmium-Resistenz, welche die Resistenz der Wildtyp-Zellen bei den entsprechenden Cadmium-Konzentrationen noch übertrifft. Das CRP-Protein muss demnach sehr effektiv zur Cadmium-Entgiftung in den Hefezellen beitragen. Wie könnten die Mechanismen aussehen, welche den CRP-exprimierenden Zellen ein Überleben und Wachstum bei ansonsten toxischen Cadmium-Konzentrationen ermöglichen?

Wie einleitend erwähnt, erfolgt die Aufnahme der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in die Hefezellen sehr schnell über aktive Transportsysteme [Volesky *et al.*, 1993]. Innerhalb weniger Minuten wird ein Grossteil der gemessenen Gesamtaufnahme an Cadmium erreicht. In dieser Zeit treten auch die Zellschädigungen auf, die bei den entsprechenden Cadmium-Konzentrationen zum Absterben der Zellen führen. So kann fünf Minuten nach Beginn der Cadmium-Intoxikation ein 90%iger Abfall in der Lebensfähigkeit der Zellen einer Kultur beobachtet werden [Gadd und Mowll, 1983]. Der über das CRP vermittelte Resistenz-Mechanismus muss demnach sehr schnell und effektiv sein. Aufgrund der durch die Anordnung der Cysteinreste bedingten Metallbindenden Eigenschaften des CRP-Proteins ist eine Ausbildung von Cadmium-Thiolat-Clustern sehr wahrscheinlich. Auf diese Weise würde sehr schnell die Konzentration freier, reaktiver  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in den Zellen gesenkt werden, so dass sich die auftretenden Zellschädigungen in einem für die Zelle tolerierbaren Rahmen bewegen und das weitere Wachstum der Zellen somit kaum beeinflusst wäre. Dieser Mechanismus würde den für die cytosolischen Metallothioneine beschriebenen Mechanismen bei der Detoxifizierung von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen entsprechen [Klaassen *et al.*, 1999]. In ähnlichen Hefesystemen sind auch die Metallothioneine in der Lage, Cadmium-Resistenzen zu vermitteln [Ecker *et al.*, 1986; Chernaik und Huang, 1991; Cody und Huang, 1994]. Lokalisationsversuche in der Hefe zeigen, dass das CRP unabhängig vom Cadmium-Gehalt der Zellen im Cytoplasma der Zellen vorliegt. Im heterologen Hefesystem scheint die potentielle Transmembran-Domäne des CRP keine Bedeutung für die Funktionalität des Proteins zu haben.

Vergleicht man die Wachstumsraten der CRP exprimierenden DTY167 Kulturen mit den Kulturen von DTY165, so stellt sich die Frage, warum das CRP in der Lage ist, eine im Vergleich zum Wildtyp grössere Resistenz in den Zellen zu vermitteln. Wie bereits beschrieben, erfolgt die Cadmium-Detoxifizierung in *S. cerevisiae* über einen ATP-abhängigen Transport von Bis-Glutathion-Cadmium-Komplexen in die Vakuolen. Diese Transportvorgänge sind von mehreren Faktoren abhängig. So muss zum einem ausreichend Glutathion in den Zellen zur Verfügung stehen, andererseits kann sich die Zahl an YCF1-Transportmolekülen sowie an benötigten Energie-Äquivalenten ebenfalls limitierend auf die Detoxifizierungsvorgänge auswirken. Zwar wird die Synthese von Glutathion und YCF-1 durch Schwermetalle wie Cadmium induziert, allerdings können die entsprechenden Synthesewege durch freie  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen gestört werden, wodurch diese Mechanismen vor allem bei hohen Cadmium-Konzentrationen nicht in vollem Umfang zur Verfügung stehen [Dierickx, 1982; Li *et al.*, 1997; Briat und Lebrun, 1999]. Da sich eine akute Cadmium-Intoxikation bei den Hefen jedoch sehr schnell auf die Zellen auswirkt, können die gesetzten Schäden irreversibel sein, wodurch das Wachstum der Kulturen stark eingeschränkt ist. In den CRP exprimierenden Zellen steht dagegen mit dem CRP ein sofort

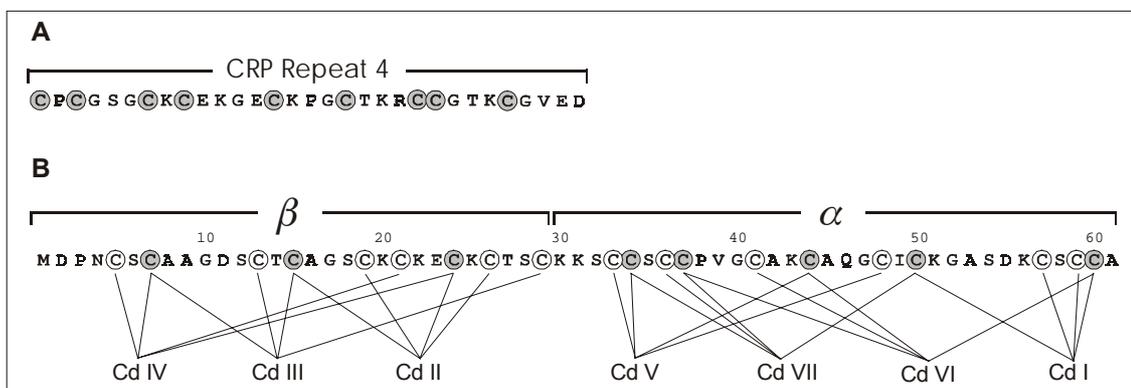
verfügbarer Chelatbildner für die freien  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen zur Verfügung, wodurch sich weniger starke Auswirkungen im Verlauf einer Cadmium-Vergiftung zeigen. Die Reparaturmechanismen in den Zellen bleiben so weitgehend intakt, was eine schnelle Kompensierung der Schäden zur Folge hat. Der Vorteil einer schnelleren Komplexierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen durch das CRP in DTY167 Zellen zeigt sich vor allem bei hohen Cadmium-Konzentrationen (400  $\mu\text{M}$ ), bei denen ein massiver Cadmium-Einstrom erfolgt. Für DTY165 Kulturen ist dort im Gegensatz zu CRP-exprimierenden Kulturen kein Wachstum mehr zu beobachten.

Einer der wichtigsten toxischen Effekte, welche durch Cadmium ausgelöst werden, ist die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und der damit verbundene oxidative Stress in den Zellen [Brennan und Schiestl, 1996]. Neben der Komplexierung von Schwermetallen können die Metallothioneine auch als Radikalfänger in den Zellen auftreten, die über ihre Sulfhydrylgruppen ähnlich wie Glutathion zur Entgiftung von Hydroxylradikalen und Superoxid-Ionen beitragen [Thornalley und Vasak, 1985; Thomas *et al.*, 1986]. So sind Metallothioneine in Hefen in der Lage, den Verlust der Superoxid-Dismutase zu kompensieren [Tamai *et al.*, 1993]. Auch in der Muschel *Mytilus galloprovincialis* konnten antioxidative Effekte von Metallothioneinen nachgewiesen werden [Viarengo *et al.*, 1999]. Bei der Vermittlung der Cadmium-Resistenz durch das CRP in den Hefezellen könnten neben den komplexierenden Eigenschaften auch solche antioxidativen Mechanismen eine Rolle spielen. Das CRP-Protein würde demnach in den Zellen nicht nur einen primären Schutz über die direkte Bindung freier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen vermitteln, sondern ist möglicherweise auch an sekundären Schutzmechanismen über die antioxidativen Eigenschaften seiner freien Sulfhydrylgruppen beteiligt.

Über die Expression verschiedener Deletionsklone sollte die Bedeutung einzelner Repeats des CRP bei der Resistenzvermittlung aufgeklärt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die protektiven Effekte in einem proportionalen Verhältnis zur Anzahl der exprimierten Repeats stehen. So zeigen das gesamte 25 kDa CRP-Protein und ein Deletionsklon ohne die potentielle Transmembrandomäne (21 kDa) sowohl bei subletalen als auch bei toxischen Cadmium-Konzentrationen das beste Wachstum aller getesteten Klone. Dies bestätigt die Annahme, dass die Transmembrandomäne scheinbar keine funktionale Bedeutung bei der Cadmium-Entgiftung in den Hefezellen besitzt. Mit abnehmender Anzahl der exprimierten Repeats nimmt auch die Resistenz der entsprechenden Kulturen ab. Das mit etwa 3 kDa kleinste Fragment, welches das vierte Repeat des Proteins umfasst, weist so den geringsten Effekt aller CRP-Deletionsklone auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass der vorrangige protektive Effekt des CRP mit der Komplexierung der freien  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen einhergeht. Je mehr repetitive Elemente in den Zellen exprimiert werden, desto mehr freie Sulfhydrylgruppen stehen für die Bildung von Cadmium-Thiolat-Clustern zur Verfügung. Dementsprechend kommt es zu geringeren physiologischen Schädigungen in den Zellen mit den meisten CRP-Repeats. Der beobachtete Effekt nimmt mit steigenden Cadmium-Konzentrationen deutlich zu. Wie bereits ausgeführt, sind aufgrund des schnellen Einstroms von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in die Hefezellen bei einer akuten Vergiftung solche Mechanismen von besonderer Bedeutung, welche die initialen Zellschädigungen so gering wie möglich halten. Daher ist es von Vorteil, wenn möglichst viele Repeats des CRP in den Zellen vorliegen, die mehr freie  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen komplexieren können. Die Fitness dieser Zellen ist entsprechend grösser, was ein besseres Wachstum der Kulturen nach sich zieht. Für die Deletionsklone CRP-R12345 und CRP-R12678 sowie CRP-R345 und CRP-R678 mit gleicher Repeat-Anzahl aus unterschiedlichen Bereichen des CRP-Proteins sind keine

Unterschiede bei der Resistenzvermittlung festzustellen. Die einzelnen Repeats des CRP scheinen demnach in gleichem Umfang an der Komplexierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen beteiligt zu sein.

Durch Bestimmung des Cadmium-Gehaltes in den Zellen verschiedener Deletionsklone sollte überprüft werden, ob aufgrund der angenommenen Komplexierung von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen durch das CRP eine Zunahme der Cadmium-Akkumulation in den Zellen zu beobachten ist, welche die meisten Repeats exprimieren. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Deletionsklonen festgestellt werden, so dass anhand der Ergebnisse eine Aussage hinsichtlich der Cd-Bindungsfähigkeit des CRP nicht zu treffen ist. Vielmehr spielen andere Faktoren wie beispielsweise die auftretende Schädigung der Zellmembran durch  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen und der daraus resultierende Einfluss auf den Ein- und Ausstrom von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen beim Cd-Gehalt in den Hefezellen eine Rolle [Gadd und Mowll, 1983; Howlett und Avery, 1997]. Faktoren wie diese überlagern möglicherweise den Akkumulationseffekt durch das CRP. So könnten stark geschädigte Zellen einen höheren Cadmium-Gehalt aufweisen als etwa Zellen, deren Zellmembranen aufgrund des exprimierten CRP-Proteins und dem damit verbundenen Schutzmechanismus nur in geringem Umfang geschädigt sind.



**Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Sequenz des vierten CRP-Repeats und der Komplexierung von Cadmium durch die Cysteine im humanen Metallothionein II. [A]** Sequenz des CRP-Repeats 4. Insgesamt weist das CRP-Protein acht derartige aufeinanderfolgende Einheiten auf, wobei das achte Repeat am carboxyterminalen Ende um sieben Aminosäuren verkürzt ist. Die konservierten Cysteinreste sind grau unterlegt [nach Willuhn *et al.*, 1996]. **[B]** Komplexierung von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen durch das humane MT-II. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des Metallothioneins. Die Beteiligung der einzelnen Cysteinreste als Liganden für die Komplexierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen ist durch Verbindungslinien dargestellt. Univalente Cysteinreste sind weiss unterlegt, bivalente Cysteinreste sind grau unterlegt [nach Pan *et al.*, 1999].

Bei Metallothioneinen aus Säugern sind alle Cysteinreste an der Koordination der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in den zwei separaten Clustern beteiligt (Abb. 4.1). Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine fungieren dabei entweder als univalente (terminale) oder als bivalente ('bridging') Liganden [Cismowski und Huang, 1991]. In der N-terminalen  $\beta$ -Domäne werden so drei  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen über drei 'bridging' und sechs terminale Cysteine komplexiert. In der  $\alpha$ -Domäne erfolgt die Komplexierung von vier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen über fünf 'bridging' und sechs terminale Cysteine (Abb. 4.1). Der Austausch einzelner Cysteinreste gegen andere Aminosäuren wie Serin hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Detoxifizierungseigenschaften der MT. Während sich beim Austausch einiger Cysteinreste keine oder nur geringe Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins zeigen, führt der Verlust insbesondere von Cysteinen, die als bivalente Liganden fungieren, zu starken Beeinträchtigungen bei der Detoxifizierung von Schwermetallen durch die MT [Chernaik und Huang, 1991].

Die einzelnen Repeats des CRP weisen in ihrem strukturellen Aufbau Parallelen zu den Domänen der Metallothioneine auf. Durch Sequenzvergleiche konnten vor allem in den Bereichen der CRP-Repeats drei, vier und fünf Übereinstimmungen mit den Metallothioneinen sowohl aus Säugern als auch aus Invertebraten detektiert werden (Kap. 3.2). Da auch bei der Expression des vierten CRP-Repeats ein protektiver Effekt bei einer Cadmium-Belastung von DTY167 Zellen erzielt werden konnte, wurde dieses Repeat für den gezielten Austausch von Cystein gegen Serin ausgewählt, um die Bedeutung der einzelnen Cysteinreste für die Vermittlung einer Cadmiumresistenz zu untersuchen. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche führen zu der Einteilung der Cysteinreste in zwei Gruppen. In Gruppe eins finden sich die Cysteinreste, deren Fehlen zwar zu einer Beeinträchtigung der Funktion des CRP-R4 führt, die jedoch dennoch begrenzt in der Lage sind, sowohl bei subletalen als auch bei toxischen Cd-Konzentrationen eine Resistenz zu vermitteln. Dazu gehören die Cysteinreste in Position 1, 7, 9 und 27. Die Cysteine in Position 3, 14, 18, 22 und 23 dagegen tragen zwar bei subletalen Konzentrationen zu einem Schutz der Zellen bei, diese zeigen jedoch bei toxischen Cd-Konzentrationen keine Cadmium-Resistenz mehr. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der protektive Effekt des CRP auf einer Komplexierung der Cadmium-Ionen beruht. Wären ausschliesslich die angesprochenen antioxidativen Effekte der Grund für die Resistenzvermittlung durch das CRP, so sollte sich der Verlust jedes einzelnen Cysteinrestes unabhängig von seiner Position in gleichem Umfang auswirken.

Im Gegensatz zu den Metallothioneinen, bei denen sich der Austausch einiger, vor allem terminaler Cysteinreste nicht auf die Detoxifizierungseigenschaften der Proteine auswirkt, zeigt beim CRP-R4 jeder der Mutationsklone ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp [Chernaik und Huang, 1991]. Demnach müssen alle Cysteinreste des CRP-R4 in eine Komplexierung so eingebunden sein, dass sich das Fehlen jeder einzelnen Sulfhydrylgruppe in einer mangelnden Cadmium-Bindungsfähigkeit des Fragmentes auswirkt, was einen verminderten protektiven Effekt in den Zellen nach sich zieht. Eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der Metall-Thiolat-Cluster kommt im CRP-R4 dem Cysteinrest in Position drei zu, bei dessen Fehlen der stärkste Verlust der Cadmium-Resistenz beobachtet wird. Bei der Vermittlung einer Cadmium-Resistenz spielt nicht nur die Anzahl der gebundener  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen eine Rolle. Auch die Stabilität der Chelat-Bindung stellt einen kritischen Faktor in dieser Hinsicht dar [Chernaik und Huang, 1991; Cismowski *et al.*, 1991]. So sind bei Metallothioneinen neben den Cysteinen vor allem die konservierten Lysin- und Serinreste beider Domänen für die Stabilität der Cluster verantwortlich. Austausche dieser Aminosäuren führen zu einer Reduzierung der detoxifizierenden Eigenschaften der Metallothioneine [Cody und Huang, 1994; Pan *et al.*, 1994; Emoto *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1997]. Auch in den CRP-Repeats sind viele Lysin- und Serinreste konserviert, was auf eine vergleichbar stabilisierende Funktion dieser Aminosäuren bei der Komplexierung von Cadmium durch das CRP hindeutet.

Überträgt man die stöchiometrischen Eigenschaften der Metallothioneine hinsichtlich einer Komplexierung von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen auf das CRP-R4, so könnte das Repeat einen Metall-Thiolat-Cluster mit drei  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen ausbilden. Dies würde den Eigenschaften der  $\beta$ -Domäne der MT entsprechen, welche ebenfalls neun Cysteinreste enthält. Da jedes  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion vier Sulfhydrylgruppen als Liganden hat, müssten drei der Cysteinreste des CRP-R4 wie in der  $\beta$ -Domäne der MT als divalente Liganden fungieren [Kille *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1998]. Eine verlässliche Aufteilung der Cysteinreste des CRP-R4 in uni- oder bivalente Liganden ist jedoch nicht möglich. Zum einen ist die Aufteilung der Cysteinreste in der als Vergleich heran-

gezogenen  $\beta$ -Domäne der MT eine andere als im CRP-R4. So besitzt die  $\beta$ -Domäne insgesamt vier Cys-X-Cys-Motive, während beim CRP-R4 zwei Cys-X-Cys- und ein Cys-Cys-Motiv zu finden sind. Zum anderen wirkt sich zwar der Austausch von bivalenten Liganden in Metallothioneinen besonders stark auf die Cadmium-Bindungsfähigkeit aus, einige univalente Liganden zeigen jedoch ähnliche Auswirkungen [Chernaik und Huang, 1991]. Bei den Aussagen hinsichtlich der Cadmium-Bindungsfähigkeit des CRP-R4 muss zudem beachtet werden, dass die isolierte Betrachtung eines Repeats nicht zwangsläufig die Verhältnisse im gesamten Protein widerspiegeln muss. Die sterischen Voraussetzungen für die Bindung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen innerhalb eines Repeats könnten aufgrund der Faltungseigenschaften des Gesamtproteins verändert werden. Die Aminosäure-Sequenz des CRP ist durch eine Reihe von  $\beta$ -Turns gekennzeichnet, was für eine globuläre Struktur des Gesamtproteins spricht [Willuhn, 1994].

Die Metallothioneine der Vertebraten weisen in der 'Hinge'-Region zwischen den beiden Domänen ein stark konserviertes Lysin-Motiv auf [Hamer, 1986]. Auch die Repeat-Übergänge des CRP-Proteins sind durch konservierte Aminosäuren wie Cystein, Valin, Glycin oder Prolin gekennzeichnet. Möglicherweise sind diese Bereiche essentiell für die korrekte Faltung des Proteins und nehmen so Einfluss auf die Cadmium-Bindungsfähigkeit des Proteins. Durch den gezielten Austausch von Prolin gegen Leucin im Übergang von Repeat vier nach fünf sowie von Aspartat gegen Asparagin im Repeat-Übergang von sechs nach sieben wurde diese Annahme überprüft. Es zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp CRP jedoch kein Einfluss der eingeführten Mutationen auf den protektiven Effekt im Verlauf einer Cadmium-Intoxikation. Die durch die Mutationen hervorgerufenen sterischen Veränderungen in der Proteinkette beeinflussen scheinbar nicht die Cadmium-Bindungsfähigkeit der Cysteinreste im CRP.

Welche Schlussfolgerungen können anhand der Ergebnisse der heterologen Expression des CRP in *S. cerevisiae* im Hinblick auf die Funktionalität des Proteins bei den Detoxifizierungsvorgängen für Cadmium in *E. buchholzi* gezogen werden? Terrestrisch lebende Oligochaeten sind in beträchtlichem Umfang in der Lage, Schwermetalle wie Cadmium zu akkumulieren. Als Entgiftungsorgan dient neben dem hinteren Teil des Darmkanals hauptsächlich das den Darm umgebende Chloragoggewebe [Morgan und Morgan, 1990]. Ein Grossteil der akkumulierten Schwermetalle wird dabei in den Chloragocyten in speziellen Vesikeln, den Chloragosomen, oder cytosolisch gebunden an Metallothioneine gefunden [Ireland, 1978; Dallingier *et al.*, 2000; Gruber *et al.*, 2000]. Die aufgrund der schnellen und spezifischen Induktion durch Cadmium angenommene Einbindung des CRP in die Detoxifizierungsvorgänge für Cadmium in *E. buchholzi* konnte durch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die strukturellen Ähnlichkeiten insbesondere zu den Metallothioneinen aus *Lumbricus* und *Eisenia* sowie die mit den MT vergleichbare Vermittlung einer Cadmium-Resistenz in Hefezellen legen den Schluss nahe, dass das CRP durch die Komplexierung freier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen im Cytosol der Zellen zur Entgiftung des Schwermetalls beiträgt. Möglicherweise ist das CRP dabei überwiegend mit den Entgiftungsorganen wie dem Chloragoggewebe oder dem Darmtrakt assoziiert und könnte dort bei einer Cadmium-Vergiftung synergistisch mit den möglicherweise ebenfalls vorhandenen Metallothioneinen wirken. Ob die potentiell vorhandene Transmembran-Domäne des CRP dabei hinsichtlich der Kompartimentierung des Proteins eine Rolle spielt, bleibt aufgrund der nicht vorhandenen Funktionalität dieser Domäne im heterologen Hefesystem unklar. Aufgrund des repetitiven Aufbaus des CRP-Proteins ist es durchaus denkbar, dass das Protein einer post-translationalen Prozessierung unterliegt, bei der es in entsprechende Untereinheiten

zerlegt wird, die dann für die Komplexierung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen verantwortlich sind. Solche Vorgänge werden beispielsweise bei *Eisenia foetida* beobachtet. In diesem Oligochaeten wird ein 80 AS umfassendes Peptid über post-translationale Mechanismen in ein 41 AS enthaltendes Ein-Domänen-Metallothionein prozessiert [Gruber *et al.*, 2000]. Ähnliche Mechanismen der Metallothionein-Prozessierung werden auch bei dem Springschwanz *Orchesella cincta* gefunden [Hensbergen *et al.*, 1999]. Ein zusätzlicher protektiver Effekt des CRP könnte im Schutz der Zellen vor dem durch Cadmium ausgelösten oxidativen Stress bestehen [Viarengo *et al.*, 1999]. Möglicherweise erfüllen das CRP und Metallothioneine in *E. buchholzi* unterschiedliche Funktionen. So werden in der terrestrisch lebenden Schnecke *Helix pomatia* verschiedene MT-Isoformen gefunden, von denen eine Isoform für die Cadmium-Detoxifizierung in der Mitteldarmdrüse verantwortlich ist und eine andere eine Rolle bei der Homöostase von Spurenelementen wie Kupfer im Mantelgewebe der Schnecken spielt [Dallinger *et al.*, 1993; Dallinger *et al.*, 1997]. Es kann somit spekuliert werden, ob das CRP in Bezug auf Cadmium die detoxifizierenden Eigenschaften der Metallothioneine ersetzt, während diese vorrangig in den Haushalt von essentiellen Schwermetallen eingebunden sind. Aufgrund der spezifischen Induzierbarkeit des *crp*-Gens durch Cadmium stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die Metallothioneine für die Detoxifizierung anderer Schwermetalle verantwortlich sind.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich weitere Ansatzpunkte für die Aufklärung der Funktionalität des CRP-Proteins. Dazu gehört der direkte Nachweis einer Komplexierung von Cadmium durch das CRP über Cadmium-Bindeassays. Eine Voraussetzung dafür ist die heterologe Überexpression und anschließende Aufreinigung des CRP-Proteins. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, ein geeignetes Expressionssystem zu finden, in dem sich ausreichende Mengen des Proteins herstellen lassen. Somit liegen auch noch keine Antikörper gegen das CRP vor, mit denen das Protein und eine mögliche Prozessierung in den Würmern nachzuweisen wäre. Mit Hilfe der Antikörper könnte das CRP über immunhistochemische Methoden in den Würmern lokalisiert werden, ein möglicher Zusammenhang mit den detoxifizierenden Geweben der Enchytraeen hergestellt und die zelluläre Verteilung des Proteins aufgeklärt werden. Auch die Detektion von Metallothioneinen und der zugehörigen Gene würden weiteren Aufschluss über die Rolle des CRP bei den Detoxifizierungsvorgängen in *E. buchholzi* geben. So könnte überprüft werden, inwieweit das Verteilungsmuster beider Proteine übereinstimmt und sich die Funktionen der Proteine ergänzen. Der Vergleich der genomischen Strukturen könnte die aufgeworfene Frage nach einer möglichen Verwandtschaft der Gene klären. Für eine weitere Aufklärung der spezifischen Regulationsmechanismen der Genexpression wäre die Kultur einer Enchytraeen-Zelllinie von Vorteil, in der die Rolle Enchytraeen-spezifischer Transkriptionsfaktoren und der Enhancer-Strukturen im Gen bei der komplexen Kontrolle des *crp*-Gens aufgeklärt werden könnten.

## 5 Zusammenfassung

Die anthropogene Belastung der Umwelt mit Cadmium (Cd) birgt zunehmende Gefahren für Menschen, Tiere und Pflanzen. Der terrestrische Oligochaet *Enchytraeus buchholzi* ist in der Lage, auch in stark Cd-belasteten Böden zu überleben. Als spezifische Antwort auf eine Cd-Belastung exprimiert *Enchytraeus* eine mRNA, die für das cysteinreiche 25 kDa CRP-Protein kodiert. Der hohe Cystein-Gehalt und die charakteristische Anordnung der Cysteinreste in Cys-X-Cys- bzw. Cys-Cys-Segmenten entsprechen den Eigenschaften Schwermetall-bindender Proteine wie den ubiquitär auftretenden Metallothioneinen (MT). Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der genomischen Organisation des *crp*-Gens und der Nachweis der Funktionalität des CRP-Proteins bei der Detoxifizierung von Cd.

Das *crp*-Gen ist aus zehn Exons und neun Introns aufgebaut. Mit seinen von sehr langen Introns unterbrochenen kleinen Exons weist das Gen eine für Invertebraten-Gene untypische Exon/Intron-Struktur auf. Bei der Exonverteilung findet sich eine auffällige repetitive Struktur im Kernbereich des Gens, in dem die kodierenden Exons drei bis acht wie die repetitiven Einheiten der CRP-cDNA aus jeweils 93 bp aufgebaut sind. In Übereinstimmung mit der Struktur der cDNA und der Exons finden sich auch in den Introns des *crp*-Gens repetitive Elemente. Neben vier direkten und einem invertierten Repeat in jeweils verschiedenen Introns wurden in den Introns sieben und neun DNA-Abschnitte mit mehreren direkt aufeinanderfolgenden kurzen Sequenzwiederholungen detektiert. Für das Fragment im Intron sieben mit seiner Anhäufung von Metall-responsiven Elementen (MRE) wurde bereits eine Enhancer-Funktion nachgewiesen. Zusätzlich sind in den Introns des *crp*-Gens fünf Konsensus-Sequenzen für transposable DNA-Fragmente aus Säugern und Invertebraten enthalten. Durch Restriktionsanalysen konnte eine teilweise Methylierung des Genoms von *Enchytraeus buchholzi* nachgewiesen werden. Das *crp*-Gen und der zugehörige Promotor liegen dabei in einem der relativ kurzen methylierten Abschnitte des Genoms. Aufgrund des uneinheitlichen Methylierungsmusters in den untersuchten Bereichen wird eine gewebsspezifische Methylierung des *crp*-Gens vermutet, die möglicherweise Einfluss auf die Expression des Gens in verschiedenen Geweben nimmt. Anhand der repetitiven Strukturen des Gens und den Ähnlichkeiten einiger Abschnitte des *crp* zu Exon- und Intron-Bereichen von MT-Genen aus *Lumbricus rubellus* ist ein gemeinsamer Ursprung der Gene ableitbar. Das *crp*-Gen könnte so aus Gen-Duplikationen entstanden sein, wie sie unter anderem bei MT-Genen in *Drosophila* gefunden werden.

Das CRP-Protein vermittelt in dem Cd-hypersensitiven Hefestamm DTY167 eine sehr effektive Cd-Resistenz, welche besonders bei hohen Cd-Konzentrationen die Resistenz des zugehörigen Wildtypstammes DTY165 weit übersteigt. Der erzielte Effekt der Resistenzvermittlung nimmt dabei proportional mit der Anzahl der exprimierten repetitiven Einheiten des CRP-Proteins zu. So zeigen Zellen, die das gesamte 25 kDa Protein exprimieren sowohl bei subletalen als auch bei toxischen Cd-Konzentrationen die grösste Resistenz. Das mit etwa 3 kDa kleinste Fragment, welches das vierte Repeat des Proteins umfasst, weist dagegen den geringsten Effekt aller CRP-Deletionsklone auf. Durch die Expression von Fragmenten gleicher Grösse aus verschiedenen Bereichen des Proteins konnte nachgewiesen werden, dass alle Repeats in gleichem Umfang an der Resistenzvermittlung beteiligt sind. Als Mechanismus der Resistenzvermittlung wird eine Komplexierung der freien Cd<sup>2+</sup>-Ionen durch das CRP-Protein im Cytosol der Zellen angenommen, wobei die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste dabei als Liganden bei der Bildung von Cd-Thiolat-Clustern dienen. Dies entspricht dem Entgiftungsmechanismus von MT. Bestätigt wird diese Annahme durch den gezielten Austausch der Cysteinreste in dem 3 kDa Fragment des vierten CRP-Repeats gegen die Aminosäure Serin. Die Mutationen wirken sich in unterschiedlich starkem Umfang auf die Fähigkeit zur Resistenzvermittlung des CRP-R4 aus. Alle Klone zeigen jedoch ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Demnach zieht das Fehlen jeder einzelnen Sulfhydrylgruppe im Gegensatz zu den MT eine Verminderung der Cd-Bindungsfähigkeit des CRP-R4 Fragmentes nach sich, was sich auf die Detoxifizierungseigenschaften der Mutationsklone auswirkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem *crp*-Gen erstmals ein Gen für ein Schwermetall-bindendes Nicht-Metallothionein Protein charakterisiert werden. Zudem konnte erstmals die Funktionalität des CRP-Proteins bei der Detoxifizierung von Cd nachgewiesen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adriano, D.C. (1986). Trace elements in the terrestrial environment. *Springer Verlag*, New York.
- Aissani, B. und Bernardi, G. (1991a). CpG islands: Features and distribution in the genomes of vertebrates. *Gene* **106**, 173-183.
- Aissani, B. und Bernardi, G. (1991b). CpG islands, genes and isochores in the genomes of vertebrates. *Gene* **106**, 185-195.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Aoki, Y., Kunimoto, M., Shibata, Y. und Suzuki, K. (1986). Detection of metallothionein on nitrocellulose membrane using western blotting technique and its application to identification of cadmium-binding proteins. *Anal. Biochem.* **157**, 117-122.
- Ayers, R.U. (1992). Toxic heavy metals: Materials cycle optimization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 815-820.
- Banville, D. und Boie, Y. (1989). Retroviral long terminal repeat is the promotor of the gene encoding the tumor-associated calcium-binding protein oncomodulin in the rat. *J. Mol. Biol.* **207**, 481-490.
- Barry, C., Faugeron, G. und Rossignol, J.-L. (1993). Methylation induced premeiotically in *Ascobulus*: Coextension with DNA repeat lengths and effect on transcript elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4557-4561.
- Bauer-Hilty, A., Dallinger, R. und Berger, B. (1989). Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from *Lumbricus variegatus* (Oligochaeta, Annelida). *Comp. Biochem. Physiol.* **94C**, 373-379.
- Belfort, M. und Perlman, P.S. (1995). Mechanisms of intron mobility. *J. Biol. Chem.* **270**, 30237-30240.
- Bernardi, G. (1995). The human genome: Organization and evolutionary history. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 445-476.
- Beyersmann, D. und Hechtenberg, S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144**, 247-261.
- Bird, A.P., Taggart, M.H. und Smith, B.A. (1979). Methylated and unmethylated DNA compartments in the sea urchin genome. *Cell* **17**, 889-901.
- Bird, A.P. und Taggart, M.H. (1980). Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Res.* **8**, 1485-1497.
- Bird, A., (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**, 5-8.
- Bird, A., Tate, P., Nan, X., Campoy, J., Meehan, R., Cross, S., Tweedie, S., Charlton, J. und Macloed, D. (1995). Studies of DNA methylation in animals. *J. Cell Science.* **19**, 37-39.

- Blackwell, K.J., Singleton, I. und Tobin, J.M. (1995). Metal cation uptake by yeast: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 579-584.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R. und Viarengo, A. (1999). Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environ. Mol. Mut.* **33**, 287-292.
- Bonner, J.J., Ballou, C. und Fackenthal D.L. (1994). Interactions between DNA-bound trimers of the yeast heat shock factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 501-508.
- Boyes, J. und Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* **11**, 327-333.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-252.
- Brady, F.O. (1982). The physiological function of metallothionein. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 143-145.
- Breathnach, R. und Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383.
- Brennan, R.J. und Schiestl, R.H. (1996). Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mut. Res.* **356**, 171-178.
- Briat, J.F. und Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *C R Acad. Sci. III* **322**, 43-54.
- Britten, R.J. (1997). Mobile elements inserted in the distant past have taken on important functions. *Gene* **205**, 177-182.
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M. und Plasterk, R.H.A. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **15**, 6132-6143.
- Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S. und Karin, M. (1989). The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4091-4095.
- Carels, N. und Bernardi, G. (2000). Two classes of genes in plants. *Genetics* **154**, 1819-1825.
- Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell* **53**, 3-4.
- Cedar, H., Solage, A., Glaser, G. und Razin, A. (1979). Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Res.* **6**, 2125-2131.
- Cedar, H. und Razin, A. (1990). DNA methylation and development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1049**, 1-8.
- Chang, C.C., Liao, W.F. und Huang, P.C. (1998). Cysteine contributions to metal binding preference for Zn/Cd in the beta-domain of metallothionein. *Protein Eng.* **11**, 41-46.

- Cherian, M.G. und Goyer, R.A. (1978). Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.* **23**, 1-9.
- Chernaik, M.L. und Huang, P.C. (1991). Differential effect of cystein-to-serine substitutions in metallothionein on cadmium resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3024-3028.
- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **201**, 134-139.
- Cismowski, M.J. und Huang, P.C. (1991). Effect of cysteine replacements at positions 13 and 50 on metallothionein structure. *Biochemistry* **30**, 6626-6632.
- Cismowski, M.J., Narula, S.S., Armitage, I.M., Chernaik, M.L. und Huang, P.C. (1991). Mutation of invariant cysteines of mammalian metallothionein alters metal binding capacity, cadmium resistance, and <sup>113</sup>Cd NMR. *J. Biol. Chem.* **266**, 24390-24397.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M. und Schachtman, D.P. (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12043-12048.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* **123**, 825-832.
- Coblentz, A. und Wolf, K. (1994). The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 303-308.
- Cody, C.W. und Huang, P.C. (1993). Metallothionein detoxification function is impaired by replacement of both conserved lysines with glutamines in the hinge region between the two domains. *Biochem.* **32**, 5127-5131.
- Cody, C.W. und Huang, P.C. (1994). Replacement of all  $\alpha$ -domain lysines with glutamates reduces metallothionein detoxification function. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **202**, 954-959.
- Coles, J.A., Farley, S.R. und Pipe, R.K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquatic Organisms* **22**, 59-65.
- Compere, S.J. und Palmiter R.D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell* **25**, 233-240.
- Creighton, T.E. (1993). Proteins. Structures and molecular properties. *W.H. Freeman and Company*, New York.
- Csank, C., Taylor, F.M und Martindale, D.W. (1990). Nuclear pre-mRNA introns: Analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5133-5141.
- Dallinger, R. und Wieser, W. (1984). Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol.* **79C** (1), 125-129.

- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P., Gruber, C., Birchler, N., Hauer, C.R. und Kägi, J.H.R. (1993). Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A. *Eur. J. Biochem.* **216**, 739-746.
- Dallinger, R. (1996). Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**, 125-133.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P. und Kägi, J.H.R. (1997). Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* **388**, 237-238.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P. und Stürzenbaum, S. (2000). Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cell. Mol. Biol.* **46**, 331-346.
- Daudeker, M (1990). Handbuch der Umweltgifte: Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis. *comed*, Landsberg/Lech, S. 80-84.
- Deutsch, M. und Long, M. (1999). Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3219-3228.
- Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial enchytraeidae. *Pedobiologia* **37**, 2-29.
- Dierickx, P.J. (1982). *In vitro* inhibition of soluble glutathion S-transferases from rat liver by heavy metals. *Enzyme* **27**, 25-32.
- Dix, D.R., Bridgham, J.T., Broderius, M.A., Bryersdorfer, C.A. und Eide, D.J. (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26092-26099.
- Ecker, D.J., Butt, T.R., Sternberg, E.J., Neeper, M.P., Debouck, C., Gorman, J.A. und Crooke, S.T. (1986). Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* **261**, 16895-16900.
- Edwards, C.A. und Bohlen, P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. *Chapman & Hall*, London.
- Emoto, T., Kurasaki, M., Oikawa, S., Suzuki-Kurasaki, M., Okabe, M., Yamasaki, F. und Kojima, Y. (1996). Roles of conserved serines of metallothionein in cadmium binding. *Biochemical Genetics* **34**, 239-251.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.H. (1984). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem. Add.* **137**, 266-277.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. und Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6982-6993.
- Fiedler, H.J. (1993). Spurenelemente in Böden. In: Fiedler, H.J. und Rösler, H.J. (Hrsg.) Spurenelemente in der Umwelt. *Custav Fischer Verlag*, Stuttgart, S. 81-96.
- Foulkes, E.C. (2000). Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223** (3), 234-240.

- Freedman, J.H., Slice, L.W., Dixon, D., Fire, A. und Rubin, C.S. (1993). The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 2554-2564.
- Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M. und Nakao, M. (2000). Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5107-5118.
- Furey, W.F., Robbins, A.H., Clancy, L.L., Winge, D.R., Wang, B.C. und Stout, C.D. (1987). Crystal structure of Cd, Zn metallothionein. In: *Metallothionein II*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 139-148
- Furner, I.J., Sheikh, M.A. und Collet, C.E. (1998). Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: Genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* **149**, 651-662.
- Furst, P., Hu, S., Hackett, R. und Hamer, D. (1988). Copper activates metallothionein gene transcription by altering conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* **55**, 705-717.
- Gadd, G.M. und Mowll, J.L. (1983). The relationship between cadmium uptake, potassium release and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**, 45-48.
- Galloway, T.S. und Depledge, M.H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* **10**, 5-23.
- Ghoshal, K. und Jacob, S.T. (2000). Regulation of metallothionein gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **66**, 357-384.
- Ghoshal, K., Majumder, S., Zhiling, L., Dong X. und Jacob, S.T. (2000). Suppression of metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter specific DNA methylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 539-547.
- Gietz, R.D. und Woods, R.A. (1994). High efficiency transformation in yeast. In: Johnston, J.A. (Hrsg.) *Molecular genetics of yeast: Practical approaches*. Oxford University Press, pp. 121-134.
- Girard, L. und Freeling, M. (1999). Regulatory changes as a consequence of transposon insertion. *Develop. Gen.* **25**, 291-296.
- Gitan, R.S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M. und Eide, D. (1998). Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J. Biol. Chem.* **273**, 28617-28624.
- Glöckner, G., Szafranski, K., Winckler, T., Dingermann, T., Quail, M.A., Cox, E., Eichinger, L., Noegel, A.A. und Rosenthal, A. (2001). The Complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res.* **11** (4), 585-594.
- Goodbourn, S. (1990). Negative regulation of transcriptional initiation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1032**, 53-77.
- Goyer, R.A. (1995). Chelation of toxic metals: Current interests. *Environ. Health Perspect.* **103**, 988-989.
- Grady, D.L., Robinson, D.L. und Hildebrand, C.E. (1990). Genomic Sequence of the Chinese hamster MT I gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7149.

- Gruber, C., Stürzenbaum, S., Gehrig, P., Sack, R., Hunziker, P., Berger, B. und Dallinger, R. (2000). Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 573-582.
- Hamer, D.H. (1986). Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-951.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1985). In: *DNA Cloning*, Volume 1, D. Glover, ed. IRL Press Ltd. London, 109.
- Hardman, N. (1986). Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. *Biochem. J.* **234**, 1-11.
- Hawkins, J.D. (1988). A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9893-9908.
- Heguy, A., West, A., Richards, R.I. und Karin, M. (1986). Structure and tissue-specific expression of the human metallothionein I<sub>B</sub> gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2149-2157.
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, O.V., Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A., Podkolodny, N.L. und Kolchanov, N.A. (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD und COMPEL. *Nucleic Acids Res.* **26**, 362-367.
- Hensbergen, P.J., Donker, M.H., van Velzen, M.J.M., Roelofs, D., van der Schors, R.C., Hunziker, P.E. und van Straalen, N.M. (1999). Primary structure of a cadmium-induced metallothionein from the insect *Orchesella cincta* (Collembola). *Eur. J. Biochem.* **259**, 197-203.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. und Schaffner, W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* **13**, 2870-2875.
- Hinkle, P.M., Shanshala, E.D. 2<sup>nd</sup> und Nelson, E.J. (1992). Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J. Biol. Chem.* **267**, 25553-25559
- Huang, X. und Miller, W. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**, 337-357.
- Hutchinson, C.A., Phillips, S., Marshall, H.E., Gillam, S., Jahnke, P. und Smith, M. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* **253**, 6551-6560.
- Howlett, N.G. und Avery, S.C. (1997). Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 539-545.
- Imlay, J.A. und Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309.
- Imlay, J.A., Chin, S.M. und Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* **240**, 640-642.

- Ireland, M.P. (1978). Heavy metal binding properties of earthworm chloragosomes. *Acta biol. Acad. Sci. hung.* **29** (4), 385-394.
- Ireland, M.P. (1981). Uptake and distribution of cadmium in the terrestrial slug *Arion ater* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **68A**, 37-41.
- Ishikawa, T., Bao, J.-J., Yamane, Y., Akimaru, K., Frindrich, K., Wright, C. D. und Kuo, M. T. (1996). Coordinated induction of MRP/GS-X pump and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 14981-14988.
- Jacob, S.T., Ghoshal, K. und Sheridan, J.F. (1999). Induction of metallothionein by stress and its molecular mechanisms. *Gene Expression* **7**, 301-310.
- Jahroudi, N., Foster, R., Price-Haughey, J., Beitel, G. und Gedamu, L. (1990). Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure. *J. Biol. Chem.* **265** (11), 6506-6511.
- Jhiang S.M., Garey, J.R. und Riggs, A.F. (1988). Exon-intron organization in genes of earthworm and vertebrate globins. *Science* **240**, 334-336.
- Jhiang S.M. und Riggs, A.F. (1989). The structure of the gene encoding chain c of the hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.* **264**, 19003-19008.
- Jungmann, J., Reins, H.-A., Schobert, C. und Jentsch, S. (1993). Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* **361**, 369-371.
- Jurka, J. (1990). Novel families of interspersed repetitive elements from the human genome. *Nucleic Acids Res.* **18** (1), 137-141.
- Jurka, J., Klonowski, P., Dagman, V. und Pelton, P. (1996). CENSOR – A program for identification and elimination of repetitive elements from DNA sequences. *Comput. Chem.* **20**, 119-121.
- Jurka, J. (1998). Repeats in genomic DNA: mining and meaning. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 333-337.
- Kägi, J.H.R. (1991). Overview of Metallothionein. *Methods Enzymol.* **205**, 613-626.
- Kahle, H. und Breckle, S.W. (1992). Blei und Cadmium – Zeitbomben in unseren Waldböden. *Biologie in unserer Zeit.* **1**, 21-27.
- Kaludov, N.K. und Wolffe, A.P. (2000). MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: Selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1921-1928.
- Kamakaka, R.T. (1997). Silencers and locus control regions: Opposite sides of the same coin. *TIBS* **22**, 124-128.
- Karin, M. und Richards, R.I. (1982). Human metallothionein genes: Molecular cloning and sequence analysis of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3165- 3173.

- Kaufer, N.F., Simanis, V. und Nurse, P. (1985). Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* correctly excises a mammalian RNA transcript intervening sequence. *Nature* **318**, 78-80.
- Kawasaki, E.S. (1991). Amplification of RNA. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (eds.). PCR protocols, a guide to methods and applications. *Academic Press Inc., San Diego, CA*, 21-27.
- Kelly, E.J., Quaife, C.J., Froelick, G.J. und Palmiter, R.D. (1996). Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J. Nutr.* **126** (7), 1782-1790.
- Khoo, H.W. und Patel, K.H. (1999). Metallothionein cDNA, promoter and genomic sequences of the tropical green mussel *Perna viridis*. *J. Experimental Zoology* **284**, 445-453.
- Kille, P., Kay, J. und Sweeney, G.E. (1993). Analysis of regulatory elements flanking metallothionein genes in Cd-tolerant fish (pike and stone loach). *Biochim. Biophys. Acta* **1216**, 55-64.
- Kille, P., Hemmings, A. und Lunney, E.A. (1994). Memories of metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta* **1205** (2), 151-161.
- Klaassen, C.D., Liu, J. und Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267-294.
- Kneer, G., Kutchan, T. M., Hochberger, A. und Zenk, M.H. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy-metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* **157**, 305-310.
- Koewius, H. (1998). Strukturelle und funktionelle Promotoranalyse des Cadmium-induzierbaren *crp*-Gens aus dem terrestrischen Oligochaeten *Enchytraeus buchholzi*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kojima, Y. und Hunziker, P.E. (1991). Amino acid analysis of metallothionein. *Methods Enzymol.* **205**, 419-421.
- Kriventseva, E.V. und Gelfand, M.S. (1999). Statistical analysis of the exon-intron structure of higher and lower eukaryote genes. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **17**, 281-288..
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- Lange, B.W., Langley, C.H. und Stephan, W. (1990). Molecular evolution of *Drosophila* metallothionein genes. *Genetics* **126**, 921-932.
- Langford, C., Nellen, W., Niessing, J. und Gallwitz, D. (1983). Yeast is unable to excise foreign intervening sequences from hybrid gene transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1496-1500.
- Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, Y.-J., Chen, Y.-P., Wang, S.-H., Chow, W.Y. und Lin, L.Y. (1996). Structure and expression of metallothionein gene in ducks. *Gene* **176**, 85-92.

- Leng, P., Klatter, D.H., Schumann, G., Boeke, J.D. und Steck, T.L. (1998). *Skipper*, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2008-2015.
- Lewken, N. und Weber, K. (1996). Nucleotide sequence of two actin genes of *Lumbricus terrestris*. *Gene* **178**, 199-200.
- Li, Z.-S., Szczycka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D.J. und Rea, P.A. (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* **271**, 6509-6517.
- Li, Z.-S., Lu, Y.-P., Zhen, R.-G., Szczycka, M., Thiele, D.J. und Rea, P.A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 42-47.
- Liu, X.F., Supek, F., Nelson, N. und Cizewski Culotta, V. (1997). Negative control of heavy metal uptake by *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 Gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 11763-11769.
- Liu, X.F. und Cizewski Culotta, V. (1999). Post-translational control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 4863-4868.
- Majumder S., Ghoshal, K., Li, Z. und Jacob S.T. (1999). Silencing of metallothionein-I gene in mouse lymphosarcoma cells by methylation. *Oncogene* **18**, 6287-6295.
- Margoshes, M. und Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine renal cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813-4814.
- Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaipe, C.J., Brinster, R.L. und Palmiter, R.D. (1994). Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 584-588.
- McKenna, I.M., Bare, R.M. und Waalkes, M.P. (1996). Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *Toxicology* **107**, 121-130.
- Mehra, R.K., Tarbet, E.B., Gray, W.R. und Winge, D.R. (1988). Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamylpeptides in *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8815-8819.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H. und Rodilla, V. (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 35-70.
- Miseta, A. und Csutora, P. (2000). Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organism. *Mol. Biol. Evol.* **17** (8), 1232-1239.
- Moffatt, P. und DenizEAU, F. (1997). Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug. Metab. Rev.* **29**, 261-307.
- Moilanen, L.H., Fukushige, T. und Freedman, J.H. (1999). Regulation of metallothionein gene transcription. *J. Biol. Chem.* **274**, 29655-29665.

- Morgan, J.E., Norey, C.G., Morgan, A.J. und Kay, J. (1989). A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the anterior alimentary canal of the *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **101C**, 601-605.
- Morgan, J.E. und Morgan A.J. (1990). The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissues of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated and 4 polluted soils. *Oecologia* **84**, 559-566.
- Mount, S.M., Burks, C., Hertz, G., Stormo, G.D., White, O. und Fields, C. (1992). Splicing signal in *Drosophila*: Intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4255-4262.
- Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5767-5768.
- Murata, M., Gong, P., Suzuki, K. und Koizumi, S. (1999). Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J. Cell. Physiol.* **180**, 105-113.
- Nejmeddine, A., Sautiere, P., Dhainuat-Courtois, N. und Baert, J.-L. (1992). Isolation and characterization of a Cd-binding protein from *Allobophora caliginosa* (Annelida, Oligochaeta): Distinction from metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.* **101C**, 601-605.
- Nemer, M., Thornton, R.D., Stuebing, E.W. und Harlow, P. (1991). Structure, spatial, and temporal expression of two sea urchin metallothionein genes, SpMTB1 and SpMTA. *J. Biol. Chem.* **266**, 6586-6593.
- Ng, H.-H., Jeppesen, P. und Bird, A. (2000). Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MDB1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1394-1406.
- Nordberg, G.F. (1989). Modulation of metal toxicity by metallothionein. *Biol. Trace Elem. Res.* **21**, 131-135.
- Nriagu, J.O. und Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**, 134-139.
- Ooi, C.E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J.S. und Klausner, R.D. (1996). Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma-membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* **15**, 3515-3523.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G. und Ow, D.W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* **11**, 3491-3499.
- Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.F. und Ow, D.W. (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 4721-4728.
- Oubella, R. (1997). Immunomodulation in populations of bivalve molluscs from the Bay of Brest. *Ann. Inst. Oceanogr.* **73**, 77-87.

- Palmiter, R. D. (1987). Molecular biology of metallothionein gene expression. *EXS 52, Birkhäuser Verlag, Basel*, 63-81.
- Palmiter, R.D., Findley, S.D., Withmore, T.E. und Durnam, D.M. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6333-6337.
- Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Koeller, D.M. und Brinster, R.L. (1993). Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5266-5275.
- Palmiter, R. D. (1994). Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1219-1223.
- Pan, P.K., Hou, F.-y., Cody, C.W. und Huang, P.C. (1994). Substitution of glutamic acids for the conserved lysines in the  $\alpha$ -domain affects metal binding in both the  $\alpha$ - and  $\beta$ -domains of mammalian metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **202**, 621-628.
- Pan, K.-y.P., Zheng, P., Lyu, P.C. und Huang, P.C. (1999). Why reversing the sequence of the  $\alpha$  domain of human metallothionein-2 does not change its metal-binding and folding characteristics. *Eur. J. Biochem.* **266**, 33-39.
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
- Pearson, W. R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **183**, 63-98.
- Penninckx, M. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 737-742.
- Perego, P. und Howell, S.B. (1997). Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**, 312-318.
- Peterson, M.G., Hannan, F. und Mercer, J.F.B. (1988). The sheep metallothionein gene family. Structure, sequence and evolutionary relationship of five linked genes. *Eur. J. Biochem.* **174**, 417-424.
- Piccinni, E., Bertaggia, D., Santovito, G., Miceli, C. und Kreav, A. (1999). Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. *Gene* **234**, 51-59.
- Piedrafita, F.J., Molander, R.B., Vansant, G., Orlova, E.A., Pfahl, M. und Reynolds, W.F. (1996). An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J. Biol. Chem.* **271**, 14412-14420.
- Pirrota, V. (1990). Transvection and long-distance gene regulation. *BioEssays* **12**, 409-414.
- Posthuma, L., Hogervorst, R.F. und Van Straalen, N.M. (1992). Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural populations of *Orchesella cincta* (L.). *Archs. Envir. Contam. Toxic.* **22**, 146-156.

- Posthuma, L. und Van Straalen, N.M. (1993). Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**, 11-38.
- Price-Haughey, J., Bonham, K. und Gedamu L. (1987). Metallothionein gene expression in fish cell lines: its activation in embryonic cells by 5-azacytidine. *Biochim. Biophys. Acta.* **908**, 158-168.
- Pringle, J.R., Adams, A.E.M., Drubin, D.G. und Haarer, B.K. (1991). Immunfluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol.* **194**, 565-602.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. und Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4878-4884.
- Quig, D. (1998). Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.* **3**, 262-270.
- Radtko, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z. und Schaffner, W. (1993). Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* **12**, 1355-1362.
- Rae, P.M.M. und Steele, R.E. (1979). Absence of cytosine methylation at CCGG and GCGC sites in the rDNA coding regions and intervening sequences of *Drosophila* and the rDNA of other higher insects. *Nucleic Acids Res.* **6**, 2987-2995.
- Razin A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three-way connection. *EMBO J.* **17**, 4905-4908.
- Rea, P.A., Li, Z.-S., Lu, Y.-P. und Drozdowicz, Y.M. (1998). From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 727-760.
- Rhounim, L., Rossignol, J.-L. und Faugeron, G. (1992). Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. *EMBO J.* **11**, 4451-4457.
- Robberson, B.L., Cote, G.J. und Berget, S.M. (1990). Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 84-94.
- Römbke, J. (1989). *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a test organism in terrestrial laboratory systems. *Arch. Toxicol. Suppl.* **13**, 402-405.
- Rönicke, V., Graulich, W., Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M. (1997). Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *S. cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **283**, 313-322.
- Romandini, P., Tallandini, L., Beltramini, M., Salvato, B., Manzano, M., de Bertoldi, M. und Rocco, G.P. (1992). Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. *Comp. Biochem. Physiol.* **103C**, 255-262.
- Roswell, D.F. und White, E.H. (1978). The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* **57**, 409-423.

- Rountree, M.R. und Selker, E.U. (1997). DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **11**, 2383-2395.
- Rüther, U. (1989). Schwermetalle in Waldböden des Eggegebirges und ihre Akkumulation durch Vertreter der Meso- und Makrofauna. Dissertation, Universität Münster.
- Rüther, U. und Greven, H. (1990). The effect of heavy metals on enchytraeids. I. Uptake from an artificial substrate and influence on food preference. *Acta Biol. Benrodis* **2**, 125-131.
- Ruskin, B., Pikielny, C.W., Rosbash, M. und Green, M.R. (1986). Alternative branch points are selected during splicing of a yeast pre-mRNA in mammalian and yeast extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2022-2026.
- Saint-Jaques, E., April, M.-J. und Seguin, C. (1995). Structure and metal-regulated expression of the gene encoding *Xenopus laevis* metallothionein-A. *Gene* **160**, 201-206.
- Salt, D.E. und Rauser, W.E. (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* **107**, 1293-1301.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory*, New York.
- Samson, S.L.-A. und Gedamu, L. (1998). Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **59**, 257-288.
- Sanger, F., Nicklen, E.F. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santoro, N., Johansson, N. und Thiele, D.J. (1998). Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6340-6352.
- Sakharkar, M.K., Kanguane, P., Woon, T.W., Tan, T.W., Kolatkar, P.R., Long, M. und de Souza, S.J. (2000). IE-Kb: Intron Exon Knowledge base. *Bioinformatics* **16**, 1151-1152.
- Schäffer, A. und Kägi, J.H.R. (1991). Metallothioneins. In: Merian E. (Hrsg.) Metals and their compounds in the environment. *VCH*, Weinberg, pp. 451-463.
- Schimming, C.G. (1992). Kontamination von Böden – Belastung mit Metallen. In: Blume, H.P. (Hrsg.) Handbuch des Bodenschutzes. *ecomed*, Landsberg, S. 277-318.
- Scott-Fordsmand, J.J. und Weeks, J.M. (2000). Biomarkers in earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **165**, 117-159.
- Searle, P.F., Davison, B.L., Stuart, G.W., Wilkie, T.L., Norstedt, G. und Palmiter, R.D. (1984). Regulation, linkage and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1221-1230.
- Shiraishi, E., Inouhe, M., Joho, M. und Tohyama, H. (2000). The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* **37**, 79-86.

- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellog, D.E., Lukyanov, K.A. and Lukyanov, S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1087-1088.
- Silar, P., Theodore, L., Mokdad, R., Erraiss, N.-E., Cadic, A. und Wegnez, M. (1990). Metallothionein *Mto* gene of *Drosophila melanogaster*. Structure and regulation. *J. Mol. Biol.* **215**, 217-224.
- Silver, S. und Phung, L.T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753-789.
- Singal, R. und Ginder, G.D. (1999). DNA Methylation. *Blood* **93**, 4059-4070.
- Smit, A.F.A. und Riggs, A.D. (1995). MIRs are classic, tRNA derived SINEs that amplified before the mammalian radiation. *Nucleic Acids Res.* **23**, 98-102.
- Smith, T.F. und Waterman, M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**, 195-197.
- Snyder, M.P., Kimbrell, D., Hunkapiller, M., Hill, R., Fristrom, J. und Davidson, N. (1982). A transposable element that splits the promoter region inactivates a *Drosophila* cuticle protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7430-7434.
- Stadtman, E.R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalysed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 797-821.
- Stallings, R.L., Crawford, B.D., Tobey, R.A., Tesmer, J. und Hildebrand, C.E. (1986). 5-Azacytidine-induced conversion to cadmium resistance correlates with early S phase replication of inactive metallothionein genes in synchronized CHO cells. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **12**, 423-432.
- Sterner, D.A., Carlo, T. und Berget, S.M. (1996). Architectural limits on split genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15081-15085.
- Stöppler, M. (1991). Cadmium. In: Merian, E. (Hrsg.) *Metals and their compounds in the environment. VCH, Weinberg*, pp. 803-851.
- Stone, H. und Overnell, J. (1985). Non-metallothionein cadmium-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **80C**, 9-14.
- Steffens, J.C., Hunt, D.F. und Williams, B.G. (1986). Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl)n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 13879-13882.
- Stephens, R.M. und Schneider T.D. (1992). Features of spliceosome evolution and function inferred from an analysis of the information at human splice sites. *J. Mol. Biol.* **228**, 1124-1136.
- Strubelt, O., Kremer, A., Tilse, J., Keogh, J., Pentz, R. und Younes, M. (1996). Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium and copper toward the isolated perfused rat liver. *J. Toxicol. Environ. Health* **47**, 267-283.

- Stuart, G.W., Searle, P.F., Chen, H.Y., Brinster, R.L. und Palmiter, R.D. (1984). A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7318-7322.
- Stürzenbaum, S.R., Kille, P. und Morgan, A.J. (1998). The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.* **431**, 437-442.
- Suzuki, K. T., Imura, N. und Kimura, M. (1993). In *Metallothionein III: Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Suzuki, M.M. und Cooper, E.L. (1995). Allogenic killing by earthworm effector cells. *Nat. Immun.* **14**, 11-19.
- Suzuki, T. und Riggs, A.F. (1993). Linker chain L1 of earthworm Hemoglobin. Structure of gene and protein: Homology with low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13548-13555.
- Szczyпка, M.S. und Thiele, D.J. (1989). A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 421-429.
- Szczyпка, M., Wemmie, J.A., Moyer-Rowley, W.S. und Thiele, D.J. (1994). A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 22853-22857.
- Szmulewicz, M., Novick, G.E. und Herrera, R.J. (1998). Effects of Alu insertions on gene function. *Electrophoresis* **19**, 1260-1264.
- Tamai, K.T., Liu, X., Silar, P., Sosinowski, T. und Thiele D.J. (1994). Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8155-8165.
- Tarrio, R., Rodriguez-Trelles, F. und Ayala, F.J. (1998). New *Drosophila* introns originate by duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1658-1662.
- Tate, P.H. und Bird, A.P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 226-231.
- Tatusova, T.A. und Madden, T.L. (1999). Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol.Lett.* **174**, 247-250.
- Thomas, J.P., Bachowski, G.J. und Girotti, A.W. (1986). Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metallothioneins. *Biochim. Biophys. Acta.* **884**, 448-461.
- Thomas, D.J., Angle, C.R. und Swanson, S.A. (1990). Effect of 5-azacytidine on metallothionein inducibility and sensitivity to lethality of cadmium in rat osteosarcoma (ROS17/2.8) cells. *Toxicology* **65**, 169-178.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. und Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4991-4996.

- Thornalley, P.J. und Vasak M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.* **827**, 36-44.
- Tomita, M., Shimizu, N. und Brutlag, D.L. (1996). Introns and reading frames: Correlation between splicing sites and their codon positions. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1219-1223.
- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G.J.R., Schinkel, A.H., Borst, P. und Martinoia, E. (1996). The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6743-6748.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Turner, J.S. und Robinson, N.J. (1995). Cyanobacterial metallothioneins: Biochemistry and molecular genetics. *J. Industr. Microbiol.* **14**, 119-125.
- Tweedie, S., Charlton, J., Clark., V. und Bird, A. (1997). Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1469-1475.
- Vallee, B.L. und Ulmer, D.D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-128.
- Vallee, B.L. (1991). Introduction to metallothionein. *Methods Enzymol.* **205**, 3-7.
- Vasak, M. und Hasler D.W. (2000). Metallothioneins: New functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 177-183.
- Van Straalen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Janssen, M.P.M., Joosse, E.N.G., Van Meerendonk, J.H., Theeuwen, J.P.J.J., Verhoef, H.A. und Zoomer, H.F. (1987). Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *J. Appl. Ecol.* **24**, 953-968.
- Van Straalen, N.M. und Bergema, W.F. (1995). Ecological risks of increased bioavailability of metals under soil acidification. *Pedobiologia.* **39**, 1-9
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E. und Blasco, J. (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* **277**, 1612-1619.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B. und Labarre, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8469-8474.
- Volesky, B., May, H. und Holan, Z.R. (1993). Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **41**, 826-829.
- Vogeli-Lange, R. und Wagner, G.J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: Implication of a transport function for cadmium-binding-peptides. *Plant Physiol.* **92**, 1086-1093.

- Waalkes, M.P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* **79**, 241-244.
- Wemmie, J.A., Szczycka, M.S., Thiele, D.J. und Moye-Rowley, W.S. (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J. Biol. Chem.* **269**, 32592-32597.
- West, A.K., Stallings, R., Hildebrand, C.E., Chiu, R., Karin, M. und Richards R.I. (1990). Human metallothionein genes: Structure of the functional locus at 16q13. *Genomics* **8**, 513-518.
- Westheide, W. und Müller, M.C. (1995). Organisation und Fortpflanzung von Enchytraeen (Oligochaeta). *Publ. Wiss. Film. Biol.* **22**, 153-170.
- WHO (1992a). Cadmium. Environmental health criteria 134. *WHO*. Genf.
- WHO (1992b). Cadmium - environmental aspects. Environmental health criteria 135. *WHO*. Genf.
- Wiebauer, K., Herrero, J.J. und Filipowicz, W. (1988). Nuclear pre-mRNA processing in plants: distinct modes of 3'-splice-site selection in plants and animals. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2042-2051.
- Wieser, W. (1979). Schwermetalle im Blickpunkt ökologischer Forschung. *Biologie in unserer Zeit* **3**, 80-89.
- Wilkinson, D.G. und Nemer, M. (1987). Metallothionein genes MTa and MTb expressed under distinct quantitative and tissue specific regulation in sea urchin embryos. *Mol. Cell. Biol.* **7** (1), 48-58.
- Willuhn, J. (1994). Cadmium-induzierte Genexpression in dem terrestrischen Oligochaeten *Enchytraeus buchholzi*: Charakterisierung einer mRNA für ein neues, cysteinreiches Nicht-Metallothionein-Protein. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Willuhn J., Schmitt-Wrede, H.-P., Greven, H. und Wunderlich, F. (1994a). Cadmium-induced mRNA encoding a non-metallothionein 33-kDa protein in *Enchytraeus buchholzi* (Oligochaeta). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **29**, 93-100.
- Willuhn J., Schmitt-Wrede, H.-P., Greven, H. und Wunderlich, F. (1994b). cDNA cloning of a cadmium-inducible mRNA encoding a novel cysteine-rich, non-metallothionein 25-kDa protein in an enchytraeid earthworm. *J. Biol. Chem.* **269**, 24688-24691.
- Willuhn J., Otto, A., Schmitt-Wrede, H.-P. und Wunderlich, F. (1996). Earthworm gene as indicator of bioefficacious cadmium. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **220**, 581-585.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I. und Schacherer, F. (2000). TRANSFAC: An integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **28**, 316-319.
- Wolffe, A.P. und Matzke, M.A. (1999). Epigenetics: Regulation through repression. *Science* **286**, 481-486.
- Wu, A. und Moye-Rowley, W.S. (1994). GSH1, which encodes  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5832-5839.

- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: Structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 441-469.
- Xiao, H., Perisic, O. und Lis, J.T. (1991). Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* **64**, 585-598.
- Xiao, J.L. und Peterson, T. (1990). Intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* induced by a maize transposon. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 22-29.
- Yamasaki, F., Kurasaki, M., Oikawa, S., Emoto, T., Okabe, M. und Kojima, Y. (1997). Effects of amino acid replacements on cadmium binding of metallothionein  $\alpha$ -fragment. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 459-465.
- Zenk, M.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* **179**, 21-30.
- Zhou, P., Szczypka, M.S., Sosinowski, T. und Thiele, D.J. (1992). Expression of a yeast metallothionein gene family is activated by a single metalloregulatory transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3766-3775.
- Zhou, J. und Goldsbrough, P.B. (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 318-328.

## 7 Anhang

Nachfolgend aufgeführt ist die bekannte Nukleotidsequenz des *crp*-Gens aus *E. buchholzi*. Für Intron 6 sind die ersten 628 bp im Anschluss an das Exon 6 aufgeführt. Über 'Southern Blot'-Analysen wurde für das gesamte sechste Intron eine Grösse von 2,0 kb bis 2,3 kb ermittelt (Kap. 3.1.1). Die Nummerierung der Basen erfolgt separat für den 5'-Bereich des Gens vom Haupt-Transkriptionsstartpunkt [Koewius, 1998] bis zum Abbruch in Intron 6 und für den 3'-Bereich des Gens beginnend mit der ersten Base des Exon 7 bis in den 3'-flankierenden Bereich des Gens. Zusätzlich ist der 5'-flankierende Bereich des *crp*-Gens aufgeführt [Koewius, 1998]. Der 5'-nichtkodierende Bereich sowie die Exonbereiche sind durch Grossbuchstaben, die Intronbereiche durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die Exon/Intron-Übergänge sowie die Grösse der einzelnen Exons und Intron sind in Kapitel 3.1.1 in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Dunkel grau unterlegt sind die beiden Transkriptionsstartpunkte, wobei der Haupt-Transkriptionsstartpunkt (Pos. 1) zusätzlich unterstrichen ist. Hellgrau unterlegt sind das Startkodon (Pos. 163) sowie das Stopkodon (Pos. 2369 und Pos. 3531-3532), welches am Übergang von Exon 9 nach 10 gelegen ist. Das Polyadenylierungssignal (Pos. 4088-4093) ist unterstrichen. Ein Sequenzunterschied zur cDNA im 5'-nichtkodierenden Bereich (Pos. 3606, G für A) ist grau unterlegt und unterstrichen.

### 5'-Bereich des *crp*-Gens

```

-770          CGCATTTTAG TTAATATCA AAATTCAGAT TTCTCATAAA ATTTCTTAAG
-720 TCAACTAGGT ATAACATAGA TTTAAAATGG TTAACCGATA CCGCCTCAAT AATATGATTT GGTAACACAT TCCAAGCATT
-640 AATACATCTT GATATTTTTG TATATTTATG AAGGGATTTT CATAGATTGA AGCCACATTA TTTTCGAGTAA CGCTTGATTT
-560 TAGAGTAAAG AATTCAGCTG CCTGTACATC AACGAGGTTA TTTACAATTT TGAAGTATGA GATTAAATCC ATTTTATAGTC
-480 TACGGAGTTC TAGAGGCTCA GAGCCAAATG GACTAGTTTC TGTGGATAGC TCATGCCGCT TAAACCGATT AAAAGTTTGG
-400 TGAACCGCTT CAGTGTCACT GATGTGTTCC ATGTTGTTCAT GGACTACATT ATAACCTCTCT AGTTATTGTT ATTTTATGTT
-320 AAGTACTACA TAATAAGTCT TCTGTAAACT GCAAAAAGGC TTAATTTTAC AGTAGTAAAA GCAAAGATTG AAAGTGACAG
-240 ATATCAACAT TGAAGATCGT TTTGATAAGG GAAGCCTTTG AGAGTTTTGC ACACGGTTCA TTCATCAGTC ATTCAGTTAA
-160 ACTCTCAGCT ATTCTGCCGA GTGCAAAACT AAATGTCGTG TGCAGACAAA TCATATCGAA TGTTACAATT ATTCGACTG
- 80 CAATCAACCA ATCGCAGAAC ATCTAACAAA ATGTTTGTGT ACATCCAGAG AATATATAAA CAAATGGAAC TTGGTGGGTT
  1  TAAATCGAG TTGATCAGCT GATTAGTTCT GTTATTAAGC AGAAAAAGAG TACTGTTACG GAAAAAGATC TAGAGCCAGC
  81 TTAATATTCA TTTAGAACAG TTTAAAGAAT ATCAGAGAGT TAATTTTCATC TAACTGATTA GACTTCAAGT GGAAAAATAA
 161 TCATGGCATC ACgtaagttt cttcaaaact gttacttaat taagctttag tatgcatagg cttcgcatta aaaaataata
 241 aactagcaaa attgcgataa ctttgtctat tcttggatatt tcaccttgaa attcaaatcg tgtgtagaag aggaatttct
 321 tcaccagatc atgtagtttt gtagaaatat ttttcatggg accatgtttt gtcaattaga atcagtcacat attttaagag
 401 taaatctttg agttttcaaa gtaaaaacttt aaatagcaaa tcaattttat aacagtttct atcctcatat gcagtattta
 481 aaagtattta ataatttcta actttttgac atgcaaaaagg acattgaaag acattgtgca cacaacgctt aactggatta
 561 tgtatgcttg atctctcggc cgctcttgat accattgatc acaatattct tctggaacgt ctttcttctt ggtttagttg
 641 tcgtgtaabt gttcttgatt ggttttctct ctatctgatg gatcgttcct ttagtgtgaa agtgatggag tacatctctt
 721 cgccttctca cttaaagtat ggtgtgcctc aaggctcctg tcttggctct atcctcttta acctctatgc aacaccctta
 801 agcactctaa tctcttctca ttctcttgat catgtagtga tttctgtatga cactcaaatg tacatctctt ctaagttaat
 881 tactcttggt agacctagct taccttcacg ctctaagcta tctaactggt ctttccagca tgctgcacct cagatctgga
 961 attctcttcc atccaactct cggaaaactt catttgaatc acatcagcct ttgcttctct atgagcaaaag aatgatgtga
1041 tctgaaatgat atgctgtgtaa ttgattaatt tcaagtgtta tgtagcacgt gaagaggaaa acggaagata gagatgaaatg
1121 gagacgttat ataccatgat ggacctgcct gtaggctgtg cagttccata agcagttgaa gacctatctt tcttttccat
1201 ctctcttttc catccagctg ccgtgagcgg cgacctgcgc ctaaaaccacc ttttctttaa ctccctttac tttggactga
1281 atttcaggat tttggaattc tgcaccgttt ttggaccttc tttttttgcc caccggcttg atttgtctc aataggtctc
1361 gatgttgtca ttgataaact tagcactcca attgctatta ttattattga aaaaatttgg atgtgtatag tatttataaa
1441 ttatttcaat ttaattgttt attcaattat acatataaaa tattttgata aatgatttaa ctgaattggt tccgatgttt
1521 tatgtattta gACGCTCATG CTGAAGCACA CTGTGGCTGT GGAAGTGTG GCCATTGCC TAAAGGTAGC TGCGGCTCTG
1601 GCTGTGGCAC GAGCACTACT GCTGGCAGCT GTGGAGgtaa ataccaatct attgctcgat ttataaaatt aattcaactaa
1681 attatgctaa cgatacttga gactggcaaa actttcagtt aattattctc ttttagtgag tgctttgttc agatgtagac
1761 aatctctctc tagtgcctcg ccaagtggtg agctgcaacg tacatattca agagtctgct ttgctttcac actccaaaga
1841 tcaacgagtt aatcctttcc caaaagctat gctatatgct taatataaag tatgcttata gtttggagat aaaaatgagc
1921 ttccttgaag ccatgacttc cgaagtcatt tgaatagaat tttttatttg aatgtcattt atttatcaaa tatacatcaa
2001 atattttgat atttgattaa gctggattgt ttttggattt ttatttattt agatgctcaa gttcattacc ttcctcagat
2081 gtgaatatata taaaaattta attttaattt attttaattt aatttaattt aaactcttgt agtttggtct tgatagtga
2161 agtactgct cagtgattct gaattcattt ttgaaagtaa gacttatagt aggaaataaa atacatatta tctctgaact
2241 tcacaagtyt aatgatttgc attttaatta tgtgatttgt ttatattcct aagcatgctt ttgttgatgc tgtaagtgc
2321 taaagctata tgaattttaa ataggttgca attttgattg cagatgtttt tactatttgt actttatata gaatttata
2401 ttttggtaa atattatatt tttcgttat gagattaatc catcagttaa ctattgttaa tttcctgcat atgatggacg
2481 ttagttttca atatcatatt aaaaataata tcaatgactt catgtaatta atattaaatc atttacacct atttgatcaa

```

2561 agatatctgt aatttctttg aaatthtaatt tattthaaata gttatattht ttatacttat tgaagaaagt cttttcgaca  
2641 tctgtatgtt ttttatttaatt tttgtthaaac agTCCAGGCG TGCCCGTGTG GTTCTCACTG TAAATGTGAG AAGGGAGAAAT  
2721 GCAGAAGAGG CTGTAGCAAG GGTGTGTGCA CTCCTAAAGT TGGAGGtaaat gttthaaatc aatatttttg gttttttttt  
2801 atthtthaaat gtgatgcctg acctttctgg cgtgagctta atactthttaa ctgaaggcgg attgthtttg gccctctgtg  
2881 gaattggcca ctctthaaat agttgaaact tatctgtcta tccaagcttg tcatgtcttg tattgtgatg tgatcatcct  
2961 ggggctggtt ccagccaatt atthctgtga tgttcctcca caaaattctt tcttttgcca tttccttgat gttctttcat  
3041 tttcttctct ctataaatgc taactccaag tatataacta tgaataatth tttacttgac atcatcttga tataaattag  
3121 cgtthaaat ttgagaagta acagcccagc cactatcaaa attactcttt tatgocattt tattatthtaa gaaattcctc  
3201 aattcaaaat tcttcaatga tgtagaacaa aatgtgacct atagtcttat tctgcataga attcaaatth tttccaactt  
3281 gaaattcagc atagctthaa tgtcatccat gttatcatgg gtaacagtac tatgctacta ctggtgtggt gttgtttgtg  
3361 cagTTGAAGG ATGCCCTGC GGTCTCAAT GCAAGTGTGA GAAAGGAGAA TGCAAAAAGG GGTGCAAGGA GGGCTGCTGT  
3441 GCCCCAAGT GTGGAGgtac aatthttttt taaaatttat catttatatt aaaaatthaa tttgcatthaa aatthttgta  
3521 tcatactaat gacacatgat ggcaactaag ctgtgatcgg agctgatagt atatgagtaa ggtgtcaaac tttggatcag  
3601 tagatgctga gttcaaatca agtgcctgca ccaacattga ctttttagag ataggaatg tgtthaaact tttctttat  
3681 ctcttaattg tagtttagtg tttttgttg caatgacaga tcttttttag taatgggact gttattataa tactttgtg  
3761 tagttctttt cctaataatgc tcatatatac tgttctttca tccatcatca taattggaaa atacattht taacaacaat  
3841 caaactgcca tttthaaact ctttataatt gtatatctgc attatattgac agtaataact tgtthaaact aatctatc  
3921 aactaattaa gcaatgcagt aatattgca ctattgaaa tgtggtatth tttcctatg ttaagataaa tattaattth  
4001 ctgtttttat tccagaaatt cagccaatc cattaaattt ctctgctthaa atgataaatt aatattgaaa tttattctgt  
4081 aattgcagtt atctataaat ttacataata atthttgtt agtthttgta ttttttcaa cattthtata aatattctta  
4161 tgatatttag ggcagataaa taactatata ttacaacat aatattaata atthaaatgta atthtataa aatcatttac  
4241 acctatttga tcaaaagacat ctgtattttt thtaaattha atgtatttag cacttgatc atthttatc tattgaagaa  
4321 agctthttt gacatctgta atthtttatt taattttgtg atacagTGGC AGGCTGCTCC TGTGGTCTCAG GATGTAAGTG  
4401 TGAGAAGGGA GAGTGTAAAG CAGGTGTAC CAAGCGATG TGTGGTACTA AATGTGGAGg tgaatcaaat tgaatcaaat  
4481 aacttcatca cattcatcga ctctccacat ttacatttat catatatgca tatgtaacat atactgttg tcataggtt  
4561 ttaaacaaaa actttattgt tcttctatc tcttctctt tttgtttact gtatgtgca gctcgatag gtaacttaat  
4641 gccctctctg atggcogtag tgaggctatt ttattttctg tttatctgca catatgttga tcaactttg tgaactgtg  
4721 ttatctgcta tcacaattgt ttgtcgggtt ttgaagact ttaaataaag acatgtacta ctactactc atattactg  
4801 ctttactcgc tttactcgtt ttactcgtt tactcgtcaa gcttttttc atthttctta ttcattttat ttaaaaggtt  
4881 aataccgact ttaacatcaa tttgtgctc aatatactgc tagttagtg gatagcact gatttgaaca ctgacttac  
4961 tgatccattg tagaacaact tactagcaag ccaccgctt agtctttat ttttgacat tgggtctcaa cagaataaat  
5041 ggtgaaatct cttatataac ctgttagtca gttggattat tctaaactt tttcatgca ttaactttgt tgcgattgaa  
5121 taaattaatt aatgatatgc tgatagagca tatagataga aactactata aaatggcaaa tgtaagaccy cgtgttgga  
5201 aagcttagga aggaaaaaat ccagggtaga tggaaagttta ttaataact cgcgcgact gcaattgatg gccactcaa  
5281 aggcaacgat tactaataac catggagagg aaggaggaaa ttggtcttaa ataagcatc gtgctctctg acccagtg  
5361 ccgttatgtt atgttatgtt atgtaagtaa atactthaa agctggtaa agctaaggtt aatatacgtt tctcactgc  
5441 aaagcgatgt cagtgacggt cgagcccagg atthgaaacc cgcacaatcc gtcgcagtc gagtatctta ctgactcgc  
5521 tactggctcc agccacttht atthactata gcataattac ctttgagcat gggagcgtg acaatcgtt aacatattg  
5601 gtttaactcag aacgggattc taactaatac tctacttgt atcacgact ttgctttg tctgtactg cagcttact  
5681 gagatagaat gttagataga aagattttg catggctat atthgacct gattataat ttgtthaaat taaacattt  
5761 cttaaaaatt tgtttcagTT GAAGATTGCC CATGTGCTCC AAGCTGCAAG TGTGAGAAAG GTGATTTAA GGTAAACTGC  
5841 AGCAAGGGTT GCTGTACCCC TAAGTGTGGA Ggtaggactc taaagcacta tagaataaat tttttatcc actatagaa  
5921 atthttttta aagaactcct caagttthaa taatgcaatc tgggtaaatg gactttgtt taaaagthaa tgtacactac  
6001 ttcaactcgg tactgtgact aawaagtaat aatthtttag ctattthtata tttactggc tggagcactt ggcgatgctg  
6081 gtaagatatt ccactcggga tcagtatgtg cggggttcaa atcctgggt caccctcac tgactcgtc ttcgagtgaa  
6161 gaaactgatc tgtthaaact agctthtata gctthttat tccatattc tagtgataat atcgtagat taccgactcc  
6241 atcatatgat aagatagcca taattcttaa cagthaaact tatthaaacca tcaataaatt aagacatcc acaagcatt  
6321 ctgacctat caagttagtt aatthaaagt ttacccttha ctctctggc aaaaattttg tttccgattt taatthctg  
6401 gcagctgctc tcagaagaat gaaagttttc tctgattcta tctctgtat tttatttat ccttttattc tgattctatt  
6481 cctgaaatta tttcctgat

### 3'-Bereich des *crp*-Gens

1 TTGTTGGCTG CCCATGCCGG TCACAGTGCA CATGTGAGAA GGGATCTGCG AAGAAAGGTT GCAGCAAAGG ATGCTGCACT  
81 CCTAAATGTG GAAgtaggtt tcttaccttt tttagattca taaatacttt tataacttaa attacagatc aggcctcatt  
161 tagagcaggc tgaagacttc atthgtttga acatagaga tgcaatgtg agaggaaagc atthgaaact atctgagAAC  
241 tatagtttat atagtgagat gtaaaaatca agttgtgtgc caagcctcct gaatgatatg cgtgtaattg atthaaattca  
321 agtgttatgt agcacgtgaa gaggaagacg gaggaagacg gaagatagag atgaaatggag acgttatata ccatgatgga cctgcctgta  
401 ggctgtgac taagagagaa aacgatatgt agcatgtgaa taaactccat ctaactagcc tctgctcact aaatgagcga  
481 catataaaaag atgctcatac ttttattaaa ttgattgca ggcgagaat agtctttgta gttttttatc tttcgthaaac  
561 tgaactgaat tccgcctaatt tcttctgat aatctcttt aaaataacg catttgatga atthatttg ataatthgat  
641 atctaattga taaacatttt gtcataaga atcattctat atthtctac gactaatggt ggaactggaa ctgatgccc  
721 ggctaactcgt taggctacaa tgtgtgtgta tgtgtgaaac agtacaggac tgccctgtg gttcaactg taatgtgtg  
801 tgatgtgtg aacagtacag gactgcctt gttggttca tttgtaatgt tttgtgattg ttgaaacagta caggactgcc  
881 cttgtgttcc acattgtaat gttgtgtgat gttgtgaa caactgtg gctcagact gctcagact gttacattg atgtgtgtt  
961 gatgtgtgta acagtgcagg gctgccttg tagttccat tttaatgtg gtatgatgtg gttacattg tttgtgatg  
1041 ttgaaacgct caggactgcc cttgtgttcc acattgthaa gttgtgatga tttgtgttca atgtgaaact atthgaaact  
1121 gttgaaacag acaggactgc cttttgttgg acattgtta tttgtgttga tttgtgttga ataacaggc ataacaggc  
1201 gttcacatgt taatgtgtgt tatatgttga acagttcagg actgcccgtg tgatttcat tgtaaatgt gttctgtgt  
1281 tgaacagTGC AGGACTGCC GTGTGGTTC CATTGTAAGT GCAGAAAGG CTCCTGTGAG AAGGGCTGCA CTCAGGATG  
1361 TTGTGCTCCT AAGTGCAGCA gtaagtttat tcttgtcaac atagttacta ttaataattc ttttttcaat tattgatgtg  
1441 atgtgtgac gtccttgaca ttacccttg atgaggaac ggtatgtaaa cctgtattat tattatctg atgtagatga  
1521 ttatctttat tattattact attattatat cctccacttc ctgtgactt gcgctgtgtg atgaaatccac tttactacaa  
1601 tcaccaaaag ctaaatthgt atthaaagcc atgatatgaa agtcaactgaa atgctacag atgctacag aagagctcc  
1681 aattacagat tgagtaataa aatctttctt gttttctct ttctctgtg tataccctc aatagcgtc atgagcttt  
1761 agaatttttt taacatttat tgcctaatta tgtctaatat tatatagtt tttattatc ttattactaa gtaatatcac

1841 ttattgctat tatttgtatt gtatcctggt tgatgaaaa ttgaacaacc gtgaactgca cgtgctgtag aaggcggcaa  
1921 agcaccacta ggatcacaac caacgtctga aagggcattc ggttggtgag aaattgctct ataaattgct acaaaatatt  
2001 ctaaagcgat ggaaaaggct taattgtaaa attcaagga agatgatgat gattatthta taattatag ttgtactata  
2081 ctatagaatg aataaaattg gttataaaaa attacatcca aaccaacttc agaaagggca ttcggttggt gagcgcctag  
2161 gctccagaaa tttctacaaa aatgtaaacg aatggataag aagtccattc gtatcccgac tctagttaaa ctgggattta  
2241 agagaagatg atgatgacta tattataaaa cgtatgttct ATCTGTAGAC GTAACCTGCA AGTGTGGCTC AAGCTGTCCG  
2321 TGTGAGAAAG GAACTTGAC ACCAAGCTGT GCACAAACCT GCTGCGCTG taagtgcacc tcgttacatc tctgatatca  
2401 gttactthta attaaatcaa ttaactctcg gtgaattcta ttaattgaa caattaactc tcggtaactc ctattaattg  
2481 aatcaattaa ctatcggtga attatattaa ttgaaatcaat taactctcgg tgaattctat caattgaaac aattaactct  
2561 cagtgaattc tattaattga atcaattaac tctcggtgaa ttctattaat tgaatcaatt aactctcggg gaattctatt  
2641 aaacaatata acaataaact ctaagtgaat tctatthaatt gaatcaacta actctagggt aattctgtta gtttagtcaa  
2721 ttaactctcg gtgaagcttt atgaaaaact ttggctgacc gcagggttga ttctaggcta gaggattcac tgagaaatgt  
2801 aatgaacatg ggttgataat atatttcatt gtataatatt agttagacca ctttgaagga gatgtacggt caggaaatc  
2881 ttgaatcttg ataactact ttcgatattc aaataggtgc acatgtagcc tcctaaaact gatthtgaat atcgatthtag  
2961 tcaaaatatt tctgagatth tttagcaatth cactgtagtt ttacatthta cgctthcaaa tataagctth atcaaatgaa  
3041 aagtcttacc cataaaatatt atthttatata tggatcatta cattgaaaac ttgcaatcgt cattctctatt ggagcctaat  
3121 ttctgttacg tgtgcccggt taaattctaa caatgttatt ctcaaggaa acgcacgacc tgtgtgactc aatttaccat  
3201 cctgattthc aatacagatca gtctagtgtc gccacagaga gcaatgaatt atthaaatc tgaacgaatg cacgtcagta  
3281 tgcagctcac aaagggcggt cggttggtga acgactaggc tccaaagaga tctthcaaat tthctaatcc cgactatagt  
3361 ctaactgaaa tccaagagaa aatgatgatg atgattgaa gcaacagtaat gttctcatat ttacttaggc ttaactcatt  
3441 attaactata gctacagatg aaatgaattt gttctthttta gtaaatgta tthtatacagt cattthttta ctaaacatg  
3521 taaattgcag AATGCTGGT CTCTGTGCGC AATACAGCTG ATGTAGCACC GCAGTATCGG CTTGACCAAT GGTGCTCATC  
3601 TATTAGCAGA GCCGCTCTAT CACATCTATT ATACACAACA CATTGAACAA ACTCATATGA TTGCACCATT GTTTCTGAAG  
3681 TGCTCCTACT ATTCACTGAC GATTTTCTTT TATTACTACA GAATTGTGTG ATTTTTTTTA TATTTACCGT GATGTTACTG  
3761 TGTATTTATT AAATTTAAAT TAAATATCTT TAATCTCGTA CTATTAACCA ACAGTTATCT TTTATTGATT CTGTGATGGA  
3841 TTGTTTTATT GATTTTTACA TGATTCTGAT TTTTTACATT TTATGTGATG ACTAAATTA AAGTAAATAT TCTTAAATTT  
3921 CTAATAATAA AATTTAACGG ATTTACAAAA TTAGTTGTA AACGAAACTT TTCTCGCTAT TTAACGTTTA TATTATGCTC  
4001 ACATTATTCA AGACAAATCT ACACAAATAT ATAATTATTC TAAAAATTGT AACGATATAT GGGTTTTTAC TTAATATTTT  
4081 CTATAAAAAA AAATTTGCAT ATTGAATTTa aaattacaca tttctatttt atthattatt atagtagag tccacaaaa  
4161 tctatatctt tgcaagcaat tagctaagt taaaaaagcg agthtttagta ccaccagaaa ctaatgctca agactctca  
4241 tctgggattc aaagcagtg cctctthtact aggaaattag tagthtaacga ctcggttaca aaaggaattg gccatattaa  
4321 aattgaagat ttctgtaatt aaatctatth aaatthaagtg ctgattthaga atctthacg tactgtagtt attagacaaa  
4401 atgtaaaaaa ttctatttht taagcagatg atgggaatta cttcaagatc agaagctaaa tcttagatta gaatgcctag  
4481 ttaaatagtt tctaactgta gaacaactga tcaatgctat aaacctatta cattgtaata tthtataac acaaaaattc  
4561 tgaaaaatag ttacaatgat ttactaacgc atthttcaca aatctataat tatattacac aagtgtaag cctatattat  
4641 atatacactg tgagtcaaaa aatccggtg cgcagcttht cgccataac tthgtatta gtgaaccgat tthttaaatt  
4721 tthgcataag tataatcagg aacacatttg ctataaaata acgtthaagtg actctgtgaa thattattht tgcgtgaaag  
4801 cagtgcctga aatatcggt

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Steffen Tschuschke
Geburtsdatum	21.04.1968
Geburtsort	Leipzig
Familienstand	verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

09/1974 – 06/1976	Etkar-Andre-Oberschule, Leipzig
09/1976 – 03/1984	Friedrich-Engels-Oberschule, Leipzig
04/1984 – 06/1987	Gymnasium Vohwinkel, Wuppertal Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium und beruflicher Werdegang

09/1987 – 06/1989	Ausbildung bei der Commerzbank AG, Wuppertal Abschluss: Bankkaufmann
12/1989 – 09/1990	Junior-Kundenberater bei der Commerzbank AG, Wuppertal
10/1990 – 09/1997	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluss: Diplom-Biologe
seit 10/1997	Promotionsstipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Toxikologie und Umwelthygiene“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf