

**Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung  
der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus  
*Ralstonia metallidurans* CH34**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Gregor B. Grass

geboren am 8. Juni 1970 in Frankfurt am Main

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. D. H. Nies
2. Prof. Dr. G.-J. Krauß
3. Prof. Dr. M. Hecker

Verteidigung: 5. Juni 2000, Halle (Saale)

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. EINLEITUNG .....	1
2. MATERIAL UND METHODEN .....	6
2.1. Bakterienstämme und Plasmide.....	6
2.2. Kultivierungsbedingungen.....	10
2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien .....	10
2.2.2. Nährmedien und Zusätze für Hefen .....	13
2.2.3. Zellanzucht, Induktion und Zellernte.....	15
2.2.4. Stammhaltung .....	16
2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA.....	16
2.3.1. Isolierung von DNA .....	16
2.3.1.1. Analytische Megaplasmidisolierung .....	16
2.3.1.2. Isolation von Gesamt-DNA .....	17
2.3.1.3. Mikroplasmidpräparation .....	18
2.3.1.4. Miniplasmidisolierung .....	18
2.3.1.5. Präparative Plasmidisolierung .....	18
2.3.1.6. Plasmidisolierung mittels QIAprep <i>Spin</i> Säulen .....	19
2.3.1.7. Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen .....	19
2.3.2. DNA-Techniken .....	20
2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.3.2.2. DNA-Größenstandard.....	20
2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung.....	20
2.3.2.4. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	21
2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	21
2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	21
2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten .....	21
2.3.2.8. Transformation nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode .....	22
2.3.2.9. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation .....	22
2.3.2.10. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> - Klone.....	23
2.3.2.11. Plasmidtransfer durch Konjugation .....	23
2.3.2.12. Selektion von Doppelaustausch-Rekombinanten im Plasmid pMOL28 .....	23
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	24
2.3.3.1. Auswahl der Primer .....	24
2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.3.3.3. <i>Quick-Change<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis</i> -PCR .....	33
2.3.3.4. Reinigung von PCR-Produkten.....	33

# INHALTSVERZEICHNIS

---

2.3.4. DNA-Sequenzierung.....	33
2.3.4.1. Sequenzierung mit dem <i>SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™</i> DNA Sequencing Kit-ALF™	34
2.3.4.2. Sequenzierung unter Verwendung des <i>dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits</i>	34
2.3.4.3. Sequenzierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des <i>Genome Priming Systems</i>	35
2.3.4.4. Das Sequenziergel	36
2.3.4.5. Auswertung der Sequenzdaten	36
2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	37
2.4.1. Herstellung der Sonden	37
2.4.1.1. Synthese von DNA-Fragmenten	37
2.4.1.2. Digoxigenin-Markierung der Sonden	37
2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards	37
2.4.3. DNA:DNA-Hybridisierung	38
2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA- <i>Blotting</i>	38
2.4.3.2. Hybridisierung	38
2.4.4. Chemilumineszenz-Nachweis	39
2.5. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA	39
2.5.1. Isolierung von RNA	39
2.5.1.1. Vorbereitung des Zellmaterials	39
2.5.1.2. Präparative Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Ralstonia metallidurans</i> AE126	40
2.5.2. RNA-Techniken	41
2.5.2.1. RNA-Konzentrationsbestimmung	41
2.5.2.2. Agarose-Gelelektrophorese	41
2.5.2.3. DNase I-Verdau der Gesamt-RNA	41
2.5.2.4. <i>Primer Extension</i>	42
2.6. <i>in vitro</i> Transkription mit [ $\alpha^{32}$ P]-UTP	43
2.6.1. Gewinnung des DNA-Templates	43
2.6.2. Synthese von mRNA-Größenstandards	43
2.6.3. <i>in vitro</i> Transkription mit [ $\alpha^{32}$ P]-UTP	43
2.6.4. Gelelektrophorese und Autoradiographie	44
2.7. Zellwachstumsversuche	44
2.7.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien	44
2.7.1.1. Das Klett-Summerson Colorimeter	44
2.7.1.2. Zellanzucht von <i>Ralstonia</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen	45
2.7.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration von Schwermetallsalzen	45
2.8. Enzymologische Methoden	46
2.8.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	46
2.8.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte	46
2.8.1.2. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	46
2.8.2. Topologie-Untersuchung von Protein-Carboxytermini	47
2.9. Proteinbiochemische Methoden	48
2.9.1. Protein-Expression und -Reinigung über das <i>IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System</i>	48
2.9.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	48
2.9.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt	49
2.9.1.3. Native Proteinreinigung über Chitin-Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins	49

# INHALTSVERZEICHNIS

2.9.2. Protein-Expression und -Reinigung über das <i>6xHis-Tag</i> -System .....	50
2.9.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte .....	50
2.9.2.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakten .....	50
2.9.2.3. Denaturierende Proteinreinigung über Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose-Säulen.....	50
2.9.3. Proteinbestimmung .....	50
2.9.4. Chloroform-Methanol-Fällung .....	51
2.9.5. Elektrophoretische Methoden.....	51
2.9.5.1. Probenvorbereitung.....	51
2.9.5.2. Protein Marker .....	51
2.9.5.3. Lineare SDS-PAGE .....	52
2.9.5.4. SDS-Tricin-PAGE .....	52
2.9.5.5. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot) .....	53
2.9.5.6. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen CnrX bzw. CzcC.....	54
2.9.5.7. Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation auf PVDF-Membranen .....	54
2.9.6. Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen .....	55
2.9.6.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau.....	55
2.9.6.2. Silberfärbung .....	56
2.9.6.3. Trocknung von Polyacrylamid-Gelen .....	56
2.9.7. Sequenzierung von Proteinen .....	56
2.9.8. Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS).....	56
2.9.8. HPLC-Analyse der proteolytischen Aktivität von CnrX.....	57
2.10. Das <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -System .....	57
2.10.1. Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae cdc25H</i> -Zellen .....	58
2.10.2. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae cdc25H</i> und Überprüfung auf Protein-Interaktionen.....	58
3. ERGEBNISSE .....	59
3.1. Die Transkription und Promotoren der <i>cnr</i> -Determinante.....	59
3.1.1. Über <i>Primer Extension</i> -Analyse konnten die Transkriptionsstartpunkte von <i>cnrYXH</i> und <i>cnrCBA</i> bestimmt werden.....	59
3.1.2. Aktivität der <i>cnr</i> -Promotoren <i>cnrYp</i> und <i>cnrCp</i> .....	61
3.2. Induktion einer $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ Operon-Fusion durch Schwermetall-Ionen.....	62
3.2.1. Die Induktion von $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ ist von der Nickel-Konzentration abhängig .....	62
3.2.2. Cobalt ist ein schwacher Induktor, andere Metalle induzieren nicht .....	66
3.2.3. Die <i>cnr</i> -vermittelte Cobalt-Resistenz wird durch unzureichende Co <sup>2+</sup> -Induktion limitiert.....	67
3.2.4. Zn <sup>2+</sup> und Co <sup>2+</sup> beeinflussen die Ni <sup>2+</sup> -vermittelte <i>cnr</i> -Induktion .....	67
3.2.5. Die Integration einer $\Omega$ -Kassette zwischen <i>cnrH</i> und <i>cnrC</i> führt nicht zum Verlust der Induzierbarkeit.....	68
3.3. Die Deletion von <i>cnrYXH</i> führt zum fast völligen Verlust der Induzierbarkeit von <i>cnr</i> durch Nickel, ist aber <i>in trans</i> komplementierbar.....	69
3.3.1. Konstruktion des <i>cnrYXH</i> -Deletionsstammes DN190 (pMOL28-3 $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH}$ ) .....	69
3.3.2. Die <i>cnrYXH</i> -Deletionsmutante weist eine stark verminderte Resistenz gegenüber Ni <sup>2+</sup> und Co <sup>2+</sup> auf und ist nur noch sehr schwach durch Ni <sup>2+</sup> oder Co <sup>2+</sup> induzierbar .....	70
3.3.3. Die <i>cnrYXH</i> -Deletionsmutante lässt sich <i>in trans</i> durch <i>cnrYXH</i> komplementieren .....	71
3.3.4. CnrY, CnrX und CnrH sind hinreichend und notwendig für die Induktion von <i>cnr</i> .....	71

# INHALTSVERZEICHNIS

3.4. Konstitutive Expression von <i>cnr</i> .....	72
3.4.1. Eine konstitutive <i>cnr</i> -Mutante kann <i>in trans</i> komplementiert werden .....	72
3.4.1.1. Komplementation mit <i>cnrYXH</i> <i>in trans</i> .....	72
3.4.1.2. Die Komplementation der <i>cnrYXH</i> -Deletionsmutante mit <i>cnrYXH</i> (Con) <i>in trans</i> führt zur konstitutiven Expression von <i>cnr</i> .....	72
3.4.1.3. Nur <i>cnrY</i> , nicht aber <i>cnrX</i> , <i>cnrH</i> , <i>cnrYX</i> , <i>cnrYH</i> oder <i>cnrXH</i> können <i>in trans</i> komplementieren .....	73
3.4.2. Der konstitutive Phänotyp wird durch eine <i>Frame-Shift</i> -Mutation in <i>cnrY</i> verursacht .....	73
3.5. Interaktion zwischen Ncc- und Cnr-Regulatoren .....	73
3.5.1. <i>NccYXH</i> kann die $\Delta$ <i>cnrYXH</i> -Deletion nicht <i>in trans</i> komplementieren .....	73
3.5.2. Die Interaktion zwischen <i>NccYXH</i> und <i>CnrYXH</i> führt zum Zusammenbruch der <i>cnr</i> -Induktion .....	75
3.5.3. Die Interaktion zwischen <i>NccYX</i> und <i>CnrH</i> führt zur Induzierbarkeit .....	76
3.5.4. Das <i>NccN</i> -Protein hat keinen Effekt auf die Induktion und das Resistenzniveau .....	76
3.6. Das <i>cnrY</i> -Gen ist um drei Basenpaare kürzer als veröffentlicht .....	77
3.7. Die Carboxy-Termini von <i>CnrY</i> und <i>CnrX</i> sind im Periplasma lokalisiert .....	77
3.8. <i>CnrY</i> und <i>CnrX</i> interagieren <i>in vivo</i> .....	79
3.9. Reinigung der drei Regulator-Proteine <i>CnrY'</i> , <i>X</i> und <i>H</i> .....	82
3.9.1. Reinigung von <i>CnrX</i> als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion .....	82
3.9.2. Reinigung von <i>CnrY'</i> als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion .....	82
3.9.3. Reinigung von <i>CnrH</i> als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion .....	83
3.10. <i>CnrH</i> ist ein Sigma-Faktor .....	85
3.11. Gerichtete Mutationen in <i>CnrX</i> führen nicht zu dessen Funktionsverlust .....	86
3.12. Gerichtete Mutationen in <i>CnrY</i> beeinflussen dessen Interaktion mit <i>CnrH</i> kaum oder gar nicht .....	88
3.13. Pro Molekül <i>CnrX</i> werden drei Moleküle Nickel gebunden .....	89
3.14. <i>CnrX</i> besitzt einen Membrananker .....	90
3.15. Wird <i>CnrY</i> von <i>CnrX</i> proteolytisch gespalten? .....	91
3.16. Stromabwärts von <i>cnrA</i> wird ein offener Leserahmen von 351 aa ( <i>CnrT</i> ) und eine putative Transposase ( <i>Tnp</i> ) kodiert .....	92
3.17. Deletion und <i>in trans</i> Komplementation der Gene <i>cnrC</i> , <i>cnrB</i> bzw. <i>cnrCB</i> auf Plasmid pMOL28 .....	96
3.17.1. Deletion der Gene <i>cnrC</i> , <i>cnrB</i> bzw. <i>cnrCB</i> auf Plasmid pMOL28 führen zur Verminderung der Nickel- und Cobaltresistenz .....	96
3.17.2. Die Komplementation der <i>cnrC</i> -, <i>cnrB</i> - bzw. <i>cnrCB</i> -Deletionsmutanten .....	98
3.18. Reinigung des <i>CzcC</i> -Proteins zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern .....	99
3.18.1. Das <i>CzcC</i> -Protein wurde als 6xHis- <i>tagged</i> Fusion überexprimiert und gereinigt .....	99
3.18.2. <i>CzcC</i> wird N-terminal prozessiert, dabei wird der periplasmatische <i>Leader</i> abgespalten .....	99
3.18.3. Mittels <i>CzcC</i> -spezifischer Antikörper ließ sich <i>CzcC</i> im Mutantenstamm DN413 (pMOL28-8 <i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) $\Delta$ <i>cnrCB</i> ), pDNA324( <i>czcCB</i> ) nachweisen .....	100
4. DISKUSSION .....	101
4.1. Die Regulation der <i>cnr</i> -Determinante .....	101
4.1.1. <i>Cnr</i> -Regulation durch Transkriptionskontrolle .....	101
4.1.2. <i>Cnr</i> -Regulation durch Protein-Protein-Interaktion .....	106
4.2. Der Einfluss der <i>ncc</i> -Regulatoren auf die <i>cnr</i> -Determinante .....	115
4.3. Aktuelles Modell der <i>cnr</i> -Regulation .....	117
4.4. Interaktion von Proteinen der Efflux-Komplexe der Resistenzsysteme <i>cnr</i> , <i>czc</i> und <i>ncc</i> .....	120
4.5. Die Region stromabwärts von <i>cnrCBA</i> .....	123

4.6. Ausblick .....	127
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	128
6. LITERATUR .....	131

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
aa (Aa)	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
ATPase	Adenosintriophosphatase
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CBD	Chitin-Binde-Domäne
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> (Proteinfamilie)
cDNA	komplementäre Desoxiribonucleinsäure
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro-{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7 ] decan }-4-yl) phenyl phosphate
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithioereitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

G	Guanin
h	Stunde
IR	<i>Inverted Repeat</i>
IPTG	Isopropyl-(-D-thiogalactopyranosid)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
LB	Luria-Bertani-Medium
LiOAc	Lithiumacetat
MFP	<i>Membran Fusions Protein</i> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min.	Minute
mind.	mindestens
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
nt	Nukleotide
NA	Nähragar
NaAc	Natriumacetat
NB	Nährbouillon
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OMF	<i>Outer Membrane Factor</i> (Proteinfamilie)
ONPG	o-Nitrophenyl-D-galactopyranosid
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
RGR	Regulatorgenregion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RND	<i>Resistance, Nodulation, Cell Division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>Rotations Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rpr	<i>M 13 Reverse Primer</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcription</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

## INHALTSVERZEICHNIS

---

SGR	Strukturgenregion
spez.	spezifisch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
upr	M 13 <i>Universal Primer</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
VIS	<i>Visible</i>
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

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

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

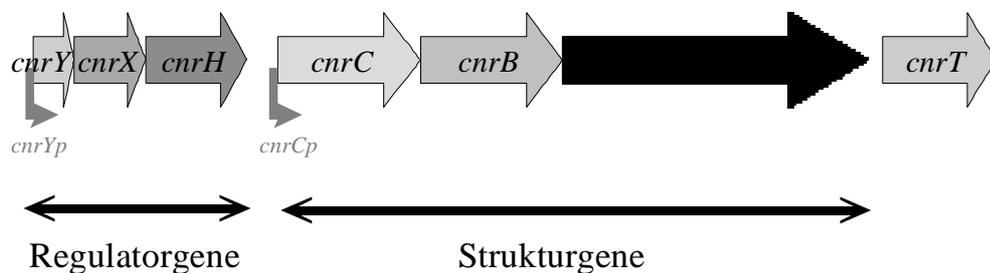
## 1. EINLEITUNG

Bakterien besitzen aufgrund ihrer hohen Reproduktions- und Mutationsrate die Fähigkeit, sich schnell an neue, widrige Umwelteinflüsse anzupassen. Als vorteilhaft erweist sich hierbei, dass sich jede Mutation auf den gesamten Organismus auswirkt. Indem die Bakterien die Genexpression den umweltbedingten Stressbedingungen anpassen, konnten sie unter verschiedensten Umgebungsbedingungen überleben (Vicente *et al.*, 1999). Ändern sich die Umwelteinflüsse, gelingt es meist einigen Bakterien, sich den neuen Gegebenheiten durch Mutation oder durch Expression einer induzierbaren Stoffwechselleistung anzupassen. Darüber hinaus bedeutet eine Adaptation meist auch die Sicherung einer neuen ökologischen Nische. So können diese Pioniere - zumindest eine Zeit lang - konkurrenzlos gedeihen. Zur Bewältigung der dabei entstehenden umweltbedingten Stresszustände haben sich verschiedenartige Strategien entwickelt.

Eine solche Strategie wird zum Beispiel bei der Anpassung von Bakterien an divalente Schwermetall-Kationen deutlich. Die Bakterienzelle kann normalerweise nicht verhindern, dass hohe toxische Konzentrationen an diesen Stressoren über die konstitutiv exprimierten, schnellen und unspezifischen CorA-Magnesium-Aufnahme-Systeme ins Cytoplasma gelangen (Smith *et al.*, 1995; Smith und Maguire, 1998; Tao *et al.*, 1995). Eine Reaktion auf diesen unkontrollierten Influx sind Mutationen im Aufnahmesystem (Nelson und Kennedy, 1971; Gibson *et al.*, 1991). Das hat allerdings den Nachteil, dass diese Zellen aufgrund ihres erhöhten Energieverbrauchs weniger lebensfähig sind als der Wildtyp, wenn keine toxischen Konzentrationen an Metall-Ionen vorliegen und daher diese Mutanten schnell durch Revertanten überwachsen werden (Nies, 1999). Die Evolution hat deshalb in den meisten Fällen zu anderen Lösungen geführt, wobei es zu einer Ergänzung der schon vorhandenen Schwermetall-Homöostase-Systeme durch weitere regulierbare Systeme kam. Zum einen werden die Kationen an Thiolgruppen bestimmter Peptide, wie Glutathion (Hultberg, 1998; Owens und Hartman, 1986) oder Proteine, wie Metallothioneine (Olafson *et al.*, 1988; Shi *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 1993) gebunden und damit entgiftet, zum anderen kann zum Beispiel Quecksilber ( $\text{Hg}^{2+}$ ) zum flüchtigen  $\text{Hg}^0$  reduziert werden (Schiering *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1992) oder  $\text{Cr}^{6+}$  zum weniger toxischen  $\text{Cr}^{3+}$  (Bopp *et al.*, 1983; Peitzsch *et al.*, 1998). Die Metall-Kationen können auch über Efflux-Systeme aus der Zelle gepumpt werden. Dabei kann die Energie für diesen Transport aus der ATP-Hydrolyse stammen (P-Typ-ATPasen; Rensing *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2000 bzw. ABC-Transporter; Cheng *et al.*, 1997) oder aus dem Protonengradienten (CBA-Protonen/Kationen-Antiport-Transporter; Sensfuß und Schlegel, 1988; Varma *et al.*, 1990; Goldberg *et al.*, 1999). Die meisten untersuchten Schwermetall-resistenten Bakterien nutzen mehrere Möglichkeiten der Entgiftung.

## 1. Einleitung

*Ralstonia metallidurans* CH34 (früher *Alcaligenes eutrophus*; Brim *et al.*, 1999; Mergeay 2000; Goris *et al.*, 2000) ist einer dieser an extreme Umweltbedingungen angepassten Organismen. Das stäbchenförmige Gram-negative Boden- und Wasserbakterium besitzt mehrere Schwermetall-Resistenzsysteme, die es in die Lage versetzen, Schwermetallstress zu bewältigen. Seine beiden Megaplasmide pMOL28 und pMOL30 kodieren für mindestens acht Schwermetall-Determinanten. Das kleinere pMOL28 (180 kb; Taghavi *et al.*, 1997) kodiert für die Chromat (*chr*)- (Nies *et al.*, 1989; Nies *et al.*, 1990; Peitzsch, 1999) und eine Quecksilberresistenz (*mer*; Diels *et al.*, 1985) sowie für die Resistenz gegen Cobalt und Nickel (*cnr*, Abb. 1; Siddiqui *et al.*, 1988; Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993). Auf dem größeren pMOL30 (238 kb; Mergeay *et al.*, 1985) befinden sich Gene für Resistenzen gegen Cobalt, Zink und Cadmium (*czc*, Abb. 2; Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989), Blei (*pbr*; N. Brown, pers. Mitteilung), Kupfer (*cop*; Dressler *et al.*, 1991) und Quecksilber (*mer*; Diels *et al.*, 1985). Eine weitere Resistenzdeterminante gegen Quecksilber befindet sich auf dem Bakterienchromosom (Dressler *et al.*, 1991). Zumindest bei den beiden Resistenzsystemen Czc und Cnr beruht der Resistenzmechanismus auf einem aktiven Efflux der Metall-Kationen (Sensfuß und Schlegel, 1988; Nies und Silver, 1989; Varma *et al.*, 1990) vom Cytoplasma über beide Membranen ins Außenmedium (*Transenvelope Transport*; Saier *et al.*, 1994; Nikaido, 1996).



**Abb.1: Struktur der *cnr*-Nickel-Cobalt-Resistenz-Determinante**

Physikalische Karte der *cnr*-Determinante. Dicke Pfeile stellen die *cnr*-Gene und ihre Transkriptionsrichtung dar, „geknickte“ Pfeile markieren die *cnr*-Promotoren und Doppelpfeile unterhalb der Gene benennen die beiden Operone der Determinante. Die Funktion von CnrT ist bisher unbekannt. Die Gene der Regulatorgen-Regionen sind leicht vergrößert dargestellt.

Die Ausprägung der Resistenz steht nicht unabhängig von den anderen StoffwechsellLeistungen des Bakteriums. Daher ist eine gut abgestimmte Regulation unbedingt notwendig. Zum Beispiel wird das in hohen Konzentrationen toxisch wirkende Nickel in geringen Konzentrationen von den *R. metallidurans*-Zellen benötigt. Zum autotrophen Wachstum von *Ralstonia* werden in die aktiven Zentren von Hydrogenasen neben Fe(II) auch Nickel(II)ionen eingebaut (Cammack *et al.*, 1986; Mergeay *et al.*, 1985; Friedrich *et al.*, 1982).

Das Bakterium *R. metallidurans* CH34 wurde 1974 aus einem Zinkdekantationstank einer Zinkhütte in Belgien isoliert (Mergeay *et al.*, 1978). Hier war es mehreren verschiedenen Metallionen ausgesetzt. In Abhängigkeit der Metallionen, die gerade im umgebenden Medium als Stressoren wirkten, war es notwendig, auch die Resistenzsysteme unterschiedlich zu regulieren. Es musste dafür gesorgt werden, dass jedes System nur durch dasjenige Metall induziert wurde, welches anschließend entgiftet wurde.

Besonders deutlich wird dieses Problem bei den zwei Determinanten *czc* und *cnr*. Beide kodieren für einen induzierbaren CBA-Efflux-Komplex, bestehend aus einem RND- (*Resistance Nodulation Cell Division*)-Protein CzcA bzw. CnrA (Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1999), einem MFP (*Membrane Fusion Protein*) CzcB bzw. CnrB (Saier *et al.*, 1994; Dinh *et al.*, 1994) und einem OMF (*Outer Membrane Factor*) CzcC bzw. CnrC (Dong und Mergeay; 1994; Diels *et al.*, 1995; Paulsen *et al.*, 1997). Die jeweiligen Regulatoren der Resistenzsysteme *cnr* und *czc* sind jedoch völlig unterschiedlich. Die *czc*-Determinante besitzt mindestens sechs Regulatorproteine deren Gene in zwei Regionen stromaufwärts (*czcN* und *czcI*) bzw. stromabwärts (*czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE*) in der gleichen Orientierung wie die Strukturgene *czcCBA* transkribiert werden (Grosse *et al.*, 1999). Den Proteinen CzcN und CzcI, die in der *Upstream Regulatory Region* (URR) kodiert werden, konnten bisher noch keine Funktionen zugeordnet werden. Das in der *Downstream Regulatory Region* (DRR) kodierte CzcD gehört zur Familie der *Cation Diffusion Facilitators* (CDF) und ist selbst eine eigenständige Homöostase-Efflux-Pumpe (Anton *et al.*, 1999). Dem periplasmatisch lokalisierten CzcE konnte ebenfalls noch keine Funktion zugeordnet werden, es hat aber Einfluss auf die *czc*-vermittelte Zink-Resistenz (Anton, pers. Mitteilung). CzcR+S bilden ein Zwei-Komponenten-System aus Histidin-Sensor-Kinase und *Response*-Regulator (van der Lelie *et al.*, 1997).

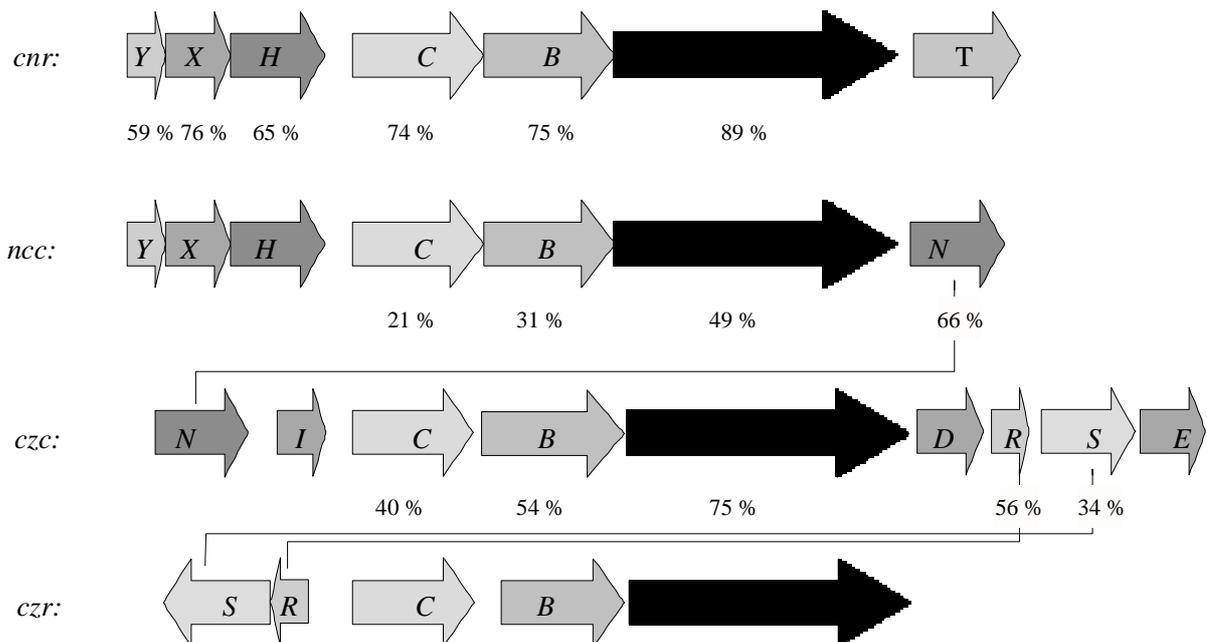
Dem gegenüber findet man bei der *cnr*-Determinante die Gene der Regulatoren nur in einer stromaufwärts gelegenen Region, die in der gleichen Richtung wie *cnrCBA* transkribiert werden (Abb. 1). In dieser Regulatorgen-Region (RGR) wird der ECF- (*Extra-Cytoplasmic Function*)-Sigma-Faktor CnrH kodiert. ECF-Sigma-Faktoren bilden eine Familie ähnlicher Sigma-Faktoren innerhalb der  $\sigma^{70}$ -Überfamilie (Lonetto *et al.*, 1994; Missiakas und Raina; 1998). Der Sigma-Faktor CnrH wird kontrolliert von einem Komplex aus CnrY (früher auch ORF0<sub>b</sub> genannt), einem membrangebundenen Protein, und CnrX (früher CnrR) (Liesegang *et al.*, 1993), einem periplasmatischen Nickel-Sensor-Protein mit möglicher proteolytischer Aktivität (Grass *et al.*, 2000b). Interessanterweise agiert im *cnr*-System ein Regulator (CnrH) als Transkriptionsfaktor des Systems (Grass *et al.*, 2000a, b; Tibazarwa *et al.*, 2000), während dies bei *czc* nicht der Fall ist. Hier ist wahrscheinlich ein auf dem Chromosom kodierter, bisher unbekannter Sigma-Faktor involviert (Große *et al.*, 1999).

Bei einem verwandten Resistenz-System (*ncc*; Abb. 2) aus *Achromobacter* (Yabuuchi *et al.*, 1998) (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* 31A, wurden Elemente aus beiden Regulations-Systemen gefunden. Dieser Organismus besitzt nur einen bekannten CnrCBA- bzw. CzcCBA-ähnlichen

## 1. Einleitung

Metall-CBA-Transport-Komplex, NccCBA. Die *ncc*-Determinante vermittelt Resistenz gegen Nickel, Cobalt und Cadmium und wird jeweils einmal auf jedem der beiden Megaplasmide pTOM8 und pTOM9 kodiert (Schmidt und Schlegel, 1994). Da nur ein Resistenz-System vorliegt, müssen keine verschiedenen Regulationswege koordiniert werden. Dieses System besteht außer aus den Strukturgenen *nccCBA* zusätzlich aus dem stromaufwärts gelegenen *nccYXH*-Operon (mit großer Ähnlichkeit zu *cnrYXH* auf Proteinebene) und dem stromabwärts gelegenen Gen *nccN* (mit großer Ähnlichkeit zu *czcN*, Abb. 2). Ein weiteres ähnliches Resistenz-System wurde kürzlich in *Pseudomonas aeruginosa* CMG103 identifiziert. Diese *czr*-Determinante vermittelt Resistenz gegen Cadmium und Zink und setzt sich aus dem CBA-Efflux-Komplex und einem R+S-Zwei-Komponenten-Regulationssystem zusammen (Hassan *et al.*, 1999; Abb. 2). Im Gegensatz zu *cnr*, *czc* und *ncc* ist die *czr*-Determinante jedoch chromosomal kodiert.

Typisch für die Regulation bakterieller CBA-Efflux-Systeme scheinen also ein Zwei-Komponenten-System R+S auf der einen, und/oder das Paar Sigma-Faktor Anti-Sigma-Faktor auf der anderen Seite zu sein. Einen Überblick über die Ähnlichkeit der Proteine der aufgeführten Efflux-Systeme gibt Abbildung 2.



**Abb.2: Vergleich verschiedener bakterieller CBA-Protonen/Kationen-Antiport-Systeme.**

Dargestellt sind die Genanordnung und Ähnlichkeiten entsprechender Proteine der *cnr*- (Cobalt-Nickel), *ncc*- (Nickel-Cobalt-Cadmium), *czc*- (Cobalt-Zink-Cadmium) bzw. *czr*- (Cadmium-Zink)-Schwermetall-Resistenz-Determinanten. Jeweils zwischen den Genen der Determinanten stehen die prozentualen Ähnlichkeiten der entsprechenden Proteine. Die Richtung der Pfeile gibt die Transkriptionsrichtung der Gene an. Nicht dargestellt sind (potentielle) Transkriptionsstartpunkte.

In *R. metallidurans* CH34 wird die *cnr*-Determinante spezifisch durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Stress induziert. Für die Bakterien wäre äußerst sinnvoll, die  $\text{Ni}^{2+}$ -Kationen bereits kurz nach der Passage durch die Porine der äußeren Membran zu „fühlen“ und über eine Signalkette bereits dann die Expression der Resistenzgene voranzutreiben. Denn wenn die Kationen erst im Cytoplasma „entdeckt“ werden, können sie schon toxische Effekte, wie etwa die Verdrängung von  $\text{Fe}^{2+}$  aus den katalytischen Zentren von Enzymen (Mallick und Rai, 1992; Stockand *et al.*, 1993) hervorgerufen haben.

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein 8.5 kb *EcoRI-PstI*-DNA-Fragment sequenziert vor, das für *cnrYXHCBA* kodiert (Abb. 1). Durch Transposonmutagenese waren die an der induzierbaren Resistenzausprägung beteiligten Gene identifiziert worden (Liesegang *et al.*, 1993).

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Regulation der *cnr*-Determinante auf molekularem und physiologischem Niveau, sowie die Charakterisierung der drei Regulatoren CnrY, CnrX und CnrH. Ebenso war die Frage der Existenz eines *cnrN*-Genes stromabwärts von *cnrA* zu klären. Außerdem wurde untersucht, in wieweit verschiedene Proteine der Schwermetall-Resistenzsysteme *cnr*, *czc* und *ncc* in ihrer Funktion austauschbar sind.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Bakterienstämme und Plasmide

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

**Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide**

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Ralstonia metallidurans</i>			
AE104	plasmidfrei	keine Metallresistenz	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE126	pMOL28	CobB <sup>r</sup> , Nic <sup>r</sup> ( <i>cnr</i> -Determinante)	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE128	pMOL30	CobB <sup>r</sup> , Zin <sup>r</sup> , Cad <sup>r</sup> ( <i>czc</i> -Determinante)	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN176	(pMOL28-1)	<i>cnrYI</i> (Con), konstitutive <i>cnr</i> -Expression	diese Arbeit
DN177	(pMOL28-2)	$\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	diese Arbeit
DN190	pMOL28-3	$\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) $\Delta$ <i>cnrYXH</i>	diese Arbeit
DN195	pMOL28-4	<i>cnrYI</i> (Con), $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) konstitutive <i>cnr</i> -Expression	diese Arbeit
DN410	pMOL28-5	pMOL28-2 $\Omega$ (2100 bp::pECD581) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	diese Arbeit
DN411	pMOL28-6	$\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) <i>cnrYI</i> (Con) $\Delta$ <i>cnrC</i>	diese Arbeit
DN412	pMOL28-7	$\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) <i>cnrYI</i> (Con) $\Delta$ <i>cnrB</i>	diese Arbeit
DN413	pMOL28-8	$\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) <i>cnrYI</i> (Con) $\Delta$ <i>cnrCB</i>	diese Arbeit
<i>Achromobacter xylosoxydans</i>			
31A	pTOM8, pTOM9	CobB <sup>r</sup> , Nic <sup>r</sup> , Cad <sup>r</sup> , Zin <sup>r</sup> , Cu <sup>r</sup> ( <i>ncc</i> -Determinante)	Schmidt und Schlegel, 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
cdc25H	plasmidfrei	Mat $\alpha$ , <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801</i> <i>trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal<sup>+</sup></i>	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>			
JM83	plasmidfrei	<i>ara</i> , $\Delta$ ( <i>lac – proAB</i> ), <i>rpsL</i> , ( <i>str<sup>r</sup></i> ), <i>thi</i> , $\phi$ 80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	Vieira und Messing, 1982

## 2. Material und Methoden

			Fortsetzung Tabelle 1.
Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
XL1-Blue	plasmidfrei	$\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMRmrr)$ 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>f</sup>Z</i> $\Delta$ M15, Tn5 (kan <sup>r</sup> )]	Stratagene GmbH, Heidelberg
XL2-Blue	plasmidfrei	<i>recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44, relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>f</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 (tet <sup>r</sup> ) Amy cam <sup>r</sup> ]	Stratagene GmbH, Heidelberg
ER 2566	plasmidfrei	<i>F<sup>-</sup> <math>\lambda</math> fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 <math>\Delta(mcrC-mrr)</math> 114::IS10 R(mcr-73::miniTn10—TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]; T7-Expressionsstamm</i>	NewEngland BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
M15	pREP4	nal <sup>s</sup> str <sup>s</sup> rif <sup>s</sup> lac <sup>-</sup> ara <sup>-</sup> gal <sup>-</sup> mtl <sup>-</sup> F <sup>-</sup> recA <sup>+</sup> uvr <sup>+</sup> ; <i>His-Tag-Expressionsstamm</i>	QIAGEN, Hilden
S17-1		<i>pro</i> , Tra <sup>+</sup> <i>recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
CC118		<i>phoA</i> $\Delta$ 20 <i>galE15 galK16 thi rpsE rpoB, aerE (Am) recA1</i>	
	pGEM -T Easy	amp <sup>r</sup> , <i>lacPOZ'</i> , zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, Wi-USA
EC719	pECD566	<i>cnrYXH</i> als 1.7 kb <i>XbaI</i> -Fragment in pGEM -T Easy	diese Arbeit
EC771	pECD618	<i>phoA</i> Fusionsvektor (pGEM -T Easy-Derivat) ohne <i>PhoA-Leader</i>	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC772	pECD619	<i>phoA</i> Fusionsvektor (pGEM -T Easy-Derivat) mit <i>PhoA-Leader</i>	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC782	pECD607	<i>cnrY</i> in pECD500 ( <i>cnrY-phoA</i> Fusion)	diese Arbeit
EC782	pECD607	<i>cnrX</i> in pECD500 ( <i>cnrX-phoA</i> Fusion)	diese Arbeit
	pLO2	<i>Suicid</i> -Rekombinations-Vektor in <i>Ralstonia metallidurans metallidurans</i>	Lenz <i>et al.</i> , 1994
EC743	pECD581	bp 2100-2400 von <i>cnrH'C'</i> in pLO2	diese Arbeit
EC745	pECD592	pGEM -T Easy mit <i>lacZ</i> (als <i>BamHI/XbaI</i> -Fragment, ohne <i>lacZop</i> )	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
	pTYB2	Amp <sup>r</sup> , Expressionsvektor für Fusions-Proteine mit C-terminalem Intein mit CBD	New England BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus

## 2. Material und Methoden

			Fortsetzung Tabelle 1.
Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
EC789	pECD614	<i>cnrY'</i> (CnrY' A <sub>58</sub> E/A <sub>59</sub> R) <i>NdeI/blunt</i> in pTYB2	diese Arbeit
EC790	pECD615	<i>cnrX NdeI/blunt</i> in pTYB2 <i>cnrX</i> (CnrX H <sub>41</sub> R/H <sub>41</sub> R) <i>NdeI/blunt</i> in pTYB2	diese Arbeit Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC791	pECD616 pQE70	<i>cnrH NdeI/blunt</i> in pTYB2 Amp <sup>r</sup> , Expressionsvektor für Fusions-Proteine mit C-terminalem <i>6xHis-Tag</i>	diese Arbeit QIAGEN, Hilden
	pGPS2	Cam <sup>r</sup> , Transprimer <sup>TM</sup> (Transposon-) GPS-Mutagenese-Vektor	New England Biolabs GmbH, Schwalbach i. Taunus
EC722	pECD569 pMC1871	1.6 kb <i>PstI/XhoI-cnr</i> -stromabwärts Fragment in pECD553 (Kan <sup>r</sup> ) trägt <i>lacZ</i> -Gen ohne Promotor	Stammsammlung der Arbeitsgruppe Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC768	pECD606 pSOS pSOS MAFB pSOS Coll	<i>czcC</i> als <i>SphI/BamHI</i> -Fragment in pQE70 <i>E.coli</i> -Hefe- <i>Shuttle</i> -Vektor, amp <sup>r</sup> , ColE1, 2μ ori, LEU2, P <sub>ADHI</sub> , hSOS' MAFB, Positiv-Kontrolle in pSOS Murine 72 kDa TypIV Collagenase (aa 148-357 in pSOS)	diese Arbeit Stratagene, Heidelberg Stratagene, Heidelberg Stratagene, Heidelberg
EC784	pECD609	<i>cnrY'</i> CnrY A <sub>58</sub> E/A <sub>59</sub> R <i>BamHI/SalI</i> in pSOS	diese Arbeit
EC785	pECD610 pMYR pMyr MAFB pMyr Lamin C	<i>cnrY'X'</i> CnrY A <sub>58</sub> E/A <sub>59</sub> R CnrX ohne <i>Leader BamHI/SalI</i> in pSOS <i>E.coli</i> -Hefe- <i>Shuttle</i> -Vektor, cam <sup>r</sup> , ColE1, 2μ ori, URA3, P <sub>GAL1</sub> , Myristylations-Signal MAFB, Positiv-Kontrolle in pMyr Humanes Lamin C (aa 67-230) in pMyr	diese Arbeit Stratagene, Heidelberg Stratagene, Heidelberg Stratagene, Heidelberg
EC786	pECD611	<i>cnrX'</i> CnrX ohne <i>Leader EcoRI/SalI</i> in pMyr	diese Arbeit
EC787	pECD612	<i>cnrH EcoRI/SalI</i> in pMyr	diese Arbeit

## 2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 1.

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
EC788	pECD613	<i>cnrX'</i> H CnrX ohne <i>Leader EcoRI/SalI</i> in pMyr	diese Arbeit
EC792	pECD617	<i>cnrX'</i> CnrX H <sub>31</sub> R ohne <i>Leader EcoRI/SalI</i> in pMyr	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
	pVDZ'2	Tet <sup>r</sup> IncP1 <i>lacZ'</i> Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup>	Deretic <i>et al.</i> , 1987
EC686	pDNA291	<i>cnrYXH</i> als 1.7 kb <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC694	pDNA298	$\Phi$ ( <i>cnrHp-lacZ</i> ) als <i>HindIII/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC695	pDNA299	$\Phi$ ( <i>cnrCp-lacZ</i> ) als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC696	pDNA300	$\Phi$ ( <i>cnrYp-lacZ</i> ) als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC699	pDNA303	<i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment $\Phi$ ( <i>nccYX-cnrH</i> ) aus pECD578 in pVDZ'2	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC700	pDNA304	<i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment ( <i>nccYXH</i> ) aus pECD577 in pVDZ'2	diese Arbeit
EC706	pDNA310	<i>cnrYXH</i> CnrX H <sub>41</sub> R als 1.7 kb <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC709	pDNA313	<i>cnrYXH</i> CnrX H <sub>31</sub> R als 1.7 kb <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
EC759	pDNA319	<i>cnrC</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC760	pDNA320	<i>cnrB</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC761	pDNA321	<i>cnrCB</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC762	pDNA322	<i>czcC</i> als <i>EcoRI/PstI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC763	pDNA323	<i>czcB</i> als <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC764	pDNA324	<i>czcCB</i> als <i>EcoRI/PstI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC765	pDNA325	<i>nccC</i> als <i>BamHI/PstI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC766	pDNA326	<i>nccB</i> als <i>BamHI/PstI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC767	pDNA327	<i>nccCB</i> als <i>BamHI/PstI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC688	pDNA292	<i>cnrY</i> als <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC689	pDNA293	<i>cnrX</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC690	pDNA294	<i>cnrH</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC691	pDNA295	<i>cnrYX</i> als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit

## 2. Material und Methoden

---

Fortsetzung Tabelle 1.

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
EC692	pDNA296	<i>cnrYH</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC693	pDNA297	<i>cnrXH</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC769	pDNA328	<i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>34</sub> D als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC770	pDNA329	<i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>34</sub> Q als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC775	pDNA334	<i>cnrYXH</i> ( <i>cnrYI</i> (Con)) als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC776	pDNA335	<i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>42</sub> D als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC777	pDNA336	<i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>42</sub> Q als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC778	pDNA337	<i>cnrYXH</i> CnrY E <sub>5</sub> Q/E <sub>6</sub> Q als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC779	pDNA338	<i>cnrYXH</i> CnrY R <sub>12</sub> T/K <sub>13</sub> T als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC780	pDNA339	<i>cnrYXH</i> CnrY C <sub>51</sub> S/C <sub>52</sub> S als <i>XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit
EC781	pDNA340	<i>nccN</i> als <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pVDZ'2	diese Arbeit

---

## 2.2. Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien

#### A) Nährbouillon I (SIFIN GmbH, Berlin)

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

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

#### B) Nähragar (SIFIN GmbH, Berlin)

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

Diese Festmedien dienten der Zellanzucht von *E. coli* - Stämmen.

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

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g Natriumchlorid  
NaOH ad pH 7.0  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

### D) Spurenelementlösung SL6 (10 fach) nach Pfennig (1974)

900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
0.1 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0.03 g MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
0.3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
0.2 g CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
0.01 g CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0.188 g NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
0.03 g Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O                      ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

#### Komponente A (20 fach):

800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
121.1 g Tris-HCl  
HCl ad pH 7.0  
danach Zugabe von:  
93.6 g NaCl  
29.8 g KCl  
21.4 g NH<sub>4</sub>Cl  
4.0 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
0.60 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat  
2 ml Spurenelementlösung SL6 (10 fach) nach Pfennig (1974)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### Komponente B (20 fach):

900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
19.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 10 H<sub>2</sub>O  
4.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt.

Für die Anzucht von *Ralstonia metallidurans* im Flüssigmedium wurden 2 g/l Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle zugesetzt und mitsterilisiert.

### F) Medium zur Selektion von Doppelrekombinanten in *Ralstonia metallidurans*

Tris-gepuffertes Minimal-Medium +

150 g/l Saccharose

1 g/l Hefeextrakt

0.1 mM K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>

Für Tris-Minimal-Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l (bei Zugabe von Metallsalzen 20 g/l) Bacto-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt.

### G) Medienzusätze

#### **Schwermetallsalze**

Die Schwermetallsalze ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> lagen als 1 M bzw. 0.1 M wässrige Stammlösungen vor.

Die Stammlösungen wurden im sterilem Medium auf die beschriebenen Endkonzentrationen verdünnt.

#### **Antibiotika**

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

**Tab. 2: Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium**

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 g/l H <sub>2</sub> O bidest	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H <sub>2</sub> O bidest	25 mg/l ( <i>E. coli</i> )
	-	1 g/l ( <i>Ralstonia metallidurans</i> )
Tetracyclin	12.5 g/l 50 % Ethanol	12.5 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l Ethanol (96 %)	20 mg/l
Streptomycin	10 g/l H <sub>2</sub> O bidest	10 mg/l

#### **Weitere Medienzusätze**

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

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

### 2.2.2. Nährmedien und Zusätze für Hefen (Stratagene, Heidelberg)

#### A) YPAD-Medium-Agar

- 1 % Hefeextrakt
- 2 % Bacto<sup>®</sup>-Pepton
- 2 % Glucose
- 2 % Bacto<sup>®</sup>-Agar
- 40 mg Adenin-Sulfat

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Nach dem Autoklavieren und Gießen der Platten wurden diese 3 Tage bei RT getrocknet. Für YPAD-Flüssigmedium wurde Medium ohne Bacto<sup>®</sup>-Agar zubereitet.

#### C) 10 x *Dropout*-Medium

- |                                  |                       |
|----------------------------------|-----------------------|
| 300 mg L-Isoleucin               | 200 mg L-Methionin    |
| 1500 mg L-Valin                  | 500 mg L-Phenylalanin |
| 200 mg L-Adenin-Hemisulfat       | 2000 mg L-Threonin    |
| 500 mg L-Arginin-HCl             | 500 mg L-Tyrosin      |
| 200 mg L-Histidin HCl Monohydrat | 1000 mg L-Glutamat    |
| 500 mg L-Lysin HCl               | 1000 mg L-Aspartat    |
| 400 mg L-Serin                   |                       |

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

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

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

- 1.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 5 g Ammonium-Sulfat
- 20 g Glucose
- ad 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

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

- 1.7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
- 5 g Ammonium-Sulfat
- 20 g Galaktose
- 10 g Raffinose
- ad 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

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

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

### 2.2.3. Zellanzucht, Induktion und Zellernte

#### *Ralstonia metallidurans*

Die Anzucht von *Ralstonia metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Medium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 2 g/l Natriumgluconat zugesetzt wurde. Für Konjugationsversuche wurde *Ralstonia metallidurans* in NB-Medium angezogen.

Als Kulturgefäße für die Anzuchten aller Stämme dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß maximal 1:5 betrug. Die Zugabe von Antibiotika und Schwermetallsalzen erfolgte in den schon beschriebenen Konzentrationen. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C (Brutraum) auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 150 rpm angezogen. Für Wachstumsversuche erfolgte die Zellanzucht in einem Wasserbadschüttler (Gyrotory G76, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey) bei 30°C und 140 rpm. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung mit einem Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., USA) in Kletteinheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Für die RNA-Isolation wurden die Zellen bei ca. 300 Kletteinheiten mit den entsprechenden Metallen induziert bzw. die Kontrollen jetzt geerntet. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30°C (im Brutraum) für 1-5 Tage inkubiert. Die Zellernte für Enzymtests erfolgte durch Zentrifugation für 4 min. bei 10000 rpm und 4°C in einer Laborzentrifuge (Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Für die RNA-Isolation wurden die Zellen entweder durch 10 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C in einer Laborzentrifuge (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) oder durch 15 s Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) bei 12000 rpm und Raumtemperatur geerntet.

### *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in NB- oder LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben, wobei ebenfalls auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C (Brutraum) in fast waagrecht eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (HS500, IKA Labortechnik) oder auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als optische Dichte (OD<sub>600</sub>) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec II, LKB Biochrom Ltd., England) gemessen. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 37°C (im Brutraum) für 12-24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder durch 10 minütige Zentrifugation in einer Hettich-Zentrifuge (Universal 30 RF, Tuttlingen) bei 4°C und 5000 rpm, in der Sigma-Laborzentrifuge bei 4°C und 12000 rpm oder durch 30 s Zentrifugation in der Sigma Tischzentrifuge.

### **2.2.4. Stammhaltung**

Die Kultivierung von *Ralstonia metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agar-Platten, wobei den plasmidtragenden Stämmen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so dass zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand.

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

### 2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

#### 2.3.1. Isolierung von DNA

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

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

Es wurden 10 ml einer *Ralstonia metallidurans*-Übernachtskultur abzentrifugiert und in 2 ml E-Puffer [75 mM Tris-Acetat (pH 7.3), 1 mM EDTA] resuspendiert. Nach vorsichtiger Zugabe von 1 ml Lysispuffer [5 Teile 1 N NaOH + 6 Teile 200 g/l SDS + 9 Teile steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>] wurde 1 h bei 68°C inkubiert. Es wurden 400 µl 5 M NaCl und 6 ml Phenol : Chloroform 1:1 (v/v) auf die heiße Probe gegeben und diese 20mal kräftig aus dem Handgelenk geschwenkt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die Oberphase 1 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde die wässrige Phase in ein frisches 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, mit 100 µl steriler 10 % (v/v) Essigsäure neutralisiert und mit 6 ml Diethylether extrahiert. Zur vollständigen Phasentrennung wurde 5 min. zentrifugiert. Ether- und Interphase wurden verworfen und verbliebene Etherreste bei 60°C (10-20 min.) verdampft. Die Megaplasmid-DNA wurde mit 6 ml eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol bei -70°C für 30 min. gefällt. Eine anschließende Zentrifugation bei 5000 rpm für 30 min. bei 4°C führte zur Sedimentation der DNA, die dann in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert wurde. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl 5 M NaCl und 1 ml 96 % (v/v) Ethanol umgefällt (30 min. bei -70°C), mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und mittels Vakuumpumpe getrocknet. Das Megaplasmid-DNA-Pellet wurde in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen und 1 h bei 50°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

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

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

7.5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 15 min. bei 4°C und 4 500 rpm abzentrifugiert (Hettich, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde in 7.5 ml Phosphatpuffer [10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8] gewaschen und erneut wie angegeben zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 0.85 ml eiskalter Saccharose-Lösung [250 g/l Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] resuspendiert und dann auf Eis gelagert. Nach vorsichtigem Einmischen von 0.1 ml Lysozym-Lösung [10 g/l Lysozym, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] verblieb der Ansatz für 15 min. bei 30°C im Wasserbad. Es wurden 1.25 ml

## 2. Material und Methoden

---

Saccharose-Lösung, 0.1 ml Proteinase-K-Lösung [2.5 g/l Proteinase K, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] und 1.25 ml SDS-Lösung [15 g/l] zugegeben, für 3 h bei 37°C und anschließend 15 min. bei 55°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden folgende Chemikalien nach dem jeweiligen Hinzupipettieren für 10-15 min. durch kräftiges Schwenken eingemischt: 0.94 ml Natriumperchlorat-Lösung [5 M in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>], 1.25 ml Phenol/NaCl und 1.25 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:1). Nach Zentrifugation bei 4 200 rpm und 20°C für 20 min. (Hettich Universal 30, RF, Tuttlingen) wurde die Oberphase abgenommen und in ein neues steriles Greinerröhrchen überführt. Die stark viskose Lösung wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol von Phenolresten befreit, indem kräftig aus dem Handgelenk geschüttelt wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei 4200 rpm und 20°C für 10 min. wurde die wässrige Oberphase abgenommen und in ein neues steriles Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe von 120 µl 10 %iger steriler Essigsäure zur Neutralisation der DNA. Es schloss sich die Extraktion mit 6 ml Diethylether an, indem wieder aus dem Handgelenk geschwenkt wurde, bis ein homogenes Gemisch entstand. Nach Zentrifugation (4500 rpm, 4°C, 10 min.) wurde die Unterphase in ein neues steriles Röhrchen überführt und zum Abdampfen der Diethyletherreste bei 60°C im Wasserbad inkubiert.

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 6 ml Ethanol (96 %) bei -20°C über Nacht. Es wurde bei 4500 rpm und 4°C für 30 min. zentrifugiert, das erhaltene Pellet in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und in ein steriles 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es schloss sich eine zweite Fällung nach Zugabe von 10 µl steriler 5 M NaCl-Lösung und 1 ml Ethanol (96 %) für 2 h bei -20°C an. Es wurde für 1 h bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Laborzentrifugen) und das dabei erhaltene Pellet im Vakuum (Speed Vac SVC 100, Savant) getrocknet. Danach wurde die DNA in 250 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei 50°C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

Diese Methode diente der Isolation genomischer DNA von *Achromobacter xylosoxydans* 31A, die als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt wurde.

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

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnten so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach überprüft werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles 1.5 ml - Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) sowie 10 µl Stop-Mix [40 % Glycerol (v/v), 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2<sup>TM</sup>, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) für 10 s und Zentrifugation für 3 min. in einer Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden ca. 25 µl des wässrigen Überstandes im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

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

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

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 3 ml Nährbouillon mit Antibiotika über Nacht. Davon wurden 1.5 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Lösung I [50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA] vollständig resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung II [0.2 M NaOH, 10 g/l SDS]. Es wurde vorsichtig gemischt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III [3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure] zugesetzt, gemischt und 5 min. auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) für 10 min. bei 12 000 rpm an. Das weißliche Präzipitat wurde mittels sterilem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, und zur Phasentrennung 5 min. bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues steriles 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol. Nach dem Mischen wurde für 1 h bei 12000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, im Vakuum (Speed Vac SVC 100, Savant) getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> [mit 0.1 g RNaseA/I] aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **2.3.1.5. Präparative Plasmidisolation** (in Anlehnung an Birnboim und Doly, 1979; Große *et al.*, 1999)

Diese recht umfangreiche Plasmidisolationstechnik diente zur Präparation großer DNA-Mengen von *low-copy*-Plasmiden (pVDZ'2).

Bis zum ersten Zentrifugationsschritt waren die Schritte gleich wie 2.3.1.4., allerdings wurde mit dem doppelten Volumen an Hauptkultur gearbeitet. Dann wurde der Überstand nochmal zentrifugiert und der Überstand mit 0.8 % Vol Isopropanol bei RT für 30 min. gefällt. Die

Pelletierung erfolgte über 30 min. bei 5000 rpm und RT. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bevor es in 500 µl TE gelöst wurde.

500 µl 4 M LiCl wurden zugegeben und der Ansatz auf Eis 30 min. inkubiert. Wieder wurde 10 min. zentrifugiert (5000 rpm, 4°C) und die DNA aus dem Überstand anschließend mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat und 2.5 Vol. Ethanol gefällt. Erneut wurde zentrifugiert (25 min. 5000 rpm und 4°C) und das Pellet in 300 µl TE gelöst. Jetzt konnte die Lösung zuerst für 30 min. mit 2 µl RNase (50 mg/ml) bei 37°C und dann für 15 min. bei 37°C mit 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) behandelt werden. Vor Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion wurde das Volumen auf 500 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt. Wieder wurde mit Na-Acetat und Ethanol die DNA gefällt (s.o.) und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Schließlich konnte das Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen werden und war nach Konzentrationsbestimmung im Agarose-Gel für weitere Experimente einsetzbar.

### **2.3.1.6. Plasmidisolation mittels QIAprep Spin Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)**

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert.

Es wurden 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 12000 rpm pelletiert (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.3.1.7. Plasmidpräparation mittels Anionen-Austauscher-Säulen (QIAGEN GmbH, Hilden)**

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

Mit dieser Methode konnte ebenfalls eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt werden. In diesem Fall wurde das "*Midi Plasmid Purification Protocol*" (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet.

### 2.3.2. DNA-Techniken

#### 2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (*Easy Cast™ Elektrophoresis System*). Dabei variierte die Gelkonzentration von 6 g/l bei großen Fragmenten bis zu 20 g/l bei kleinen Fragmenten.

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

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Volumen Stopp-Lösung [40 % (v/v) Glycerin, 0.1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, ± 2.5 g/l Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-10 µl (analytische Gele) bzw. 20-50 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen), bis die gesuchten Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (UV-Transilluminator, Appligene, Illkirch), die Dokumentation mittels Image-Master (Pharmacia Biotech, Freiburg).

#### 2.3.2.2. DNA-Größenstandard

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe *HindIII* geschnittener  $\lambda$ -DNA, *EcoRI/BamHI* geschnittener Plasmid-DNA pES1 sowie dem *Gene Ruler 100 bp DNA LadderPlus* (MBI).

Der *Gene Ruler 100 bp DNA LadderPlus* umfasst 14 Fragmente von 3 000, 2 000, 1 500, 1 200, 1 031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp Länge.

Das Plasmid pES1 hat eine Größe von ca. 12.8 kb. Nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* treten elf Fragmente auf, deren etwaige Größen bei 4 000, 2 500, 1 700, 1 300, 800, 660, 600, 510, 375, 230 und 140 bp liegen.

Beim Restriktion von DNA des Phagen  $\lambda$  (Gesamtgröße 48.5 kb) mit *HindIII* entstehen acht Fragmente mit einer Größe von 23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564 und 139 bp.

#### 2.3.2.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

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

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

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0.1 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37°C spaltet.

Nach Überprüfung auf vollständige Spaltung mittels Agarosegelelektrophorese wurden die Enzyme durch Ausheizen (10 min. bei 70°C) inaktiviert.

### **2.3.2.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA**

Die Reinigung der DNA erfolgte über den *QIAquick PCR Purifikation Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden). Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silika-Gel-Membran, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschriff, erfolgte die Elution der DNA mittels sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (niedrige Salzkonzentration).

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

### **2.3.2.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment rasch aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

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

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl durchgeführt. Das Verhältnis Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug bei Ligation in pVDZ'2 1:5. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min. bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2-3 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Für die Ligation von PCR-Produkten in pGEM<sup>®</sup>-T Easy wurde 0.5 µl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison, Wi) verwendet. Die Ligation wurden über Nacht (pGEM<sup>®</sup>-T Easy) bzw. für 2-3 Tage (pVDZ'2) bei 16°C inkubiert.

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

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Die Transformation wurde in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Von dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Diese wurde 1:100 in einer 100 ml Hauptkultur verdünnt und bei 37°C bis zu einem OD<sub>600</sub> von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden zu je 50 ml in sterile, auf Eis vorgekühlte Greiner-Röhrchen überführt und 10 min. auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min. bei 4000 rpm und 4°C (Hettich Universal, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde vorsichtig in je 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert (auf Eis) und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und im Eisbad bis zur Transformation (mindestens 3 h, maximal 24 h) aufbewahrt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei –80°C gelagert.

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

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

#### A. Herstellung kompetenter Zellen

200 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach Abkühlung auf Eis (15 min.) zentrifugiert (15 min. 5000 rpm, 4°C) und das Zellpellet zweimal mit je 50 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 30 ml Glycerol (10 %) gewaschen, vereinigt und die Zellen nach einer weiteren Zentrifugation (15 min., 5000 rpm, 4°C) in 500 µl Glycerol (10 %) aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden als 40 µl-Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

#### B. Elektroporation

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

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

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

### 2.3.2.11. Plasmidtransfer durch Konjugation

Der konjugative Plasmidtransfer wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) aus einer Nährbouillon-Übernachtskultur und *Ralstonia metallidurans*-Zellen aus einer NB-Übernachtskultur durchgeführt. Je 100  $\mu$ l der konjugierenden Stämme wurden auf einer NA-Platte zusammen ausplattiert und 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Konjuganten wurden mit 5 ml Saline [9 g/l NaCl] auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten plus Tetracyclin selektiert bzw. auf NA-Platten mit 1.5 mg/ml Kanamycin, welche ein Wachstum von *E. coli*-Zellen aufgrund von Auxotrophien bzw. zu hohe Konzentration an Antibiotikum und von plasmidfreien *Ralstonia metallidurans*-Zellen aufgrund fehlender Antibiotikaresistenz verhindern sollten.

### 2.3.2.12. Selektion von Doppelaustausch-Rekombinanten im Plasmid pMOL28

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

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

Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E. coli*-Stamm mit *R. metallidurans* konjugiert werden. Es kommt zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, die durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden können. Diese Zellen wurden zwei Tage in Tris-Minimalmedium angezogen, wobei die Cointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten und es dabei zur Plasmid-Excision kam. Wurden die Kulturen dann in ein Medium überführt, das zum einen durch den Gehalt an Chromat (0.1 mM) auf pMOL28 selektierte, zum anderen durch die Zugabe von Rohrzucker die Cointegrate abtötete, konnten die gewünschten Doppel-Rekombinanten durch negative Selektion auf Kanamycin identifiziert werden. Dieser letzte Schritt war wichtig, da sich gezeigt hat, dass nicht alle Cointegrate durch Saccharose-Zugabe abstarben. Zur zusätzlichen Überprüfung wurde noch eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment gefahren.

### 2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 2.3.3.1. Auswahl der Primer

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

Die Oligonukleotid-Primer (Tabelle 3) wurden von kommerziellen Anbietern (Gibco BRL, Eggenstein; Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H<sub>2</sub>O bidest gelöst, und auf eine Endkonzentration von ca. 20 pmol/μl verdünnt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer

<i>Primer-Extension-Primer</i>		
Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5' → 3' Position <sup>a</sup>	Beschreibung
PREX 1 CY'5	← CY'5- <sub>1066</sub> CACTCCTGAATGCTGGTC	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) und für <i>Primer Extension</i> , bindet ca. 80 bp stromabwärts von <i>cnrX</i> -ATG
PREX 2 CY'5	← CY'5- <sub>1852</sub> CGTCCACATCGGTTTCAGG	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) und für <i>Primer Extension</i> bindet ca. 120 bp stromabwärts von <i>cnrH</i> -GTG
PREX <i>PcnrC</i> U CY'5	← CY'5- <sub>2436</sub> GGCTCAACGCAACGGG	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) und für <i>Primer Extension</i> bindet ca. 100 bp stromabwärts von <i>cnrC</i> -ATG
$\Phi$ ( <i>cnr-lacZ</i> )-Primer		
<i>cnr-lacZ</i> OD	→ AA <u>ACTGCAG</u> <sub>7726</sub> TCCGCTATCCGAAAACGCC	ca. 300 bp stromaufwärts des TGAs von <i>cnrA</i>
<i>cnr-lacZ</i> OU	← AA <u>CTCTAGA</u> <sub>8023</sub> ACTCATGCTTCCAGCGC	direkt stromabwärts des TGAs von <i>cnrA</i>
<i>cnr-lacZ</i> UD	→ AA <u>ATCTAGA</u> <sub>8034</sub> GTCCACGCTCCCACTGCGC	direkt stromabwärts des TGAs von <i>cnrA</i> , stromabwärts von „ <i>cnr-lacZ</i> OU“
<i>cnr-lacZ</i> UU	← AA <u>ACTGCAG</u> <sub>8328</sub> CCCCGCTACGCCGCCAG	ca. 300 bp stromabwärts von <i>cnrA</i>

## 2. Material und Methoden

Fotrsetzung Tabelle 3.

<i>cnr</i> -Promotoren		
Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5'→3' <sup>a</sup>	Beschreibung
<i>cnr</i> RGR OD	→ AAATCTAGA <sub>698</sub> ATCCGTTTCAAAGTCAGTCT CCCTG	ca. 300 bp strom- aufwärts von <i>cnrY</i>
<i>cnr</i> BamH1 U	← AAAGGATCC <sub>1276</sub> ACGAGATTTTCATCATTTACC GATGAGGA	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i>
<i>cnr</i> Promotor D	→ AAAGGGCCC <sub>2163</sub> ATTGTCGGGATG TCTCAGCCAG	ca. 100 bp strom- aufwärts vom <i>cnrH</i> - Stop-Codon
<i>cnr</i> Promotor U BamH1	← AAAGGATCC <sub>2353</sub> CAAGAGGTCAGCGGTGG AGG	direkt stromaufwärts von <i>cnrC</i>
<b>Deletionen</b>		
<i>cnr</i> RGR OD	→ AAATCTAGAATCC <sub>698</sub> GTTTCAAAGTCAGTCT CCCTG	ca. 300 bp strom- aufwärts von <i>cnrY</i>
<i>cnr</i> RGR OU	← AAACAATTG <sub>996</sub> AGCCACTCTTCCACGTCT GCCATG	direkt stromabwärts des ATGs von <i>cnrY</i>
<i>cnr</i> RGR UD	→ AAACAATTG <sub>2262</sub> CTGCTGGATGCTGACTCGGA	direkt stromaufwärts des TGAs von <i>cnrH</i>
<i>cnr</i> RGR UU	← AAATCTAGA <sub>2604</sub> GGAGCGCCAAGGTTTT CAAGC	ca. 300 bp strom- abwärts von <i>cnrH</i>
<i>cnr</i> Delta C OD	→ AAATCTAGA <sub>2087</sub> GCTGGAGTTGGCCCGCGT	ca. 300 bp strom- aufwärts von <i>cnrC</i>
<i>cnr</i> Delta C OU	← AAACAATTG <sub>2382</sub> TCGACAAAGGAACGAGG AGATCAC	direkt stromabwärts des ATGs von <i>cnrC</i>
<i>cnr</i> Delta C UD	→ AAACAATTG <sub>3594</sub> CTAGCCTTTGAGGAATCAC GATGATG	direkt stromaufwärts des TGAs von <i>cnrC</i>
<i>cnr</i> Delta C UU	← AAATCTAGA <sub>3870</sub> CGCAAGTATTTCCGTTCCGA CG	ca. 300 bp stromabwärts von <i>cnrC</i>
<i>cnr</i> Delta B OD	→ AAATCTAGA <sub>3218</sub> CAGTGGCTATGTGGTTGGG GTCA	ca. 300 bp strom- aufwärts von <i>cnrB</i>
<i>cnr</i> Delta B OU	← AAACAATTG <sub>3627</sub> CCGGCGCTCGTTCTTCATC	direkt stromabwärts des ATGs von <i>cnrB</i>
<i>cnr</i> Delta B UD	→ AAACAATTG <sub>4775</sub> AACAAAGGCGGCGGGGAC	direkt stromaufwärts des TGAs von <i>cnrB</i>
<i>cnr</i> Delta B UU	← AAATCTAGA <sub>5110</sub> GCGCATGAAGTACAGGTTG GC	ca. 300 bp stromabwärts von <i>cnrB</i>

## 2. Material und Methoden

Fotrsetzung Tabelle 3.

<i>ncc</i> -Primer		
Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5'→3' <sup>a</sup>	Beschreibung
<i>NccRGR EcoRI</i> D	→ <u>TTCGAATTC</u> <sub>16</sub> CGTTGGAGAGGTTATTTTCGCA GTG	ca. 200 bp strom- aufwärts von <i>nccY</i>
<i>NccRGR XbaI</i> U	← <u>TTCTCTAGA</u> <sub>1644</sub> GCGCCCACATGGACTCCCA	ca. 120 bp stromabwärts von <i>nccH</i>
<i>NccN</i> D	→ <sub>7419</sub> AGCAACAAAACAGTAGACGAGACAACA	direkt stromaufwärts von <i>nccN</i>
<i>NccN XbaI</i> U	← <u>AAATCTAGA</u> <sub>8090</sub> TCGCAATACGCTCAGGGCA	direkt stromabwärts von <i>nccN</i>
<b>Topologie-Primer</b>		
<i>Topo cnrY</i> D <i>KpnI</i>	→ <u>AAGGGTACC</u> <sub>961</sub> TGGATCTGGATGGAGGTTTG CC	direkt stromaufwärts von <i>cnrY</i> , inclusive RBS (fett)
<i>Topo cnrY</i> U <i>XbaI</i>	← <u>ATTCTCTAGA</u> <sub>1262</sub> TTTACCGATGAGGAGTCCAAA GGG	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i>
<i>Topo cnrX</i> D <i>KpnI</i>	→ <u>GGAGGTACC</u> <sub>1262</sub> GGAGGTAATGATGAAATC TCGTACCCGA	fügt vor <i>cnrX</i> RBS wie vor <i>cnrY</i> ein (fett)
<i>Topo cnrX</i> U <i>XbaI</i>	← <u>CCGTCTAGA</u> <sub>1705</sub> CTGCGAGCCGCGGCGTAG	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i>
<i>CY'5 phoA</i> U	← <i>CY'5</i> -ATCGCTAAGAGAATCACGCAGA	<i>CY'5</i> -markierter Sequenzierprimer (ALF) für <i>phoA</i> -Konstrukte, bindet in <i>phoA</i>
<b>Yeast-Two-Hybrid-Primer</b>		
<i>Y-2-H</i> <i>pSOS cnrY BamHI</i> D	→ <u>GGTGGATCC</u> <sub>984</sub> TGGCAGACGTGGAAGAGTGG CT	ab viertes Bp von <i>cnrY</i> , führt zur N'-Fusion von CnrY mit hSOS
<i>Y-2-H</i> <i>pSOS cnrY SalI</i> U	← <u>AGTGTCGAC</u> <sub>1306</sub> AACAGCGTAGACAAGGAAAG CCG	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i>
<i>QC cnrY A58E/A59R</i> D	→ <sub>1139</sub> TGCGCCGCATTTGAACGCTTGGTTCGCGT TT	<i>Quick-change</i> - Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, C <sub>1152</sub> A, GC <sub>1154</sub> CG (A58E, A59R im Protein)
<i>QC cnrY A58E/A59R</i> U	← <sub>1162</sub> AAACGCGACCAAGCGTTCAAATGCGGC GCA	<i>Quick-change</i> - Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, C <sub>1152</sub> A, GC <sub>1154</sub> CG (A58E, A59R im Protein)

## 2. Material und Methoden

			Fortsetzung Tabelle 3
Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5'→3' <sup>a</sup>	Position	Beschreibung
Y-2-H pMyr <i>cnrX</i> EcoRI D	→	<u>GGCGAATTC</u> <sub>1336</sub> GTCGCGGCGGCATGGCTG	ab Bp 1336 (in <i>cnrX</i> ), führt zur N'-Fusion von CnrX (ohne <i>Leader</i> ) mit Myristylationssignal
Y-2-H pMyr <i>cnrX</i> SalI U	←	<u>CAAGTCGAC</u> <sub>1723</sub> TGTCAGCGTCTTCCGGATTCA CT	direkt stromabwärts von <i>cnrX</i>
Y-2-H pMyr <i>cnrH</i> EcoRI D	→	<u>CGGGAATTC</u> <sub>1713</sub> GTGAATCCGGAAGACGCTGA CAG	ab viertes Bp von <i>cnrH</i> , führt zur N'-Fusion von CnrH mit Myristylations-Signal
Y-2-H pMyr <i>cnrH</i> SalI U	←	<u>CTGGTCGAC</u> <sub>2353</sub> CAAGAGGTCAGCGGTGGAG GC	direkt stromabwärts von <i>cnrH</i>
Y-2-H pSOS U	←	GCAGCAGGAGCCAAGGAAAAT	Sequenzierprimer (ABI) für pSOS-Konstrukte
Y-2-H pMyr U	←	AACGTCAAGGAGAAAAAACCCCG	Sequenzierprimer (ABI) für pMyr-Konstrukte
<b>Überexpressions-Primer</b>			
<i>cnrY</i> NdeI D	→	<u>TTTCATATG</u> <sub>986</sub> GCAGACGTGGAAGAGTGGC	fügt direkt am ATG von <i>cnrY</i> eine NdeI – Schnittstelle ein
<i>cnrY</i> U	←	<sub>1263</sub> TTTACCGATGAGGAGTCCAAAGGGA	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i> (für <i>blunt-end-Klonierung</i> )
<i>cnrH</i> NdeI D	→	<u>CTCCATATG</u> <sub>1716</sub> AATCCGGAAGACGCTGACAG	fügt direkt am ATG von <i>cnrH</i> eine NdeI – Schnittstelle ein
<i>cnrH</i> U	←	<sub>2279</sub> TTTTTCCGAGTCAGCATCCAGCA	direkt stromabwärts von <i>cnrH</i> (für <i>blunt-end-Klonierung</i> )
<i>cnrX</i> NdeI D	→	<u>TAACATATG</u> <sub>1276</sub> AAATCTCGTACCCGACGG	fügt direkt am ATG von <i>cnrX</i> eine NdeI – Schnittstelle ein
<i>cnrX</i> U	←	<sub>1707</sub> CTGCGAGCCGCGGCGTAG	direkt stromabwärts von <i>cnrX</i> (für <i>blunt-end-Klonierung</i> )
QC <i>cnrY</i> A58E/A59R D	→	<sub>1139</sub> TGCGCCGCATTTGAACGCTTGGTCGCGT TT	<i>Quick-change-Mutagenese-Primer</i> , führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, C <sub>1152</sub> A, GC <sub>1154</sub> CG (A58E, A59R im Protein)

## 2. Material und Methoden

		Fortsetzung Tabelle 3	
Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5'→3' <sup>a</sup>	Beschreibung	
QC <i>cnrY</i> A58E/A59R U	← 1159AAACGCGACCAAGCGTTCAAATGCGGC GCA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, C <sub>1152</sub> A, GC <sub>1154</sub> CG (A58E, A59R im Protein)	
Seq Primer pTYB2	← CY'5-TCTTTACCCATGACCTTATTACCAACCTC	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pTYB2-Konstrukte	
<i>czcC SphI</i> D	→ TTGCATGC <sub>36</sub> GAAGACTATTTC	Fügt direkt am ATG von <i>czcC</i> eine <i>SphI</i> – Schnittstelle ein	
<i>czcC BamH1</i> U	← CTTAGGATCC <sub>1279</sub> CAGAATGCGATGAT	Verändert am C- Terminus von <i>czcC</i> die letzten drei bp von CGT nach CCT (im Protein R→P)	
pQE Reverse	← CY'5-GTTCTGAGGTCATTACTGG	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für pQE-Konstrukte	
<i>cnr/ncc/czc-Shuffle-Primer</i>			
<i>cnr</i> Promotor <i>ApaI</i> D	→ AAAGGGCCC <sub>2163</sub> ATTGTCGGGATGTCTCAGC CAG	ca. 100 bp strom- aufwärts von <i>cnrH</i> -Stop- Codon	
<i>cnr</i> Delta B OU	← AAACAATTG <sub>3627</sub> CCGGCGCTCGTTCCTTCATC	direkt stromabwärts des ATGs von <i>cnrB</i>	
<i>cnrB HindIII</i> D	→ GCGAAGCTT <sub>3516</sub> GACGCCCGGCAACTGACG	ca. 100 bp strom- aufwärts von <i>cnrB</i>	
<i>cnrB XbaI</i> U	← CAGTCTAGA <sub>4838</sub> GACCAGCCAGCGATAGCGG A	ca. 50 bp stromabwärts von <i>cnrB</i>	
<i>CzcC EcoRI</i> Δ	→ TCTCGCCGAATTC <sub>4</sub> TCCTGGT	stromaufwärts von <i>czcC</i>	
<i>CzcCB KpnI</i> Δ	→ CGATCGCATTCTGGTACC <sub>1277</sub> TAAGA	direkt stromabwärts von <i>czcC</i>	
<i>CzcCB KpnI</i> U	← CATGTTTTAT <sub>1282</sub> GGTACCCGTCTTAA	direkt stromaufwärts von <i>czcB</i>	
<i>CzcBA BamH1</i> U	← AACATTGCTGGATCC <sub>2878</sub> CCCGTATCA	direkt stromabwärts von <i>czcB</i>	
<i>NccC BamH1</i> D	→ TTTGGATCC <sub>1629</sub> CGAGGGGGAGTCCATGTGG G	ca. 70 bp stromaufwärts von <i>nccC</i>	
<i>NccC KpnI</i> U	← GCCGACGC <sub>2971</sub> GGTACCTCGTCATCA	direkt stromabwärts von <i>nccC</i>	
<i>NccB BamH1</i> D	→ ACGGGATCC <sub>2906</sub> GGCGGCATTGGCTCAGGC	ca. 30 bp stromaufwärts von <i>nccB</i>	

## 2. Material und Methoden

			Fortsetzung Tabelle 3
Primer-Name/ Orientierung	Sequenz 5'→3' <sup>a</sup>	Beschreibung	
<i>NccB PstI</i> U	← CGCCTGCAG <sub>4188</sub> ACGGCGGTGAGGACAGCA	ca. 50 bp stromabwärts von <i>nccB</i>	
<b>In vitro</b> Transkription Primer			
T7	→ GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA	bindet an den T7-Promotor in Plasmiden (pGEM T-Easy)	
<i>cnrY</i> Anfang Helix U	← <sub>1138</sub> GGCGCAGCAGATGGCACGC	in <i>cnrY</i> , ca. 150 bp stromaufwärts vom Stop-Codon	
<i>cnrRGR</i> OD	→ AAATCTAGA <sub>702</sub> ATCCGTTTCAAAGTCAGTCTCCCTG	ca. 300 bp stromaufwärts von <i>cnrY</i>	
<i>cnrY</i> U	← <sub>1262</sub> TTTACCGATGAGGAGTCCAAAGGGA	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i>	
<i>cnr</i> Promotor <i>ApaI</i> D	→ AAAGGGCCC <sub>2163</sub> ATTGTCGGGATGTCTCAGCC AG	ca. 100 bp stromaufwärts von <i>cnrH</i> -Stop-Codon	
PREX PII CY'5	← CY'5- <sub>2540</sub> GCCAGCCGCACGAACATT	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) und für <i>Primer Extension</i> bindet ca. 200 bp stromabwärts von <i>cnrC</i> -ATG	
<b>CnrY-Mutagenese-Primer</b>			
<i>cnrY</i> E5-6Q D	→ <sub>984</sub> TGGCAGACGTGCAACAGTGGCTGACGC	<i>Quick-change</i> -Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, G <sub>995</sub> C, G <sub>998</sub> C (CnrY, E <sub>5</sub> D und E <sub>6</sub> D)	
<i>cnrY</i> E5-6Q U	← <sub>1004</sub> GCGTCAGCCACTGTTGCACGTCTGCCA	<i>Quick-change</i> -Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, G <sub>995</sub> C, G <sub>998</sub> C (CnrY, E <sub>5</sub> D und E <sub>6</sub> D)	
<i>cnrY</i> R12K13TT D	→ <sub>1005</sub> TGACGCACGCGACCA CAGTGACGCAAGAGG	<i>Quick-change</i> -Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, GA <sub>1017</sub> CC, A <sub>1020</sub> C (CnrY, R <sub>12</sub> T; K <sub>13</sub> T)	
<i>cnrY</i> R12K13TT U	← <sub>1026</sub> CCTCTTGCGTCACTGTGGTCGCGTGCGTCA	<i>Quick-change</i> -Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, GA <sub>1017</sub> CC, A <sub>1020</sub> C (CnrY, R <sub>12</sub> T; K <sub>13</sub> T)	

## 2. Material und Methoden

		Fortsetzung Tabelle 3	
Primer-Name/ Orientierung		Sequenz 5'→3' <sup>a</sup> <sub>Position</sub>	Beschreibung
<i>cnrY</i> C51-52SS D	→	1125GGCGTGCCATCAGCAGCGCCGCATTGTC	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, T <sub>1136</sub> A, T <sub>1139</sub> A (CnrY, C <sub>51</sub> S und C <sub>52</sub> S)
<i>cnrY</i> C51-52SS U	←	1145GCAAATGCGGCGCTGCTGATGGCACGC C	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutationen in <i>cnrY</i> ein, T <sub>1136</sub> A, T <sub>1139</sub> A (CnrY, C <sub>51</sub> S und C <sub>52</sub> S)
<b>CnrX-Mutagenese-Primer</b>			
<i>cnrX</i> E42D D	→	1386TGACTTGCCATGACATCCTGCACGAAG	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, A <sub>1398</sub> C (CnrX, E <sub>42</sub> D)
<i>cnrX</i> E42D U	←	1410CTTCGTGCAGGATGTCATGCAAGTCA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, A <sub>1398</sub> C (CnrX, E <sub>42</sub> D)
<i>cnrX</i> E42Q D	→	1386TGACTTGCCATCAAATCCTGCACGAAG	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, G <sub>1396</sub> C (CnrX, E <sub>42</sub> Q)
<i>cnrX</i> E42Q U	←	1410CTTCGTGCAGGATTTGATGCAAGTCA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, G <sub>1396</sub> C (CnrX, E <sub>42</sub> Q)
<i>cnrX</i> E34D D	→	1359CTCGCATCGGAATGAGGCCGGACATGGT GA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, A <sub>1374</sub> G (CnrX, E <sub>34</sub> D)
<i>cnrX</i> E34D U	←	1388TCACCATGTCCGGCCTCATTCCGATGCG AG	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, A <sub>1374</sub> G (CnrX, E <sub>34</sub> D)
<i>cnrX</i> E34Q D	→	1359CTGGCATCGGAATCAAGCCGGACATGGT GA	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, G <sub>1372</sub> C (CnrX, E <sub>34</sub> Q)
<i>cnrX</i> E34Q U	←	1388TCACCATGTCCGGCTTGATTCCGATGCG AG	<i>Quick-change-</i> Mutagenese-Primer, führt Mutation in <i>cnrX</i> ein, G <sub>1372</sub> C (CnrX, E <sub>34</sub> Q)

Sonstige Primer			
Primer-Name/ Orientierung		Sequenz 5'→3' <sup>a</sup> <sub>Position</sub>	Beschreibung
<i>cnr EcoRI</i> D	→	AAAGAATTC <sub>95</sub> AGGCAATGGATCTGGATGGA GGTT	direkt stromaufwärts der RBS von <i>cnrY</i>
<i>cnr BamHI</i> U	←	AAAGGATCC <sub>1276</sub> ACGAGATTTTCATCATTTACC GATGAGGA	direkt stromabwärts von <i>cnrY</i>
<i>cnrX BamHI</i> D	→	AAAGGATCC <sub>1262</sub> ATCGGTAAATGATGAAATC TCGTACCCG	direkt stromaufwärts von <i>cnrX</i>
<i>cnrX XbaI</i> U	←	AAATCTAGA <sub>1726</sub> CCTGTCAGCGTCTTCCGGA TTCAC	direkt stromabwärts von <i>cnrX</i>
<i>cnrH XbaI</i> D	→	AAATCTAGA <sub>1934</sub> GCTCTTCCGCATTGGGCTG A	in <i>cnrH</i>
<i>cnrH PstI</i> U	←	AAACTGCAG <sub>2300</sub> TCCCCTCGGTGAATCCAAA CTTAT	direkt stromabwärts von <i>cnrH</i>
<i>cnrH XbaI</i> D 2	→	GCGTCTAGA <sub>1647</sub> CCTGAAGCCGGAACATCGA CC	stromaufwärts von <i>cnrH</i>
<i>cnrH PstI</i> D 2	→	TACCTGCAG <sub>1685</sub> TTATCGATGCACTACGCCG CG	stromaufwärts von <i>cnrH</i>
<i>cnr Promotor BamHI</i> D	→	CTGGGATCC <sub>2163</sub> ATTGTCTGGGATGTCTCAGC CAG	in <i>cnrH</i>
<i>cnr Promotor BamHI</i> U	←	CTGGGATCC <sub>2354</sub> CAAGAGGTCAGCGGT	direkt stromaufwärts von <i>cnrC</i>
CY'5- <i>cnrX</i> D	→	CY'5-TTGAAAAGCCTGCCCCG	CY'5-markierter Sequenzierprimer (ALF) für Mutationsüberprüfung in <i>cnrX</i>
Upr-ABI	←	CGACGTTGTA AAAACGACGGCCAGT	<i>Universal</i> Primer, Sequenzierprimer für ABI
Rpr-ABI	→	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>Reverse</i> Primer, Sequenzierprimer für ABI
Upr-CY'5	←	CY'5-CGACGTTGTA AAAACGACGGCCAGT	<i>Universal</i> Primer, CY'5- markierter Sequenzierprimer (ALF) für pUC- und pGEM-T- Easy-Konstrukte
Rpr-CY'5	→	CY'5-CAGGAAACAGCTATGAC	<i>Reverse</i> Primer, CY'5- markierter Sequenzierprimer (ALF) für pUC- und pGEM-T- Easy-Konstrukte

## 2. Material und Methoden

		Fortsetzung Tabelle 3	
Primer-Name/ Orientierung		Sequenz 5'→3' <sup>a</sup>	Beschreibung
GPS-TpN	←	ACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTG	„up“ Sequenzierprimer (ABI) für <i>Genome Prime System</i>
GPS-TpS	→	AACTCCATTTCCCCTC	„down“ Sequenzierprimer (ABI) für <i>Genome Prime System</i>
CnrT D	→	<u>TTTCTAGAGG</u> ATTTCCCATGTCTATTCGTAC GG	direkt stromabwärts von <i>cnrA</i>
CnrT U	←	GC <u>AGGATCC</u> GTGAGAATGGCGATGATGCAC GT	am 3'-Ende von <i>cnrT</i>

<sup>a)</sup>für die Klonierung relevanter Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet. CY-5 kennzeichnet eine Fluoresceinmarkierung der Primer. Vergrößert dargestellte Basen weisen auf Austausch hin. Tiefergestellte Ziffern kennzeichnen die Basenposition in der *cnr*-Sequenz (Eintrag M91650 EMBL-Datenbank).

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

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

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

Zur Analyse wurde *Taq*-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Hierbei wurden entweder gereinigte Plasmide oder frisches Koloniematerial als Template verwendet. Die Zellen wurden mittels sterilem Zahnstocher von der Agaroberfläche in steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> überführt. Nach Erhitzung für 2 min. auf 96°C und anschließender Zentrifugation konnte der Überstand als Template eingesetzt werden und ersetzte im Ansatz das zuzufügende Wasser.

Reaktionsansatz:

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

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

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

- |   |           |         |                                 |
|---|-----------|---------|---------------------------------|
| 1)  | 2 min.    | 96°C    | <i>Hot-Start</i>                |
| Zugabe von Polymerase (0.3-2 U). Dabei wurde die Mineralölschicht mit der Pipettenspitze durchstoßen. |           |         |                                 |
| 2.  | 20 s      | 96°C    | Denaturierung                   |
| 3.  | 20 s      | x°C     | <i>Annealing</i>                |
| 4.  | 1 min./kb | 68/72°C | <i>Extension (Pwo/Taq)</i>      |
| Schritt 2-4 : 25-30 Zyklen  |           |         |                                 |
| 5.  | 5 min.    | 68/72°C | Nachsynthese ( <i>Pwo/Taq</i> ) |
| 6.  | Pause     | 4°C     |                                 |

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

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

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

### **2.3.3.4. Reinigung von PCR-Produkten**

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem "*QIAquick PCR Purification Protocol*" (QIAGEN GmbH, Hilden).

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

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

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

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

Zuerst wurde auf Eis ein *Premix* pipettiert:

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

Der *Premix* wurde gemischt und auf Eis gelagert.

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Material und Methoden

---

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

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

Nach Ablauf des Programms wurde die wässrige Unterphase abgenommen und restliches Mineralöl durch Adhäsion an einen schräg gelegten Streifen Parafilm entfernt. Die DNA wurde anschließend zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl Ethanol zugegeben wurden. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei RT und 14000 rpm und anschließendem 5 min. Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und war bei -20°C bis zur Sequenzierung stabil. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 4 µl Gelpuffer (Gemisch aus 5 Vol. Formamid und 1 Vol. 25 mM EDTA pH 8.0) aufgenommen und 2 min. bei 90°C denaturiert.

### 2.3.4.3. Sequenzierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des *Genome Priming System* (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

Informationen über die DNA-Sequenz eines rekombinanten Plasmides können unter Umgehung zeitaufwendiger Subklonierungs- und *Primer-Walking*-Strategien mittels des *Genome Priming System* (GPS<sup>TM</sup>-1 [New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) erhalten werden. Das Prinzip beruht auf der Generierung und Selektion von Klonen, bei denen an zufälligen Stellen des Plasmides eine Transposon-Insertion stattgefunden hat. Spezifische, zur DNA-Sequenz des Transposons homologe, Primer erlauben dann eine beidseitige Sequenzierung der DNA an der Insertionsstelle.

Zur Generierung von Transposon-Klonen wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

GPS-Puffer (2x)	1 µl
pGPS1 Transposon-Donor-Plasmid (Cam <sup>r</sup> )	0.5 µl
Ziel-Plasmid-DNA (50 ng/µl)	1µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 8 µl

Nach guter Durchmischung des Ansatzes erfolgte die Zugabe von 0.5 µl Transposase (TnsABC) und Inkubation bei 37°C für 10 min. Anschließend wurde 1 µl Start-Lösung zugegeben, wieder gut durchmischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 75°C für 10 min. abgestoppt. Nach Abkühlung konnte der Reaktionsansatz direkt in kompetente *E. coli* Zellen transformiert werden und auf Nähr-Agar

Platten mit entsprechenden Antibiotika (Chloramphenicol + Kanamycin) ausplattiert werden. Die Plasmid-DNA konnte nach den Standard-Methoden gewonnen werden. Die Integration des Transposons in das Insert unbekannter Sequenz im Ziel-Plasmid wurde durch PCR mit dem *universal* und *reverse*-Primer überprüft. Damit konnten Klone eliminiert werden, bei denen das Transposon in die Sequenz des Ziel-Plasmides integriert war. Mit den Transposon spezifischen Primern GPS TpN und GPS TpS (Tabelle 3) konnten die Plasmide sequenziert werden.

### 2.3.4.4. Das Sequenziergel

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

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

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

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

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

### 2.3.4.5. Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Alf-Manager DBA. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen Clone 4 (*Clone Manager*-Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, USA) und Dnasis (Version V5.00) ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Internet-Programm *Basic Logic Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm ClustalW vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen *Simple Modulra Architecture Research* (SMART, Schultz *et al.*, 1998, Schultz

*et al.*, 2000), *Scan Prosite*, *Profile Scan* und *Compute pI/Mw ExPASy* des *ExPASy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

### 2.4. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

#### 2.4.1. Herstellung der Sonden

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

Durch PCR wurden je ein ca. 450 bp und ein ca. 300 bp DNA-Fragment aus pMOL28 amplifiziert (Primer „*cnrX NdeI* D + *cnrX U*“ bzw. „*cnrRGR DU* + *cnrRGR UU*“), die als Sonden für den Nachweis von Nukleinsäuren dienen sollten. Beide Fragmente dienen zur Kontrolle der *cnrYXH*-Deletion. Das ca. 450 bp-Fragment band im Bereich der Deletion, lieferte also in der Deletionsmutante pMOL28-3 ein negatives Ergebnis, während das ca. 300 bp Fragment im Deletionsplasmid gegen ein verkürztes Restriktionsfragment hybridisierte.

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

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

##### 2.4.2. Digoxigenin-markierte Längenstandards

Um die Größe der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden ein Digoxigenin-markierter Größenstandard eingesetzt. Für die Southern-Experimente kam der DIG-Marker VII (Roche Mannheim) zum Einsatz. Er enthält 15 DNA-Fragmente mit folgenden Größen: 8000; 7100; 6000; 4800; 3500; 2700; 1900; 1850; 1500; 1400; 1150; 1000; 680; 490 und 370 bp. Der Marker wurde mit im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht. Als nachteilig bei dieser Methode ist allerdings die Instabilität der Markierung anzusehen.

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

### 2.4.3.1. Gelelektrophorese und DNA-Blotting

Plasmid-DNA der zu untersuchenden pMOL28-Derivate wurde nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen in 1 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für mindestens 2 h in 1 x TAE-Puffer. Das Agarosegel wurde unter leichtem Schwenken (auf einer Laborwippe) wie folgt für den DNA-Transfer auf die Membran vorbereitet:

Depurinieren: 5 min. in 0.25 N HCl

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

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

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gespült.

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (QIABRANE Nylon Plus Membran *positively charged*, QIAGEN, Hilden) auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 20 min. in sterilem H<sub>2</sub>O und anschließend in 10 x SSC [20 x SSC (0.3 M Na-Citrat, pH 7.0, 3 M NaCl)] geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Agarose-Gel auf die Membran erfolgte mittels Druck-Blot in einer Blottingapparatur (Posi Blot<sup>TM</sup> Pressure Blotter, Statagene, Heidelberg). Die vorbereitete Membran wurde auf mit 10 x SSC benetztes Filterpapier in der Blotting-Apparatur gelegt, darüber die Maske und schließlich das Gel. Darauf wurde ein mit 10 x SSC getränkter Schwamm gelegt, die Apparatur geschlossen und ein Druck von 75 mm Hg-Säule angelegt. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Position des Geles auf der Membran markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch 3 minütige Bestrahlung mit UV (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und zwischen Filterpapier bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

### 2.4.3.2. Hybridisierung

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

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

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

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

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

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

Die Membran wurde zuerst 5 min. in Waschpuffer (Puffer 1 [0,1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl, pH 7.5] mit 0.3 % (v/v) Tween 20) inkubiert. Es schloss sich eine Inkubation über 30 min. in Puffer 2 [Puffer 1 mit 1 % (v/v) Blocking-Reagenz] an. Danach wurde für weitere 30 min. mit Anti-DIG-AP-Konjugat (Verdünnung 1:20000 in Puffer 2) behandelt.

Anschließend wurde 2 mal 15 min. mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min. in Puffer 3 [0.1 M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5] äquilibriert, vorsichtig abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt. Die Membran wurde gleichmäßig mit der verdünnten Substratlösung (CSPD in Puffer 3 1:100) benetzt, mit einer zweiten Folie abgedeckt und 5 min. inkubiert. Die Membran wurde auf sauberem Filterpapier soweit abgetrocknet, dass keine überschüssige Flüssigkeit mehr vorhanden war und luftblasenfrei in eine neue Folie eingeschweißt. Zum besseren Start des Substratumsatzes wurde 15 min. bei 37°C inkubiert.

Die Membran wurde in einer Röntgenkassette für 15 min. bis 3 h auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch 4 minütige Inkubation in Entwicklerlösung. Entwicklerreste wurden durch kurzes Spühlen im Wasserbad entfernt. Die Fixierung des Filmes erfolgte 10 min. in Fixierlösung. Danach wurde der Film 10 min. in Wasser gespült.

## **2.5. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA**

### **2.5.1. Isolierung von RNA**

#### **2.5.1.1. Vorbereitung des Zellmaterials**

##### A. Zellanzucht und Induktion (*Ralstonia metallidurans*)

100 ml Hauptkultur wurden 3 %ig aus einer Vorkultur angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer Zelldichte von 180-200 KE wurde mit 300 µM Ni<sup>+</sup> für 10 min. induziert, bzw. die uninduzierten Kontrollen geerntet.

### B. Zellernte

Zur Zellernte wurden 10 x 2 ml Hauptkultur in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 1 min. bei 4°C und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) pelletiert. Der Überstand wurde schnell abgegossen und die Zellen in flüssigem Stickstoff fixiert.

Das abrupte Einfrieren diente der Inaktivierung zelleigener RNasen. Außerdem unterstützte die Bildung von Eiskristallen die spätere Lyse der Zellen. Bis zur Isolation der RNA verblieben die Pellets bei -80°C.

### **2.5.1.2. Präparative Isolierung von Gesamt-RNA aus *Ralstonia metallidurans* AE126**

Alle Lösungen, die mit RNA in Berührung kamen, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem bidestilliertem Wasser hergestellt oder, wenn möglich, wurde DEPC direkt zur Lösung gegeben. Diethylpyrocarbonat wurde in einer Endkonzentration von 0.1 % (v/v) zugesetzt und diente der Inaktivierung von RNasen. Das mit DEPC versetzte H<sub>2</sub>O bidest sowie die Lösungen wurden 12 h bei 37°C inkubiert und danach autoklaviert. Dieses Wasser wird im folgenden mit DEPC-H<sub>2</sub>O bezeichnet. Die für die Isolation eingesetzten Geräte wurden, soweit möglich, zweimal 25 min. autoklaviert, hitzelabile Gegenstände, z.B. automatische Pipetten, sorgfältig mit 70 % (v/v) Ethanol abgerieben.

Alle Arbeiten wurden mit Einweghandschuhen (Roth, Karlsruhe) durchgeführt, da die an Händen anhaftenden RNasen die Hauptkontaminationsquelle darstellen (Ausubel *et al.*, 1993). Es zeigte sich, dass die Handschuhe vor der Arbeit mit RNA zuerst mit Flüssigseife, anschließend mit Rotisol (Roth, Karlsruhe) abgewaschen und mit doppelt autoklavierten Zellstofftissues (Kleenex) getrocknet werden mussten, da ihre Puderung zu einer stetigen Kontamination von Proben und Lösungen führte.

Auch wurde darauf geachtet, dass Fenster und Türen geschlossen blieben, um eine Verwirbelung der RNasen von Boden und Inventar (Staub) weitgehend zu minimieren.

### Isolation von Gesamt-RNA mit heißem Phenol

Diese von Oelmüller *et al.* (1990) zur Isolation prokaryotischer Gesamt-RNA entwickelte Methode wurde leicht modifiziert (Große *et al.*, 1999) und für *Ralstonia metallidurans* angewendet.

Das Zellpellet wurde in einer sterilen Spritze + Kanüle (Terumo, Rose GmbH) mit 1 ml AE-Puffer [20 mM Natriumacetat (pH 5.5), 1 mM EDTA] durch mehrmaliges Auf- und Abziehen resuspendiert und je die Hälfte in ein neues 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, welches bereits 6 ml 60°C heißes Lysegemisch [1 Vol. Roti-Phenol, 1 Teil AE-Puffer, 2 Teile Chloroform, 1 g/l SDS, 0.1 % Hydroxychinolin (zur Konservierung)], 72 µl 200 g/l SDS und 2.5 ml AE-Puffer enthielt. Der Ansatz wurde 5 min. bei 60°C im Wasserbad geschüttelt und verblieb dann mindestens 10 min. in einem Kochsalz-Eis-Gemisch. Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 20 min. bei 10°C und 5000 rpm in der Hettich-Zentrifuge (RF, Tuttlingen)

getrennt. Die Oberphase wurde in ein neues 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt, das 3 ml Lysegemisch und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat enthielt. Nach Mischen wurde erneut 20 min. zentrifugiert, diesmal aber bei RT. Diese beiden Schritte wurden solange wiederholt, bis keine Interphase mehr erkennbar war. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte nach Zugabe von 2.5 Vol. 96 % Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht.

Nach Pelletierung durch Zentrifugation über eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 12000 rpm wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Röhrchen wurden zum Trocknen kopfüber auf doppelt autoklavierte Tissues gestellt.

Das Pellet wurde in zweimal 80  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dort war die RNA über den Zeitraum bis zum Verbrauch stabil.

### **2.5.2. RNA-Techniken**

#### **2.5.2.1. RNA-Konzentrationsbestimmung**

2  $\mu\text{l}$  der frisch isolierten RNA wurden in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  (1:50) verdünnt und am Gene-Quant (Pharmacia, Freiburg) vermessen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Absorption bei 260 nm zwischen 0.6 und 1.5 lag. Die Konzentration der Nukleinsäuren entsprach Werten von 1.5-3.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Reinheit, der Quotient aus Nukleinsäuren/Protein (260/280 nm), lag bei etwa 1.7 .

#### **2.5.2.2. Agarose-Gelelektrophorese**

Sowohl für analytische, als auch für präparative Zwecke wurden denaturierende Formaldehyd-Gele verwendet. Pro 50 ml Gel wurden 0.75 g Agarose in 43.5 ml DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  und 5 ml 10 x MOPS [0.2 M MOPS, 0.05 M Natriumacetat (pH 7.0), 0.01 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ] durch Erhitzen in der Mikrowelle (Bosch) gelöst. Nach Abkühlung auf  $50^{\circ}\text{C}$  wurden 1.5 ml 37 % (v/v) Formaldehyd zugesetzt, gut gemischt und das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer.

Aufgetragen wurden für analytische Gele 2-10  $\mu\text{g}$ , für präparative Gele 10-40  $\mu\text{g}$ , Gesamt-RNA pro Spur. Die RNA wurde mit 12.5  $\mu\text{l}$  Formamid, 2.5  $\mu\text{l}$  10 x MOPS und 4  $\mu\text{l}$  Formaldehyd versetzt und 15 min. bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt, 3  $\mu\text{l}$  Probenpuffer [100 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 1 g/l SDS, 1 g/l Bromphenolblau] und 1.5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid zugegeben und im Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße für 1.5-4 h bei 70-140 V.

### 2.5.2.3. DNase I-Verdau der Gesamt-RNA

Um DNA-Kontaminationen in der nach Isolation erhaltenen Gesamt-RNA zu beseitigen, wurde ein Verdau der Präparation mit RNase-freier DNase I durchgeführt. Dabei wurde die von Große *et al.*, 1999 entwickelte und optimierte Methode angewandt.

Folgender Ansatz:

Gesamt-RNA-Isolat	100 µg
3 M Natriumacetat (pH 5.5) (in DEPC-H <sub>2</sub> O)	10 µl
1 M MgSO <sub>4</sub> (in DEPC-H <sub>2</sub> O)	1.5 µl
steriles DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 300 µl

wurde nach Zugabe von 1 U RNase-freier DNase I (Roche, Mannheim) pro 1 µg RNA für 2 h bei 37°C inkubiert. Das Volumen wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 500 µl erhöht. Es schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Die in der Oberphase befindliche RNA wurde nach Zugabe von 1/10 Vol. Natriumacetat mit 2.5 Vol. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Pelletierung erfolgte durch Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C für 1 h (Eppendorf-Zentrifuge). Nach Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde die RNA bei RT getrocknet und in sterilem DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C, wo die RNA bis zum Verbrauch stabil war. Die Überprüfung der RNA auf DNA-Kontaminationen erfolgte im Formaldehydgel.

Die DNA-freie RNA wurde *Primer Extension*-Experimenten eingesetzt.

### 2.5.2.4. *Primer Extension*

Um das 5'-Ende einer mRNA (Transkriptionsstartpunkt) bestimmen zu können, wurde eine *Primer Extension*-Reaktion durchgeführt. Dabei wird durch die Reverse Transkriptase, nach Anlagerung eines Fluorescein-markierten Primers an die mRNA, ein cDNA-Strang in 5'-Richtung synthetisiert, welcher zur mRNA komplementär ist, und dessen Länge mittels PAA-Gelelektrophorese bestimmt werden kann.

Für die *Primer Extension*-Experimente wurde die Standardmethode (Sambrook *et al.*, 1989) in Anlehnung an Voos *et al.* (1991) an den automatischen A.L.F.<sup>TM</sup>DNA-*Sequencer* angepasst und optimiert (Große *et al.*, 1999).

Für die Synthese der cDNA wurde DNase I behandelte Gesamt-RNA aus *Ralstonia metallidurans* (*cnr* durch 10 min. Inkubation mit Ni<sup>2+</sup> induziert) eingesetzt.

Folgender Ansatz wurde für 10 min. bei 70°C inkubiert:

Gesamt RNA aus <i>Ralstonia metallidurans</i>	10 µg
Fluorescein-markierter 3' <i>antisense</i> -Primer	20 pmol
steriles DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 12 µl

Nach sofortiger Abkühlung auf Eis wurden hinzupipettiert:

5x <i>first strand</i> -Puffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP-Lösung	1 µl

Nach 2 minütiger Inkubation bei 50°C wurden 0.7 µl SUPERSCRIPT™ II (200 U/µl, Gibco BRL, Eggenstein) zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 50°C inkubiert.

Danach wurde die Reaktion für 5 min. bei 85°C inaktiviert.

Anschließend wurde die synthetisierte cDNA konzentriert. Dazu wurde der Ansatz im Vakuum (Speed Vac) bis zur Trockne eingeengt. Das Pellet wurde in 4 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest gelöst und mit 4 µl A.L.F.-Stop-Lösung (siehe Sequenzierung 2.3.4.1.) versetzt.

Die DNA der untersuchten Genregion wurde mit dem für die *Primer Extension* verwendeten Fluorescein-markierten Primer sequenziert und diente als Größenstandard für die cDNA. Die Proben wurden nach Denaturierung parallel auf das 7 %ige denaturierende Sequenziergel des automatisierten A.L.F.™DNA-*Sequencers* aufgetragen. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt. Dieser diente zum Abgleichen des Hintergrundes im Fluorogramm.

Die Transkriptionsstartpunkte konnten durch Vergleich der Retentionszeiten zwischen den Produkten der *Primer Extension* und der Sequenzreaktion bestimmt werden.

### 2.6. *in vitro* Transkription mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP

#### 2.6.1. Gewinnung des DNA-Templates

Als Template für die RNA-Polymerase dienten DNA-Fragmente, die in einer Standard-PCR (Primer siehe Tabelle 3) amplifiziert wurden und den potentiellen Promotorbereich sowie einen Teil des nachfolgenden Genes enthielten. Die Fragmente wurden über den *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.6.2. Synthese von mRNA-Größenstandards (*DIG RNA Labeling Kit SP6/T7*, Roche, Mannheim)

Als Template für die T7-RNA-Polymerase dienten PCR-Produkte, die in einer Standard-PCR (Primer siehe Tabelle 3) amplifiziert wurden und die aus dem T7-Promoter sowie einen Teil des nachfolgenden Genes bestanden. Die Fragmente wurden über den *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert. Diese PCR-Produkte dienten als DNA-Templates in der *in vitro* Transkriptionsreaktion. Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen. Jedoch wurde DIG-UTP gegen [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP ausgetauscht.

#### 2.6.3. *in vitro* Transkription mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP (nach Beck *et al.*, 1997)

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 40 µl durchgeführt. Zuerst wurden 1 U *E. coli*-RNA-Polymerase-Core-Enzym mit 4 µl 5 x Transkriptionspuffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.75 M KCl, 2 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM DTT, 0.05 mg/ml BSA] versetzt und bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bzw. gereinigtes Protein (Sigma-Faktor CnrH) zugegeben. Der Ansatz verblieb 20 min. bei 4°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl 5 x Transkriptionspuffer,

2 µl NTP-Gemisch (MBI) [Endkonzentration pro Nukleosidtriphosphat in Reaktion 1 mM], 1 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP, 1 µl RNase-Inhibitor (50 U/µl; MBI), DNA-Template [Endkonzentration 20 nM ] ad 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gestartet und 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurde eine Negativ-Kontrolle mit 1 U *E. coli*-RNA-Polymerase-Core-Enzym ohne Sigma-Faktor CnrH mitgeführt.

Es schloss sich die Fällung der RNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5.2) und 2.5 Vol. 96 % Ethanol über Nacht bei -20°C an. Die RNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert, das Pellet luftgetrocknet und in 6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 10 µl Probenpuffer [ad 10 ml Formamid: 10 mg Xylen Cyanol FF, 10 mg Bromphenolblau, 200 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0)] aufgenommen.

Die Proben wurden 2 min. bei 85°C erhitzt und direkt auf ein 6 %iges denaturierendes Harnstoff-Gel aufgetragen.

### 2.6.4. Gelelektrophorese und Autoradiographie

Zur Auftrennung der Proben wurden 6 %ige denaturierende Harnstoff-Gele mit 0.5 x TBE [44.5 mM Tris, 44.5 mM Borsäure, 0.1 mM EDTA (pH 8.0)] als Laufpuffer verwendet.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Minigel-Twin-Kammer (Fa. Biometra GmbH) mit Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm. Pro Gel wurden 10 ml Gellösung hergestellt.

Gelzusammensetzung:	19:1 konz. Acrylamid + Harnstoff	2.4 ml
	Gelpuffer [0.5 x TBE mit 500 g/l Harnstoff]	7.6 ml
	10 % APS	52 µl
	TEMED	12 µl

Die Gellösung wurde vorsichtig gemischt und zwischen die vorbereiteten Platten gegossen. In das noch flüssige Gel wurde ein Probenkamm gesteckt, der nach Festwerden des Geles unter Puffer entfernt wurde und zur Ausbildung der Taschen zur Aufnahme der Proben diente.

Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung und einer Stromstärke von 15 mA pro Gel durchgeführt. Nachdem die Lauffront (Bromphenolblau des Probenpuffers) vollständig aus dem Gel herausgelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde nach Entfernung der Glasplatten in Folie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Nach Entwicklung des Filmes waren die Transkripte als Schwärzungen sichtbar.

## 2.7. Zellwachstumsversuche

### 2.7.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien

#### 2.7.1.1. Das Klett-Summerson Colorimeter

Das Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) diente der Zelltrübungsmessung wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Dazu wurde der Filter

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

### **2.7.1.2. Zellanzucht von *Ralstonia*-Stämmen in Wachstumsversuchen**

Die Zelltrübungsmessungen wurden in Tris-gepuffertem Minimalmedium mit 2 g/l Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle und NiCl<sub>2</sub> in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte eine einheitliche, in Tris-Minimalmedium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogene Vorkultur des jeweiligen Stammes. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 30°C und 140 rpm kultiviert und nach 48 h entnommen. Den Stämmen, die neue Plasmidkonstrukte enthielten (pVDZ 2-Derivate), wurde in der Vorkultur Tetracyclin (10 µg/ml) zur Selektion zugegeben. Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten 100 ml Erlenmeyerkolben.

Für die Anzucht der zu vermessenden Hauptkulturen wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 20 ml Tris-Minimalmedium [2 g/l Natriumgluconat, 0,5-1 mM NiCl<sub>2</sub>] mit der entsprechenden Vorkultur 1 %ig beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 30°C unter ständigem Schütteln in einem Gyrotory-Wasserbad oder im 30°C Brutraum inkubiert. Das Zellwachstum wurde kontinuierlich mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

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

Die Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) erfolgte auf Tris-Minimal-Agar. Es wurden Platten mit steigender Konzentration an Schwermetallionen gegossen. Auf den Platten wurden die entsprechenden Stämme aus Vorkulturen in Sektoren ausgestrichen und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert. Als Minimale Inhibitor Konzentration wird die Metallkonzentration bezeichnet, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen.

### 2.8. Enzymologische Methoden

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

#### 2.8.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte

Die für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *Ralstonia metallidurans* wurden in Tris-Minimalmedium mit Na-Gluconat bei 30°C inkubiert. Aus einer 48-Stunden Vorkultur wurden 20 ml Hauptkulturen angeimpft und unter Schütteln bis zu einer Zelldichte von ca. 70 Klett (Klett-Summerson-Colorimeter) inkubiert. Bei dieser Zelldichte wurden die Kulturen geteilt und eine Hälfte mit Metallionen inkubiert. Als Proben für den Enzymtest zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden zu verschiedenen Zeiten je 0.2 ml Kultur in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und die Zellen durch Zentrifugation (1 min., 4°C, 12 000 rpm) in der Sigma 2K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Auch wurde zu jedem Zeitpunkt der Probennahme die Zelldichte ermittelt, da dieser Wert für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität notwendig war.

#### 2.8.1.2. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Das Zellpellet wurde in 950  $\mu$ l Z-Puffer [0.6 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 M Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer [2.5 g/l CTAB, 5 g/l Natriumdesoxycholat] permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Substratlösung [4 g/l o-Nitrophenylgalactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz gemischt und bis zur Gelbfärbung bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des ONPG zu o-Nitrophenol durch die  $\beta$ -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung abgestoppt. Natriumcarbonat erhöhte den pH-Wert des Reaktionsansatzes auf 11, wodurch die  $\beta$ -Galaktosidase inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde 5 min. bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

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

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

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

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

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

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

Vorkulturen der *E. coli* CC118-Stämme mit Fusionsplasmiden (und Kontrollen) wurden über Nacht bei 30°C in 3 ml LB-Medium mit Antibiotika (Ampicillin und Kanamycin) unter Schütteln angezogen. 20 ml Hauptkulturen wurden 3 %ig aus den Vorkulturen angeimpft und ca. 2 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Das Fusionsprotein wurde durch Temperaturerhöhung auf 42°C für 30 min. induziert und über einen Zeitraum von einer weiteren Stunde bei 37°C exprimiert, bis zu einer optischen Dichte von etwa 100 Klett. 1 ml Kultur wurde bei 2 min. 4°C und 12000 rpm geerntet. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l Waschpuffer [10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM  $MgSO_4$  und 1 mM Jodazetamid (nach dem Autoklavieren zugeben zu 10 mM Tris/HCl pH 8.0)] resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 1ml Assay-Puffer [1 M Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM  $ZnCl_2$  und 1 mM Jodazetamid (nach dem Autoklavieren zugeben zu 10 mM Tris/HCl pH 8.0)] resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1 g/l SDS-Lösung und 50  $\mu$ l Chloroform permeabilisiert. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 min. bei 37°C inkubiert und dann 5 min. auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Substratlösung [1 M Tris/HCl pH 8.0, 0.4 % Paranitrophenol, immer frisch herstellen] und Mischen gestartet. Die Zeit bis sich die Probe bei 37°C im Wasserbad durch Nitrophenolbildung leicht gelb färbte, wurde bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von 120  $\mu$ l Stoppmix [1 M  $KH_2PO_4$  (5 Teile), 0.5 mM EDTA pH 8.0 (1 Teil)] und Inkubation auf Eis beendet. Der Ansatz wurde 4 min. bei 4°C und 12000 rpm pelletiert, der Überstand vorsichtig in eine Küvette gegossen und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

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

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

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

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

## 2.9. Proteinbiochemische Methoden

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

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

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

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* ER2566 transformiert. Die Hauptkulturen in LB-Medium zur Überexpression (100-500 ml) wurden direkt mit frischem Material einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von ca. 100 KE schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Induktion der T7-Polymerase durch Zugabe von 0.1-0.5 mM IPTG [Endkonzentration] und Inkubation über Nacht bei 16 – 20°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5 000 rpm, 4°C für 10 min. (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

### 2.9.1.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

#### A) Ultraschall

Das Zellpellet wurde in 5 ml (pro 50 ml Kultur) Säulenpuffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.5-1.0 mM NaCl, (+/- 0.1 mM EDTA), 0.2 % (v/v) Tween 20, 0.5 % (v/v) Triton X-100] resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 10 x in 20 sec.-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min. bei 5 000 rpm und 4°C zentrifugiert.

#### B) French-Press

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

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

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

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

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

### 2.9.2. Protein-Expression und -Reinigung über das *6xHis-Tag-System* (QIAGEN, Hilden)

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

Die Anzucht des Expressionsstammes *E. coli* M15 [pREP4], der das Plasmid pECD606 (Expressionsvektor pQE70 mit *czcC*) enthielt, erfolgte aerob in Erlenmeyerkolben mit 10 -100 ml LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin und Kanamycin. 1.5 ml bzw. 10 ml Vorkulturen wurden nach Beimpfung mit einer Einzelkolonie des Expressionsstammes über Nacht bei 30°C inkubiert. Die jeweils 5 %ig mit der Vorkultur angeimpfte Hauptkulturen wurden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 100 Klett angezogen und die Proteinexpression durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Im *screening*-Maßstab erfolgte eine stündliche Entnahme von 1 ml Proben (bis 4 h nach IPTG-Induktion), die bei RT in einer Microzentrifuge bei 12000 rpm 2 min. zentrifugiert wurden. Im präparativen Maßstab wurde nach 10 min. Inkubation mit dem Induktor IPTG die Kultur für 10 min. bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgegossen und durch frisches LB-Medium mit Antibiotika, aber ohne IPTG ersetzt. Nach 2 stündigem Schütteln bei 37°C wurde die Kultur auf Eis abgekühlt 10 min., in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min. bei 5000 rpm und 4°C in einer Zentrifuge der Fa. Hettich (Universal 30 RF, Tuttlingen) zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.9.2.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakten

Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Ultraschall, wie unter 2.8.1.2 beschrieben. Jedoch wurde Lyse-Puffer B (8 M Harnstoff, 0.1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 M Tris/HCl pH 8.0) verwendet. Anschließend wurde der Rohextrakt für 30 min. bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet verworfen.

#### 2.9.2.3. Denaturierende Proteinreinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säulen

Die Reinigung erfolgte nach der Vorschrift *The QIAExpressionist<sup>TM</sup>* der Fa. QIAGEN (Hilden, 1996) unter Verwendung eines für *His-tag*-Fusionsproteine affinen Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-*Spin-Columns* Säulenmaterial.

Dazu wurde der Rohextrakt auf die Säule appliziert und nach mehreren Waschschritten durch Änderung des pH-Wertes und Zugabe von Imidazol das gereinigte Protein eluiert.

### 2.9.3. Proteinbestimmung nach Bradford, 1976

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

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

Die Herstellung der Bradford-Lösung erfolgte, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96 % Ethanol 1 h gerührt und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85 %ige o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei RT im Dunkeln.

### **2.9.4. Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984)**

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

Dazu wurden 100 µl Proteinprobe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt, 300 µl Wasser zugegeben und nach Schütteln für 2 min. in einer Tischzentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 300 µl Methanol wurde wieder kräftig geschüttelt und erneut für 2 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und im entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O bidest und Probenpuffer aufgenommen.

### **2.9.5. Elektrophoretische Methoden**

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

#### **2.9.5.1. Probenvorbereitung**

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

#### **2.9.5.2. Protein Marker** (New England Biolabs GmbH, Schwalbach i. Taunus)

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

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

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

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

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

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

Sammelgel:	30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacylamid
Stammlösung	0.33 ml
0.625 M Tris-HCl (pH 8.8)	0.4 ml
5 g/l SDS	0.4 ml
H <sub>2</sub> O bidest	0.87 ml
TEMED	2 µl
APS (10 %ig)	10 µl

Der Elektrodenpuffer [2 mM Tris (pH 8.3), 0.2 M Glycin, 10 g/l SDS] wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben. Das Gel wurde (ohne *Spacer*) mittels Klemmen an der Kammer befestigt und der Kamm unter Puffer entnommen.

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

**2.9.5.4. SDS-Tricin-PAGE nach Schägger et al., 1988**

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

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

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

### 2.9.5.5. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)

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

#### a) *Semi-dry-Blot*

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

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

### b) Tank-Blot

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach dem Gellauf in auf 4°C vorgekühltem Transferpuffer [1 Teil 0.1 M CAPS pH 11.0, 8 Teile H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 1 Teil Methanol] geschwenkt, um die beim Transfer auf die Membran störenden Salze zu entfernen. Außerdem wurden 12 Lagen Whatman-3MM-Papier auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls mit gekühltem Transferpuffer getränkt. Eine PVDF-Membran, die gleichfalls der Gelgröße entsprach, wurde nacheinander für jeweils 1 min. in Methanol, H<sub>2</sub>O und Transferpuffer äquilibriert. Nach Aufbau des Blots, bei dem das Gel und die Membran zwischen je 6 Lagen Whatman-3MM-Papier gelagert wurden, erfolgte der Transfer der Proteine bei 100 V und 250 mA für etwa 90 min. auf die PVDF-Membran. Die Tank-Blot-Apparatur wurde dabei auf einen Magnetrührer gestellt, so dass ein kontinuierlicher Pufferstrom erzeugt wurde, der wie die Vorkühlung des Transferpuffers dem Abfangen der während der Übertragung entstehenden Wärme diente. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran luftgetrocknet, die Markerspuren abgeschnitten und einer Coomassie-Färbung unterzogen. Ebenso wurde das Gel zur Überprüfung der Blot-Effizienz Coomassie gefärbt.

### **2.9.5.6. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen CnrX bzw. CzcC**

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

Polyklonale Antikörper gegen CzcC wurden durch die Fa. BioGenes GmbH (Berlin) generiert. Dazu wurde 1 mg CzcC-Protein in vier *Boosts* über einen Zeitraum von vier Wochen einem Kaninchen gespritzt. Dann wurde das Tier ausgeblutet und die IgG-Fraktion gewonnen.

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

Der Proteinnachweis mittels Doppelimmunpräzipitation beruht auf der Kreuzreaktion eines primären Antikörpers (IgG) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzymaktivität (alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase) ermöglicht den Nachweis der gebildeten Protein/IgG/Anti-IgG-Komplexe durch eine Farbreaktion bzw. Lichtreaktion, d.h. Schwärzung eines Röntgenfilms durch Lichtemission.

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei Raumtemperatur, in sauberen Plastikschaalen und unter Schütteln durchgeführt. Die PVDF-Membran mit den darauf transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in Blockierungspuffer [PBS (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl) + 5 % „Glücksglee“-Magermilchpulver] inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend erfolgte ein Waschen der Membran für 3 x 5 min. mit PBS-Tween [0.1 % Tween 20 (v/v)]. Danach wurde die Membran in PBS-Tween mit dem gegen das nachzuweisende Antigen-Protein gerichteten 1. Antikörper für 1-3 h inkubiert, wobei sich die Konzentration des Antikörpers nach dessen erwarteter Spezifität richtete. Es wurden Verdünnen zwischen 1:100-1:50000 eingesetzt. Der ersten Antikörper-Inkubation folgte 3 x 15 min. Waschen der Membran in PBS-Tween und 1 x 5 min. in PBS-Puffer, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Darauf wurde die Membran mit einem Anti-IgG-Antikörper (monoklonal, Anti-Kaninchen-Antikörper, Maus-Ig, Alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase [Sigma-Aldrich, Deisenhofen]) für 1 h inkubiert, der 1:50000 in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den darauf folgenden Waschschritten (3 x 15 min. in PBS-Tween und 1 x 5 min. in PBS-Puffer) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunkomplexe an.

### a) Färbereaktion

Bei der Nachweisreaktion wurde die PVDF-Membran bis 1 h in 20 ml Nachweispuffer mit 10 µl Nitrotetrazoliumblau [75 g/l in 70 % (v/v) Dimethylformamid] und 60 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-Phosphat [50 g/l in Dimethylformamid] bis zum Auftreten lila gefärbter Banden inkubiert. Bei guter Intensität wurde die Reaktion durch kurzes Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

### b) Lichtreaktion

Bei der Nachweisreaktion wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 15 ml Detektionslösung I [1.5 ml 1 M Tris/HCl pH 8.5 und 8.16 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ad 15 ml H<sub>2</sub>O bidest.] und Detektionslösung II [1.5 ml 1 M Tris/HCl pH 8.5, 168 µl 250 mM Luminol (gelöst in DMSO), 66 µl 30 mM p-Cumarsäure (gelöst in DMSO) ad 15 ml H<sub>2</sub>O bidest] gegeben, durch Schwenken gemischt und 1 min. inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgegossen, die Membran in eine aufgeschnittene Plastikfolie gepackt und ein Röntgenfilm (Lumifilm, Amersham, Little Chalfont, England) 30 sec. bis 2 min. exponiert.

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

### **2.9.6.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau** (nach Weber und Osborn, 1969)

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung [2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0.5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest] inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärbelösung [50 % Methanol, 7.5 % Essigsäure].

Die Gele wurden bis zur Trocknung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufbewahrt.

Zur Färbung von Markerspuren auf PVDF-Membranen wurden diese 1 min. in Färbelösung inkubiert, anschließend ebenfalls unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt und luftgetrocknet.

### **2.9.6.2. Silberfärbung (nach Rabilloud *et al.*, 1988; Nesterenko *et al.*, 1994)**

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 100 ml Fixierlösung [50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Ethanol in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ] für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gel für eine Minute in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und für zwei Minuten in 100 ml Vorbehandlungslösung [40 mg Natriumthiosulfat in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ] inkubiert. Bevor das Gel für 20 min. imprägniert wurde (200 mg Silbernitrat und 50  $\mu\text{l}$  37 % (v/v) Formaldehyd in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ), wurde es dreimal 20 sec. in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. An einen erneuten kurzen Waschschrift mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  schloss sich die Entwicklung (6 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  und 70  $\mu\text{l}$  Formaldehyd in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ) an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem nacheinander zweimal zwei Minuten mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ , einem Methanol [50 % (v/v)]-Essigsäure [12 % (v/v)]-Gemisch und 100 ml 50 % Methanol (v/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen wurde. Anschließend konnte das Gel in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufbewahrt oder getrocknet werden.

### **2.9.6.3. Trocknung von Polyacrylamid-Gelelen**

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

### **2.9.7. Sequenzierung von Proteinen**

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

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

Die Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) dient zum Nachweis von an Proteine gebundene Metallionen. Dabei wird das Protein verbrannt. Aus der Extinktion des von einer Lampe

emittierten Lichts einer konstanten Wellenlänge (232 nm bei Ni<sup>2+</sup>, 213 nm bei Zn<sup>2+</sup>), kann der Gehalt an Metallionen errechnet werden. Gereinigtes CnrX-Protein (ca. 2 mg) wurde zuerst gegen *Cleavage*-Puffer [20 mM HEPES (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100 ] über Nacht dialysiert, um das Reduktionsmittel DTT zu entfernen, dann gegen *Cleavage*-Puffer (mit 0.1 mM NiCl<sub>2</sub> bzw. ZnCl<sub>2</sub> oder beide) über Nacht, um das Protein mit Metall zu beladen, und schließlich wurde das ungebundene Metall durch Dialyse über Nacht entfernt. Es wurde eine Cellulose-Dialysemembran mit einem *Cut-off* von 3500 kDa verwendet (Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin). Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das Protein am „929 AA-Spectrometer2 (Unicam Ltd., Cambridge England) unter einem Luft/Aceton-Gemisch verbrannt. Als Nullabgleich wurde *Cleavage*-Puffer verwendet. Die Metallkonzentration der Probe wurde aus dem Vergleich mit einer Eichreihe aus Lösungen verschiedener Metallkonzentration bestimmt. Aus der Menge an eingesetztem Protein und dem Messwert konnte dann das Verhältnis Metall:Protein bestimmt werden.

### **2.9.8. HPLC-Analyse der proteolytischen Aktivität von CnrX**

Die HPLC-Untersuchungen zum Nachweis der proteolytischen Aktivität von CnrX gegen CnrY wurden in Kooperation mit Dr. Siglinde Menge, Institut für Biochemie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg und Dr. Beate Fricke Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Die in *E. coli* überexprimierten und anschließend gereinigten Proteine CnrY und CnrX wurden durch Elektroelution aus der PAA-Gelelektrophorese von Verunreinigungen befreit und die Reinheit mittels HPLC-Analyse bestätigt.

Die homogenen Proteine CnrY und CnrX wurden im Verhältnis 1:1 in 10 mM Tris/HCl-Puffer gemischt, für die Induktion der Proteolyse 100 µM NiCl<sub>2</sub> zugegeben und für 3-16 Stunden bei RT inkubiert. Der Reaktions-Ansatz wurde auf eine 250 mm Säule (Nucleosil 300 A, 5 µm Porenweite C/8-Modifikation; Machery-Nagel, Düren) gegeben, in einem LiChroGraph (mit L-6200 Intelligente Pumpe, Rheodyne 6-Wege-Ventil, 655-A und variablem Wellenlängen-Detektor; Merck-Hitachi, Darmstadt) in einem Acetonitril-Gradienten von 2-70 % aufgetrennt und mit der Software HPLC-Manager (Merck, Darmstadt) ausgewertet.

### **2.10. Das Yeast-Two-Hybrid-System (Cyto Trap<sup>Tm</sup>, Stratagene, Heidelberg)**

Das *Yeast-Two-Hybrid-System* dient zur Untersuchung der *in vivo* Interaktion von zwei Proteinen (pro- oder eukaryotisch) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H.

Das erste Protein wird hierbei mit dem Protein hSos (einem Protein der RAS-Hitzestress-Antwort) fusioniert. Dieses Konstrukt diente als *Bait* (Beute). Ein zweites Protein wird mit einem Myristylationssignal (führt zur Membranassoziation) fusioniert. Diese Konstrukte dienten als *Target* (*Predator*).

Interagieren die Fusionen miteinander, kommt es zur Membranassoziation von hSos. Dieses aktiviert den GDP/GTP-Austausch am Protein RAS. So wird eine Kaskade gestartet, die der Hefe ermöglicht, bei erhöhten Temperaturen zu überleben.

### **2.10.1. Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H-Zellen**

5 x 100 ml Kulturen *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H in YPAD-Medium wurden in separaten 250 ml Erlenmeyer-Kolben inokuliert. Die Kulturen wurden dazu für etwa 48 Stunden bei 25°C stark geschüttelt bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.7.

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

Alle 100 ml Kulturen wurden bei 4000 rpm und 4°C für 10 min. abzentrifugiert und in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 5 ml Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 4000 rpm und 4°C für 10 min. abzentrifugiert, in 50 ml sterilem LiSORB [100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA und 1 M Sorbitol] resuspendiert und bei RT für 30 min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2600 rpm und 4°C für 10 min. abzentrifugiert und in 500 µl LiSORB aufgenommen. Es wurden 1 ml Heringsspermien-DNA-Lösung [400 µl einer 20 mg/ml Heringsspermien-DNA-Lösung und 600 µl LiSORB] zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Dann wurden 9 ml PEG/LiOAc-Lösung [10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM LiOAc pH 7.5 und 400 g/l PEG 3350] und 880 µl Dimethylsulfoxid zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Die kompetenten Zellen wurden zu Aliquoten von je 1 ml bei -80°C eingefroren.

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

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

Für jede Transformation wurden mindestens drei Kolonien gepickt und jeweils in 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Davon wurden je 2.5 µl auf zwei SD/Glucose (-UL) Agar-Platten und auf zwei SD/Galaktose (-UL) Agar-Platten ausplattiert. Jeweils eine Platte wurde bei 37°C, die andere bei RT für mindestens 5 Tage inkubiert. Durch Galaktose wurde der GAL1-Promotor auf dem Plasmid pMYR und damit auch das myristylierte Fusionsprotein induziert. Bei einer Interaktion mit dem pSOS-Fusionsprotein kam es zur Koloniebildung auf SD/Galaktose (-UL) Agar-Platten bei 37°C.

### 3. ERGEBNISSE

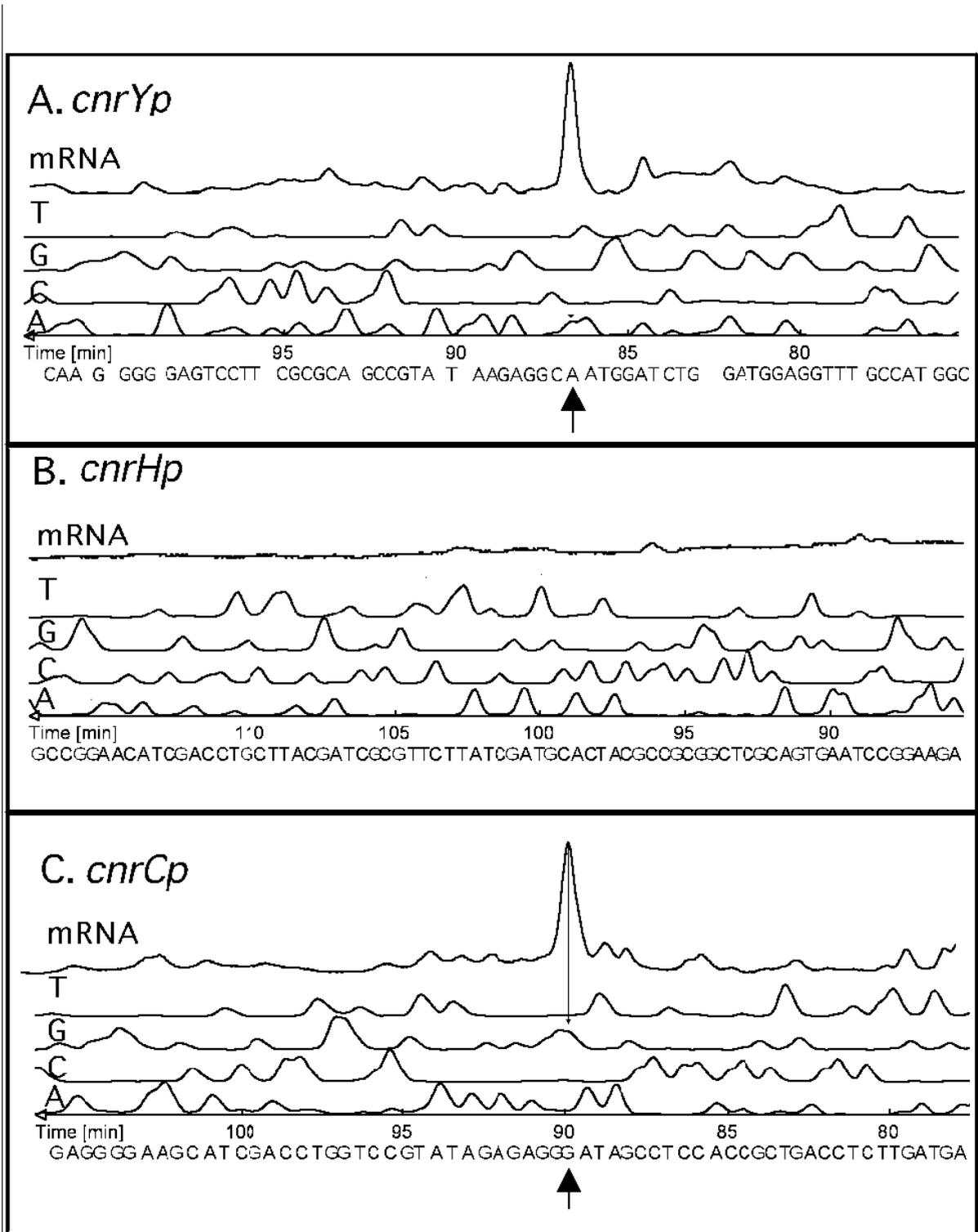
#### 3.1. Die Transkription und Promotoren der *cnr*-Determinante

##### 3.1.1. Über *Primer Extension*-Analyse konnten die Transkriptionsstartpunkte von *cnrYXH* und *cnrCBA* bestimmt werden

Die genauen Startpunkte der Transkripte der *cnr*-Determinante sollten mit der Methode der *Primer Extension*-Analyse nachgewiesen werden. Die *Primer Extension*-Experimente wurden mit DNA-freier Gesamt-RNA aus *Ralstonia metallidurans* AE126 durchgeführt. Zur Induktion von *cnr* wurden die Kulturen 10 min. vor der Zellernte mit 0.3 mM NiCl<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden Fluorescein-markierte Primer abgeleitet, die ca. 100 bp im kodierenden Bereich der Gene *cnrY* (PREX 1 CY'5), *cnrH* (PREX 2 CY'5) bzw. *cnrC* (PREX P*cnrC* U CY'5) banden und für die reverse Transkriptions-Reaktion eingesetzt. Durch paralleles Auftragen der *Primer Extension*-Reaktionen und der Sequenzreaktionen der entsprechenden DNA-Regionen konnten aus dem Vergleich der Retentionszeiten das genaue 5'-Ende der Transkripte nachgewiesen werden. Als Negativ-Kontrollen dienten *Primer Extension*-Reaktionen mit DNase I-behandelter Gesamt-RNA aus Zellen des plasmid- und somit *cnr*-freien, metallsensitiven *R. metallidurans* Stammes AE104.

Unter Verwendung der in *cnrY* und *cnrC* bindenden Primer konnten die jeweiligen Transkriptionsstartpunkte ermittelt werden (Abb. 3 A und C). Diese befanden sich ca. 20 bp stromaufwärts der entsprechenden ATG-Start-Kodons. Stromaufwärts der Transkriptions-Startpunkte konnten hoch konservierte Regionen gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnte in der *Primer Extension*-Reaktion mit einem Primer, der in *cnrH* band kein Transkriptions-Startpunkt nachgewiesen werden (Abb. 3 B). Anhand der ermittelten Transkriptionsstartpunkte wurden aus der *cnr*-Sequenz (Eintrag M91650, EMBL-Datenbank) die beiden möglichen Promotoren *cnrYp* und *cnrCp* abgeleitet (Abb. 4).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3: Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der *cnr*-Determinante mittels *Primer Extension*-Analyse**

Abgebildet sind jeweils das Fluorogramm der *Primer Extension*-Reaktion und der dazugehörigen Sequenzierung. Nach Inkubation mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  wurde Gesamt-RNA aus dem Stamm AE126(pMOL28) isoliert und DNaseI-behandelt. Sequenzierung und *Primer Extension*-Analyse wurde mit dem gleichen Fluorescein-markierten Primer durchgeführt. Die Primer banden nahe des 5'-Endes der Gene *cnrY* (Tafel A), *cnrH* (Tafel B) oder *cnrC* (Tafel C). Die Sequenz-Daten sind unterhalb der Angabe der Retentionszeit (in Minuten) gezeigt. Die Sequenz korreliert mit bp 924-987 (Tafel A), 1653-1726 (Tafel B) und 2302-2364 (Tafel C) (Basenpaarnummern nach Eintrag M91650, EMBL-Datenbank). Der Pfeil kennzeichnet den Transkriptionsstartpunkt für *cnrY* bzw. *cnrC*.



**Tabelle 4: Expression der  $\Phi(\text{cnr-Promotor-lacZ})$ - Reporter in *R. metallidurans* AE126(pMOL28) <sup>1</sup>**

Stamm,	<i>in trans</i>	0 mM Ni <sup>2+</sup>		0.5 mM Ni <sup>2+</sup>	
		a, [U/mg] TG	b, [U/h*mg] TG	a, [U/mg] TG	b, [U/h*mg] TG
AE126, pMOL28 <sup>2</sup>	$\Phi(\text{cnrHp-lacZ})$	11.1±3.7	0	10.8±8.6	0
	$\Phi(\text{cnrYp-lacZ})$	6.43±1.49	8.76	0.06±0.01	39
	$\Phi(\text{cnrCp-lacZ})$	0.87±0.52	1.26	0	15

<sup>1</sup> 0.5 mM Ni<sup>2+</sup> oder 0 mM Ni<sup>2+</sup> wurde zu Kulturen von verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen gegeben, die sich in der frühen exponentiellen Phase befanden (Zeit = 0 h). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht wurde für mindestens 3 h bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht vor Induktion (a) und die Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/h x mg Trockengewicht (b). Das entspricht der linearen Funktion  $y=bx+a$ . Wenn es zu keiner Zunahme kam ( $b=0$ ), sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aller Datenpunkte des jeweiligen Experimentes angegeben.

<sup>2</sup> Das *lacZ*-Gene steht unter Kontrolle eines *cnr*-Promotors auf einem *in trans* zu pMOL28 komplementierten pVDZ' 2-Derivat

## 3.2. Induktion einer $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ Operon-Fusion durch Schwermetall-Ionen

### 3.2.1. Die Induktion von $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ ist von der Nickel-Konzentration abhängig

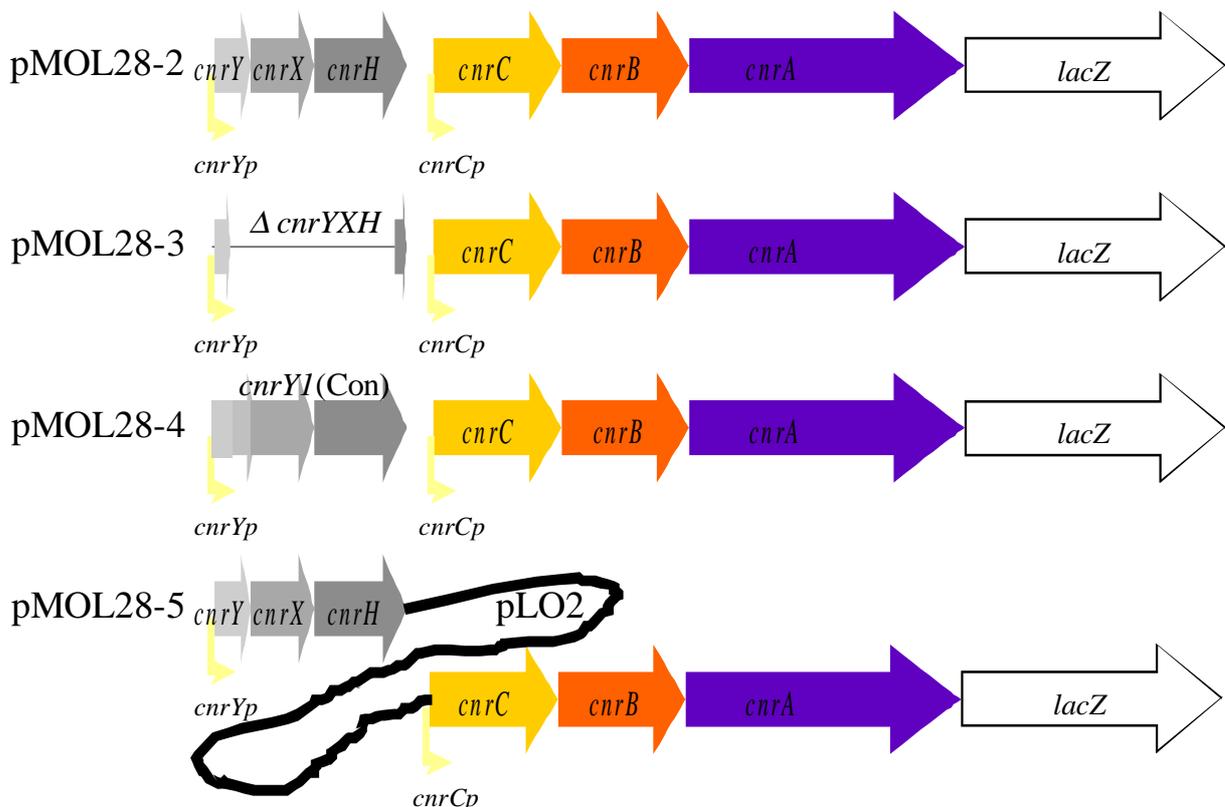
Da die Genprodukte des *cnr*-Efflux-Komplexes keine unmittelbar messbare Enzymaktivität liefern, sollte durch Konstruktion eines Reporterstamms ein leicht messbares Enzym mit den Proteinen des *cnr*-Systems koexprimiert werden. Hierzu wurde die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) gewählt. Dabei sollte aber durch die Einführung des Reporters in das *cnr*-System auf keinen Fall die Schwermetallresistenz beeinträchtigt werden. Aus diesem Grunde wurde der *lacZ*-Reporter als Transkriptions-(Operon-)Fusion konstruiert. Hierbei wurde eine promotorlose *lacZ*-Kassette unmittelbar stromabwärts von *cnrCBA* auf Plasmid pMOL28 eingefügt, wodurch der *lacZ*-Reporter-Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ ) entstand (Abb. 5). Für die Konstruktion dieses Stammes wurden die 300 bp stromaufwärts des *cnrA*-Stop-Codons durch PCR als *PstI/XbaI*-Fragment aus Megaplasmid pMOL28-DNA amplifiziert (Primer *cnr-lacZ* OD + *cnr-LacZ* OU). Ebenso wurden die 300 bp stromabwärts des Stop-Codons als *XbaI/PstI*-Fragment amplifiziert (Primer *cnr-LacZ* UD + *cnr-LacZ* UU). Die PCR-Produkte wurden mit *XbaI* (jedoch nicht mit *PstI* geschnitten) und beide Fragmente zusammen in den Vektor pGEM T-Easy kloniert.

Das resultierende Plasmid trug ein 600 bp Fragment mit einer *XbaI*-Schnittstelle direkt stromabwärts des *cnrA*-Stop-Codons, was dazu führte, dass die Sequenz **TGA8025GTTTTGCGA** (das TGA-*cnrA*-Stop-Codon in fett) zu **TGA8025GTTTTCTAGA** mutiert wurde. In die *XbaI*-Schnittstelle dieses Plasmides wurde das promotorlose *lacZ*-Gen aus Plasmid pMC1871 kloniert und das resultierende, um *lacZ* vergrößerte *PstI*-Fragment wurde in Plasmid pLO2 umklontiert. Anschließend wurde mit Hilfe dieses pLO2- $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ -

Hybrid-Plasmids durch Doppel-Rekombination das *lacZ*-Gen stromabwärts von *cnrA* auf Megaplasmid pMOL28 eingefügt. Die korrekte Insertion und Orientierung von *lacZ* im  $\beta$ -Galaktosidase-Reporter-Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) wurde durch PCR überprüft.

Der Einfluss der *lacZ*-Insertion wurde untersucht. Die Ermittlung der minimalen Inhibitor-Konzentration (MIC) gegen  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  auf Agar-Platten (Tab. 5) und Wachstumsversuche in Flüssigmedium mit Nickel zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp AE126(pMOL28) (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Reporter-Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) wurde für  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtests eingesetzt, wobei als erstes die Induktion durch Nickel untersucht wurde. Hierzu wurden Konzentrationen von 50, 100, 500 und 2000  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  eingesetzt. Bis zu einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  führte eine Erhöhung der Nickel-Konzentration auch zu einer Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Abb. 6 A; Tab. 6). Eine weitere Steigerung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentration führte zur schwächsten Induktion von  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) (Abb. 6 A). Dies wurde wahrscheinlich durch toxische Effekte verursacht, da die  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentration sich der MIC näherte.



**Abb. 5: Physikalische Karte von Derivaten der *cnr*-Region auf Plasmid pMOL28**

In allen Konstrukten war das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) stromabwärts von *cnrA* als Operon-Fusion  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) eingeführt worden. In Plasmid pMOL28-3, wurden zusätzlich die Gene *cnrYXH* in *Frame* deletiert. In Plasmid pMOL28-4 trägt das *cnrYI(Con)*-Gen eine 14 bp-Insertion nach Position 1111. Dadurch wird der offene Leserahmen danach in einem anderen *Frame* fortgesetzt. Diese *Frame-Shift*-Mutation führt zur konstitutiven *cnr*-Expression. In Plasmid pMOL28-5 führt die Insertion von Plasmid pECD581 zur Trennung von *cnrYXH* und *cnrCBA*. Der Plasmid-pLO2-Anteil von pECD581 ist als dicke Linie dargestellt.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 5: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) von Nickel und Cobalt in *R. metallidurans* AE126(pMOL28)-Derivaten<sup>a</sup>**

Bakterien-Stamm	Relevanter Genotyp	Ni <sup>2+</sup> [mM]	Co <sup>2+</sup> [mM]
AE126(pMOL28)	Wildtyp	4.0	5.0
AE104	Plasmid-freie Kontrolle	0.3	0.3
DN177(pMOL28-2)	Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	4.0	5.0
DN177(pMOL28-2) <sup>b</sup>	Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )		10
DN177(pMOL28-2, pDNA291)	Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> in trans	5.0	3.0
DN190(pMOL28-3)	Δ <i>cnrYXH</i> Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	0.4	0.3
DN190(pMOL28-3, pDNA291)	Δ <i>cnrYXH</i> Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> in trans	4.0	5.0
DN195(pMOL28-4)	<i>cnrYI</i> (Con) Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	7.0	10
DN195(pMOL28-4, pDNA291)	<i>cnrYI</i> (Con) Φ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> in trans	7.0	10

<sup>a</sup>MIC (Minimale Inhibitor Konzentration), definiert als Inhibierung des Wachstums bei 30°C für 3 Tage. Einzelkolonien wurden nicht als Wachstum gewertet. Jede Bestimmung wurde zweimal mit den gleichen Ergebnissen wiederholt.

<sup>b</sup>Kultiviert in Anwesenheit von Cobalt plus 1 mM Ni<sup>2+</sup>

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 6: Expression von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$  in *R. metallidurans* AE126(pMOL28)-Derivaten<sup>1</sup>**

Stamm, Megaplasmid	<i>in trans</i>	0 mM Ni <sup>2+</sup>		0.5 mM Ni <sup>2+</sup>	
		a, [U/mg] TG	b, [U/h*mg] TG	a, [U/mg] TG	b, [U/h*mg] TG
pMOL28-2	-	62.2±6.8	0	64±5	86.4
$\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$					
pMOL28-5 <sup>2</sup>	-	121±5	0	102.6±0.4	90.7
$\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$					
$\Omega(\text{cnrHC::pECD581})$					
pMOL28-3	-	28.1±2.5	0	26.6±1.0	0
$\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$					
$\Delta\text{cnrYXH}$					
pDNA291	<i>cnrYXH</i>	36.0±5.1	0	48.5±1.8	24.8
pDNA292	<i>cnrY</i>	39.9±3.3	0	33.2±3.3	0
pDNA293	<i>cnrX</i>	34.6±6.0	0	36.7±3.7	0
pDNA294	<i>cnrH</i>	937±106	0	770±52	0
pDNA295	<i>cnrYX</i>	31.6±3.6	0	35.0±4.8	0
pDNA296	<i>cnrYH</i>	1650±93	0	1590±140	0
pDNA297	<i>cnrXH</i>	900±195	0	1025±320	0
pDNA334	<i>cnrYI(Con), cnrXH</i>	1350±60	0	1380±97	0
pMOL28-4	-	1025±107	0	1095±88	0
$\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$					
<i>cnrYI(Con)</i>					
pDNA291	<i>cnrYXH</i>	63.1±5.9	18.4	61.3±1.2	44.5
pDNA292	<i>cnrY</i>	114±4	0	97±2	26.0
pDNA293	<i>cnrX</i>	687±53	0	896±19	0
pDNA294	<i>cnrH</i>	678±97	0	785±64	0
pDNA295	<i>cnrYX</i>	151±9	0	155±19	0
pDNA296	<i>cnrYH</i>	1010±68	0	1050±176	0
pDNA297	<i>cnrXH</i>	1226±254	0	1190±176	0
pDNA334	<i>cnrYI(Con), cnrXH</i>	1180±55	0	1450±123	0

<sup>1</sup> 0.5 mM Ni<sup>2+</sup> oder 0 mM Ni<sup>2+</sup> wurde zu Kulturen von verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen gegeben, die in der frühen exponentiellen Phase wuchsen (Zeit = 0 h). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht wurde für mindestens 3 h bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht vor Induktion (a) und die Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/h x mg Trockengewicht (b). Das entspricht der linearen Funktion  $y=bx+a$ . Wenn es zu keiner Zunahme kam ( $b=0$ ), sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aller Datenpunkte des jeweiligen Experimentes angegeben.

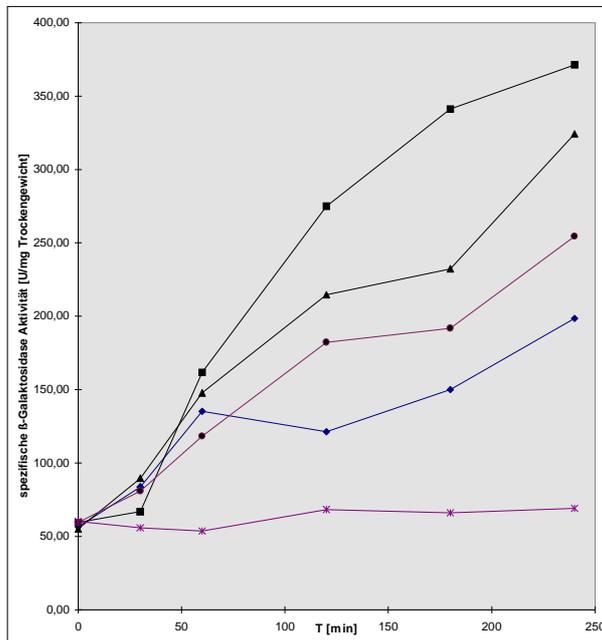
<sup>2</sup> Trägt eine Insertion von pLO2 und flankierend die Duplikation der Region von bp 2100-2400. Dadurch wird *cnrYXH* von *cnrCBA* getrennt (Abb. 5).

### 3.2.2. Cobalt ist ein schwacher Induktor, andere Metalle induzieren nicht

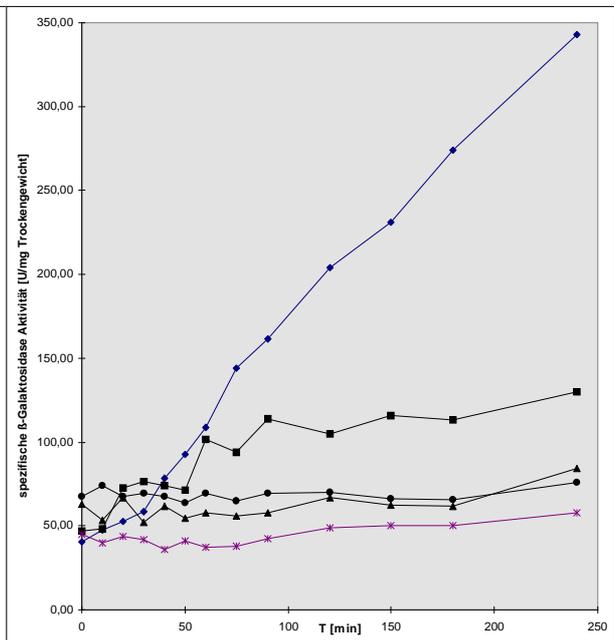
Cobalt als zweites Substrat der *cnr*-Determinante, sowie andere Metalle, wurden ebenfalls in einem  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest mit dem Reporter-Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) auf ihre Eigenschaft als *cnr*-Induktoren untersucht. Steigende Konzentrationen (bis 500  $\mu$ M) von Cobalt führten ebenso wie bei Nickel zur Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (Ergebnis nicht gezeigt). Jedoch war das Expressionsniveau bei den gleichen Konzentrationen wie im Experiment mit Nickel deutlich geringer (Ergebnis nicht gezeigt). In Übereinstimmung aber war wieder 0.5 mM die beste Induktor-Konzentration (Abb. 6 B).

Um zu testen, ob es eventuell andere Metalle gibt, die die *cnr*-Determinante zwar induzieren können, aber für die keine Resistenz durch *cnr* vermittelt wird, wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtests mit  $Zn^{2+}$  (0.3 mM) und Chromat (0.1 mM) durchgeführt. Chromat wurde gewählt, da die Gene für die Chromat-Resistenz direkt stromaufwärts von *cnr* kodiert werden, Zink, weil bekannt war, dass es Mutationen in *cnr* gibt, die dazu führen, dass durch das System eine geringe  $Zn^{2+}$ -Resistenz vermittelt wird (Collard *et al.*, 1993). Dadurch dass sowohl  $Zn^{2+}$  als auch Chromat toxisch für AE126-Stämme ist, wurden nur geringe Konzentrationen eingesetzt. Keines dieser Metalle vermochte jedoch, *cnr* nennenswert zu induzieren (Abb. 6 B).

A.



B.



**Abb. 6: Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im *lacZ*-Reporterstamm DN177 (pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) durch Metalle**

Kulturen von *R. metallidurans* DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) wurden 15fach in frischem Medium auf eine optische Dichte von ca. 30 Klett-Einheiten verdünnt und nach 4 h Schütteln bei 30°C je eine Hälfte mit (—■—, —▲—, —◆—, —●—) oder ohne (\*—) Metalle inkubiert.

A. Induktion durch  $NiCl_2$  (50 (—●—), 100 (—▲—), 500 (—■—), 2000 (—◆—)  $\mu$ M)

B. Induktion durch 500  $\mu$ M  $NiCl_2$  (—◆—), 500  $\mu$ M  $CoCl_2$  (—■—), 300  $\mu$ M  $ZnCl_2$  (—●—) oder 100  $\mu$ M  $K_2CrO_4$  (—▲—)

#### **3.2.3. Die *cnr*-vermittelte Cobalt-Resistenz wird durch unzureichende $\text{Co}^{2+}$ -Induktion limitiert**

Die Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase war durch  $\text{Co}^{2+}$  bei gleicher Konzentration deutlich niedriger als bei  $\text{Ni}^{2+}$ . Deshalb sollte untersucht werden, ob die *cnr*-vermittelte Cobalt-Resistenz dadurch limitiert wird, dass die Expression des CnrCBA-Efflux-Komplex durch  $\text{Co}^{2+}$  schlechter induziert wird als durch Nickel. Dazu wurden Agarplatten hergestellt, in die zusätzlich zu verschiedenen Konzentrationen  $\text{Co}^{2+}$ , eine konstante induzierende Konzentration  $\text{Ni}^{2+}$  (1 mM) beigemischt wurde. Dies führte tatsächlich zu einer Erhöhung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegenüber  $\text{Co}^{2+}$  (Tab. 5). Ein ähnliches Experiment mit  $\text{Zn}^{2+}$  bzw.  $\text{Cd}^{2+}$  führte zu keiner Erhöhung der MIC gegen diese Metall-Kationen (Ergebnis nicht gezeigt).

#### **3.2.4. $\text{Zn}^{2+}$ und $\text{Co}^{2+}$ beeinflussen die $\text{Ni}^{2+}$ -vermittelte *cnr*-Induktion**

Um zu untersuchen, wie sich die Anwesenheit verschiedener Metall-Kationen auf die Induktion von *cnr* auswirkt, wurde zusätzlich zu  $\text{Ni}^{2+}$  auch  $\text{Zn}^{2+}$  bzw.  $\text{Co}^{2+}$  zu Kulturen von DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) gegeben. Dazu wurde eine in der exponentiellen Phase wachsende Kultur von DN177 geteilt, mit 0.15 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , 0.15 mM  $\text{Ni}^{2+}$ , 0,15 mM  $\text{Ni}^{2+}$  + 0.15 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , 0.25 mM  $\text{Co}^{2+}$ , 0.25 mM  $\text{Ni}^{2+}$  oder 0.25 mM  $\text{Ni}^{2+}$  + 0.25 mM  $\text{Co}^{2+}$  inkubiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die verwendeten Metall-Kationen-Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie sich im subtoxischen Bereich befanden. Damit sollten hemmende Effekte auf die Zellen vermindert werden.

Die Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$  +  $\text{Ni}^{2+}$  führte zu einer geringeren Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, als wenn  $\text{Ni}^{2+}$  alleine zugegeben wird (Tab. 7). Das ist auch der Fall wenn  $\text{Co}^{2+}$  mit  $\text{Ni}^{2+}$  kombiniert wird. Es war zu beobachten, dass im Vergleich zur Induktion durch  $\text{Ni}^{2+}$ , die prozentuale Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch  $\text{Zn}^{2+}$  +  $\text{Ni}^{2+}$  weniger stark verringert wurde, als durch  $\text{Co}^{2+}$  +  $\text{Ni}^{2+}$  (Tab. 7). Anscheinend kann  $\text{Zn}^{2+}$ , das kein Substrat des CnrCBA-Efflux-Komplexes ist, dennoch die  $\text{Ni}^{2+}$ -vermittelte *cnr*-Induktion inhibieren. Das Ergebnis der Inkubation mit  $\text{Co}^{2+}$  +  $\text{Ni}^{2+}$  kann somit quantitativ erklären, dass die Minimale Inhibitor Konzentration gegen  $\text{Co}^{2+}$  durch  $\text{Ni}^{2+}$  gesteigert werden kann (Tab. 5), indem die *cnr*-Determinante durch  $\text{Ni}^{2+}$  stärker induziert wird.

**Tab. 7: Inhibierung von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$  durch  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$  in DN177(pMOL28-2)<sup>1</sup>**

Induktion von $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ mit	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätszunahme [U/h x mg Trockengewicht]	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätszunahme [% der Induktion durch $\text{Ni}^{2+}$ ]
0.15 mM $\text{Zn}^{2+}$	15.6 $\pm$ 7.6	27
0.15 mM $\text{Ni}^{2+}$	57.2 $\pm$ 1.7	100
0.15 mM $\text{Ni}^{2+}$ + 0.15 mM $\text{Zn}^{2+}$	46 $\pm$ 2.8	80
0.25 mM $\text{Co}^{2+}$	30.9 $\pm$ 7.4	46
0.25 mM $\text{Ni}^{2+}$	67.2 $\pm$ 3.4	100
0.25 mM $\text{Ni}^{2+}$ + 0.25 mM $\text{Co}^{2+}$	50.6 $\pm$ 3	75

<sup>1</sup>  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  bzw.  $\text{Zn}^{2+}$  wurde zu Kulturen von *R. metallidurans* DN177(pMOL28-2  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ ) gegeben, die in der frühen exponentiellen Phase wuchsen. Die Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/h x mg Trockengewicht wurde für 3 h bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/h x mg Trockengewicht.

### 3.2.5. Die Integration einer $\Omega$ -Kassette zwischen *cnrH* und *cnrC* führt nicht zum Verlust der Induzierbarkeit

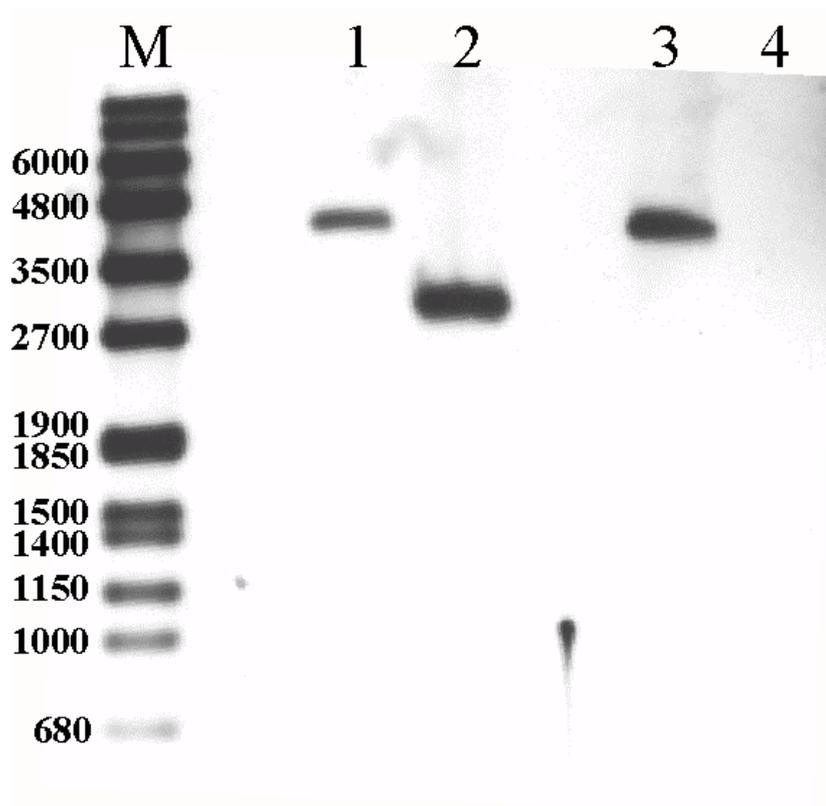
Die *cnr*-Determinante besitzt zwei Promotoren *cnrYp* und *cnrCp*. Werden für eine effektive Expression des CBA-Komplexes beide benötigt oder muss die *cnr*-mRNA von Y bis A durchgelesen werden? Ist *cnrYp* nur dafür verantwortlich, genügend Regulatoren CnrY, X und H bereitzustellen? Existiert ein Promotor *cnrHp*? Um diese Fragen zu klären, wurde eine *cnrH'C'*-Region (bp 2100 bis 2400, Abb. 5) in Plasmid pLO2 kloniert (Primer *cnr* Delta C OD + *cnr* Delta C OU), wodurch Plasmid pECD581 entstand. Die Integration dieses Plasmides in das Megaplasmid pMOL28-2 des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporterstammes führte zur räumlichen Trennung des *cnrYXH*-Operons vom *cnrCBA*-Operon im Plasmid pMOL28-5 (Abb. 5). Im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest war das Grundniveau vor Induktion mit Nickel etwas höher in diesem Reporterstamm DN410(pMOL28-5  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$   $\Omega(\text{cnrHC}::\text{pECD581})$ ) als im *lacZ*-Wildtyp-ähnlichen Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ ) (Tab. 6). Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch einen unidentifizierten Promotor auf Plasmid pLO2 verursacht, z. B. den des Kanamycin-Resistenz-Gens. Nach Induktion mit 0.5 mM  $\text{Ni}^{2+}$  war die Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Stamm DN410(pMOL28-5) der des *lacZ*-Kontrollstammes sehr ähnlich (Tab. 6). Dadurch wurde bestätigt, dass die Aktivität des *cnrCBA*-Promotors *cnrCp* ausreichend ist, um genügend CnrCBA-Komplex herzustellen.

### 3.3. Die Deletion von *cnrYXH* führt zum fast völligen Verlust der Induzierbarkeit von *cnr* durch Nickel, ist aber *in trans* komplementierbar

#### 3.3.1. Konstruktion des *cnrYXH*-Deletionsstammes DN190 ( $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH}$ )

Um den Einfluss der Proteine CnrY, CnrX und CnrH auf die *cnr*-Induktion zu untersuchen, wurden deren Gene im  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ -Plasmid pMOL28-2 deletiert. Dazu wurden stromaufwärts von *cnrY* durch PCR ca. 300 bp als *XbaI/MunI*-Fragment aus Megaplasmid-DNA pMOL28 amplifiziert (Primer *cnrRGR* OD + *cnrRGR* OU), wobei die ersten 24 Basen von *cnrY* (bis Position G<sub>1006</sub>) enthalten waren. Ebenso wurden stromabwärts *cnrH* 300 bp als *MunI/XbaI*-Fragment mit den letzten 24 Basen von *cnrH* (ab C<sub>2261</sub>) amplifiziert (Primer *cnrRGR* UD + *cnrRGR* UU). Die PCR-Produkte wurden mit *MunI*, jedoch nicht mit *XbaI* geschnitten und beide Fragmente zusammen in den Vektor pGEM T-Easy kloniert und zur Kontrolle sequenziert.

Das resultierende Plasmid trug ein 600 bp Fragment, das für ein kleines Hybrid-Peptid kodiert, das aus den ersten acht Aminosäuren von CnrY, den zwei durch die *MunI*-Schnittstelle kodierten und den acht letzten von CnrH besteht. Das 600 bp-Fragment wurde in das Plasmid pLO2 umkloniert. Anschließend wurde mit Hilfe dieses pLO2- $\Delta(\textit{cnrYXH})$ -Hybrid-Plasmids durch Doppel-Rekombination die *cnrYXH*-Regulatorregion auf dem  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ -Megaplasmid pMOL28-2 deletiert (Abb. 5). Im resultierenden Deletionsplasmid pMOL28-3  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta(\textit{cnrYXH})$  im Stamm DN190 sind beide *cnr*-Promotoren *cnrYp* und *cnrCp* weiterhin vorhanden. Das Plasmid pMOL28-3 wurde durch PCR und Hybridisierung kontrolliert. In der Hybridisierung konnte ein um den Deletionsbereich verkürztes *EcoRI/PstI*-Fragment in pMOL28-3 nachgewiesen werden, zusätzlich lieferte eine zweite Sonde, die gegen den Deletionsbereich hybridisierte, ein Signal in pMOL28, nicht jedoch in pMOL28-3 (Abb. 7).



**Abb. 7: Nachweis der *cnrYXH*-Deletion im Megaplasmid pMOL28-3 mittels Southern DNA:DNA-Hybridisierung**

Jeweils ca. 3 µg DNA von pMOL28-2 ( $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*), Spur 1, 3) bzw. pMOL28-3 ( $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*), Spur 2, 4) wurden *EcoRI-PstI* geschnitten, in einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetragen und auf eine Nylon-Membran geblottet. Die Hybridisierung mit einer Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonde, die im Deletionsbereich band (Spur 3, 4) bzw. einer Sonde, die außerhalb des Deletionsbereichs, aber auf dem gleichen *EcoRI-PstI*-Fragment band (Spur 1, 2), erfolgte über Nacht bei 68°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz. Spur M kennzeichnet den DIG-DNA-Marker

### 3.3.2. Die *cnrYXH*-Deletionsmutante weist eine stark verminderte Resistenz gegenüber $\text{Ni}^{2+}$ und $\text{Co}^{2+}$ auf und ist nur noch sehr schwach durch $\text{Ni}^{2+}$ oder $\text{Co}^{2+}$ induzierbar

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegen  $\text{NiCl}_2$  bzw.  $\text{CoCl}_2$  des Deletionsstammes DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) zeigte, dass die jeweilige Metallresistenz drastisch verringert war. Im Falle von  $\text{NiCl}_2$  lag die MIC mit 0.4 mM nur gering über der MIC des plasmidfreien, metallsensitiven Stammes AE104. Im Falle von  $\text{CoCl}_2$  war die Resistenz sogar völlig zusammengebrochen (Tab. 5).

Im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest wies der  $\Delta$ *cnrYXH*-Deletionsstamm fast keine Induktion durch 0.5 mM  $\text{Ni}^{2+}$  auf. Die resultierende  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität lag in etwa auf dem gleichem Niveau, wie bei dem mit 0.3 mM  $\text{Zn}^{2+}$  inkubierten *lacZ*-Reporter-Wildtypstamm DN177(pMOL28-2) (Tab. 6). Entsprechend ließ sich  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) im Deletionsstamm DN190 sehr schwach durch 0.5 mM  $\text{Co}^{2+}$  bzw. 0.1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  oder Chromat induzieren (Ergebnis nicht gezeigt).

### 3.3.3. Die *cnrYXH*-Deletionsmutante lässt sich *in trans* durch *cnrYXH* komplementieren

Der Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) diene als Grundlage, um die Funktion der *cnr*-Regulatoren CnrY, X und H genauer zu untersuchen. Dafür musste im ersten Schritt überprüft werden, ob sich in diesem Stamm der Effekt der Deletion *in trans* komplementieren ließ. Hierfür wurde ein 1.7 kb *cnrYXH*-Fragment (mit *cnrYXH* und dem Promotor *cnrYp*) durch PCR amplifiziert (Primer *cnrRGR* OD + *cnr* Promotor U), in Plasmid pGEM T-Easy kloniert, zur Kontrolle sequenziert und in das Weitwirtsbereichs-Plasmid pVDZ'2 subkloniert. Das resultierende Plasmid pDNA291 wurde in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3 $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) übertragen.

In der resultierenden Transkonjugante wurde die Induktion in  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtests mit 0.5 mM Ni<sup>2+</sup> untersucht. Es war eine Nickel-spezifische Induktion zu beobachten, ähnlich wie im  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)-Kontrollstamm DN177(pMOL28-2), (Tab. 6). Die Bestimmung der MIC gegen NiCl<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub> der Transkonjugante zeigte nur einen geringen Unterschied zur Positiv-Kontrolle, d.h. er war voll resistent (Tab. 5). Demnach konnte der Stamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*), der die Nickel-spezifische Induktion von *cnr* verloren hatte, *in trans* durch *cnrYXH* komplementiert werden.

### 3.3.4. CnrY, CnrX und CnrH sind hinreichend und notwendig für die Induktion von *cnr*

Nachdem gezeigt war, dass der Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) *in trans* durch *cnrYXH* komplementierbar war, sollten auch die Einzelgene *cnrY*, *X* oder *H* bzw. zweier-Kombinationen dieser Gene *in trans* getestet werden. Dazu wurden Fragmente mittels PCR generiert (*cnrY*, Primer *cnrRGR* OD + *cnr BamHI* U; *cnrX*, Primer *cnrX BamHI* D + *cnrX XbaI* U; *cnrYX*, Primer *cnrRGR* OD + *cnrX XbaI* U; *cnrYH*, Primer *cnrRGR* OD + *cnr BamHI* U und *cnrH PstI* D + *cnr* Promotor *XbaI* U ; *cnrXH*, Primer *cnrX BamHI* D + *cnrH PstI* U; *cnrH*, Primer *cnrH XbaI* D 2 + *cnrH PstI* U), diese in Plasmid pGEM T-Easy kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Mittels der in der PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen wurden die *cnr*-Gene in Vektor pVDZ'2 subkloniert und in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) übertragen. Hierdurch entstanden die Stämme DN190(pMOL28-3, pDNA292, *cnrY in trans*), DN190(pMOL28-3, pDNA293, *cnrX in trans*), DN190(pMOL28-3, pDNA294, *cnrH in trans*), DN190(pMOL28-3, pDNA295, *cnrYX in trans*), DN190(pMOL28-3, pDNA296, *cnrYH in trans*), DN190(pMOL28-3, pDNA297, *cnrXH in trans*).

In  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtests wurde die Ni<sup>2+</sup>-vermittelte Induktion mit 0.5 mM Ni<sup>2+</sup> als Induktor untersucht. Es zeigte sich, dass die Komplementation mit allen Plasmiden mit *cnrH*, also mit *cnrH* alleine, *cnrYH* oder *cnrXH*, zu einer konstitutiven Expression der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf hohem Niveau führten (Tab. 6). Die Kombination *cnrYH* zeigte die höchste Enzym-Aktivität von allen untersuchten Stämmen. Dies wird wahrscheinlich durch die zusätzliche Transkriptionsinitiation am Promotor *cnrYp* verursacht, der in diesem

Konstrukt vorhanden ist. Alle Stämme ohne *cnrH* (d.h. mit *cnrY*, *cnrX* oder *cnrYX*) jedoch waren nicht induzierbar und besaßen eine konstitutiv niedrige  $\beta$ -Galaktosidase-Expression (Tab. 6). Folglich ist CnrH alleine fähig die *cnr*-Expression zu aktivieren, aber sowohl CnrY als auch CnrX werden benötigt, um die *cnr*-Expression Nickel-abhängig zu kontrollieren.

#### 3.4. Konstitutive Expression von *cnr*

##### 3.4.1. Eine konstitutive *cnr*-Mutante kann *in trans* komplementiert werden

Um mehr über die Interaktion zwischen den *cnr*-Regulatoren zu lernen, wurde ein Mutantenstamm von AE126(pMOL28) isoliert, der *cnr* konstitutiv exprimiert. Dieser Stamm DN176(pMOL28-1) *cnrYI*(Con) wurde nach einer Methode von Collard *et al.* (1993) isoliert, indem Mutanten des Wildtyp gesucht wurden, die fähig waren, in Anwesenheit von 1 mM  $Zn^{2+}$  zu wachsen. Wie in Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnr-lacZ*)) wurde das *lacZ*-Gen stromabwärts von *cnrA* in dieser Mutante integriert, wodurch der *lacZ*-Reporter-Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) entstand (Abb. 5).

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) ergab, dass dieser Stamm gegen höhere Konzentrationen von  $Ni^{2+}$  und  $Co^{2+}$  resistent war als der Kontrollstamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)). Gegenüber  $Co^{2+}$  wurde das gleiche Resistenzniveau erreicht, wie wenn im Wildtyp-Stamm durch  $Ni^{2+}$ -Zugabe (1 mM), die *cnr*-vermittelte  $Co^{2+}$ -Resistenz gesteigert wurde. (Tab. 5).

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest mit dem konstitutiven Stamm zeigte, dass das  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)-Operon auf einem hohen, konstitutiven Niveau exprimiert wurde (Tab. 6), ähnlich wie wenn *cnrH* *in trans* die Deletionsmutante DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) komplementiert.

##### 3.4.1.1. Komplementation mit *cnrYXH* *in trans*

Es stellte sich die Frage, ob die Mutation, die zur konstitutiven Expression von *cnr* im Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) führte, durch *cnrYXH* *in trans* komplementiert werden kann, wie das beim  $\Delta$ *cnrYXH*-Stamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) der Fall war. Dazu wurde Plasmid pDNA291(*cnrYXH*) in Stamm DN190 übertragen. In der resultierenden Transkonjugante war *cnr* wieder durch  $Ni^{2+}$  induzierbar (Tab. 6), allerdings verlor der Stamm nicht die erhöhte Metall-Resistenz der konstitutiven Mutante (Tab. 5).

##### 3.4.1.2. Die Komplementation der *cnrYXH*-Deletionsmutante mit *cnrYXH*(Con) *in trans* führt zur konstitutiven Expression von *cnr*

Die Regulatorgenregion aus Plasmid (pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) wurde in pVDZ'2 kloniert (Plasmid pDNA334, Primer *cnrRGR* OD + *cnr* Promotor U) und *in trans* in

der Deletionsmutante DN190(pMOL28-3  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ}) \Delta\text{cnrYXH}$ ) exprimiert. Dadurch kam es zur konstitutiven Expression von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$  (Tab. 6). Hierdurch war bewiesen, dass der Ort der Mutation, die zur konstitutiven *cnr*-Expression führt, auf diesem 1.7 kb großen DNA-Bereich liegen muss.

#### **3.4.1.3. Nur *cnrY*, nicht aber *cnrX*, *cnrH*, *cnrYX*, *cnrYH* oder *cnrXH* können *in trans* komplementieren**

Um den Mutationsort weiter einzugrenzen, wurden die Plasmide pDNA292 (*cnrY*), pDNA293 (*cnrX*), pDNA294 (*cnrH*), pDNA295 (*cnrYX*), pDNA296 (*cnrYH*), pDNA297 (*cnrXH*) in den konstitutiven Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ ) übertragen. *CnrXH*, *YH*, *YX*, *H* oder *X in trans* führten zu keiner signifikanten Änderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Tab.6). Nur die Komplementation mit *cnrY in trans* führte zu einer Wiederherstellung der Nickel-abhängigen Induktion von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$  (Tab. 6). Es wurde allerdings auch deutlich, dass zu einer vollständigen Komplementation nicht nur *cnrY*, sondern das gesamte *cnrYXH*-Operon benötigt wurde. Interessanterweise führte *cnrYX in trans* sogar zu einer Repression des konstitutiven Systems. Auch *cnrX* oder *cnrH* allein senkten das  $\beta$ -Galaktosidase-Niveau (Tab. 6). Damit war gezeigt, dass der Mutationsort, der zum konstitutiven Phänotyp führt, im Bereich von *cnrY*, d.h. im Gen selbst oder im Promotor *cnrYp*, zu finden sein musste.

#### **3.4.2. Der konstitutive Phänotyp wird durch eine *Frame-Shift*-Mutation in *cnrY* verursacht**

Um den genauen Mutationsort in *cnrYI*(Con) zu identifizieren, wurde ein ca. 0.6 kb Bereich (Primer *cnrRGR* OD + *cnr BamHI* U, bp 698-1284) sequenziert. Dabei konnte die Insertion CGCGACGCGTCGCGCGC bei Position 1111 nachgewiesen werden. Diese Sequenz ist eine nahezu vollständige Duplikation der Sequenz CGCGACGCGTgGCGtGC direkt stromabwärts der 14 bp Insertion (wobei unterschiedliche Basen in Kleinbuchstaben dargestellt sind).

Diese Insertion führt zu einem *Frame-Shift* in *cnrY*. Dadurch entsteht ein Mutanten-Protein von 134 Aminosäuren, wobei die ersten 46 identisch mit denen von *cnrY* sind.

### **3.5. Interaktion zwischen Ncc- und Cnr-Regulatoren**

#### **3.5.1. *NccYXH* kann die $\Delta\text{cnrYXH}$ -Deletion nicht *in trans* komplementieren**

Die Proteine des Nickel-Cobalt-Cadmium-Resistenz-Systems *ncc* aus *Achromobacter* (ehemals *Alcaligenes*) *xylosoxydans* 31A sind der *cnr*-Determinante sehr ähnlich (Abb. 1 B). Deshalb sollte untersucht werden, ob die *ncc*-Regulator-Proteine die Funktion der von *cnr* ersetzen können. Die Regulatorgen-Region von *ncc* wurde mittels PCR aus *A. xylosoxydans*

### 3. Ergebnisse

31A amplifiziert (Primer *nccRGR EcoRI D* + *nccRGR XbaI U*), in Plasmid pGEM T-Easy kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Das ca. 1600 kb-Fragment wurde in pVDZ'2 subkloniert (dabei entstand Plasmid pDNA304) und in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) übertragen. Im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest mit 0.5 mM NiCl<sub>2</sub> als Induktor kam es nicht zur Ni<sup>2+</sup>-induzierten Expression von  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) (Tab. 8). Außerdem führte die *in trans* Komplementation auch nicht zu einer Veränderung der MIC gegenüber Ni<sup>2+</sup> bzw. Co<sup>2+</sup> (Tab. 9). Die *ncc*-Regulatoren können also die Transkription an den *cnr*-Promotoren nicht initiieren.

**Tabelle 8: Expression von  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) in *R. metallidurans*-Derivaten mit Kombinationen der *ncc* und *cnr*-Regulatoren<sup>1</sup>**

Megaplasmid bzw. pVDZ'2-Derivat	<i>in trans</i>	0 mM Ni <sup>2+</sup>		0.5 mM Ni <sup>2+</sup>	
		a,	b,	a,	b,
		[U/mg] TG	[U/h * mg] TG	[U/mg] TG	[U/h * mg] TG
pMOL28-2, $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	-	62.2±6.8	0	64.0±5	86.4
pDNA304	<i>nccYXH</i>	40.0±4.5	0	46.1±4.7	0
pMOL28-4, $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYI</i> (Con)	-	1025±107	0	1095±88	0
pDNA304	<i>nccYXH</i>	53.0±6.3	0	59.1±5.3	0
pMOL28-3, $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrYXH</i>	-	28.1±2.5	0	26.6±1.0	0
pDNA304	<i>nccYXH</i>	39.9±4.2	0	47.9±1.3	0
pDNA303	$\Phi$ ( <i>nccYX-cnrH</i> )	38.0±1.0	0	40.0±4.0	16.2
pDNA291	<i>cnrYXH</i>	36.0±5.1	0	48.5±1.8	24.8

<sup>1</sup>0.5 mM Ni<sup>2+</sup> oder 0 Ni<sup>2+</sup> wurde zu Kulturen von verschiedenen *R. metallidurans*-Stämmen gegeben, die in der frühen exponentiellen Phase wuchsen (Zeit = 0 h). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht wurde für mindestens 3 h bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht vor Induktion (a) und die Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/h x mg Trockengewicht (b) nach der Gleichung  $y=bx+a$ . Wenn es zu keiner Zunahme kam (b=0), sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aller Datenpunkte des jeweiligen Experimentes angegeben.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 9: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC<sup>a</sup>) von Nickel und Cobalt in *R. metallidurans*-Derivaten mit Kombinationen der *ncc*- und *cnr*-Regulatoren**

Stamm, Megaplasmid	Relevanter Genotyp	Ni <sup>2+</sup> [mM]	Co <sup>2+</sup> [mM]
DN177(pMOL28-2)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$	4	5
DN177(pMOL28-2, pDNA304)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}), \textit{nccYXH}$ in trans	0.5	0.4
DN177(pMOL28-2, pDNA340)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}), \textit{nccN}$	4	5
DN195(pMOL28-4)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$	7.0	10
DN195(pMOL28-4, pDNA304)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}),$ <i>nccYXH</i> in trans	0.5	0.4
DN190(pMOL28-3)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH}$	0.4	0.3
DN190(pMOL28-3, pDNA291)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH},$ <i>cnrYXH</i> in trans	4.0	5.0
DN190(pMOL28-3, pDNA304)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH},$ <i>nccYXH</i> in trans	0.5	0.4
DN190(pMOL28-3, pDNA303)	$\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH},$ $\Phi(\textit{nccYX-cnrH})$ in trans	1.5	1.5
AE104	Plasmid-freie Kontrolle	0.3	0.3
AE104, pDNA340	<i>nccN</i>	0.3	0.3

<sup>a</sup>MIC (Minimale Inhibitor Konzentration), definiert als Inhibierung des Wachstums bei 30°C für 3 Tage. Einzelkolonien wurden nicht als Wachstum gewertet. Jede Bestimmung wurde mindestens zweimal mit den gleichen Ergebnissen wiederholt.

#### 3.5.2. Die Interaktion zwischen NccYXH und CnrYXH führt zum Zusammenbruch der *cnr*-Induktion

Da NccY, NccX und NccH den *cnr*-Regulatoren CnrY, X und H sehr ähnlich sind, stellte sich die Frage, ob es zu einer Interaktion oder Kooperation zwischen ihnen kommt, wenn in der Zelle die Regulatoren beider Systeme vorhanden sind. Dazu wurde das *nccYXH*-Plasmid pDNA304 in den Reporter-Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ ) übertragen. Überraschenderweise war im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest mit 0.5 mM NiCl<sub>2</sub> als Induktor keine Ni<sup>2+</sup>-induzierten Expression von  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$  zu beobachten (Tab. 8). Den gleichen Effekt hatte das *nccYXH*-Plasmid pDNA304 im konstitutiven Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ ) (Tab. 8). Die Regulatoren NccY, NccX und NccH sind demnach nicht nur nicht in der Lage, eine Ni<sup>2+</sup>-abhängige Transkription im *cnr*-System zu initiieren, sie führen sogar im *cnr*-System zu einer Verhinderung der Induktion von  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$  und damit zur Erniedrigung der Metallresistenz (Tab. 9).

#### 3.5.3. Die Interaktion zwischen NccYX und CnrH führt zur Induzierbarkeit

Es gab zwei Möglichkeiten, warum es zu keiner NccYXH-vermittelten Expressionsinitiation an *cnr*-Promotoren kam. Zum einen könnte der Sigma-Faktor NccH nicht in der Lage sein, nach Bindung des NccH-abhängigen RNA-Polymerase Holoenzym (E<sup>NccH</sup>) am Promotor *cnrC*, die Umlagerung vom geschlossenen in den offenen Initiations-Komplex zu ermöglichen. Zum anderen wäre es denkbar, dass die Sigma-Faktor/Anti-Sigma-Faktor Hybrid-Komplexe ihre Funktion nicht mehr erfüllen können. Um diese Frage zu klären, wurde Plasmid pDNA303 von Kühnemund (1999) konstruiert. In diesem Plasmid sind im Vektor pVDZ'2 *nccYX* (von bp 16-956) und *cnrH* (bp 1685 - 2359) auf einer gemeinsamen mRNA ( $\Phi$ (*nccYX-cnrH*)-Operon-Fusion) kodiert. Es wurde in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) übertragen. Im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest mit 0.5 mM NiCl<sub>2</sub> als Induktor konnte eine Ni<sup>2+</sup>-induzierte Expression von  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) beobachtet werden, die jedoch etwas geringer war als im Stamm DN190(pMOL28-3,  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*, pDNA291) (Tab. 8). Die Bestimmung der MIC zeigte jedoch, dass es zu einer deutlichen Erhöhung der Resistenz gegen Ni<sup>2+</sup> bzw. Co<sup>2+</sup> im Vergleich zum Deletionsstamm kam. Das Niveau des Wildtypes aber wurde nicht erreicht (Tab. 9). Zur Induktion von  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) kann NccYX die Funktion von CnrYX annähernd ersetzen. Es kommt also nicht zur Bildung eines in seiner Funktion gestörten Sigma-Faktor/Anti-Sigma-Faktor Hybrid-Komplexes aus NccYX und CnrH. Demzufolge sollte die Blockierung des *cnrC*-Promotors durch NccH dafür verantwortlich sein, dass die  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)-Transkription unterbleibt.

#### 3.5.4. Das NccN-Protein hat keinen Effekt auf die Induktion und das Resistenzniveau

In *Achromobacter xylosoxydans* 31A führt die Deletion von *nccN* zur Verringerung der Schwermetallresistenz (Schmidt und Schlegel, 1994). Die ansonsten sehr ähnliche *cnr*-Determinante besitzt kein bekanntes verwandtes Gen „*cnrN*“. Es stellte sich die Frage, ob durch eine Co-Expression von NccN zum *cnr*-System die *cnr*-vermittelte Nickel-Resistenz erhöht werden kann. Das Gen *nccN* wurde mittels PCR aus *Achromobacter xylosoxydans* 31A amplifiziert (Primer *nccN* EcoRI D + *nccN* XbaI U), in pGEM T-Easy kloniert, zur Kontrolle sequenziert und in das Plasmid pVDZ'2 kloniert. Das entstandene Plasmid pDNA340 wurde in Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) übertragen und die MIC gegen Nickel bestimmt (Tab. 9). Es ließ sich jedoch keine Erhöhung der Resistenz durch NccN gegen Ni<sup>2+</sup> beobachten, d.h. NccN hat keinen Einfluss auf die von *cnr* vermittelte Ni<sup>2+</sup>-Resistenz. Ebenso führte pDNA340 im plasmid-freien Stamm AE104 nicht zu einer Erhöhung der MIC gegen Ni<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup> (Tab. 9).

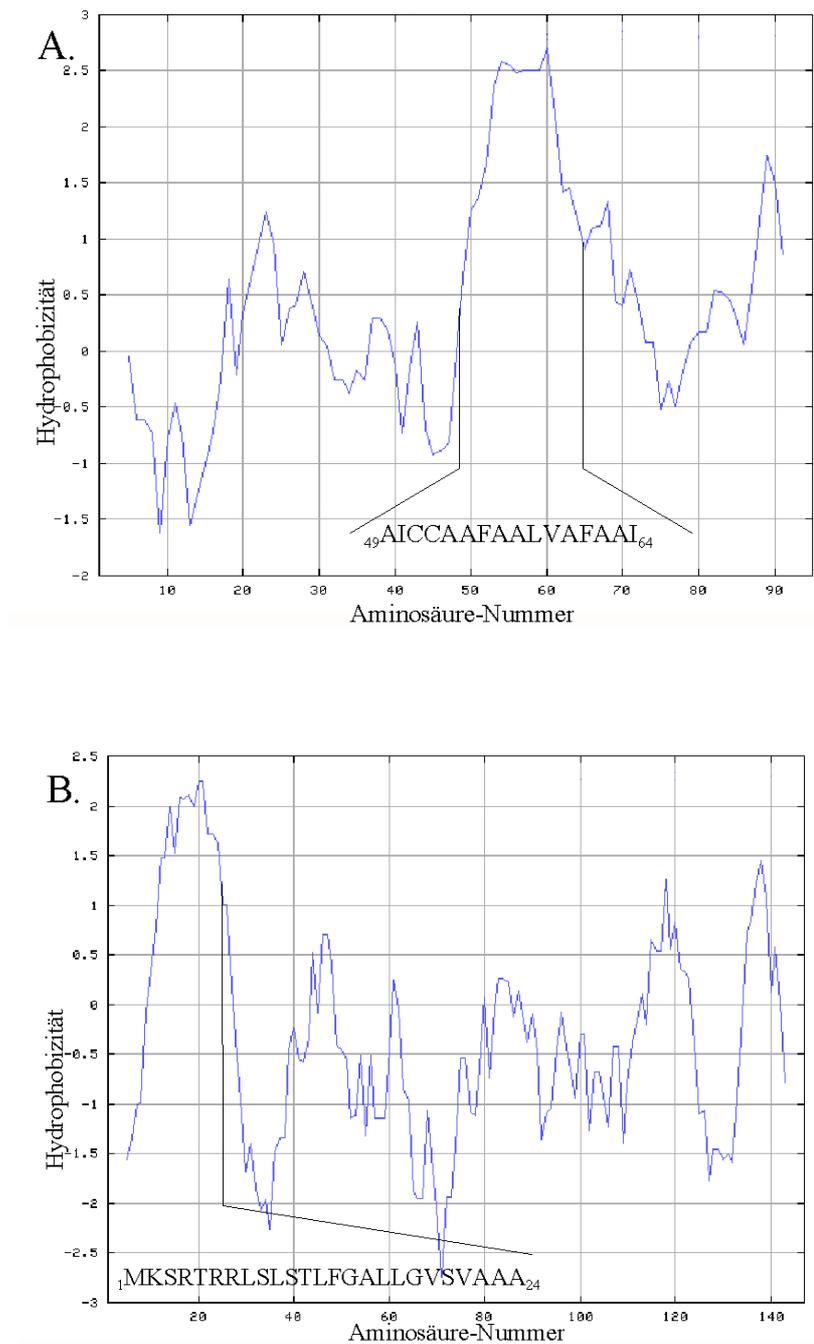
#### **3.6. Das *cnrY*-Gen ist um drei Basenpaare kürzer als veröffentlicht**

Bei der Suche nach dem Mutationsort, der für den konstitutiven Phänotyp im Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) verantwortlich ist, konnte im Wildtyp und der Mutante eine Abweichung von der veröffentlichten *cnr*-DNA-Sequenz EMBL M91650 ermittelt werden. Das Gen *cnrY* ist um drei Basenpaare kleiner. Die Sequenz an Position <sub>1108</sub>CGCCGCCGC muss zu <sub>1108</sub>CGCCGC berichtigt werden (EMBL AJ276513). Dies führt zu einem um ein Arginin (R<sub>44</sub>) verkürztem CnrY. Dadurch wird CnrY dem verwandten NccY ähnlicher und die Länge der beiden Proteine stimmt überein (95 aa).

#### **3.7. Die Carboxy-Termini von CnrY und CnrX sind im Periplasma lokalisiert**

Im Gegensatz zu einer älteren Publikation (Liesegang, 1994) führten eigene Sequenzanalysen zu der Ansicht, dass CnrY kein cytoplasmatisches, sondern ein membrangebundenes Protein ist. CnrX ist kein cytoplasmatischer Regulator, denn es besitzt eine *Leader*-Sequenz, wodurch es im Periplasma lokalisiert sein sollte (Abb. 8). Um das zu beweisen, wurden die Gene *cnrY* und *cnrX* mit dem Gen der Alkalischen Phosphatase (*phoA* ohne *Leader*-Sequenz) im Plasmid pECD618 C-terminal an die jeweils letzte Aminosäure fusioniert. Da PhoA nur im Periplasma eine Enzymaktivität zeigt und sein periplasmatischer *Leader* fehlte, konnte ein aktives Protein nur entstehen, wenn sich der C-Terminus des Fusionspartners im Periplasma befand. Die *cnrY'* bzw. *cnrX'*-Gene wurden mit den Primern Topo *cnrY* D *KpnI* + Topo *cnrY* U *XbaI* (*cnrY'*) bzw. Topo *cnrX* D *KpnI* + Topo *cnrX* U *XbaI* (*cnrX'*) durch PCR aus Plasmid pMOL28 amplifiziert, in Plasmid pECD618 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Dadurch entstanden die Plasmide pECD607 (*cnrY-phoA'*) und pECD608 (*cnrX-phoA'*). Als Positiv-Kontrolle diente Plasmid pECD619 mit *PhoA-Leader* vor '*PhoA*, als Negativ-Kontrolle Plasmid pECD618 (ohne *Leader*). Beide Fusionen CnrY-'*PhoA* bzw. CnrX-'*PhoA* zeigten im Enzymtest im Stamm *E. coli* CC118 eine Phosphatase-Aktivität im Bereich der Positiv-Kontrolle (Tab. 10). Damit war deutlich gezeigt, dass sich die C-Termini von CnrY und CnrX im periplasmatischen Raum befanden.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 8: Hydrophathie-Profile der Proteine CnrY und CnrX nach Kyte und Doolittle (1982)**

Die Hydrophobie (y-Achse) ist als Funktion der Aminosäure-Position (x-Achse) dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren haben positive Werte.

- Hydrophathie-Profil von CnrY. Hervorgehoben ist der  $\alpha$ -Helicale Membrandurchgang (mit der entsprechenden Aminosäuresequenz), der dazu führt, dass der Carboxyterminus von CnrY periplasmatisch lokalisiert ist.
- Hydrophathie-Profil von CnrX. Hervorgehoben ist die *Leader*-Sequenz (mit der entsprechenden Aminosäuresequenz), die zur periplasmatische Lokalisierung des Carboxyterminusses von CnrX führt.

Tab. 10: Topologie von CnrY und CnrX.

Plasmid	Relevanter Genotyp	spezifische Aktivität [U/mg Trockengewicht]	spezifische Aktivität [% der Positiv-Kontrolle]
pECD607	<i>cnrY'</i> - <i>phoA</i>	32.4±3	78
pECD608	<i>cnrX'</i> - <i>phoA</i>	57.6±2	138
pECD619	Positiv-Kontrolle	41.6±7	100
pECD618	Negativ-Kontrolle	1.4±1.2	3

Enzymaktivitäten der CnrY- bzw. CnrX-PhoA-Fusionsproteine im Alkalische Phosphatase-Enzymtest. Die enzymatische Aktivitäten von permeabilisierten Zellen, die die Hybridproteine enthielten, sind in U/mg Trockengewicht angegeben und mit den Aktivitäten der Kontrollen (Positiv-Kontrolle, PhoA mit *Leader*, periplasmatische Lokalisation; Negativ-Kontrolle, PhoA ohne *Leader*, cytoplasmatische Lokalisation) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte mehrerer Messungen ( $\pm$  Standardabweichungen).

### 3.8. CnrY und CnrX interagieren *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass die C-Termini von CnrY und CnrX im Periplasma lokalisiert waren, stellte sich die Frage, ob sie miteinander interagieren. Das gleiche galt für den cytoplasmatischen N-Terminus von CnrY und das CnrH-Protein. Um zu untersuchen, ob CnrY und CnrX bzw. CnrY und CnrH interagieren, wurden zuerst Mutantengene konstruiert. Diese kodierten für lösliche Derivate des jeweiligen Proteins (CnrY' bzw. CnrX'), da im verwendeten *Cyto Trap Yeast-Two-Hybrid-System* (Stratagene, Heidelberg) nur lösliche Proteine untersucht werden können. Im Falle von CnrX' wurde die Region, die für den hydrophoben *Leader* am N-Terminus kodiert, deletiert, bei CnrY' wurden A<sub>58</sub> und A<sub>59</sub> in der membranspannenden  $\alpha$ -Helix mittels *Quick-Change* Mutagenese zu E<sub>58</sub> und R<sub>59</sub> mutiert, so dass die Hydrophobizität dieses Bereichs stark abgesenkt wurde. Außerdem wurde dadurch je eine negativ- und eine positiv geladene Aminosäure eingeführt, wodurch sich die Gesamtladung des Proteins nicht änderte.

Beide Mutanten-Gene wurden durch PCR amplifiziert (*cnrY'*, Primer Y-2-H pSOS *cnrY* *Bam*HI + Y-2-H pSOS *cnrY* *Sal*I U D und QC *cnrY* A58E/A59R D + QC *cnrY* A58E/A59R U); *cnrX'*, Primer Y-2-H pMyr *cnrX* *Eco*RI D + Y-2-H pMyr *cnrX* *Sal*I U). Zusätzlich wurde, um ein unabhängiges redundantes Ergebnis zu erhalten, die Region *cnrY'X'* amplifiziert und kloniert. Die Konstrukte *cnrY'* und *cnrY'X'* wurden in den *Bait*-Vektor pSOS kloniert und sequenziert. Als Interaktionspartner wurden *cnrH* (Primer Y-2-H pMyr *cnrH* *Eco*RI D + Y-2-H pMyr *cnrH* *Sal*I U) und *cnrX'H* (Primer Y-2-H pMyr *cnrX* *Eco*RI D + Y-2-H pMyr *cnrH* *Sal*I U, wie *cnrY'X'* als Kontrolle) durch PCR amplifiziert, wie *cnrX'* in den *Predator*-Vektor pMyr kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen dienten Vektor-Konstrukte des Herstellers.

### 3. Ergebnisse

---

Paare aus je einem pSOS- und pMYR-Konstrukt wurden in die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H co-transformiert, d.h.

pECD609 (pSOS mit *cnrY'*) mit pECD612 (pMYR mit *cnrH*),

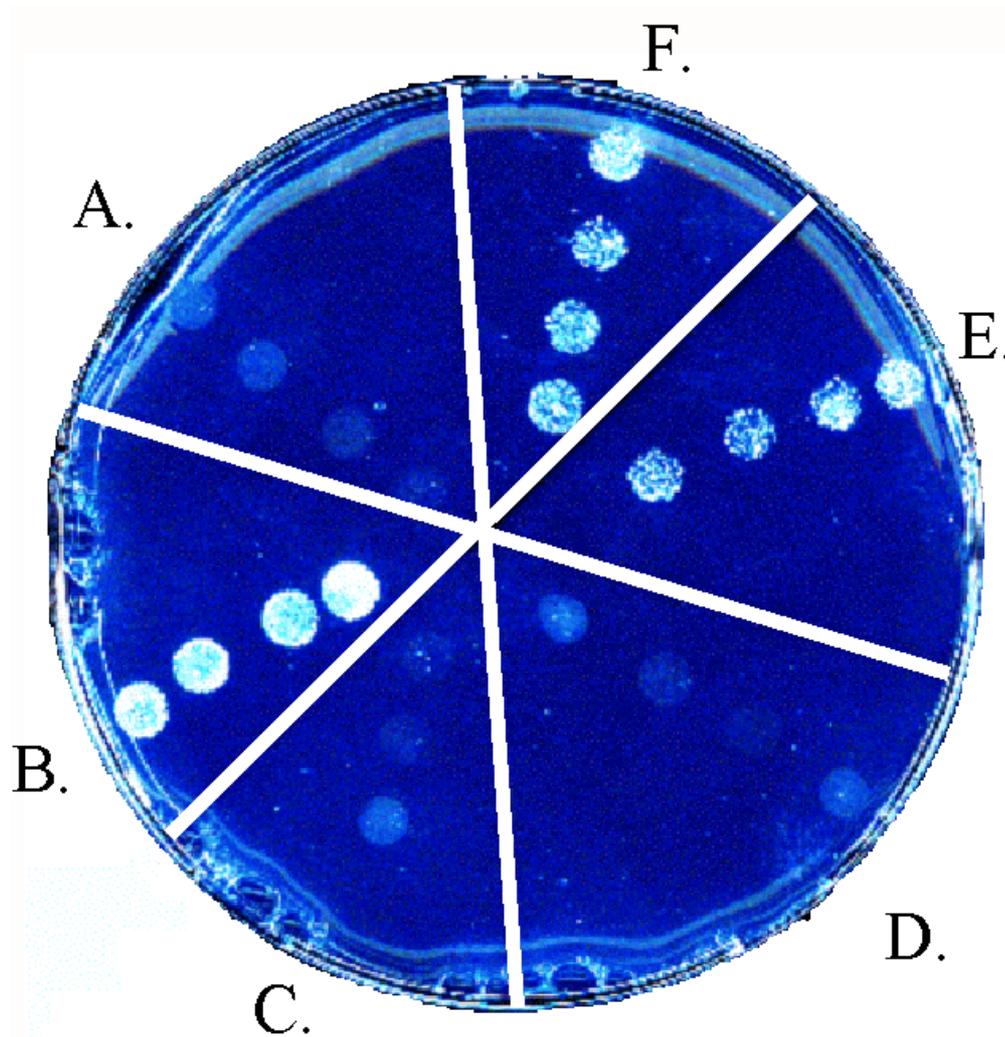
pECD609 (pSOS mit *cnrY'*) mit pECD611 (pMYR mit *cnrX'*),

pECD609 (pSOS mit *cnrY'*) mit pECD613 (pMYR mit *cnrX'H*) und

pECD610 (pSOS mit *cnrY'X'*) mit pECD612 (pMYR mit *cnrH*).

Nach Temperaturerhöhung auf 37°C waren auf Galaktose nur noch die Stämme überlebensfähig, bei denen es zur Interaktion kam. Abbildung 9 zeigt, dass die Stämme mit *cnrY'* im *Bait*-Vektor und *cnrX'* im *Predator*-Vektor Kolonien bildeten, während Stämme mit anderen Kombinationen nicht wuchsen. Es kam also zu einer *in vivo* Interaktion zwischen den löslichen Derivaten von CnrY und CnrX, nicht aber zwischen CnrY' und CnrH.

Von Kühnemund (1999) wurde ein Mutanten-*cnrX*-Gen konstruiert, das für ein CnrX H<sub>31</sub>R kodiert. Der Stamm DN190(pMOL28-3, pDNA313), bei dem  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH}$  *in trans* mit *cnrYXH* (CnrX H<sub>31</sub>R) komplementiert wurde, wies im  $\beta$ -Galaktosidase-Test ein stark erhöhtes Expressionsniveau von  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$  im Vergleich zur Kontrolle mit Wildtyp-CnrX auf. Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Interaktion zwischen CnrY und CnrX in diesem Stamm durch die H<sub>31</sub>R-Mutation gestört ist, wurde das mutierte *cnrX*-Gen mit den Primern Y-2-H pMyr *cnrX* EcoRI D + Y-2-H pMyr *cnrX* SalI U aus Plasmid pDNA313 als *Leader*-loses Derivat amplifiziert. in den *Predator*-Vektor pMyr kloniert und zu Kontrolle sequenziert. Das Paar pECD609 (pSOS mit *cnrY'*) und pECD617 (pMYR::*cnrX'* CnrX' H<sub>31</sub>R) wurden in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H co-transformiert und nach Temperaturerhöhung auf 37°C auf Interaktionen getestet. Wie bei dem Paar pECD609 (pSOS mit *cnrY'*) + pECD611 (pMYR::*cnrX'*) kam es zur Interaktion des CnrY' des *Bait*-Vektors und des CnrX' des *Predator*-Vektors und es bildeten sich Kolonien (Ergebnis nicht gezeigt). Die beobachtete Erhöhung der  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ -Expression im Stamm DN190(pMOL28-3, pDNA313) ist also nicht auf eine Störung der Interaktion zwischen CnrY und CnrX H<sub>31</sub>R zurückzuführen.



**Abb. 9: Interaktion von CnrY' und CnrX' im Yeast-Two-Hybrid-Assay in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H**

CnrH und Derivate von CnrY und CnrX wurden in mehreren Konstrukten mit Proteinen eines Hefe-Hitzeschock-Antwort-Systems (RAS) fusioniert. Bei einer Interaktion kommt es zum Wachstum eines temperatursensitiven Hefestammes cdc25H bei erhöhten Temperaturen. Dargestellt ist eine bei 37°C inkubierte SD -((-)Uracil/(-)Leucin)-Galaktose-Agar-Platte mit in Sektoren aufgetropften Hefe-CnrY'X'H-Interaktionsderivaten. A, Negativ-Kontrolle; B, Positiv-Kontrolle; C, CnrY-CnrH; D, CnrYX-CnrH; E, CnrY-CnrXH; F, CnrY-CnrX

### 3.9. Reinigung der drei Regulator-Proteine CnrY', X und H

#### 3.9.1. Reinigung von CnrX als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion

Für die nähere Charakterisierung des potentiellen Nickel-Sensor-Proteins CnrX sollte es heterolog in *E. coli* überexprimiert und nativ gereinigt werden. Hierfür wurde das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* (NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Schwalbach i. Taunus) gewählt. Dabei wird das gewünschte Protein an einen Fusionspartner fusioniert, der aus einem selbst-spleißenden Intein und einer Chitinbindedomäne besteht. Später kann dann das *Target*-Protein nach der Abspaltung der Fusionspartner unter reduzierenden Bedingungen von einer Chitinmatrix eluiert werden.

Das *cnrX*-Gen wurde über PCR mit den Primern *cnrX NdeI D* und *cnrX U* aus Plasmid pMOL28 amplifiziert, in den Überexpressionsvektor pTYB2 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Durch die Klonierung wurden am 3'-Ende von *cnrX* drei Basenpaare GGG angehängt, die im Protein dann einem Glycin entsprechen. Dieses war notwendig, da andere Aminosäuren an dieser Position die autokatalytische Spaltung durch das Intein erschweren. Das resultierende Plasmid pECD615 wurde in den *E. coli* Überexpressionsstamm ER2566 transformiert und die Expressionshauptkulturen direkt von einer Einzelkolonie angeimpft. Nach Induktion des Fusionsproteins mit 0.25 mM IPTG, Expression über Nacht und Reinigung konnte nach DTT-induzierter Spaltung ein ca. 16 kDa Protein in mehreren Fraktionen in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 10 A).

Pro 100 ml Kultur und 2 ml Chitin-Affinitätsmaterial konnten im Durchschnitt 2 mg Protein gereinigt werden. Allerdings führte ein Vergrößern des Kulturvolumens (*up-scaling*) zu wesentlich schlechteren Ergebnissen hinsichtlich der Reinheit des Proteins.

Das eluierte Protein wurde N-terminal ansequenziert. Die erhaltene Sequenz „MKSRTTRR“ stimmt mit den ersten sieben Aminosäuren von CnrX überein. Überraschend war, dass (im Gegensatz zu CzcC) der periplasmatische *Leader* zumindest in *E. coli* nicht abgespalten wird. Vermutlich deshalb verbleibt auch ein nicht unerheblicher Teil des Fusionsproteins im Rohextrakt durch hydrophobe Wechselwirkungen an Membranreste und am Säulenmaterialgebunden.

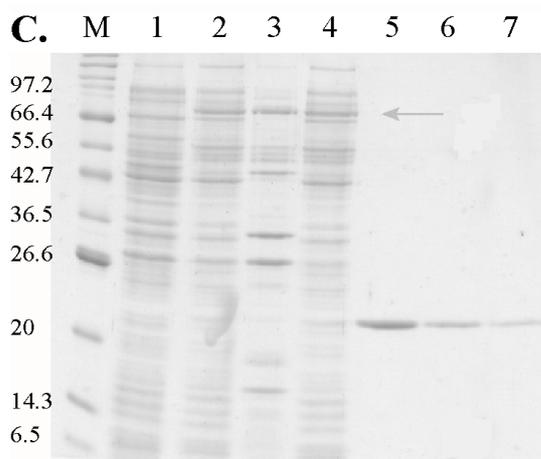
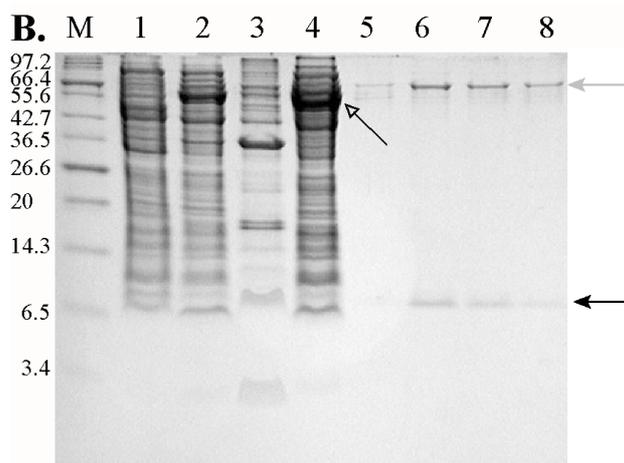
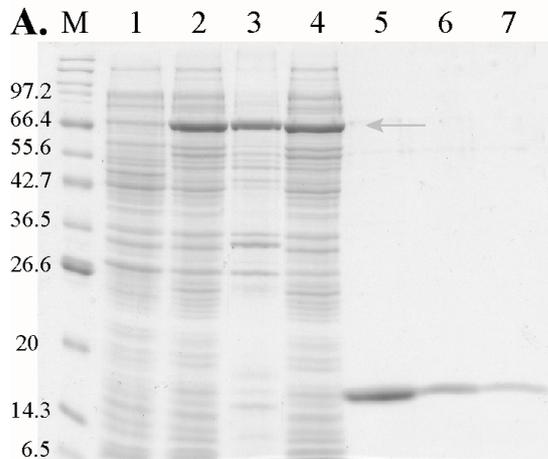
#### 3.9.2. Reinigung von CnrY' als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion

Ebenso wie CnrX sollte auch CnrY für weitergehende Experimente gereinigt werden. Dabei bestand die Hoffnung, dass durch die Fusion mit dem hydrophilen 55 kDa Fusionspartner das hydrophobe 10.4 kDa Membranprotein CnrY löslicher werden würde. Das *cnrY*-Gen wurde über PCR aus Plasmid pMOL28 mit den Primern *cnrY NdeI D* und *cnrY U* amplifiziert, in den Überexpressionsvektor pTYB2 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Die Hoffnung, dass CnrY durch die Fusion löslicher werden würde, erfüllte sich nicht. Im Gegenteil, sobald die Überexpressionskultur auch nur mit geringen Konzentrationen von IPTG induziert wurde,

starben die Zellen ab. Die Veränderung der Inkubationstemperatur und -zeit hatte darauf keinen Einfluss (Ergebnis nicht gezeigt). Auch die Klonierung von *cnrY* in ein anderes Überexpressionsystem (Strep-Tag II, IBA, Göttingen) führte nicht zum Erfolg (Ergebnis nicht gezeigt). Da das Wildtyp-CnrY-Protein toxisch auf die *E. coli*-Zellen wirkte, wurde versucht, ein Mutantenprotein zu reinigen. Es wurde das aus dem *Yeast-Two-Hybrid*-Experiment verwendete *cnrY'* (CnrY' A<sub>58</sub>E, A<sub>59</sub>R) mit den Primern *cnrY NdeI* D und *cnrY* U aus Plasmid pECD609 mittels PCR-amplifiziert, in pTYB2 kloniert, wodurch Plasmid pECD614 entstand und dieses zur Kontrolle sequenziert. Dieses Protein ohne funktionstüchtigen Membrandurchgang wurde gewählt, da es zumindest einen Teil seiner Funktionen, nämlich die Bindung an CnrX, behalten würde. Die PCR führte wie bei CnrX dazu, dass ein Glycin an den C-Terminus des CnrY'-Proteins angehängt wurde. Die Überexpression und Reinigung von CnrY' erfolgte analog CnrX. Es wurden mehrere Fraktionen CnrY' eluiert, wobei sich zeigte, dass ein nicht unbeträchtlicher Teil des Elutionsproteins aus Fusionsprotein bzw. Fusionspartner bestand (Abb. 10 B). Das ca. 10.5 kDa große Elutionsprotein wurde N-terminal ansequenziert, wobei die ersten sieben Aminosäuren „MADVEEW“ von CnrY bestätigt werden konnten.

#### **3.9.3. Reinigung von CnrH als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion**

Der potentielle ECF-Sigma-Faktor CnrH war das einzige der drei *cnr*-Regulatorproteine, dem von vornherein eine bestimmte Funktion zuzuordnen war. Diese sollte nach Überexpression und Reinigung von CnrH experimentell bestätigt werden. Das *cnrH*-Gen wurde über PCR aus Plasmid pMOL28 mit den Primern *cnrH NdeI* D und *cnrH* U amplifiziert, in den Überexpressionsvektor pTYB2 kloniert (dadurch entstand Plasmid pECD616) und zur Kontrolle sequenziert. Durch die PCR wurde, wie bei CnrX und CnrY, an das CnrH-Protein ein Glycin an dessen C-Terminus angehängt. Außerdem wurde das GTG-Startcodon (Valin) durch den *cnrH NdeI* D-Primer in ein ATG (Methionin) umgewandelt. CnrH von Plasmid pECD616 wurde wie CnrX von Plasmid pECD615 überexprimiert und gereinigt (Abb. 10 C). Das ca. 20 kDa große Elutionsprotein wurde N-terminal ansequenziert. Dabei konnten die ersten fünf Aminosäuren „(M)NPED“ (mit dem Austausch V nach M) von CnrH bestätigt werden.



**Abb. 10: Reinigungsschemata der Proteine CnrY, CnrX und CnrH in der SDS-PAGE nach Laemmli, Coomassie gefärbt**

Die Proteine wurden in *E. coli* ER2566 als Intein-Chitinbindedomäne-Fusion exprimiert und über Chitin-Affinitäts-Säulen-Chromatografie nativ gereinigt. Im Falle von CnrY war dies ein Mutantenprotein mit den Aminosäureaustauschen  $A_{58}E/A_{59}R$ . Aufgetragen wurden 10-20  $\mu$ l der Zellextrakte bzw. der Eluate.

A. CnrX im 15 %igen SDS-Page

B. CnrY im 17.5 %igen SDS-Page

C. CnrH im 15 %igen SDS-Page

M. Marker

1. nicht induzierter Rohextrakt

2. induzierter Rohextrakt

3. Pelletfraktion nach Ultraschall und Zentrifugation

4. Überstand nach Ultraschall und Zentrifugation

5.-7.: Eluate 1-3, (4)

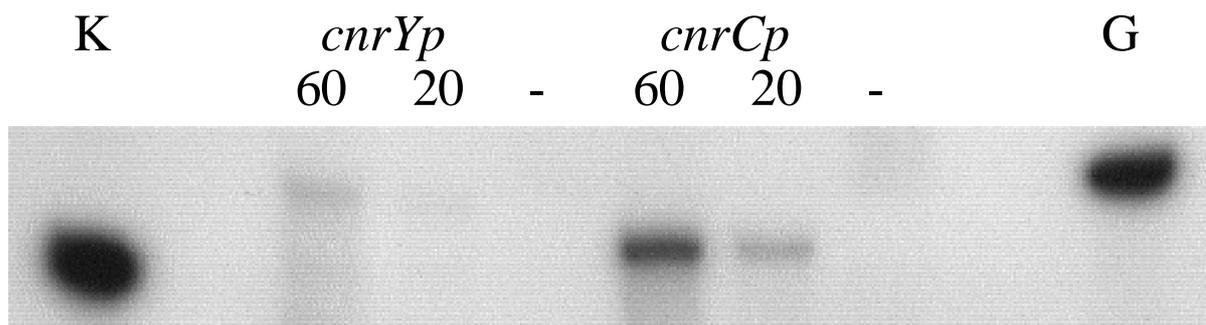
Schwarze Pfeile markieren das prozessierte Protein, graue Pfeile das Fusions-Protein und der offene Pfeil das durch *in vivo-Cleavage* verursachte Auftreten des Fusionspartners.

### 3.10. CnrH ist ein Sigma-Faktor

Da gezeigt wurde, dass CnrH hinreichend und notwendig für die Expression der *cnr*-Determinante ist, sollte im weiteren auch seine Funktion als ECF-Sigma-Faktor nachgewiesen werden. Dazu wurde die Methode der *in vitro* Transkription gewählt. Wenn CnrH ein Sigma-Faktor ist, muss es die Transkription von den *cnr*-Promotoren initiieren, und es wird anschließend spezifische mRNA synthetisiert.

Über PCR wurden mit den Primern *cnrURROD* und *cnrY U* ein ca. 600 bp bzw. mit Primern *cnr* Promotor D *ApaI* und PREX PII CY'5 ein 420 bp langes DNA-Fragment mit pDNA291-Plasmid-DNA als *Template* amplifiziert, die neben dem jeweiligen Promotor (*cnrYp* bzw. *cnrCp*) noch etwa 300 bzw. 200 bp des kodierenden Bereichs von *cnrY* bzw. *cnrC* umfassten. Diese in der PCR gewonnene DNA wurde als *Template* in der *in vitro* Transkriptionsreaktion mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP eingesetzt. Vor dem Einsatz in der Reaktion wurde der gereinigte Sigma-Faktor CnrH gegen *Cleavage*-Puffer ohne DTT dialysiert. Als Größenstandards wurden zwei in einer *in vitro* Transkriptionsreaktion mit der Phage T7-Polymerase gewonnenen mRNAs eingesetzt. Dazu wurden aus einem *cnrY*-pGEM T-Easy-Derivat (T7-Promotor nahe der *Multicloning Site*) PCR-Produkte gewonnen (Primer T7 + *cnrY* Anfang Helix U, 180 bp bzw. T7 + *cnrY* U, 340 bp), die den T7-Promotor trugen.

Nach Auftrennung der Proben im 6 %igen denaturierenden Harnstoff-Gel erfolgte die Dokumentation mittels Autoradiografie. Abbildung 11 zeigt, dass CnrH *in vitro* in der Lage ist, die Transkription an den beiden Promotoren der *cnr*-Determinante (*cnrYp* bzw. *cnrCp*) zu initiieren.



**Abb. 11: *In vitro* Transkription von *cnrYp* und *cnrCp***

PCR-Produkte entweder mit dem Promotor *cnrYp* oder *cnrCp* wurden als *Template* für die *in vitro* (*runoff*) Transkription mit *Core*-RNAP alleine (-), oder nach Zugabe von CnrH (20 min., (20) bzw. 60 min., (60) eingesetzt. Größenstandards (G, 340 nt bzw. K, 180 nt) wurden in einer *in vitro* Transkription vom T7-Promotor zweier PCR-Produkte mittels T7-RNAP synthetisiert.

### 3.11. Gerichtete Mutationen in CnrX führen nicht zu dessen Funktionsverlust

Die sechs Histidine von CnrX sind wichtig für die Funktion dieses Proteins (Kühnemund, 1999). Auffällig war, dass im Bereich der Histidine 41 und 45 das Motiv HEILH zu erkennen war. Dieses HEXXH-Motiv ist typisch für Zink-Metalloproteasen, die „Zincins“ (Stöcker *et al.*, 1995). In Zn<sup>2+</sup>-Metalloproteasen ist das Glutamat (E) essentiell, da es das katalytische Zentrum bildet. Wenn CnrX auch eine Zink-abhängige Protease wäre, müsste auch hier das Glutamat essentiell sein. Um dies zu untersuchen, wurde mittels *Quick-Change* Mutagenese-PCR (mit den Primern *cnrX* E42D D + *cnrX* E42D U bzw. *cnrX* E42Q D + *cnrX* E42Q U und Plasmid pECD566 als *Template*) die Basen A<sub>1399</sub> bzw. G<sub>1397</sub> in die Basen C<sub>1399</sub> bzw. C<sub>1397</sub> verändert. Daraus sollten für zwei verschiedene CnrX-Mutanten-Proteine mit den Aminosäureaustauschen E<sub>42</sub>D bzw. E<sub>42</sub>Q kodiert werden. Die resultierenden Mutanten-Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert und das 1.7 kb *cnrYXH* (CnrX E<sub>42</sub>D bzw. Q) Fragment in Vektor pVDZ'2 subkloniert. Die resultierenden Plasmide pDNA335 bzw. pDNA336 wurden in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) übertragen. Auf die gleiche Weise wurde mit den Primern *cnrX* E34D D + *cnrX* E34D U bzw. *cnrX* E34Q D + *cnrX* E34Q U die Basen A<sub>1374</sub> bzw. G<sub>1372</sub> in die Basen G<sub>1374</sub> bzw. C<sub>1372</sub> verändert. Dadurch sollten CnrX-Mutanten-Proteine mit den Aminosäureaustauschen E<sub>34</sub>D bzw. E<sub>34</sub>Q kodiert werden. Sollte dieses Glutamat essentiell sein, müssten die Mutanten eine verminderte Induzierbarkeit durch Ni<sup>2+</sup> aufweisen. Die resultierenden Mutanten-Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert und das 1.7 kb *cnrYXH* (CnrX E<sub>34</sub>D bzw. Q) Fragment in Vektor pVDZ'2 subkloniert. Die resultierenden Plasmide pDNA328 bzw. pDNA329 wurden in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) übertragen.

In den resultierenden Transkonjuganten wurde in  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtests die Ni<sup>2+</sup>-vermittelte Induktion mit 0.5 mM NiCl<sub>2</sub> untersucht. Es war eine Nickel-spezifische Induktion zu beobachten, ähnlich wie im  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)-Kontrollstamm mit Wildtyp CnrX (Tab. 11). Zwar zeigte sich bei der Bestimmung der Minimalen-Inhibitor-Konzentration (MIC) eine Verringerung der Resistenz verglichen mit dem Wildtyp, das Niveau lag aber signifikant über dem der Deletionsmutante (Tab. 12). Als weitere Kontrolle diente der Stamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*, pDNA310) (Kühnemund, 1999), in dem ein Mutanten CnrX mit dem Aminosäureaustausch H<sub>41</sub>R exprimiert wird. Das führt dazu, dass *cnr* in diesem Stamm (fast) nicht mehr induzierbar ist (physiologische CnrX-Deletionsmutante). Die E<sub>42</sub>D- und die E<sub>42</sub>Q-, bzw. die E<sub>34</sub>D- und die E<sub>34</sub>Q-Mutanten verhalten sich fast wie der Wildtyp und nicht so wie die H<sub>41</sub>R-Mutante. Da die Mutationen die putativen Zentren der Metalloprotease-Motive verändert haben ohne dass die Induzierbarkeit von *cnr* darunter litt, kann ausgeschlossen werden, dass CnrX eine Zincin-Protease ist.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 11: Expression von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$  in *R. metallidurans* AE126(pMOL28)-Derivaten mit *cnrX*- bzw. *cnrY*-Mutationen<sup>1</sup>**

Megaplasmid bzw. pVDZ'2-Derivat	<i>in trans</i>	0 mM Ni <sup>2+</sup>		0.5 mM Ni <sup>2+</sup>	
		a, [U/mg] TG	b, [U/h * mg] TG	a, [U/mg] TG	b, [U/h * mg] TG
pMOL28-3, $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ $\Delta\text{cnrYXH}$	-	28.1±2.5	0	26.6±1.0	0
pDNA291	<i>cnrYXH</i>	36.0±5.1	0	48.5±1.8	24.8
pDNA335	<i>cnrYXH</i> , CnrX E <sub>42</sub> D	23.5±1.6	0	48.5±12.5	24.6
pDNA336	<i>cnrYXH</i> , CnrX E <sub>42</sub> Q	25.5±1.5	0	41.5±5.5	21.6
pDNA328	<i>cnrYXH</i> , CnrX E <sub>34</sub> D	36.3±16	0	38.8±17.9	19.0
pDNA329	<i>cnrYXH</i> , CnrX E <sub>34</sub> Q	35.3±13.1	0	52.8±17.9	18.2
pDNA337	<i>cnrYXH</i> , CnrY E <sub>5</sub> Q, E <sub>6</sub> Q	68±1.0	0	88±4.0	29.7
pDNA338	<i>cnrYXH</i> , CnrY R <sub>12</sub> T, K <sub>13</sub> T	94±1.0	0	86±9.0	64.2
pDNA339	<i>cnrYXH</i> , CnrY C <sub>51</sub> S, C <sub>52</sub> S	69±5.0	0	84±3.5	24.9
pDNA310	<i>cnrYXH</i> , CnrX H <sub>41</sub> R	44.5±1.5	0	43±1.0	6.6

<sup>1</sup>0.5 mM Ni<sup>2+</sup> oder 0 Ni<sup>2+</sup> wurde zu Kulturen von verschiedenen *Ralstonia metallidurans*-Stämmen gegeben, die in der frühen exponentiellen Phase wuchsen (Zeit = 0 h). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht wurde für mindestens 3 h bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/mg Trockengewicht vor Induktion (a) und die Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in U/h x mg Trockengewicht (b) nach der Gleichung  $y=bx+a$ . Wenn es zu keiner Zunahme kam (b=0), sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aller Datenpunkte des jeweiligen Experimentes angegeben.

**Tabelle 12: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) von Nickel und Cobalt in *R. metallidurans*-Derivaten mit *cnrX*- bzw. *cnrY*-Mutationen<sup>a</sup>**

Stamm, Megaplasmid	Relevanter Genotyp	Ni <sup>2+</sup> [mM]	Co <sup>2+</sup> [mM]
DN195(pMOL28-4)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	7.0	10
DN190(pMOL28-3)	$\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ) $\Delta$ <i>cnrYXH</i>	0.4	0.3
DN190(pMOL28-3, pDNA291)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> <i>in trans</i>	4.0	5.0
DN190(pMOL28-3, pDNA335)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>42</sub> D <i>in trans</i>	4.0	4.0
DN190(pMOL28-3, pDNA336)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>42</sub> Q <i>in trans</i>	3.0	4.0
DN190(pMOL28-3, pDNA328)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>34</sub> D <i>in trans</i>	3.0	4.0
DN190(pMOL28-3, pDNA329)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrX E <sub>34</sub> Q <i>in trans</i>	3.0	4.0
DN190(pMOL28-3, pDNA337)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrY E <sub>5</sub> Q, E <sub>6</sub> Q <i>in trans</i>	4.0	4.0
DN190(pMOL28-3, pDNA338)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrY R <sub>12</sub> T, K <sub>13</sub> T <i>in trans</i>	5.0	5.0
DN190(pMOL28-3, pDNA339)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrY C <sub>51</sub> S, C <sub>52</sub> S <i>in trans</i>	4.0	4.0
DN190(pMOL28-3, pDNA310)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH</i> CnrX H <sub>41</sub> R <i>in trans</i>	1.0	0.4
DN190(pMOL28-3, pDNA291)	$\Delta$ <i>cnrYXH</i> $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), <i>cnrYXH in trans</i>	4.0	5.0
AE104	Plasmid-freie Kontrolle	0.3	0.3

<sup>a</sup>MIC (Minimale Inhibitor Konzentration), definiert als Inhibierung des Wachstums bei 30°C für 3 Tage. Einzelkolonien wurden nicht als Wachstum gewertet. Jede Bestimmung wurde zweimal mit den gleichen Ergebnissen wiederholt.

### 3.12. Gerichtete Mutationen in CnrY beeinflussen dessen Interaktion mit CnrH kaum oder gar nicht

Für die Interaktion von CnrY mit CnrH kann nur der cytoplasmatische N-terminale Teil von CnrY verantwortlich sein, möglicherweise sind die beiden Cysteine C<sub>51</sub> und C<sub>52</sub> für die Funktion von CnrY wichtig. Im N-Terminus V<sub>4</sub>**EEWLTHARK**V<sub>TQ</sub> (negative Ladungen **fett**, positive unterstrichen) von CnrY fällt auf, dass es zwei Anhäufungen von je zwei positiv- bzw. negativ-geladenen Aminosäuren in einem neutralen Umfeld gibt. Ein ähnliches Motiv ist in NccY erkennbar (I<sub>4</sub>**DEWL**VQAKK<sub>V</sub>TY). Aufgrund dieser Übereinstimmung mit dem

verwandten System wurde davon ausgegangen, dass diese Ladungen für die Interaktion von CnrY mit CnrH verantwortlich sein könnten.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde mittels *Quick-Change* Mutagenese-PCR (mit den Primern *cnrY* E5-6Q D + *cnrY* E5-6Q U bzw. *cnrY* R12K13TT D + *cnrY* R12K13TT U bzw. *cnrY* C51-52SS D + *cnrY* C51-52SS U und Plasmid pECD566 als *Template*) die Basenaustausche G<sub>995</sub>C, G<sub>998</sub>C bzw. GA<sub>1017</sub>CC, A<sub>1020</sub>C bzw. T<sub>1136</sub>A, T<sub>1139</sub>A verursacht. So sollte für drei verschiedene CnrY-Mutanten-Proteine mit den Aminosäureaustauschen E<sub>5</sub>Q/E<sub>6</sub>Q, R<sub>12</sub>T/K<sub>13</sub>T bzw. C<sub>52</sub>S/C<sub>53</sub>S kodiert werden. Die resultierenden Mutanten-Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert und die 1.7 kb *cnrYXH* CnrY E<sub>5</sub>Q/E<sub>6</sub>Q, R<sub>12</sub>T/K<sub>13</sub>T bzw. C<sub>52</sub>S/C<sub>53</sub>S Fragmente in Vektor pVDZ'2 subkloniert. Die resultierenden Plasmide pDNA337, pDNA338 bzw. pDNA339 wurden in den Deletionsstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) übertragen.

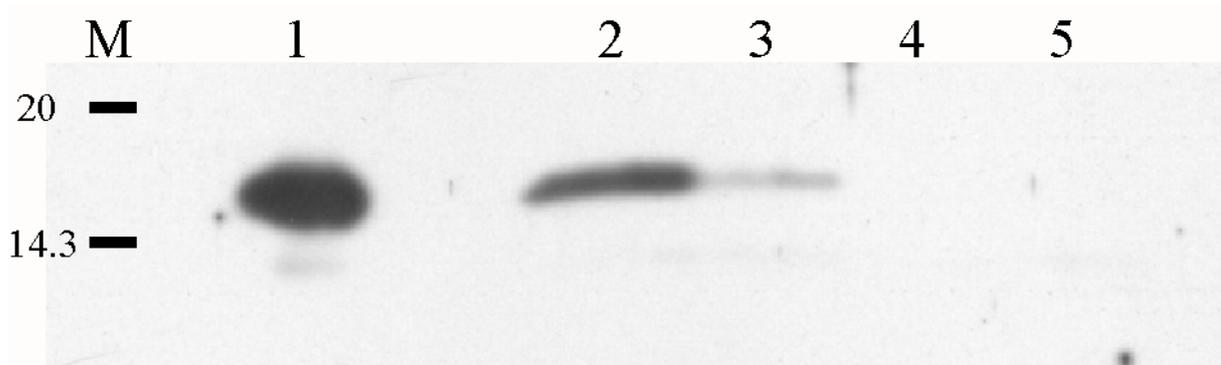
In  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtests mit diesen Transkonjuganten war jedoch bei den Stämmen mit *cnrYXH* CnrY E<sub>5</sub>Q/E<sub>6</sub>Q bzw. C<sub>52</sub>S/C<sub>53</sub>S *in trans*, ähnlich wie im Wildtyp eine Nickel-spezifische Induktion durch 0.5 mM NiCl<sub>2</sub> zu beobachten (Tab. 11). Nur der Aminosäureaustausch R<sub>12</sub>T/K<sub>13</sub>T führte zu einer Erhöhung des  $\beta$ -Galaktosidase-Grundniveaus ohne Nickel und zu einer verstärkten Induktion mit Nickel, die sogar deutlich höher war als die des Kontrollstammes (Tab. 11). Zusätzlich zeigte bei der Bestimmung der MIC nur dieser Mutantenstamm ein leicht erhöhtes Resistenzniveau gegenüber Ni<sup>2+</sup> im Vergleich zur Kontrolle. Die anderen beiden Stämme zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollstamm (Tab. 12). Als eine weitere Kontrolle diente der CnrX (H<sub>41</sub>R) Stamm DN190 (pMOL28-3, pDNA310) (Kühnemund, 1999). Von den getesteten Aminosäuren sind anscheinend nur die positiv geladenen Arginin<sub>12</sub> und Lysin<sub>13</sub> an der Interaktion von CnrY mit CnrH beteiligt.

#### 3.13. Pro Molekül CnrX werden drei Moleküle Nickel gebunden

Die sechs Histidine von CnrX (H<sub>31</sub>, H<sub>37</sub>, H<sub>41</sub>, H<sub>45</sub>, H<sub>118</sub>, H<sub>130</sub>) sind wichtig für seine Funktion (Kühnemund, 1999). Sie könnten dafür verantwortlich sein, dass Ni<sup>2+</sup>-Kationen gebunden werden. Um zu überprüfen, ob CnrX zur Metallbindung befähigt ist, wurde die Methode der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) angewendet. Dazu wurden je 2 mg gereinigtes CnrX-Protein mit Ni<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> beladen. Nach dem Abwaschen der ungebundenen Metallkationen und Bestimmung der Proteinkonzentration zeigte sich, dass der größte Teil des Proteins (ca. 80 %) aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften im *Leader*-Peptid an die Dialysemembran assoziiert war. Der in Lösung verbliebene Teil wurde zur Verbrennung in der AAS eingesetzt. Die Berechnung des Verhältnisses zwischen Metall und Protein ergab, dass drei (3.09) Ni<sup>2+</sup>-Ionen pro Molekül CnrX gebunden wurden. War Zn<sup>2+</sup> vorhanden, wurden zwei (2.43) Zn<sup>2+</sup>-Ionen pro Molekül CnrX gebunden.

### 3.14. CnrX besitzt einen Membrananker

Das durch heterologe Überexpression in *E. coli* gewonnenen Protein CnrX zeigte keine Abspaltung des *Leader*-Peptids (Abb. 7). Es bestand also die Möglichkeit, dass es als Membrananker agiert. Durch Testung von Antikörpern gegen CnrX in *R. metallidurans* sollte überprüft werden, ob dies wirklich der Fall ist. Dazu wurde gereinigtes CnrX zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Das aus diesem Kaninchen gewonnene Antiserum wurde in Western-Blot-Experimenten eingesetzt. Dazu wurden die Stämme AE126(pMOL28) bzw. als Negativ-Kontrolle DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) wie für  $\beta$ -Galaktosidase-Versuche angezogen, geteilt und eine Hälfte mit 0.5 mM NiCl<sub>2</sub> inkubiert. Bei einer Zelldichte von ca. 100 Klett wurden 300  $\mu$ l Aliquote pelletiert, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Anti-CnrX-Serum (1:40000) inkubiert. Als Positiv-Kontrolle dienten ca. 0.02  $\mu$ g gereinigtes CnrX-Protein. Im ECL-Nachweis zeigte sich, dass eine hohe Hintergrund-Reaktion (unspezifische Bindung des Antikörpers) erfolgte. Diese Reaktion konnte schon im Präimmunserum gegen *R. metallidurans*-Zellen beobachtet werden (Fricke, pers. Mitteilung). Jedoch konnte CnrX eindeutig im Rohextrakt aus Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) nachgewiesen werden, nicht jedoch im Rohextrakt des Deletionsstammes DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) (Abb. 12). Da beim Nachweis von CnrX in *R. metallidurans* nur als eine Bande auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass CnrX nicht prozessiert wird und der *Leader* wahrscheinlich als Membrananker funktioniert. Durch Analyse der Pixeldichte der CnrX-Signale im Western Blot (mit dem Programm (NIH-Image, Apple) wurde das Mengen-Verhältnis von CnrX in mit Ni<sup>2+</sup>-inkubierten und nicht mit Ni<sup>2+</sup>-inkubierten Zellen als etwa 7 : 1 bestimmt. Dieses Verhältnis lag in der gleichen Größenordnung wie das Verhältnis der Konzentration von induziertem zu nicht induziertem CnrCBA-Komplex (4 : 1) im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest, wobei die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die im stöchiometrischen Verhältnis zu CnrCBA synthetisiert wurde, als Maß für die Expression diente (Tab. 6). Dadurch konnte gezeigt werden, dass *cnrYXH* und *cnrCBA* annähernd gleich exprimiert werden.



**Abb. 12: Western-Blot-Reaktionen des Anti-CnrX-polyklonalen Antikörpers**

Gereinigtes, heterolog in *E. coli* überexprimiertes CnrX-Protein, sowie Rohextrakte von *Ralstonia metallidurans*-Derivaten wurden präpariert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen CnrX inkubiert.

M. Größenmarker

1. gereinigtes CnrX-Protein ca. 0.02 µg

2. *Ralstonia metallidurans* DN177(pMOL26-2 Φ(*cnrCBA-lacZ*) Rohextrakt, Zellen mit 0.5 mM Ni<sup>2+</sup> inkubiert

3. *Ralstonia metallidurans* DN177(pMOL26-2 Φ(*cnrCBA-lacZ*) Rohextrakt, Zellen ohne Ni<sup>2+</sup> inkubiert

4. *Ralstonia metallidurans* DN190(pMOL26-3 Φ(*cnrCBA-lacZ*) Δ*cnrYXH*) Rohextrakt, Zellen mit 0.5 mM Ni<sup>2+</sup> inkubiert

5. *Ralstonia metallidurans* DN190(pMOL26-3 Φ(*cnrCBA-lacZ*) Δ*cnrYXH*) Rohextrakt, Zellen ohne Ni<sup>2+</sup> inkubiert

### 3.15. Wird CnrY von CnrX proteolytisch gespalten?

Nachdem gezeigt wurde, dass es zu einer Bindung zwischen CnrX und CnrY kam, sollte untersucht werden, ob es zwischen ihnen zu einer weiteren Interaktion kommt. Vorallem sollte untersucht werden, ob CnrY von CnrX proteolytisch in Anwesenheit von Ni<sup>2+</sup> gespalten wird. Aufgrund seiner Lokalisation im Periplasma ist nur der Carboxy-terminale Bereich von CnrY ab dem Ende des Membrandurchgangs für diese postulierte CnrX-abhängige Spaltung zugänglich. Da es völlig offen war, an welcher Position dies geschieht und eventuelle Spaltprodukte zu klein für eine SDS-PAGE-Analyse sind, wurden diese Untersuchungen mittels HPLC durchgeführt.

Die Versuche deuten darauf hin, dass in Anwesenheit von Ni<sup>2+</sup> Spaltprodukte entstehen. Allerdings konnte das Ergebnis noch nicht quantifiziert werden. Außerdem muss im weiteren noch untersucht werden, ob dieses neu entstandene Produkt ein spezifisches Spaltprodukt von CnrY ist.

### 3.16. Stromabwärts von *cnrA* wird ein offener Leserahmen von 351 aa (CnrT) und eine putative Transposase (Tnp) kodiert

Die beiden am nächsten zu *cnr*-verwandten Systeme *ncc* und *czc* besitzen jeweils ein Gen *nccN* bzw. *czcN* (mit 66 % Ähnlichkeit auf der Ebene der Proteine) (Große *et al.*, 1999; Diels *et al.*, 1995; Schmid und Schlegel, 1994). In der *cnr*-Determinante war bisher noch kein entsprechendes Gen nachgewiesen worden. Deshalb sollte der DNA-Bereich stromabwärts der *PstI*-Schnittstelle bei Position C<sub>8523</sub>TGCAG sequenziert werden. In einer Diplomarbeit (Kühnemund, 1999) wurde bereits ein ca. 1.6 kb *PstI/XhoI*-Fragment kloniert, wodurch Plasmid pECD569 entstand. Dieses Plasmid sollte vollständig sequenziert werden. Mittels des *Genome Priming Systems* (GPS, NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach i. Taunus) wurde eine Transposon-Mutagenese im Plasmid pECD569 durchgeführt. Dieses elegante System umgeht die Notwendigkeit, das zu sequenzierende Fragment weiter zu subklonieren oder eine umständliche *Primer-Walking*-Methode anzuwenden.

Es wurden mehrere Klone isoliert, bei denen das Transposon in das 1.6 kb-Insert gesprungen war. Mit den Primern GPS-TpN und GPS-TpS konnten die Derivate des Plasmids pECD569 dieser Klone sequenziert werden. Aus den Sequenzen konnte die DNA-Basenabfolge des gesamten *PstI/XhoI*-Fragmentes gewonnen werden (Abb. 13). Die 1623 bp lange Sequenz dieses Fragmentes wurde unter der *Accession Number* AJ276513 in der *EMBL-Nucleotide Sequence Database* hinterlegt. Diese Sequenz enthält das 3'-Ende eines offenen Leserahmens (*cnrT*), der für ein 351 Aminosäuren langes Peptid kodiert. Weiter stromabwärts in entgegengesetzte Richtung wird ein Gen (das 3'-Ende) einer potentiellen Transposase Tnp transkribiert. Die Produkte dieser offenen Leserahmen sowie deren putative Ribosomenbindestellen sind ebenfalls dargestellt (Abb. 13). Bei der Sequenzierung des DNA-Bereichs direkt stromabwärts von *cnrA* konnten zwei Abweichungen von der von Liesegang *et al.* (1993) veröffentlichten Sequenz festgestellt werden (<sub>8101</sub>CTGGCG zu <sub>8101</sub>CTGGCCG und <sub>8306</sub>CGCAAT zu <sub>8306</sub>CGCCAT). Dadurch wird der offene Leserahmen von *cnrT* in 5'-Richtung verlängert. Weitere mögliche offene Leserahmen von geringerer Größe, die meist mit den beiden großen ORFs überlappten, wurden nicht berücksichtigt (Ergebnis nicht gezeigt). Zwischen *cnrT* und der putativen Transpose befindet sich eine Haarnadelstruktur bestehend aus sieben Basen, die sich nach 12 Nukleotiden invertiert wiederholen (<sub>1132</sub>CTTTGCC-N<sub>12</sub>-GGCAAAG; Abb. 13).

Durch die bei der Konstruktion von Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) bzw. DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) eingeführte *lacZ*-Kassette wird der offene Leserahmen von *cnrT* nicht gestört.

### 3. Ergebnisse

---

A Q A A L E A \*

7998 5'AGCGCAAGCAGCGCTGGAAGCAT**AG**AGTTTGCAGTCCACGCTCCCACTGCGCCTTGATCC  
Ende *cnrA*

M S I R T A S P A L L A A L L F G

8058 TT**GA**TTTCCC**ATG**TCTATTTCGTACCGCATCTCCGGCATTACTGGCCGCTCTGCTTTTTCGG  
Start *cnrT*

A S T P L A K A L T G S V A P L L L A G

8118 AGTAGCACGCCGCTGGCCAAGGCGCTAACCGGTTCCGTTGCCCACTCCTGTTGGCGGG

L L Y L G S G I G L A L V L A I R R A W

8178 CTTGCTCTATCTTGGCAGTGGCATCGGACTGGCGCTTGTGCTCGCAATCCGAAGAGCCTG

I T P D P G N D D V G I P R G E V P W L

8238 GATCACGCCTGACCCAGGAAATGATGACGTGGGTATTCCGCGAGGGGAAGTGCCGTGGCT

I G A I L A G G V A G P A L L M T G L V

8298 GATCGGCGCCATCCTCGCTGGCGGCGTAGCGGGGCCAGCGTTGCTGATGACCGGGCTCGT

S T N A A S A S L L L N V E G V F T A V

8358 CTCAACCAATGCCGCTTCGGCATCCCTGCTGCTGAACGTGGAGGGTGTGTTACGGCCGT

I A W V V F K E N A D R Q I V L G M I A

8418 CATCGCCTGGGTGGTGTTC AAGGAGAATGCTGACCGCCAGATTGTCTGGGGATGATCGC

I V A G G L L L S W Q P G S L Q M S T G

8478 GATCGTGGCCGGTGGCCTTCTGCTGTCTTGGCAGCCGGGCAGC CTGCAGATGTCAACCGG  
*Pst*I

A L L I V G A C L C W A V D N N L T R K

8538 TGCGCTGCTTATCGTGGGTGCCTGCCTGTGCTGGGCCGTAGATAACAACCTGACCCGCAA

V S S N D A L L V A C L K G L V A G L C

8598 GGTCTCCAGCAATGACGCGCTGCTCGTCGCTGCCTGAAGGGGCTTGTGCTGGGCTATG

N T T L A L T H G A V F P S V S T A A A

8658 CAACACCACCTCGCCTTGACGCATGGGGCGGTGTTTCCATCGGTCACTGCGGCGGC

A L I I G F A G Y G V S L A L F V V A L

8718 AGCGCTGATCATCGGATTTCGCCGGATACGGTGTAAGCCTCGCCTTGTGTTGGTGGCGCT

R L L G T A R T G A Y F S V A P L F G V

8778 GCGGCTGTTGGGCACTGCGCGAACCGGGGCATATTTCTCTGTCGCCCCATTATTTGGCGT

L L A F A I W P E V P G F A F W A A L A

8838 CCTGCTTGCCTTTCGATCTGGCCTGAGGTGCCAGGCTTCGCATTCTGGGCGGCTTTGGC

### 3. Ergebnisse

Fortsetzung Abb. 13

L M A L G V W L H L R E R H E H E H T H  
 8898 TTTGATGGCCTTGGGTGTGTGGTTACATCTGCGAGAGAGGCACGAGCATGAGCATACCCA  
  
 E P L E H S H S H R H D E H H Q H E H D  
 8958 TGAGCCACTGGAGCATAGCCACTCGCATCGGCACGACGAACACCCATCAGCATGAGCATGA  
  
 F P W D G K E P H R H W H R H E V M V H  
 9018 CTTCCCATGGGATGGGAAGGAACCCACAGGCATTGGCATCGGCACGAGGTGATGGTGA  
  
 K H P H Y P D V H H R H S H \*  
 9078 CAAGCATCCACACTACCCGGACGTGCATCATCGCCATTCTCAC **TAG**AGTTGCTTTGCCTC  
 3` TCAACGAAACGGAG  
 Ende *cnrT* ----->  
 9138 GGTTCGCTGGCAAAGGCCTCTATAGGTAAGAGGCTCTCGACATCCCGACGACTCAGCC  
 CCAAGACGGACCGTTTCCGGAGATATCCATTCTCCGAGAGCTGTAGGGCTGCTGAGTCGG  
 <-----  
 9198 GAATAGGCTCGTTGGG 5'  
 CTTATCCGAGCAACCC**AGT**AGGCCATGCGGTACAGCAGCGATTGCAGACGCGCCAGCACC  
 \* G T R W T T A L T Q A T T A  
 Ende putative Transposase (Tnp)  
  
 9258 GTGAGCCTTCATCAGCTACGCGCATCGCGGTTAGCCCTTTAGCTTTTCATGGCGCATTCA  
 S P L L R H A Y R A I P F D F T G R L N  
  
 9318 ACTACGGAAGGTCGGCTCAGCCACGCTAGACGGCATCCAGGAGCCGTGCGTACCTAAGCG  
 I G E L R T P A I Q R L D E A R M S E G  
  
 9378 GCGGCTCTCGAAGATAGCGGAGGTCCCGCACGACGTACACGTCACACAAGGTTCCGGTAGT  
 G L A E I A E L A H Q M H L T N W A M V  
  
 9438 GCCGTAACCAGTCGTCGAGTTGCTCCTGCTCTGGCGACGGTCCCTGCGTAGCACAGCTC  
 A N T L L T L S S S V A A L S A D H R A  
  
 9498 GGTGAGGTTCCCTTAAAAAGGCATTACCTACCGGGCGACGTGCCATACGTGTCGAAGTG  
 L E L P I K G Y H I A R Q V T H V A E G  
  
 9558 GCGCTAAGTCCCGTACGACGTAGAGAACCGCCTTGCGCCTCAACCACTTTATCAGCTGCT  
 R N L A H Q M E Q R F A S N T F Y D V L  
  
 9618 CCTTCTAGCATGCCTTATCGGAAGGGTCTACGTGCGGACGGAGTATCTGCACAACCGGGG  
 F I T R F L R G L H V G A E Y V H Q G R  
  
 9678 CACGGCGGCGGGCTTTGCACAGTTACGGACGTGGCGGCACGTAACCGGCCAGACCTGGC  
 A A A G F R T L A Q V A T C Q G T Q V S  
  
 9738 TGCGGCGCTAGGCCTGGTCAAGTAGGGTCCGTTAAAGCTAGTTGTGGTCCGGCTTGTAGGC  
 A A I R V L E D W A I E I L V L R V D A

### 3. Ergebnisse

Fortsetzung Abb. 13

```
9798 GCAGGCGCTGGCGCCGGTCAAGACTGCCTTGGCGTATCGGAAACCCCTGTACGTTGGCCG
    D A V A A L E S P V A Y G K P V H L R R

9858 CTAGTGCGTCTACCCTCTCGGCGCCCGTCTCTAGCTTCGGGTCGTTGGCACTGTCTGAGT
    D R L H S L R P C L D F G L L R S L S M

9918 ACCGCTTCAGCCACATCGGCACCCATAGCTGCCGCTCAACGCACTGCAGAAGGGGCGGTA
    A F D T Y G H T D V A L Q T V D E G G N

9978 AGACTGCTTAGTGCGGGAGCTACCGCCGTGGGCGAACAGAGAGTAAGTTCTCCTAGCCGA
    Q R I V G E I A A G A Q R E N L L I P Q

10038 CCAGCATCTTCTACGGGGTAGCTAGCGCCTGTACCCACATGTAGGGTTAGCTGCGCCATG
    D Y F I G W R D R V H T Y M G I S A T R

10098 CAGCTGCGCCCAGTCAGGCGCGAACGGTCTGGCTCGCGCAGCAGAGCTC 5'
    R R P D T R A Q W V S R T S E L
                                     „XhoI“
```

**Abb. 13: Nukleotidsequenz einer 2.1 kb Region stromabwärts der *cnr*-Strukturgene (Eintrag AJ276513, EMBL-Datenbank)**

Das 3'-Ende der bereits von Liesegang *et al.*, 1993 veröffentlichten Sequenz (Eintrag M91650, EMBL-Datenbank) reicht bis zur *Pst*I-Schnittstelle. Auf dem abgebildeten DNA-Bereich liegt das Gen *cnrT* mit einem potentiellen Startpunkt. Das daraus abgeleitete Protein ist unter der DNA-Sequenz in Großbuchstaben dargestellt. Der offene Leserahmen einer möglichen Transposase (Tnp) befindet sich auf dem Gegenstrang, das Translationsprodukt ist in 3'-5' Richtung abgebildet. Die Translationsstart- und Endpunkte sind hervorgehoben (**fett/unterstrichen** bzw. **fett/kursiv**), die putativen Ribosomenbindestellen (RBS) sind **fett** dargestellt. Pfeile deuten eine potentielle *Loop*-Struktur zwischen *cnrT* und dem putativem Transposase-Gen (*tnp*) an. Die *Pst*I-Schnittstelle wurde unterstrichen/kursiv, ebenso die in 3'-5'-Richtung dargestellte *Xho*I-Schnittstelle. Die Korrekturen der Sequenz M91650 sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Zur Kontrolle, ob sich die neu-sequenzierte Sequenz direkt stromabwärts der *Pst*I-Schnittstelle der alten Sequenz (M91650) anschloss, wurde das Gen *CnrT* mittels PCR (mit Primern Orf down + Orf up) amplifiziert, das Produkt in pGEM T-Easy kloniert und sequenziert.

### 3.17. Deletion und *in trans* Komplementation der Gene *cnrC*, *cnrB* bzw. *cnrCB* auf Plasmid pMOL28

#### 3.17.1. Deletion der Gene *cnrC*, *cnrB* bzw. *cnrCB* auf Plasmid pMOL28 führen zur Verminderung der Nickel- und Cobaltresistenz

Um den Einfluss der Proteine CnrC und CnrB auf die *cnr*-vermittelte Schwermetallresistenz zu untersuchen, wurden deren Gene im konstitutiven Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) deletiert. Dieser Stamm wurde gewählt, da hier die Strukturgene konstitutiv exprimiert werden. Wodurch das *cnr*-System immer maximal induziert sein sollte. Für die Konstruktion der Deletionen wurde wie bei der Konstruktion der *cnrYXH*-Deletion je ca. 300 bp stromaufwärts von *cnrC* bzw. *cnrB* durch PCR als *XbaI/MunI*-Fragment aus Megaplasmid-DNA pMOL28 amplifiziert (Primer *cnr* Delta C OD + *cnr* Delta C OU für *cnrC* bzw. *cnr* Delta B OD + *cnr* Delta B OU für *cnrB*), wobei die ersten 33 Basen von *cnrC* bzw. 18 bp *cnrB* beinhaltet waren. Ebenso wurden die 300 bp stromabwärts *cnrC* bzw. *cnrB* als *MunI/XbaI*-Fragment mit den letzten 21 Basen von *cnrC* bzw. 24 Basen *cnrB* amplifiziert (Primer *cnr* Delta C UD + *cnr* Delta C UU für *cnrC* bzw. *cnr* Delta B UD + *cnr* Delta B UU für *cnrB*).

Nach Restriktion, Klonierung, Sequenzierung zur Kontrolle, Klonierung in pVDZ'2 und Übertragung in den Stamm DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) wurden die resultierenden Deletionsplasmide pMOL28-6 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrC* im Stamm DN411, pMOL28-7 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrB* im Stamm DN412 bzw. pMOL28-8 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrCB* im Stamm DN413 durch PCR auf korrekt erfolgte Rekombination überprüft.

Die Bestimmung der MIC gegen NiCl<sub>2</sub> bzw. CoCl<sub>2</sub> der *cnrC*-, *cnrB*- bzw. *cnrCB*-Deletionsstämme zeigte, dass die jeweilige Metallresistenz drastisch verringert war (Tab. 13). Im Falle des  $\Delta$ *cnrC*-Deletionsstammes DN411 lag die MIC gegen NiCl<sub>2</sub> auf dem gleichen niedrigen Niveau wie bei der  $\Delta$ *cnrCB*-Doppelmutante DN413 und nur wenig über der des plasmidfreien, metallsensitiven Stamm AE104, während die Restresistenz der  $\Delta$ *cnrB*-Deletionsmutante DN412 interessanterweise etwas höher war. Im Falle von CoCl<sub>2</sub> war die Resistenz in den Stämmen mit Einzeldelationen (DN411, DN412) nur wenig über der der Doppeldeletionsmutante DN413 (Tab. 13).

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 13: Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) von Nickel und Cobalt in *R. metallidurans* AE126(pMOL28)- $\Delta$ *cnrC*, - $\Delta$ *cnrB* und - $\Delta$ *cnrCB*-Derivaten und ihren Komplementanten**

Stamm, Megaplasmid	Relevanter Genotyp	Ni <sup>2+</sup> [mM]	Co <sup>2+</sup> [mM]
DN195(pMOL28-4)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> )	7.0	10
DN411(pMOL28-6)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrC</i>	1.0	1.25
DN411(pMOL28-6, pDNA319)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrC</i> , <i>cnrC</i> in trans	2.0	1.75
DN411(pMOL28-6, pDNA322)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrC</i> , <i>czcC</i> in trans	2.0	1.75
DN411(pMOL28-6, pDNA325)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrC</i> , <i>nccC</i> in trans	2.0	1.75
DN412(pMOL28-7)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrB</i>	1.75	1.0
DN412(pMOL28-7, pDNA320)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrB</i> , <i>cnrB</i> in trans	4.0	5.0
DN412(pMOL28-7, pDNA323)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrB</i> , <i>czcB</i> in trans	1.25	1.0
DN412(pMOL28-7, pDNA326)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrB</i> , <i>nccB</i> in trans	1.25	1.5
DN413(pMOL28-8)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrCB</i>	1.0	0.75
DN413(pMOL28-8, pDNA321)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrCB</i> , <i>cnrCB</i> in trans	1.25	1.5
DN413(pMOL28-8, pDNA324)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrCB</i> , <i>czcCB</i> in trans	1.0	1.0
DN413(pMOL28-8, pDNA327)	<i>cnrYI</i> (Con) $\Phi$ ( <i>cnrCBA-lacZ</i> ), $\Delta$ <i>cnrCB</i> , <i>nccCB</i> in trans	1.0	1.5
AE104	Plasmid-freie Kontrolle	0.3	0.3

<sup>a</sup>MIC (Minimale Inhibitor Konzentration), definiert als Inhibierung des Wachstums bei 30°C für 3 Tage. Einzelkolonien wurden nicht als Wachstum gewertet. Jede Bestimmung wurde zweimal mit den gleichen Ergebnissen wiederholt.

### 3.17.2. Die Komplementation der *cnrC*-, *cnrB*- bzw. *cnrCB*-Deletionsmutanten

Die *cnrC*-, *cnrB*- bzw. *cnrCB*- Deletionsstämme boten die Möglichkeit, die Funktion von *Outer Membrane* Faktoren bzw. *Membrane Fusion* Proteinen genauer zu untersuchen. Dazu sollten die deletierten Gene mit ihren Analoga aus dem *ncc*- bzw. *czc*-System *in trans* komplementiert werden. Hierfür wurden die Gene *cnrC*, *cnrB*, *cnrCB* (*Template* pMOL28), *nccC*, *nccB*, *nccCB* (*Template* Gesamt-DNA aus *A. xylosoxydans*), *czcC*, *czcB* und *czcCB* (*Template* pMOL30) durch PCR amplifiziert (Primer *cnr* Promotor D + *cnr* Delta B OU für *cnrC*; *cnrB* *HinDIII* D + *cnrB* *XbaI* U für *cnrB*; *cnr* Promotor D + *cnrB* *XbaI* U für *cnrCB*; *nccC* *BamHI* D + *nccC* *KpnI* U für *nccC*; *nccB* *BamHI* D + *nccB* *PstI* U für *nccB*; *nccC* *BamHI* D + *nccB* *PstI* U für *nccCB*; *czcC* *EcoRI* D + *czcCB* *KpnI* U für *czcC*; *czcCB* *KpnI* D + *czcBA* *BamHI* U für *czcB*; *czcC* *EcoRI* D + *czcBA* *BamHI* U für *czcCB*), in Plasmid pGEM T-Easy kloniert, zur Kontrolle sequenziert und in das Weit-Wirtsbereichs-Plasmid pVDZ'2 subkloniert. Die resultierenden pVDZ'2-Derivate (pDNA319, *cnrC*; pDNA320, *cnrB*; pDNA321, *cnrCB*; pDNA322, *czcC*; pDNA323, *czcB*; pDNA324, *czcCB*; pDNA325, *nccC*; pDNA326, *nccB*; pDNA327, *nccCB*) wurde in die jeweiligen *cnrC*-, *cnrB*- bzw. *cnrCB*-Deletionsstämme übertragen.

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) gegen  $\text{NiCl}_2$  und  $\text{CoCl}_2$  in den resultierenden Transkonjuganten von DN411, DN412 bzw. DN413 zeigte, dass die Komplementation mit *cnrC* die  $\text{Ni}^{2+}$ -Resistenz besser restaurierte als die gegen  $\text{Co}^{2+}$ . Allerdings wurde das Niveau des Wildtypes bei weitem nicht erreicht. Es gab keine Unterschiede zwischen den Komplementationen durch *cnrC*, *czcC* oder *nccC* (Tab. 13).

Die Deletion von  $\Delta\text{cnrB}$  ließ sich gut durch *cnrB* komplementieren, kaum durch *nccB* und gar nicht durch *czcB*. Interessanterweise kam es durch *nccB* oder *czcB* sogar zum Absinken der Rest-Resistenz gegen  $\text{Ni}^{2+}$ .

Noch stärker als bei den Einzeldelationen war der Defekt durch die  $\Delta\text{cnrCB}$ -Doppeldelation. Diese ließ sich kaum *in trans* komplementieren. Eine leichte aber signifikante „Heilung“ der Deletionsmutante gelang nur durch *cnrCB* oder *nccCB*. Auffällig war dabei, dass die  $\text{Co}^{2+}$ -Resistenz besser restauriert werden konnte als die Resistenz gegen  $\text{Ni}^{2+}$ . Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass sich der *cnrB*-Deletionsstamm DN412 besser als der *cnrC*-Deletionsstamm DN411 und dieser wiederum besser als der *cnrCB*-Deletionsstamm DN413 *in trans* komplementieren ließ. Die Komplementation durch die „C“-Gene war gleich effektiv, die Komplementation durch *cnrB* (CB) war effektiver als die durch *nccB* (CB), während *czcB* (CB) (fast) nicht komplementieren konnte.

### **3.18. Reinigung des CzcC-Proteins zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern**

#### **3.18.1. Das CzcC-Protein wurde als 6xHis-tagged Fusion überexprimiert und gereinigt**

Die Reinigung von CzcC hatte zwei Ziele. Zum einen sollte mit den gegen CzcC gewonnenen Antikörpern die Expression des Proteins in Mutantenstämmen nachgewiesen werden, zum anderen sollte geklärt werden, ob und an welcher Position CzcC in *R. metallidurans* prozessiert wird.

Das *czcC*-Gen wurde über PCR mit den Primern *czcC SphI D* und *czcC BamHI U* aus Plasmid pMOL30 amplifiziert, in den Überexpressionsvektor pQE70 kloniert und das entstandene Plasmid pECD606 zur Kontrolle sequenziert. Durch die Klonierung wurden am 3'-Ende von *czcC* drei Basenpaare CGT zu CCT verändert, die im Protein einen Austausch der letzten Aminosäure Arginin gegen Prolin bewirken. Das Plasmid pECD606 wurde in den *E. coli* Überexpressionsstamm M15 [pREP4] transformiert, die Zellen angezogen und das Fusionsprotein gereinigt. In der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese konnten zwei Banden eines 44 kDa und eines 42 kDa Protein nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

#### **3.18.2. CzcC wird N-terminal prozessiert, dabei wird der periplasmatische Leader abgespalten**

Zur Klärung der Frage an welcher Stelle der *CzcC-Leader* abgespalten wird, wurden beide eluierten Proteine N-terminal ansequenziert. Die erhaltene Sequenz des größeren der beiden Proteine stimmt in den ersten sieben Aminosäuren mit CzcC überein (MRRLFLP). Die Sequenz QSDTGT vom kleineren Protein stimmt mit den Aminosäuren 23-28 von CzcC überein. Der periplasmatische *Leader* wird also zumindest in *E. coli* abgespalten. Um zu untersuchen, ob dies auch in *R. metallidurans* der Fall ist, wurden Antikörper gegen CzcC gewonnen. Hierfür wurde mit 1 mg gereinigtem *CzcC-6xHis-Tag*-Protein zwei Kaninchen immunisiert und Antisera gewonnen.

Die Antisera wurden in Western-Blot-Experimenten eingesetzt. Dazu wurde der Stamm AE128 in Tris-Minimalmedium angezogen, bei einer optischen Dichte von ca. 200 Klett-Einheiten geteilt und eine Hälfte für 30 min. mit ZnCl<sub>2</sub> inkubiert. 200 µl Aliquote wurden pelletiert, auf einer SDS-PAGE aufgetragen und nach Western-Blot mit Anti-CzcC-Serum inkubiert. Als negativ Kontrolle dienten Zellen vom plasmidfreien Stamm AE104. Nach ECL-Nachweis zeigte sich, dass CzcC auch in *R. metallidurans* prozessiert wird (Abb. 14).



**Abb. 14: Western-Blot-Reaktionen des Anti-CzcC-polyklonalen Antikörpers**

Protein-Fractionen des gereinigten, heterolog in *E. coli* überexprimierten CzcC-Proteins, sowie Rohextrakte von *Ralstonia metallidurans*-Derivaten wurden präpariert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen CzcC inkubiert.

M. Größenmarker

1. gereinigtes CzcC-Protein ca. 1.75 µg

2. gereinigtes CzcC-Protein ca. 0.81 µg

3. *Ralstonia metallidurans* AE128 Rohextrakt, Zellen ohne Zn<sup>2+</sup> inkubiert

4. *Ralstonia metallidurans* AE128 Rohextrakt, Zellen mit 0.2 mM Zn<sup>2+</sup> inkubiert

5. *Ralstonia metallidurans* AE128 Rohextrakt, Zellen mit 2.5 mM Zn<sup>2+</sup> inkubiert

6. Rohextrakt von DN412 (pMOL28-7 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrB*), pDNA323(*czcB*)

7./8. Rohextrakt von DN413 (pMOL28-8 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrCB*), pDNA324(*czcCB*) (unabhängig voneinander konstruierte Klone)

Der durchgezogene Pfeil bezeichnet das prozessierte, *Leader*-lose CzcC-Protein, der gestrichelte Pfeil das CzcC-Proprotein.

### 3.18.3. Mittels CzcC-spezifischer Antikörper ließ sich CzcC im Mutantenstamm DN413 (pMOL28-8 *cnrYI*(Con) $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) $\Delta$ *cnrCB*), pDNA324(*czcCB*) nachweisen

In den Komplementationsexperimenten (3.17.2) konnte festgestellt werden, dass der *cnrCB*-Deletionsstamm DN413 (pMOL28-8 *cnrYI*(Con)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrCB*) schlecht durch *cnrCB*, *czcCB* bzw. *nccCB* *in trans* komplementierbar war. Mit Hilfe der CzcC-Antikörper sollte überprüft werden, ob in diesen Mutantenstämmen das *Outer-Membrane Factor*-, „C“-Protein überhaupt exprimiert wurde. Die Stämme DN413(pMOL28-8 *cnrYI*(Con),  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrCB*), pDNA321(*cnrCB*) bzw. pDNA324(*czcCB*) bzw. pDNA324(*nccCB*) wurden angezogen, pelletiert, in einer SDS-PAGE aufgetragen und nach Western-Blot mit Anti-CzcC-Serum inkubiert. Im ECL-Nachweis zeigte sich, dass CzcC auch in Mutantenstämmen exprimiert wird. (Abb. 14). Leider zeigte der CzcC-Antikörper keine Affinität gegen CnrC oder NccC. So konnten diese Derivate nicht nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

## 4. DISKUSSION

Bei Prokaryoten ist die Transkription die wichtigste Ebene der Regulation der Genexpression. An diesem Prozess sind Schwermetallionen beteiligt. So wird zum Beispiel die Bindung eines  $Zn^{2+}$ -Kations für die Funktion der RNA-Polymerase benötigt (Yoo *et al.*, 1995; Markov *et al.*, 1999). Spezifischer ist die Funktion eines Schwermetallkations bei der Induktion der *mer* Quecksilber-Resistenz. Auch hier hängt die Genexpression von der Bildung eines Protein-Metall-Komplexes ab. Der Regulator MerR bindet an den Operator des *mer*-Operons und verhindert die Initiation der Transkription (O'Halloran und Walsh, 1987; Helmann *et al.*, 1990; Caslake *et al.*, 1997). Bei Anwesenheit von  $Hg^{2+}$  kommt es zu dessen Bindung an MerR. Dieses ändert seine Konformation und wird zum Aktivator. Es bewirkt eine Verdrehung und damit eine Verkürzung der DNA im Promotorbereich. Dadurch kann die RNA-Polymerase die Transkription initiieren, was letztlich zur Synthese der Quecksilberreduktase MerA und damit zur Entgiftung des Cytoplasmas an Quecksilber führt (Schiering *et al.*, 1991; Silver und Misra, 1988).

Bei den bakteriellen CBA-Protonen/Schwermetallkationen-Antiport-Transport-Systemen ist der Mechanismus der Induktion ein anderer. Hier hat das Metall-Kation keinen direkten Einfluss auf die Initiation der Transkription. Vielmehr gelangt die Information, dass toxische Konzentrationen an Schwermetallkationen außerhalb der Zelle vorhanden sind, durch eine Signal-Kette über die Cytoplasmamembran hinweg ins Innere und die Transkription der Efflux-Komplexe wird initiiert (van der Lelie *et al.*, 1997; Hassan *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 1993; Mills *et al.*, 1994).

### 4.1. Die Regulation der *cnr*-Determinante

#### 4.1.1. *Cnr*-Regulation durch Transkriptionskontrolle

Je nach den Umweltbedingungen müssen unterschiedliche Gene exprimiert werden. Für diese differentielle Genexpression besitzen Bakterien mehrere Sigma-Faktoren. Ihnen gemeinsam ist die Interaktion mit dem RNA-Polymerase Core-Enzym (RNAP-Core). Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Affinität für die von ihnen erkannten Promotor-Sequenzen. *Escherichia coli* besitzt mindestens sieben Sigma-Faktoren (Helmann und Chamberlin, 1988; Maeda *et al.*, 2000). Der normale  $\sigma^{70}$  (RpoD) sorgt für die Expression der sogenannten *House-Keeping* Gene (Burton *et al.*, 1981; Kumar *et al.*, 1994).  $\sigma^{38}$  (RpoS) ist für die Stressantwort beim Wechsel vom exponentiellen zum stationären Wachstum verantwortlich (Jishage und Ishihama, 1995; Loewen und Hengge-Aronis, 1994).  $\sigma^{54}$  (RpoN) ist im Stickstoffstoffwechsel involviert (Merrick, 1993).  $\sigma^{28}$  (FliA, SigD) ist unter anderem für Expression von Genen der

Flagellen-Synthese zuständig. Zwei Sigma-Faktoren,  $\sigma^{24}$  (SigE, Erickson und Gross, 1989) und  $\sigma^{32}$  (SigH, Erickson *et al.*, 1987), sind für die Expression unter Hitzestress verantwortlich,  $\sigma^{32}$  im Besonderen für die von Chaperonen und Proteasen (Yura *et al.*, 1993),  $\sigma^{24}$  für extracytoplasmatische Funktionen (Raina *et al.*, 1995). Eine Sonderstellung nimmt FecI ein, da es im Gegensatz zu den anderen genannten Sigma-Faktoren nur für die Transkriptions-Initiation eines bekannten Operons (*fecABCDE*) verantwortlich ist (Angerer *et al.*, 1995).

*Ralstonia metallidurans* CH34 nutzt den Sigma-Faktor CnrH zur differentiellen Genexpression unter Nickelstress. Für die *cnr*-Determinante waren zu Beginn dieser Arbeit zwei Promotoren postuliert. Der eine stromaufwärts von *cnrY* und ein weiterer entweder stromabwärts von *cnrX* oder zwischen *cnrH* und *cnrC* (Liesegang, 1994). Der ungewöhnlich große Abstand der -10 und -35 Region des Promotors vor *cnrY* von 21 bp gegenüber den regulären 16-19 bp (Gruber und Bryant, 1997; Dombroski *et al.*, 1996) der  $\sigma^{70}$ -Konsensussequenz, wurde damit erklärt, dass *cnr* positiv reguliert würde (Liesegang, 1994), vermutlich ähnlich wie bei *mer*. Der andere Promotor sollte von den Genprodukten von *cnrY* oder *cnrX* negativ kontrolliert werden. Diese Aussagen konnten durch diese Arbeit nicht bestätigt werden.

Stromaufwärts von *cnrY* befindet sich zwar ein Promotor (*cnrYp*), dessen -10 und -35 Region ist aber nicht mit der von Liesegang *et al.* (1993) postulierten (Abb. 15) identisch. Dieser Promotor und das 5'-Ende der *cnrYXH*-mRNA konnten inzwischen auch von einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Tibazarwa *et al.*, 2000). Ein zweiter *cnr*-Promotor (*cnrCp*) konnte zwischen *cnrH* und *cnrC* identifiziert werden. Der Promotor *cnrCp* hat annähernd die gleiche Basenabfolge im Bereich der -35 und -10 Region wie *cnrYp* (Abb. 15). Stromaufwärts von *cnrH* konnte kein Transkriptionsstart durch *Primer Extension* ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht in direktem Widerspruch zu den Daten von Tibazarwa *et al.* (2000), die einen Transkriptionsstartpunkt vor *cnrH* aber nicht vor *cnrC* nachweisen konnten. Der „*cnrHp*“ hat den theoretischen Vorteil gegenüber *cnrCp*, dass er ein „AAC“-Motiv in der -35 Region aufweist (Abb. 15), wie es für einen Teil der ECF-Sigma-Faktoren typisch ist (Lonetto *et al.*, 1994). Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass ein (!) Sigma-Faktor zwei völlig unterschiedliche Promotorstrukturen erkennen sollte (Abb. 15). Außerdem ist das „AAC“-Motiv nicht zwingend notwendig, wie an Promotorsequenzen anderer ECF-Sigma-Faktoren gezeigt werden konnte (Ward *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 1999). Selbst der von Tibazarwa *et al.* (2000) postulierte Promotor *cnrYp* besitzt kein „AAC“-Motiv (Abb. 15).

Sehr aufschlussreich war auch der Vergleich mit dem *ncc*-System, dessen Proteine wie in Abbildung 2 gezeigt, die größten Ähnlichkeiten zu den Cnr-Proteinen besitzen. Wie beim *cnr*-System konnte stromaufwärts von *nccY* bzw. *nccC* eine konservierte -35 und -10 Region in der DNA-Sequenz gefunden werden. Diese sind nicht nur untereinander sehr ähnlich, sondern



Die Postulierung des Promotors *nccCp* führt dazu, dass das veröffentlichte *nccC*-Gen (Schmidt und Schlegel, 1994) nicht mehr transkribiert werden kann. Bei Basenpaar 1701 (EMBL 31363) befindet sich allerdings ein GTG-Startkodon. Wird dieses als Beginn der Translation angesehen, entsteht ein Protein NccC, das aus genauso vielen Aminosäuren besteht wie CnrC (418).

Möglicherweise ist der von Tibazarwa *et al.* (2000) identifizierte Promotor „*cnrHp*“ ein Promotor, an den ein anderer, bisher nicht identifizierter ECF-Sigmafaktor unter bestimmten experimentellen Bedingungen binden kann. Allerdings ist in einer entsprechenden Position stromaufwärts von *nccH* im *ncc*-System ein von Tibazarwa *et al.* (2000) als für so wichtig erachtetes „AAC“-Motiv nicht zu erkennen (Abb. 15).

Zur weiteren Charakterisierung der *cnr*-Promotoren und der „*cnrHp*“-Region wurden diese vor eine promotorlose *lacZ*-Kassette gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass für die Induktion von *cnrYp* und *cnrCp* das Megaplasmid pMOL28 (und damit *cnr*) notwendig ist. Nur in Anwesenheit von pMOL28 kam es zur Ni<sup>2+</sup>-abhängigen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätssteigerung, nicht aber im plasmidfreien Stamm AE104. Ebenso war keine Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Stämmen mit dem Konstrukt  $\Phi(\textit{cnrHp-lacZ})$  nachzuweisen.

Für die *in vitro* Transkriptionsexperimente wurden deshalb nur *Templates* mit *cnrYp* und *cnrCp* verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass von diesen *Templates* CnrH abhängig *cnr*-Transkripte abgelesen wurden. In *Band-Shift*-Experimenten von Tibazarwa *et al.* (2000) konnten hingegen Verzögerungen nur mit *cnrYp*- bzw. *cnrHp*-enthaltenden DNA-Fragmenten nachgewiesen werden. Jedoch werden über *Band-Shift*-Experimente, bei denen der RNA-Polymerase-Holoenzymkomplex an die DNA-Matrize bindet, nur eine Verzögerung der Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel durch Bildung der Initiationskomplexe nachgewiesen, wohingegen es bei der *in vitro* Transkription zur Synthese einer spezifischen mRNA kommt, die von den Promotoren (und dem Sigma-Faktor) abhängig ist. Aus diesen widersprüchlichen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob vielleicht *cnrCp* ein Hilfspromotor ist und die meisten Transkriptionsereignisse vom *cnrYp* initiiert werden, wobei eine hexacistronische *cnrYXHCBA* mRNA synthetisiert wird. Deshalb wurde *cnrYXH* von  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$  durch das Einfügen einer  $\Omega$ -Kassette auf Plasmid pMOL28-5 getrennt (Abb. 5). Da dieses Konstrukt weiterhin durch Nickel induzierbar war, ähnlich wie die Kontrolle, kann „*cnrHp*“ keinen wichtigen Einfluss auf  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$  haben, hingegen ist *cnrCp* wichtig für die Ni<sup>2+</sup> induzierte Expression des CBA-Efflux-Komplexes.

Im *czc*-System sind die Transkripte bereits gut untersucht (Große *et al.*, 1999). Dort wird die Transkription stromabwärts von *czcA* Rho-unabhängig terminiert. Es existieren mRNAs von definierter Größe, die teilweise auch in Northern-Blot-Experimenten nachweisbar waren (Grass, 1996; Große *et al.*, 1999). In der *cnr*-Determinante scheinen die mRNAs nicht Rho-unabhängig terminiert zu werden, da keine Terminatoren identifiziert werden konnten. Mittels Northern-Blot-Experimenten konnten keine distinkten *cnr* mRNA-Banden nachgewiesen

werden, nur bereits im Abbau befindliche Transkripte als „Schmier“ oder als Größen, die nicht den *cnr*-Genen zugeordnet werden konnten (Kühnemund, 1999; Tibazarwa *et al.*, 2000). Mittels der sehr sensitiven Methode der RT-PCR konnten durchgängige Transkripte von *cnrY* bis *cnrH* und von *cnrC* bis *cnrA* nachgewiesen werden. Es existieren auch mRNAs, die die Gene der gesamten *cnr*-Determinante umfassen. Auch wird nach *cnrA* die Transkription nicht terminiert, sondern wird bis in das Gen von *cnrT* fortgesetzt. Die RT-PCR-Experimente zeigten jedoch deutlich, dass es kein gemeinsames Transkript mit der stromaufwärts von *cnrY* gelegenen *chr*-Determinante (Grass *et al.*, 2000a; Peitzsch, 1999) gibt.

Die Existenz der beiden Haupttranskripte *cnrYXH* und *cnrCBA* wird auch durch die Beobachtung untermauert, dass es eine translationale Kopplung durch Überlagerung der Stopp-Kodons mit den Start-Kodons der nachfolgenden Gene bei *cnrYX* (TGATG) und *cnrXH* (GTGA) bzw. *cnrCB* (TGATG) und *cnrBA* (ATGA) gibt. Eine vergleichbare enge translationale Kopplung kann auch bei anderen Operons, die von ECF-Sigma-Faktoren kontrolliert werden, beobachtet werden (Chi und Bartlett, 1995; Missiakas *et al.*, 1997; Gorham *et al.*, 1996). Im allgemeinen ermöglichen solche Stopp-Kodon-Start-Kodon-Überlappungen die Synthese der Proteine in einem stöchiometrischen Verhältnis (Nomark *et al.*, 1983; Govantes *et al.*, 1996; Botella *et al.*, 1995). Es ist anzunehmen, dass diese enge Kopplung im Falle der Regulatoren dazu führt, dass die Synthese von CnrY, X und H in einem stöchiometrischen Verhältnis abläuft, die von der Initiationsrate abhängt.

Die Ergebnisse der *in trans* Komplementation des Stammes DN190(pMOL28-3  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)  $\Delta$ *cnrYXH*) mit Kombinationen der Regulatoren zeigen deutlich, dass CnrY, CnrX und CnrH hinreichend und notwendig für die Transkriptionsregulation der *cnr*-Determinante sind. Der Einfluss der translationalen Kopplung wird ebenfalls deutlich, wenn *cnrY in trans* zur Konstitutiv-Mutante DN195(pMOL28-4 *cnrY1*(Con.)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) exprimiert wird. Hier kommt es nur zu einem teilweise Wiedererlangen der Induzierbarkeit. Eine solche Komplementation kann auch bei anderen Regulationssystemen, die einen ECF-Sigma-Faktor beinhalten, beobachtet werden (Gorham *et al.*, 1996).

Frühere *Knock-Out*-Experimente mittels Transposonmutagenese (Liesegang *et al.*, 1993) hatten den Nachteil, dass durch Transposoninsertion polare Effekte verursacht werden (Berg *et al.*, 1980). Die in dieser Arbeit konstruierte *cnrYXH*-Deletion ist eine *in Frame*-Mutation. Mit Hilfe des LacZ-Reporters konnte die Funktion der einzelnen Regulatoren auf die Transkriptionsrate von *cnrCBA* genauer beschrieben werden. CnrH alleine führte zu einer hohen konstitutiven *cnr*-Expression. Von Liesegang *et al.* (1993) wurde ein verkürztes *cnrH*-Gen postuliert, mittlerweile konnte jedoch der größere mit GTG beginnende Leserahmen als korrekt identifiziert werden (Lonetto *et al.*, 1994). Damit ist die Zuordnung des CnrH-Proteins zu den ECF-Sigma-Faktoren eindeutig.

Für eine Induzierbarkeit von  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*) sind jedoch außer CnrH noch CnrY und CnrX nötig. Wird *cnrY* ausgeschaltet, wird *cnrCBA* konstitutiv exprimiert. Der konstitutive

Phänotyp von DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con.)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) wird durch eine *Frame-Shift* Mutation in *cnrY* verursacht. Die festgestellte fast vollständige Duplikation an dieser Stelle erinnert an Duplikationen, wie sie bei der Transposition von transponiblen Elementen entstehen (Reed *et al.*, 1979; Healy *et al.*, 1999). Von Tibazarwa *et al.* (2000) wurde parallel zu dieser Arbeit ebenfalls ein Mutanten-*cnrY*, das zu einem konstitutiven Phänotyp führte, sequenziert. Dabei wurde festgestellt, dass ein Insertions-Element (IS1087, EMBL AJ243722) in das *cnrY*-Gen an Position 1036 gesprungen war und eine *Nonsense*-Mutation verursacht hatte. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch die Stämme DN176(pMOL28-1 *cnrYI*(Con.)) und DN195(pMOL28-4 *cnrYI*(Con.)  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*)) durch einen ähnlichen Transpositions-Mechanismus entstanden waren, das transponierbare Element jedoch durch eine zweite Transposition wieder aus *cnrY* herausgesprungen war und dabei die *Target*-Duplikation hinterließ.

### 4.1.2. *Cnr*-Regulation durch Protein-Protein-Interaktion

Die gewonnenen Daten bestätigen, dass CnrH ein Sigma-Faktor der ECF-Familie ist (Lonetto *et al.*, 1994; Liesegang *et al.*, 1993). In vielen Beispielen von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien kontrollieren ECF-Sigma-Faktoren Operons, deren Genprodukte in der Sensorik von Umweltreizen involviert sind (Martinez-Salazar *et al.*, 1996; Humphreys *et al.*, 1999; Schurr *et al.*, 1996; Gorham *et al.*, 1996; Chi und Bartlett, 1995). Die meisten dieser ECF-Sigma-Faktoren werden durch einen membrangebundenen Anti-Sigma-Faktor reguliert. In Stress-Situationen kommt es zur Signalweiterleitung, entweder über diesen Anti-Sigma-Faktor alleine oder in Unterstützung mit einem oder mehreren Sensorproteinen, zur Freilassung des Sigma-Faktors und damit zur Initiation der Transkription (De Las Penas *et al.*, 1997; Paget *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1996; Enz *et al.*, 2000).

Beim Vergleich mit dem Sigma-Faktor RpoE aus *E.coli* (Lonetto *et al.*, 1994), der (nach NccH) die höchste Ähnlichkeit zu CnrH besitzt, fällt auf, dass die Regulation dort anders verläuft. RpoE wird von einem Anti-Sigma-Faktor RseA (*Regulation of Sigma E*) kontrolliert (Missiakas *et al.*, 1997). Weitere Regulatoren, vom gleichen Operon kodiert, tragen nur zu einem geringen Teil zur Regulation der Hitzestress-Antwort bei (Mecsas *et al.*, 1993; Gross, 1996; Missiakas *et al.*, 1997). Das Protein RseA besteht aus 219 Aminosäuren (aa) und besitzt einen Transmembrandurchgang (Aminosäuren 100-118). So wie CnrY und CnrX unter nicht induzierenden Bedingungen durch Bindung von CnrH die Transkriptions-Initiation an *cnr*-Promotoren verhindern, ist es hauptsächlich RseA, das im *E. coli*-System diese Funktion erfüllt (Missiakas *et al.*, 1997; De Las Penas *et al.*, 1997).

In einem Gedankenexperiment kann man leicht eine große Ähnlichkeit der beiden Systeme konstruieren. CnrY (95 aa) und CnrX (147 aa) sind zwar bei bloßer Addition 242 aa lang, bedenkt man jedoch, dass CnrX durch seinen 24 aa umfassenden *Leader* an die Membran und in die Nähe von CnrY gebracht wird und lässt diesen *Leader* bei der Größenbetrachtung weg,

kommt man auf eine Länge des fiktiven Hybridproteins Cnr(YX') von 218 aa. Außer einem Membrandurchgang hätte dieses Hybridprotein weitere Gemeinsamkeiten mit RseA. Sein N-terminaler Teil wäre im Cytoplasma, wo dieser den Sigma-Faktor CnrH binden könnte, sein C-terminaler Teil im Periplasma lokalisiert, wo er das Signal für die Freilassung von CnrH aufnehmen könnte. Diese Verhältnisse wären analog zu RseA (Missiakas *et al.*, 1997; De Las Penas *et al.*, 1997). Mit Hilfe dieses Gedankenmodells vermindern sich Unterschiede der beiden ECF-Systeme, auch wenn beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cnr(YX') und RseA keine signifikanten Ähnlichkeiten auftraten.

Die in dieser Arbeit und von Tibazarwa *et al.* (2000) durchgeführten Topologie-Untersuchungen zur Lokalisation der C-Termini von CnrY bzw. CnrX ergaben, dass diese im Periplasma lokalisiert sind. Denn nur bei Fusionen, bei denen der alkalische Phosphatase-Anteil (PhoA') im Periplasma lokalisiert ist, können sich Disulfidbrücken zwischen den Phosphatase-Molekülen ausbilden, die zu deren Aktivierung führen (Derman und Beckwith, 1991). Desweiteren konnte im *Yeast-Two-Hybrid*-System nachgewiesen werden, dass es zwischen CnrY und CnrX zu einer Bindung kommt. Aufgrund der Lokalisation der Proteine geschieht dies in *R. metallidurans* im Periplasma.

Es erweist sich als vorteilhaft, dass der *Leader* von CnrX nicht abgespalten wird. Zwar besitzt seine Aminosäure-Sequenz ein AXA (AAA)-Motiv, wie es typisch ist als Spaltstelle der Signalpeptidase (Karamyshev *et al.*, 1998). Aber der Vergleich mit NccX, das dieses AXA-Motiv nicht besitzt (Abb. 16), zeigt, dass der periplasmatische *Leader* im X-Protein wahrscheinlich als Membrananker fungiert, ähnlich wie es bei manchen Membran-Fusionsproteinen der Fall ist, so zum Beispiel CzcB (Rensing *et al.*, 1997). Dies wird auch durch die Ergebnisse der Western-Analyse mit CnrX-spezifischen Antikörpern bestätigt, wo keine Prozessierung von CnrX zu beobachten war. Wenn CnrX durch seinen Membrananker von außen an der Membran festsetzt, fällt auch ein Freiheitsgrad in der Diffusion von CnrX im Periplasma weg. Das könnte dazu führen, dass es zwischen dem membrangebundenen CnrX und dem ebenfalls aus der Cytoplasma-Membran ins Periplasma ragenden C-terminalen Teil von CnrY schneller zur Interaktion kommen kann.

Somit kann der CnrYX-Komplex das Signal, das zur Induktion führt, im Periplasma aufnehmen und die Information ins Cytoplasma vermitteln. Interessanterweise befindet sich in der Aminosäure-Sequenz des CnrX-*Leaders* ein sogenanntes *Twin-Arginine*-Motiv (TRRLFLS) wie es ähnlich bei Co-Faktor-beinhaltenden Redox-Proteinen vorkommt. Diese Proteine werden unabhängig vom regulären *sec*-Transport-System ins Periplasma transportiert. Ihr vollständiges *Twin-Arginine-Leader* Konsensus-Motiv lautet S/TRRXFLK. (Santini *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1998). Die entsprechende Sequenz in CnrX (TRRLSLS) weicht in zwei von sieben Positionen vom Konsensus ab. Auch läßt der Vergleich mit NccX, dem dieses Motiv fehlt (Abb. 16), die Hypothese unwahrscheinlich erscheinen, dass CnrX *sec*-unabhängig in den periplasmatischen Raum exportiert wird.

## 4. Diskussion

	1	0+0+0++00000000000000000000000000+0-0000-00-000-0000-00--00-
CnrX		<u>MKSRTRRLSLSTLFGALLGVSVAAAWLYYSHRNEAGHGDLHEILHEAVPLDANEREILE</u>
NccX		<u>MKSRTRRLSVSTLVGALVGLMAIVGVYVTHSTEEPHTSLHEMLHDAVPLDSNEREILE</u>
		***** *:***:***:***:* :* . :* :* * .***:***:*****:*****
	1	0+0+00+00000000000000000000000000--000000-000-0000-00--00-
	61	0+--0000+++0-0+0+0000+00-000+000000-0-0000-0-+000-00+000000
CnrX		LKEDAFQAQRREIETRLRAANGKLADAIKPNPWSPEVEEATQEVERAAGDLQRATLVHV
NccX		LKEEFTARREIESRLRAANGKLAESIKNPQWSPEVEEATREVERAAADLQRATLVHV
		***: *: *****:*****:*****:***** ***** **:***** .*****
	61	0+--000+++0-0+0+0000+00-000+000000-0--00+-0-+000-00+000000
	121	0-0+000+0-0+0000+000-00++000
CnrX		FEMRAGLKPEHRPAYVVRVLIDALRRGSQ
NccX		FEMRAGLKPEHRAAYDRVLVDALKRGSQ
		***** .** ***:***:****
	121	0-0+000+0-0+000-+000-00++000

**Abb. 16: Vergleich der Aminosäuresequenzen von CnrX und NccX.**

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Proteine CnrX und NccX. In der obersten bzw. untersten Reihe ist die Verteilung der Ladungen der entsprechenden Aminosäuren (in CnrX bzw. NccX) dargestellt. Die Reihe unterhalb von NccX gibt die Übereinstimmungen (\*) von Aminosäurepositionen bzw. Ähnlichkeiten (: und .) an. Positionen von Aminosäuren in **fetten** Buchstaben zeigen konservierte Histidine, die Unterstreichung die N-terminale *Leader*-Sequenz und *kursive* Aminosäuren Positionen der gerichteten Mutagenese.

Über das *Yeast-two-Hybrid*-System konnte keine Interaktion zwischen dem CnrYX-Komplex und CnrH nachgewiesen werden. In der Hefe gibt es in der Regel keine translationale Kopplung, daher wird von den *cnrYX*- bzw. *cnrXH*-Konstrukten nur jeweils das erste Gen exprimiert. Jedoch konnte durch diese Konstrukte das positive Interaktions-Ergebnis von CnrY' mit CnrX' bestätigt werden.

Im *E. coli* RseABC- $\sigma^E$ -System ist das Signal, das letztlich zur Freilassung von  $\sigma^E$  führt, wahrscheinlich die Anwesenheit von missgefalteten Proteinen im Periplasma (Ades *et al.*, 1999; Rouviere und Gross, 1996). Der genaue Mechanismus, mit dem es zur Regulierung über RseA kommt, ist bisher nicht bekannt. Es werden jedoch zwei Möglichkeiten diskutiert. I. Es kommt zur Interaktion zwischen RseA und einem Signal-Molekül. Dabei sollen Modifikation, Konformationsänderung oder Änderung des Oligomerisierungszustandes die Zugänglichkeit von RseA für eine proteolytische Spaltung durch die Serin-Protease DegS fördern. Zusätzlich könnte durch die missgefalteten Proteine auch die Protease DegS aktiviert werden und im weiteren RseA abbauen bzw. zerschneiden (Ades *et al.*, 1999). II. Das Signal, das zum RseA-Abbau führt, wird indirekt „gefühl“. Unter Stressbedingungen kommt es in der Zelle zur Erhöhung der Konzentration an missgefalteten Proteinen und damit zu einer Verringerung an freien periplasmatischen Faltungszentren (Chaperonen), wie SurA (Missiakas *et al.*, 1996; Lazar und Kolter, 1996). Dadurch werden sie von RseA wegtitriert, was dieses Protein zugänglich für Proteasen macht. Oder die Chaperone binden unter Nicht-Stress-Bedingungen an die Protease, die für den Abbau von RseA verantwortlich ist (Ades *et al.*, 1999).

Im AlgU-MucABCD-System aus *Azotobacter vinelandii* ist möglicherweise eine Protease Bestandteil des Operons. Dieses Operon spielt eine Rolle bei der Alginat-Synthese bei Umweltstress. (Martinez-Salazar *et al.*, 1996). Der ECF-Sigma-Faktor AlgU wird vom Anti-Sigma-Faktor MucA gebunden. Das letzte Gen des Operons, *mucD*, kodiert für ein Protein das zur HtrA Serin-Protease-Familie gerechnet wird (Lipinska *et al.*, 1988; Lipinska *et al.*, 1990; Martinez-Salazar *et al.*, 1996). Eine ähnliches Arrangement findet man im AlgU-MucABCD-System aus *Pseudomonas aeruginosa* (Boucher *et al.*, 1997), sowie AlgU-ORF1-5 aus *Photobacterium* sp. SS9. Die Induktion dieses Systems unter hohem Druck ermöglicht dem Bakterium das Überleben in der Tiefsee (Chi und Bartlett, 1995).

Andere ECF-Anti-Sigma-Faktoren werden etwas anders reguliert. Es wird diskutiert, dass im *rse*-System wahrscheinlich eine Protease, DegS, die nicht im gleichen Operon kodiert wird, den Anti-Sigma-Faktor abbaut (Ades *et al.*, 1999). Im *car*-System soll durch Licht der *Photosensitizer* Photoporphyrin IX angeregt werden, was zum Abbau von CarR führt (Gorham *et al.*, 1996). Die Beteiligung einer noch unbekannt Protease an diesem Prozess ist sehr wahrscheinlich (Ades *et al.*, 1999).

Was ist das Signal, das die Induktions-Kette in der *cnr*-Determinante startet? Der CnrYX-Komplex ist unbedingt notwendig für eine induzierbare Regulation. Die Deletionsexperimente mit den  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ -Stämmen zeigten sehr deutlich, dass weder CnrX noch CnrY alleine den Sigma-Faktor CnrH binden können. Da CnrX von außen an der Cytoplasmamembran anheftet, scheidet es von vornherein als Anti-Sigma-Faktor aus. Aber auch CnrY mit seinem cytoplasmatischen N-Terminus agiert alleine nicht als Anti-Sigma-Faktor. Dies konnte zusätzlich auch durch die *Yeast-Two-Hybrid*-Experimente untermauert werden. In Abwesenheit von Metall-Kationen liegt also ein Komplex aus Sigma-Faktor (CnrH) und Anti-Sigma-Faktor (CnrYX) an der Cytoplasmamembran gebunden vor. Soweit gleicht das *cnr*-System wahrscheinlich nicht nur dem RseABC- $\sigma^E$ -System aus *E. coli* (Missiakas *et al.*, 1997; De Las Penas *et al.*, 1997), sondern auch anderen ECF-Systemen aus Gram-negativen Bakterien (Humphreys *et al.*, 1999; Martinez-Salazar *et al.*, 1996). Im MucCBA-AlgU(T)-System aus *Pseudomonas aeruginosa* agiert MucA als Anti-Sigma-Faktor gegen AlgU(T) (Schurr *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). Mutationen in MucA führen zu einer hohen Aktivität von AlgU(T) (Martin *et al.*, 1993; Boucher *et al.*, 1997). Dies führt zu einer starken Alginat-Synthese, die es dem Organismus ermöglicht, sich in Patienten, die an Cystischer Fibrose erkrankt sind, sowohl der Wirkung von Antibiotika, als auch der Immunabwehr zu entziehen (Deretic *et al.*, 1994). Interessanterweise führt hier die funktionelle Deletion des Anti-Sigma-Faktors, wie bei den *cnr*-konstitutiv-Mutanten DN195 und DN176, dazu, dass die Bakterien mit widrigen Umwelteinflüssen besser zurechtkommen (höhere Pathogenität bei *muc* bzw. höhere und erweiterte Metalltoleranz bei *cnr*). Auch bei Stress durch Lichteinwirkung reguliert anscheinend ein gleichartiger Mechanismus die Stressantwort. Im CarQRS-System

aus *Myxococcus xanthus* bindet der Anti-Sigma-Faktor CarR den Sigma-Faktor CarQ bei Dunkelheit. Im Licht kommt es zur Zerstörung von CarR und damit kann CarQ die Transkription initiieren (Gorham *et al.*, 1996).

Die zu beobachtende Übereinstimmung der Interaktion zwischen den ECF-Sigma-Faktoren und ihren Anti-Sigma-Faktoren (Gorham *et al.*, 1996) ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass zwar die ECF-Sigma-Faktoren, nicht aber die Anti-Sigma-Faktor-Proteine Sequenz-Ähnlichkeiten aufweisen. Die *cnr*-Determinante weist sogar hier eine Besonderheit auf, denn es ist von den diskutierten das einzige System, bei dem der Anti-Sigma-Faktor wahrscheinlich aus einem Komplex aus zwei Proteinen besteht.

Als weitere Besonderheit des *cnr*-Systems kann die Anordnung der Gene im Regulationsoperon betrachtet werden. Bei den anderen Systemen liegt folgende Transkriptionsreihenfolge vor: zuerst Sigma-Faktor, gefolgt vom Anti-Sigma-Faktor, und zuletzt weitere Regulatoren, während es bei *cnr* umgekehrt ist. Dadurch werden im *cnr*-System erst beide Teile des Anti-Sigma-Faktors synthetisiert, bevor der Sigma-Faktor translatiert wird. Das führt dazu, dass genug Zeit bleibt, CnrY in die Membran zu integrieren und CnrX ins Periplasma zu exportieren. Sobald die Synthese von CnrH beendet ist, steht der Anti-Sigma-Faktor-Komplex zur Verfügung, an seinem cytoplasmatischen Teil den Sigma-Faktor zu binden. Ein Teil der neugebildeten CnrH-Proteine kann vor der Sequestrierung die Transkription an den *cnr*-Promotoren initiieren. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Versuche mit dem LacZ-Reporter, wo auch im nicht induzierten Zustand ein gewisses Basisniveau an  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu messen war. Bei den Systemen *rse*, *car* oder *muc* wird zuerst der Sigma-Faktor  $\sigma^E$ ,  $\sigma^{CarQ}$  oder  $\sigma^{AlgT(U)}$  synthetisiert (Gorham *et al.*, 1996; Gross, 1996, Chavez und Deretic, 1996) und anschließend durch die translationale Kopplung sofort der Anti-Sigma-Faktor RseA, CarR oder MucA, wobei dessen cytoplasmatisch lokalisierter N-Terminus gleich den Sigma-Faktor binden kann. Der Sigma-Faktor bleibt auch gebunden, während der Anti-Sigma-Faktor in die Membran integriert wird (Gorham *et al.*, 1996). Weitere Proteine der Operons werden zuletzt translatiert.

Unter Nicht-Stress-Bedingungen liegt also ein fertiger CnrYXH-Regulator-Komplex an der Membran gebunden vor, der im Cytoplasma den Sigma-Faktor von der Transkriptionsinitiation mit dem RNA-Polymerase-Core-Enzym abhält. Der periplasmatische Teil des Komplexes steht bereit, das Induktionsignal zu erhalten. Die Art der Interaktion zwischen CnrY und CnrH wurde mittels gerichteter Mutagenese in CnrY untersucht. Für die Interaktion mit CnrH kommt nur der N-terminale Teil von CnrY in Frage (Abb. 17). Es fällt auf, dass die negative Ladung an Position 5 und 6 (Glutamat) auch im NccY-Protein (Abb. 17) konserviert ist (Aspartat, Glutamat). Ebenso konserviert ist die positive Ladung an den Positionen 13 und 14 (Arginin, Lysin in CnrY bzw. Lysin, Lysin in NccY), sowie zwei aufeinander folgende Cysteine an Position 52 und 53. Durch gerichtete Mutagenese wurden die negativ-geladenen Aminosäurereste an Position 5 und 6 durch neutrale, polare Glutamine

ersetzt, die positiv-geladenen in Position 13 und 14 durch neutrale, polare Threonine und die Cysteine in Serine (Abb. 17). Die Mutation der negativen Ladungen hatte keinen signifikanten Einfluss, weder auf die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporters noch auf die Höhe der MIC gegen  $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$ . Hingegen scheinen die positiv geladenen Aminosäuren Arginin<sub>13</sub> und Lysin<sub>14</sub> einen gewissen Einfluss auf die Interaktion zwischen CnrX und CnrY zu haben. Die Mutation zu Threoninen an ihrer Stelle führten zu einer Erhöhung des Grundniveaus der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  im Vergleich zum CnrY-Wildtyp. Diese Mutation führte aber nicht zum totalen Verlust der Bindung zwischen CnrX und CnrY, da die Mutante weiterhin induzierbar blieb.

```

1          00-0--00000++000-00000-00000-0000-000+0000++-00+00000000000
CnrY      MADVEEWLTHARKVTQEASIGVDVTSIQECISAEPQRVLVARRDAWRAICCAAFAALV
NccY      MENIDEWLVQAKKVTYEASREPGLGRIQQRLSREPSQMVLTARHDILRAVCCAALASLV
*  ::::***.::***  ***  .:  **:  :*  **:  *  *.  **  *  **:  ***:  *:  **
1          0-00--00000++000-00+-0000+000+00+-00000000+0-00+00000000000

61         000000+000000-+000000000000000000000000+
CnrY      AFAAINRVATIMLEKPAPTWVATPSAASPFGLLIGK
NccY      AFTAIDRIAVGLYQKQOPTWVAAPSAASPFGLLIGK
**:*:*:*:*  .  :  :*  *****:*****

61         00000-+0000000+000000000000000000000000+

```

**Abb. 17: Vergleich der Aminosäuresequenzen von CnrY und NccY.**

Dargestellt sind die Aminosäuren des Proteine CnrY und NccY. In der obersten bzw. untersten Reihe ist die Verteilung der Ladungen der entsprechenden Aminosäuren (in CnrY bzw. NccY) dargestellt. Die Reihe unterhalb von NccY gibt die Übereinstimmungen (\*) von Aminosäurepositionen bzw. Ähnlichkeiten (: und .) an. Positionen unterstrichener Aminosäuren zeigen konservierte Ladungen von Aminosäureresten an, die gerichtet mutiert wurden. Der Membrandurchgang von CnrY bzw. der potentielle von NccY ist *kursiv* dargestellt.

Für die beiden mutierten Cysteine wurde zwar keine Funktion in der Interaktion zwischen CnrY und CnrX postuliert, aber in vielen Proteinen tragen Cysteine zur Metallbindung bei (Coy *et al.*, 1994; Helmann *et al.*, 1990). In CnrY führt die Mutationen der Cysteine 52, 53 zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität des Proteins. Möglicherweise ist nur die Polarität der Mercapto-Seitengruppen wichtig. Diese Eigenschaft wird von den ebenfalls polaren Hydroxy-Seitenketten des Serins anscheinend hinreichend erfüllt.

Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen zeigen deutlich, dass  $\text{Ni}^{2+}$  das primäre Signal ist, das zur  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ -Expression führt. Auch andere Proteine, wie die Peptidyl-Prolyl *Cis/Trans* Isomerase SlyD, können durch die Bindung von  $\text{Ni}^{2+}$  aktiviert werden (Hottenrott *et al.*, 1997). Die Anhäufung von missgefalteten Proteinen im Periplasma, verursacht durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Kationen, ist wahrscheinlich im *cnr*-System nicht der zur Induktion der Stressantwort führende Vorgang. Dies wird im *rse*-System aus *E. coli* diskutiert, wo es im Periplasma durch Hitzestress zu einer Anhäufung von missgefalteten Proteinen kommen soll, die die Chaperone austitrieren (Ades *et al.*, 1999).

Die Hypothese, dass wirklich eine Metallbindung das primäre Signal ist, das zur Induktion von *cnr* führt, wird von der Aminosäuresequenz von CnrX gestützt. CnrX besitzt zwar keine

Cysteine, aber sechs Histidine, die typisch für eine Nickelbindung sind (Hottenrott *et al.* 1997).

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass für die Überexpression der *cnr*-Regulatoren bewusst nicht ein *His-tag*-System verwendet wurde, bei denen das Protein über Ni<sup>2+</sup>-Agarose (oder ein ähnliches Material) gereinigt wird. Denn selbst bei einem abspaltbaren *His-tag* kann nicht von einer vollständigen Entfernung ausgegangen werden. Ein *His-tag* ist daher bei einem Nickel-Resistenz-System, bei dem Proteine (CnrX) Ni<sup>2+</sup> binden äußerst problematisch. Infolge dessen müssen auch die Experimente von Tibazarwa *et al.* (2000) mit CnrX-*his-tag* kritisch bewertet werden.

Die sechs Histidine in der Aminosäuresequenz von CnrX (Abb. 16) kann man sich in drei Gruppen zu je zwei angeordnet vorstellen. Zusätzlich sind genügend negativ geladene Aminosäurereste über das ganze Protein verteilt, die als dritter Bindungspartner fungieren können (Watt und Ludden, 1998; Rey *et al.*, 1994). Für eine tetraedrische Anordnung des Ni<sup>2+</sup>-Kations (Becker *et al.*, 1998) stehen dann noch weitere negativ geladene Aminosäurereste oder H<sub>2</sub>O-Moleküle zur Verfügung. Deletionsexperimente (Kühnemund, 1999) bewiesen die Wichtigkeit aller sechs Histidine von CnrX für die Ni<sup>2+</sup>-abhängige Induktion von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ . Dabei wurden die Histidine jeweils durch gerichtete Mutagenese einzeln oder in den beschriebenen Zweiergruppen zu Argininen mutiert. Jede Mutation führte zu einer starken Verringerung der Induzierbarkeit (zum Beispiel die CnrX-Mutation H<sub>41</sub>R in Tab. 11). Der einzige signifikante Unterschied dieser Mutanten war, dass die Mutation des Histidins H<sub>31</sub> zu einem konstitutiv erhöhtem Expressionsniveau führte, während alle anderen Mutationen zu einem Absinken der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in etwa auf die Höhe des nicht mit Nickel inkubierten Wildtypes führten und damit auch zur starken Verringerung des Resistenzniveaus (Tab. 12; Kühnemund, 1999).

Mittels *Yeast-Two-Hybrid*-System konnte gezeigt werden, dass die von der Mutation H<sub>31</sub>R verursachte erhöhte  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ -Expression nicht auf eine Behinderung der Interaktion zwischen CnrY und CnrX zurückzuführen war. Möglicherweise täuscht das Arginin an Position 31 eine Ni<sup>2+</sup>-Bindung vor, und CnrX wird dadurch in eine Konformation gebracht, die einem mit Ni<sup>2+</sup> beladenen CnrX ähnlich ist.

CnrX besitzt anscheinend nicht nur eine Affinität für Ni<sup>2+</sup>. Wurde Zn<sup>2+</sup> mit Ni<sup>2+</sup> kombiniert, war die *cnr*-Expression deutlich gegenüber der Induktion nur durch Ni<sup>2+</sup> verringert. Dieser Effekt kann am besten durch eine unspezifische Bindung von Zn<sup>2+</sup> an die Ni<sup>2+</sup>-Bindestellen in CnrX bzw. einen kompetitiven Effekt zwischen Zn<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> an diesen Bindestellen erklärt werden. Interessanterweise führt die Kombination Co<sup>2+</sup> + Ni<sup>2+</sup> zu einem stärkeren prozentualen inhibierenden Effekt der *cnr*-Expression als die Kombination Zn<sup>2+</sup> + Ni<sup>2+</sup>. Das könnte dadurch erklärt werden, dass Co<sup>2+</sup> besser an die Ni<sup>2+</sup>-Bindestellen bindet als Zn<sup>2+</sup> und daher stärker um sie mit Ni<sup>2+</sup> konkurriert. Erstaunlich ist dabei, dass Co<sup>2+</sup> *cnr* zwar schwächer induziert als Ni<sup>2+</sup>, aber dennoch das Potential vorhanden ist, Resistenz gegen höhere

Konzentrationen  $\text{Co}^{2+}$  zu vermitteln, wenn *cnr* optimal induziert ist. Letztlich führt das zu dem erstaunlichen Effekt, dass die Kombination von  $\text{Ni}^{2+}$  mit  $\text{Co}^{2+}$  die MIC gegen  $\text{Co}^{2+}$  erhöht (Tab. 5).

Bei der Arbeit mit CnrX fiel auf, dass in seiner Aminosäuresequenz das Motiv HEILH vorkommt. Das führte zu der Hypothese, dass es sich bei CnrX um eine Protease handeln könnte. Das HEXXH-Motiv ist ein hoch-konserviertes Sequenz-Motiv der  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen Metalloproteasen (Zincine) des Clans1 der Metalloproteasen (Barrett *et al.*, 1998; Stöcker *et al.*, 1995; Jiang und Bond, 1992). Hier binden die beiden Histidine das divalente Kation. Ein weiterer Bindungspartner, Glutamat in der Familie der Gluzincine (Hooper, 1994), Histidin in der Familie der Metzincine (Bode *et al.*, 1992) wozu auch einige Schlangengifte zählen (Bode *et al.*, 1993), bzw. Aspartat in der Familie der Aspzinzine (Fushimi *et al.*, 1999) findet sich in der Regel stromabwärts des HEXXH-Motivs (Rawlings und Barret, 1993). Das Glutamat (E) in HEXXH ist das aktive Zentrum, das für die Aktivierung eines Wassermoleküls sorgt, mit dessen Hilfe es dann zur proteolytischen Spaltung eines Substrates kommt (Barrett *et al.*, 1998; Rudner *et al.*, 1999).

Es gibt noch weitere Gemeinsamkeiten innerhalb der Protein-Sequenzen dieser Proteasen, so kann zum Beispiel das Binde-Motiv erweitert werden: Xaa-Xbb-Xcc-His-Glu-Xbb-Xbb-His-Xbb-Xdd (Xaa hydrophob oder Threonin, Xbb eine ungeladene Aminosäure, Xcc eine beliebige Aminosäure außer Prolin, und Xdd hydrophob) (Barrett *et al.*, 1998). Jedoch existieren zahlreiche Ausnahmen (Le Moual *et al.*, 1993). Diese über das HEXXH-Motiv hinausgehenden Übereinstimmungen in der Sequenz mancher Metalloproteasen konnten bei CnrX nicht beobachtet werden (Abb. 16).

Für die Aktivität in  $\text{Zn}^{2+}$ -Metalloproteasen mit HEXXH-Motiv ist das Glutamat im aktiven Zentrum meistens nötig, immer aber die negative Ladung (Klimpel *et al.*, 1994; Fushimi *et al.*, 1999; Rudner *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob dies in CnrX auch der Fall ist, wurde das Glutamat<sub>42</sub> in ein Aspartat bzw. Glutamin mutiert. Damit sollte folgendes untersucht werden: I. Wenn beide CnrX-Mutantenproteine (CnrX E<sub>42</sub>D bzw. E<sub>42</sub>Q) ihre Funktion verlieren, bestünde eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass CnrX eine HEXXH- $\text{Zn}^{2+}$ -Metalloprotease ist. II. Wenn nur die negative Ladung an Position 42 wichtig ist, sollte die Mutation CnrX E<sub>42</sub>D sich wie der Wildtyp verhalten, während die Mutation CnrX E<sub>42</sub>Q seine Funktion verlieren sollte. Beide Hypothesen konnten nicht bestätigt werden. Sowohl im  $\beta$ -Galaktosidase-Enzymtest als auch bei der Bestimmung der MIC zeigten sich nicht die geforderten Unterschiede zum Wildtyp. Die beobachteten Effekte waren nicht signifikant genug, um dem Glutamat 42 eine herausragende Rolle zuzuweisen. Bei anderen membrangebundenen Metalloproteasen, wie SpoIVFB aus *Bacillus subtilis* führte ein E/Q-Austausch im HEXXH-Motiv zum Aktivitätsverlust, ebenso jede Veränderung der beiden Histidine, während ein E/D-Austausch ohne Einfluss blieb (Rudner *et al.*, 1999). In vielen

weiteren Beispielen von HEXXH-Metalloproteasen führt der E/D-Austausch jedoch zum Verlust der proteolytischen Aktivität (Fushimi *et al.*, 1999; Klimpel *et al.*, 1994).

Andere Zn<sup>2+</sup>-Metalloproteasen (z. B. Metallo-carboxypeptidasen) weisen ein HXXE-Motiv auf (Ostermann *et al.*, 1992). Dieses Motiv kann zweimal in CnrX identifiziert werden H<sub>31</sub>RNE und H<sub>118</sub>VFE (an gleichen Positionen auch in NccX, H<sub>31</sub>STE und H<sub>118</sub>VFE). Die Mutation des Glutamats in einem dieser Motive (H<sub>31</sub>RNE) führte allerdings nicht zum Verlust der Funktion von CnrX und damit der Induzierbarkeit von  $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ , auch wenn die Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Mutanten mit CnrX E<sub>34</sub>D bzw. CnrX E<sub>34</sub>Q geringer war als im Wildtyp und auch die MIC etwas verringert war. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass CnrX als HXXE-Zn<sup>2+</sup>-Protease funktioniert.

Möglich wäre auch, dass in CnrX Ni<sup>2+</sup> die Funktion von Zn<sup>2+</sup> ersetzen sollte und es daher zu den beobachteten Abweichungen im Bindemotiv kommt. Außerdem existieren zahlreiche Beispiele von Metalloproteasen, bei denen nicht Zn<sup>2+</sup>, sondern mehrere Co<sup>2+</sup>-Kationen ein aktivierendes Zentrum bilden (Roderick und Matthews, 1993). Ebenso könnte auch in CnrX Ni<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> an das aktive Zentrum binden. Es gibt aber auch Zn<sup>2+</sup>-Metalloproteasen, die keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen aufweisen (Fricke *et al.*, 1995; Grass *et al.*, 2000c).

Bei HycI, einer sogenannten „Hydrogenase Reife-Endopeptidase“ aus *E. coli*, scheint die Prozessierung des C-Terminus der großen Untereinheit einer Hydrogenase (HycE) Ni<sup>2+</sup>-abhängig zu sein (Rossmann *et al.*, 1995; Rossmann *et al.*, 1994). Das Spalt-Motiv dieses Proteasesubstrates Arg↓Met (Ile, Val, Ala) kommt interessanterweise auch unmittelbar C-terminal des transmembranen Durchgangs von CnrY bzw. NccY vor (Arg<sub>66</sub>Val bzw. Arg<sub>66</sub>Ile; Abb. 17). Möglicherweise wird CnrY von CnrX nach einem ähnlichen Mechanismus prozessiert und dadurch inaktiviert.

In *E. coli* reguliert die Metalloprotease FtsH die Aktivität des Sigma-Faktors  $\sigma^{32}$  (Tomoyasu *et al.*, 1995). In *Bacillus subtilis* wird ebenfalls ein Sigma-Faktor durch eine Metalloprotease reguliert (Rudner *et al.*, 1999).

Da die Deletion der positiven Ladung an den Positionen 42 bzw. 34 keinen messbaren Einfluss auf die Induzierbarkeit von *cnr* hat, muss der Wirkmechanismus von CnrX ein anderer sein. Wenn CnrX eine ungewöhnliche Metalloprotease mit Ni<sup>2+</sup> im aktiven Zentrum ist, sollte sich die Bindung von Nickel in CnrX nachweisen lassen. Die Ergebnisse der Atom-Absorptions-Resonanz-Messung des mit Ni<sup>2+</sup>-Kationen beladenen CnrX beweisen, das Nickel wirklich gebunden wird. Die Tatsache, dass pro Molekül CnrX drei Atome Ni<sup>2+</sup> gebunden wurden, korreliert mit der Anzahl der postulierten Bindestellen. Allerdings wird nicht nur Ni<sup>2+</sup> gebunden, sondern auch Zn<sup>2+</sup> bindet fast ebenso gut. Außerdem konkurriert Zn<sup>2+</sup> mit Ni<sup>2+</sup> um die Metallbindestellen, wie die Expression des LacZ-Reporters in Anwesenheit beider Kationen zeigte.

Bislang sind keine Nickel-abhängigen Proteasen bekannt. Es existiert aber eine Familie von  $\text{Ni}^{2+}$ -bindenden Enzymen, die Peptid-Deformylasen, die ebenfalls ein HEXXH-Motiv aufweisen. Die Peptid-Deformylase aus *E. coli* (PDF) nutzt  $\text{Fe}^{2+}$  im aktiven Zentrum. Interessanterweise ist die  $\text{Zn}^{2+}$ -Form nahezu inaktiv, während die  $\text{Ni}^{2+}$ -Form nur eine minimale Reduktion in der Aktivität gegenüber dem Eisen-Enzym zeigt (Becker *et al.*, 1998; Groche *et al.*, 1998).

### 4.2. Der Einfluss der *ncc*-Regulatoren auf die *cnr*-Determinante

Die *ncc*-Determinante aus *Achromobacter* (ehemals *Alcaligenes*) *xylosoxydans* 31A (Yabuuchi *et al.*, 1998) vermittelt eine Resistenz gegen höhere Konzentrationen an  $\text{Ni}^{2+}$ -Kationen als die *cnr*-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34, obwohl beide Systeme sehr ähnlich sind (Schmidt und Schlegel, 1994). Das kann mehrere Gründe haben. I. Die Efflux-Pumpe (der CBA-Komplex) ist im *ncc*-System effektiver als die von *cnr*, d.h. die Transportleistung ist höher. II. Das NccN-Protein führt durch einen unbekanntem Mechanismus zur Steigerung der Nickelresistenz. III. Die Induktion von *ncc* führt zu einer stärkeren Expression des Efflux-Komplexes, weil die Regulatoren eine stärkere Transkriptionsrate verursachen. Die Möglichkeiten II. und III. wurden in dieser Arbeit untersucht. Möglichkeit I. wird ebenfalls in der Arbeitsgruppe zur Zeit bearbeitet (Legatzki, nicht veröffentlicht). Um den Einfluss von NccN auf die Ausprägung der Nickelresistenz in *cnr* zu untersuchen, wurde es unter den konstitutiven *lac*-Promotor in pVDZ'2 (Deretic *et al.*, 1987; Legatzki, 1998) *in trans* zum *cnr*-System im Stamm AE126(pMOL28, pDNA340) gebracht. Die Bestimmung der MIC zeigte keinen Unterschied zum Kontrollstamm AE126(pMOL28). Die Deletion von *nccN* in *A. xylosoxydans* 31A führt also zwar zur Verringerung der Nickelresistenz (Schmidt und Schlegel, 1994), jedoch kann die Co-Expression von NccN in *cnr* das Resistenzniveau nicht erhöhen.

Die Überprüfung, ob die NccYXH-Regulatoren zur hohen *ncc*-vermittelten Nickel-Resistenz führen, wurde in mehreren unabhängigen Experimenten untersucht. Alle diese Experimente waren indirekter Natur, da in Derivaten von *R. metallidurans* gearbeitet wurde. Von Schmidt und Schlegel (1994) wurde beobachtet, dass ein 14.5 kb *Bam*HI-Fragment aus dem Megaplasmid pTOM9 mit der vollständigen *ncc*-Determinante, in *R. metallidurans* AE104 eine hohe aber konstitutive Nickel-Resistenz-Ausprägung verursacht, während die Nickel-Resistenz in *A. xylosoxydans* 31A induzierbar ist. Dieser Effekt könnte von einem noch unbekanntem Wirkmechanismus von NccN herrühren. Wahrscheinlicher ist aber, dass es beim Transfer der *ncc*-Megaplasמידe von *A. xylosoxydans* in *R. metallidurans* durch die Selektion auf Nickel zu einer Mutation in *nccY* kam. Dies sollte wie in *cnr* zur Ausprägung eines konstitutiven Phänotypes führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass mindestens ein weiterer

Regulator „NccR“ existiert, der außerhalb des 14.5 kb *Bam*HI-Fragmentes kodiert wird, wie es von Schmidt und Schlegel (1994) diskutiert wird. Allerdings ließ sich ein DNA-Fragment nur mit der *cnr*-Determinante sogar induzierbar in *Ralstonia eutropha* H16 (Liesegang, 1994) und N9A (Siddiqui *et al.*, 1988) exprimieren. Aufgrund der großen Übereinstimmung von *cnr* und *ncc* erscheint die Hypothese eher unwahrscheinlich, dass ein weiterer, unbekannter Regulator notwendig ist.

Möglicherweise führen aber die *ncc*-Regulatoren im *cnr*-System zu einer Veränderung der *cnr*-Expression. Um die Wirkung von NccYXH im *cnr*-System zu untersuchen, wurde *nccYXH in trans* im *cnrYXH*-Deletionsstamm exprimiert. Dabei war keine nickelabhängige Expression von  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$  zu beobachten und auch das Resistenzniveau gegen NiCl<sub>2</sub> gleich dem der *cnrYXH*-Deletionsmutante. Außerdem kam es zu einer Inhibierung der  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ -Expression, wenn NccYXH im Wildtyp co-exprimiert wurde.

Durch die Arbeit von Kühnemund (1999) und eigene Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer irreversiblen Bindung der Anti-Sigma-Faktor-Komponenten untereinander oder mit den Sigma-Faktoren kam. Das Hybrid-Konstrukt NccYX-CnrH im *cnrYXH*-Deletionsstamm war weiterhin durch Ni<sup>2+</sup> induzierbar, wenn auch die Höhe der Expression niedriger war als im Kontrollstamm DN190(pMOL28-3  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ}) \Delta\textit{cnrYXH}$ , pDNA291) mit *cnrYXH*. Dieser Unterschied lässt sich jedoch damit erklären, dass die Translations-Kopplung zwischen *nccX* und *cnrH* durch das Einfügen von zusätzlichen Basenpaaren für die Klonierung gebrochen wurde. Somit erfolgte die Synthese der Regulatoren nicht mehr im stöchiometrischen Verhältnis.

Vielmehr ist es der ECF-Sigma-Faktor NccH, der die *cnr*-Promotoren effektiv blockiert (Kühnemund, 1999). Vermutlich kann der NccH-RNA-Polymerase-Holoenzym-Komplex die -35 Region der *cnr*-Promotoren erkennen und es kommt zur Ausbildung des geschlossenen binären Komplexes zwischen dem RNAP-Holoenzym und dem Promotor. Da die -10 Region der *cnr*- und *ncc*-Promotoren mehr voneinander abweichen, als die stärker konservierten -35 Regionen (Abb.15), könnte im weiteren der offene binäre Komplex nicht ausgebildet werden. Es fällt auf, dass die letzte Base im Konsensus-Motiv ccgtata der *cnr*-Promotoren eine andere ist als die der -10 Region der postulierten *ncc*-Promotoren c/acgtatg/t. Zusätzlich ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen CnrH und NccH aufschlussreich. In ECF-Sigma-Faktoren wird ein bestimmter Abschnitt der Aminosäure-Sequenz (die Region 2.4) für die Erkennung der -10 Region verantwortlich gemacht (Lonetto *et al.*, 1994). Abbildung 18 zeigt einen Vergleich der 2.4 Region von CnrH und NccH.

```

+0000+0+-00+0++0+0
CnrH      76RIGLNKMRDLYRFRRVRQ93
NccH      76RIGLNKMRDLRRFRQVRH93
+0000+0+-0++0+00+0
*****   ***:***

```

**Abb. 18: Vergleich der Aminosäuresequenzen der ECF-Sigma-Faktoren CnrH und NccH im Bereich der für die -10-Region-Bindung zuständigen Proteinregion 2.4 (Lonetto *et al.*, 1994)**

Dargestellt sind die Aminosäuren des jeweiligen Proteins von Position 76-93. Oberhalb von CnrH bzw. unterhalb von NccH ist die Verteilung der Ladungen der entsprechenden Aminosäuren dargestellt. Die unterste Reihe gibt die Übereinstimmungen (\*) von Aminosäurepositionen bzw. Ähnlichkeiten (: ) an. Positionen unterstrichener Aminosäuren zeigen Unterschiede der Ladung (**fett**) an.

Auffällig ist, dass von den 18 Aminosäuren der 2.4 Region der ECF-Sigma-Faktoren (Lonetto *et al.*, 1994) 15 konserviert sind (Abb. 18). Nur drei sind verschieden, davon zwei hinsichtlich der Ladung ihrer Seitenketten. Das könnte die Unterschiede in der Präferenz der Basen der -10 Region erklären. Mutations-Untersuchungen an dem Sigma-Faktor SigE aus *Bacillus subtilis* zeigten, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure in der Region, die für die Erkennung der -10 Region verantwortlich ist, die Bindung des Initiationskomplexes am Promotor stabilisiert. In Folge dessen ist E<sup>SigE</sup> unfähig die Transkription zu initiieren (Jones und Moran, 1992). Es ist möglich, dass NccH an den *cnr*-Promotoren ähnlich inhibierend wirkt und aus diesem Grund nicht CnrH ersetzen kann.

In *Bacillus subtilis* wird die Expression bestimmter Gene zu unterschiedlichen Zeiten durch einen der beiden ECF-Sigma-Faktoren SigW bzw. SigX kontrolliert. Teilweise überlappen die -35 und -10 Regionen für beide Sigma-Faktoren vor den zu transkribierenden Genen. Die Verhinderung der Expression durch den falschen Sigma-Faktor zur falschen Zeit wird unter anderem durch Unterschiede in der -10-Region verursacht (Huang *et al.*, 1998; Huang und Helmann, 1998; Huang *et al.*, 1999). SigW bevorzugt CGTa, während SigX CGaC (kleine Buchstaben bezeichnen nicht absolut spezifizierte Basen) bevorzugt. Interessanterweise werden -10-Regionen mit der Sequenz CGTC von beiden Sigma-Faktoren erkannt (Huang *et al.*, 1998). Wie im Falle CnrH/NccH können auch bei anderen ECF-Sigma-Faktor-Systemen sehr ähnliche ECF-Sigma-Faktoren aus verwandten Organismen, zum Beispiel der ECF-Sigma-Faktoren HrpL aus *Pseudomonas syringae*, die Funktion des nativen Sigma-Faktors HrpL aus *Erwinia amylovora* nicht übernehmen (Wei und Beer, 1995). HrpL ist an der Transkription von Genen beteiligt, die in der Wirtspflanze eine hypersensitive Reaktion auslösen (Kim *et al.*, 1997).

Aufschlussreicher für die Aufklärung der Frage, warum die *ncc*-vermittelte Ni<sup>2+</sup>-Resistenz höher ist als die von *cnr*, war die Erkenntnis, dass in *A. xylosoxydans* 31A zwei Kopien des *ncc*-Systems vorliegen (Schmidt und Schlegel, 1994), während nur ein *cnr*-System in *R. metallidurans* vorkommt. Wenn im Stamm DN177(pMOL28-2  $\Phi$ (*cnrCBA-lacZ*), pDNA291) die *cnr*-Regulatoren *in trans* zu der vollständigen *cnr*-Determinante exprimiert werden, konnte bei der Bestimmung der MIC ein Anstieg im Vergleich zum Wildtyp

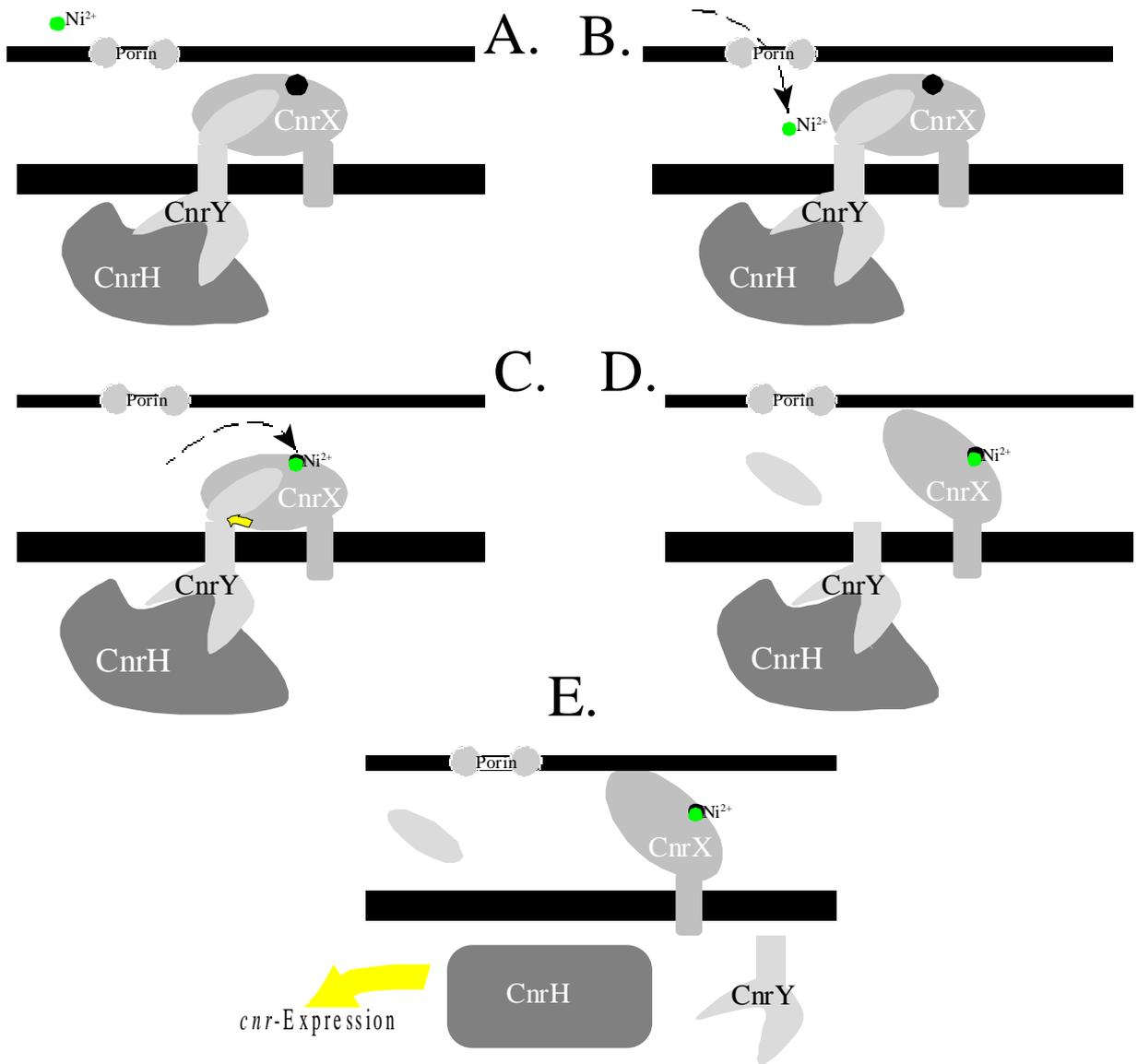
beobachtet werden. Dies ist sicher eine gute Erklärung dafür, wie es zu einer sehr hohen Nickel-Resistenz im *A. xylosoxydans* 31A-Wildtyp kommt. Es kann aber nicht erklären, warum die *ncc*-vermittelte Nickel-Resistenz in *R. metallidurans* AE104 höher ist (Schmidt und Schlegel, 1994) als die von *cnr*.

### 4.3. Aktuelles Modell der *cnr*-Regulation

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte ein Modell der Induktion der *cnr*-Determinante abgeleitet werden. In Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$  liegt ein Anti-Sigma-Faktor-Komplex aus CnrY+X gebunden an der Cytoplasmamembran vor (Abb. 19A). Möglicherweise ist eine *Coil-Coil*-Struktur, die mittels Computeranalyse in CnrX identifiziert werden konnte, für diese Interaktion verantwortlich. Der C-terminale Teil von CnrX ragt ins Periplasma, der N-terminale Teil von CnrY befindet sich im Cytoplasma und bindet dort den ECF-Sigma-Faktor CnrH (Abb. 19A). Durch eine enge translationale Kopplung werden die entstehenden Proteine in einem stöchiometrischen Verhältnis in der Transkriptions-/Translationsreihenfolge CnrY-CnrX-CnrH gebildet. Obwohl dabei CnrH als letztes Protein des Operons exprimiert wird und von dem zu diesem Zeitpunkt bereits vorliegenden CnrYX-Anti-Sigma-Faktor-Komplex sequestriert werden könnte, vermag ein geringer Anteil des neusynthetisierten CnrH erneut die Transkription initiieren. Somit steht immer eine gewisse Anzahl des CnrYXH-Komplexes bereit.

Sobald  $\text{Ni}^{2+}$  durch die Porine der äußeren Membran in den periplasmatischen Raum gelangt, wird es vom periplasmatischen Teil von CnrX über dessen Histidine gebunden (Abb. 19 B, C). Dadurch kommt es wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung und zur CnrX-vermittelten Proteolyse von CnrY und damit zur Freilassung von CnrH (Abb. 19 C, D). Während die  $\text{Ni}^{2+}$ -Kationen über das CorA-System ins Zellinnere gelangen, zerfällt der CnrYXH-Komplex. Der Sigma-Faktor CnrH bindet das RNA-Polymerase-Core-Enzym. Das RNAP-Holoenzym  $E^{\text{CnrH}}$  kann an die *cnr*-Promotoren *cnrYp* bzw. *cnrCp* binden und die Transkription initiieren (Abb. 19 E). Jetzt werden zum einen der CBA-Efflux-Komplex gebildet, der die toxischen Kationen entgiftet, zum anderen werden weitere CnrYXH-Komplexe synthetisiert.

Wie in den LacZ-Reporterexperimenten gezeigt wurde, war die Zunahme der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nach Nickel-Induktion linear für mindestens vier Stunden. Bei bis zu 0.5 mM  $\text{Ni}^{2+}$  war die Steigung dieser Zunahme eine Funktion der Nickel-Konzentration. Die Zunahme der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität konnte mittels Sättigungs-Kinetik als Lineweaver-Burk-Blot beschrieben werden. Der Regressions-Koeffizient war 1.0, die maximale Zunahme der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nach Nickel-Induktion war 94.8 U/h x mg (Trockengewicht), und die Nickel-Konzentration, die für die Halb-Maximale Induktion benötigt wurde, war 49  $\mu\text{M}$ .



**Abb.19: Aktuelles Model der *cnr*-Regulation.**

In Abwesenheit von Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) liegt ein Sigma-Faktor/Anti-Sigma-Faktor-Komplex aus dem periplasmatischen Nickel-Sensor-Protein CnrX, dem Membranprotein CnrY und dem ECF (*Extracytoplasmic Function*) Sigma-Faktor CnrH an die Cytoplasmamembran gebunden vor. Die Bindung von CnrH verhindert die Initiation der Expression der CBA-Efflux-Pumpe (A). Gelangt  $\text{Ni}^{2+}$  über die Porine der äußeren Membran in den periplasmatischen Raum wird dieses von CnrX über dessen Histidine gebunden (B), es kommt zur Konformationsänderung (C), Spaltung von CnrY (D) und damit zur Freilassung von CnrH. CnrH kann die Expression von *CnrCBA* und *CnrYXH* initiieren (E) und das Zellinnere wird entgiftet.

#### 4.4. Interaktion von Proteinen der Efflux-Komplexe der Resistenzsysteme *cnr*, *czc* und *ncc*

Die zentralen am Efflux der bakteriellen CBA-Schwermetall-Transport-Systeme beteiligten Proteine sind sich sehr ähnlich (Abb. 2). Das gilt insbesondere für die Proteine CnrA, CzcA (plasmid-kodierte Cobalt-Nickel- bzw. Cobalt-Zink-Cadmium-Resistenz aus *Ralstonia metallidurans* CH34, Liesegang *et al.*, 1993; Tseng *et al.*, 1999), NccA (plasmid-kodierte Nickel-Cobalt-Cadmium-Resistenz aus *Achromobacter xylosoxydans* 31A, Schmidt und Schlegel, 1994), CzcA (chromosomal-kodierte Cadmium-Zink-Resistenz aus *Pseudomonas aeruginosa* CMG103, Hassan *et al.*, 1999), SilA (plasmid-kodierte Silber-Resistenz aus *Salmonella typhimurium*, Gupta *et al.*, 1999) und AgrA (chromosomal-kodierte Silber-Resistenz aus *E. coli*, Franke *et al.*, eingereicht; Franke, 1999). Für die Proteine der zugehörigen Membran-Fusions-Proteine (MFP) (zum Beispiel CnrB, CzcB und NccB) bzw. *Outer Membrane* (OMF) Faktoren (zum Beispiel CnrC, CzcC und NccC) gilt das nur in geringerem Maße. Während die A-Pumpenproteine mittlerweile gut charakterisiert sind (Sensfuß und Schlegel, 1988; Juhnke, 1997; Legatzki, unveröffentlicht) und teilweise auch schon ihre Funktion *in vitro* rekonstituiert werden konnte (Goldberg *et al.*, 1999; Franke unveröffentlicht; Legatzki, unveröffentlicht), ist trotz großer Anstrengungen noch immer wenig über die genau Funktion der Membran-Fusions-Proteine sowie der *Outer Membrane* Faktoren bekannt. Die bisherige Vorstellung ging davon aus, dass die Proteine dieser beiden Familien einen Kanal bilden (Lewis, 1994; Saier *et al.*, 1994), der verhindert, dass die vom Pumpen-Protein überreichten Substrate in den periplasmatischen Raum entweichen (Zgurskaya und Nikaido, 1999a; Zgurskaya und Nikaido, 1999b). In den Schwermetall-Resistenz-Systemen sollten sie für die Metall-Substratspezifität verantwortlich sein (Rensing, 1996). Im Czc-System führte zum Beispiel die Deletion des CzcB-Proteins zu einem deutlichen Absinken der Czc- vermittelten Zn<sup>2+</sup>-Resistenz, eine Restresistenz gegen Co<sup>2+</sup> blieb erhalten. Die Deletion von CzcC hatte das Absinken der Resistenz gegen alle drei Substrate zur Folge, am stärksten jedoch gegen Co<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> (Nies *et al.*, 1989; Rensing, 1996). Bei *cnr* führte eine Deletion von CnrC zum fast völligen Verlust der Ni<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> - Resistenz (Liesegang, 1994).

Als problematisch bei diesen Versuchen wird die Versuchsanordnung angesehen. Die deletierten Genregionen wurden im Weit-Wirtsbereich-Plasmid pVDZ'2 (Deretic *et al.*, 1987) im Plasmid-freien *R. metallidurans*-Derivat AE104 exprimiert. Das führt einerseits zu einer Veränderung der Kopienzahl gegenüber dem Wildtyp, zum anderen stehen ein Teil der Mutanten-Determinanten unter der Kontrolle eines Plasmid-Promotors, der nicht denen der Schwermetall-Determinanten entspricht.

Wenn das CzcA-Protein alleine im plasmidfreien Stamm *R. metallidurans* AE104 exprimiert wird, führt das zu einer geringen aber signifikanten Erhöhung der Resistenz gegenüber Zn<sup>2+</sup>-

und  $\text{Co}^{2+}$ -Kationen im Vergleich zur plasmidfreien Kontrolle (Rensing *et al.*, 1997). Wird CnrA alleine exprimiert, sinkt die Nickelresistenz auf ein Fünftel des Wildtypes, aber deutlich über die der Plasmid-freien Kontrolle AE104 (Liesegang, 1994).

Um die Probleme der früheren Mutanten-Konstrukte zu umgehen, wurden in dieser Arbeit gerichtete Deletionsmutationen direkt auf dem Megaplasmid pMOL28 konstruiert. Das hatte den Vorteil, dass weder die Kopienzahl verändert, noch in die Translations-Kopplung eingegriffen wurde. Außerdem konnten durch die Deletion auf pMOL28 *in trans*-Komplementationsexperimente durchgeführt werden. Für diese Deletions-Experimente diente die konstitutive Mutante DN195 als Ausgangsstamm, da hier die Expression der Rest-Determinante unter immer gleichen Bedingungen erfolgte.

Wie erwartet, zeigte sich, dass die Doppel-Deletion der beiden Gene *cnrCB* einen größeren Einfluss auf die Resistenzausbildung hatte, als die jeweilige Einzeldelationen. Hier wurde deutlich, wie wichtig die gewählte Konstruktion der Deletions-Mutanten war. Bei der Expression verkürzter *cnr*-Fragmente (*cnrBA* bzw. *cnrA*) auf Plasmid pVDZ'2 war kein Unterschied zwischen der *cnrC*- und der *cnrCB*-Deletion zu beobachten (Liesegang, 1994). Interessanter war jedoch, dass mit Absinken der Nickel-(Cobalt)-Resistenz auch die von dem konstitutiven Stamm DN195 vermittelte  $\text{Zn}^{2+}$ -Resistenz verloren ging. Die Ergebnisse der Einzel- und Doppel-Mutations-Analysen ließen jedoch, im Gegensatz zu den bei *czc*-gewonnen Daten (Rensing, 1996), nicht den Schluss zu, dass CnrC bzw. CnrB für je ein anderes Substrat ( $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$ ) die Höhe der Resistenz festlegt.

Dadurch stellte sich die Frage, ob die Membran-Fusions-Proteine bzw. *Outer Membrane* Faktoren überhaupt für eine Festlegung der Substratspezifität der jeweiligen Systeme *cnr*, *czc* bzw. *ncc* verantwortlich sein können. Ist das der Fall, müssten die Proteine nicht nur in ihrer Funktion austauschbar sein, vielmehr sollte sich bei diesem Austausch auch das Substratspektrum ändern.

Die Ergebnisse der *in trans* Komplementations-Experimente bewiesen deutlich, dass die *cnrC*- bzw. *cnrB*-Einzeldelationen relativ gut durch *cnrC* bzw. *cnrB* komplementiert werden konnten, wenn auch das Resistenzniveaus des Wildtypes nicht erreicht wurde. Das lässt sich aber dadurch erklären, dass durch die Expression *in trans* die im Wildtyp vorhandene starke translationale Kopplung gebrochen wurde und so der Efflux-Komplex nicht stöchiometrisch synthetisiert werden konnte. Entscheidender jedoch war, dass sowohl CzcC als auch NccC in der Lage waren, die Funktion von CnrC zu übernehmen. Die  $\Delta$ *cnrB*-Mutante DN412 hingegen ließ sich zwar gut durch *cnrB* komplementieren, nicht aber durch *czcB*. Die Komplementation mit *nccB* führte nur zu einer minimalen Erhöhung der MIC gegen Cobalt, nicht aber gegen Nickel. Die Komplementation mit *czcB* vermittelte auch keine Erhöhung der MIC gegen Zink. Interessanterweise ergab die *in trans* Komplementation der Doppelmutante  $\Delta$ *cnrCB* mit *nccCB* eine etwas höhere Resistenzprägung gegen  $\text{Co}^{2+}$  als die Komplementation mit *cnrCB*. Wieder führte die Komplementation mit dem *czc*-Derivat *czcCB* weder zu einer

Steigerung der Resistenz gegen  $\text{Ni}^{2+}$  bzw.  $\text{Co}^{2+}$  gegenüber der *cnrCB*-Deletionsmutante DN413, noch wurde eine messbare  $\text{Zn}^{2+}$ - bzw.  $\text{Cd}^{2+}$ -Resistenz-Erhöhung vermittelt.

Es lässt sich also im Gegensatz zu (Rensing 1996) feststellen, dass in den untersuchten Schwermetall-Resistenz-Systemen *cnr*, *czc* bzw. *ncc* wahrscheinlich nicht die Membran-Fusions-Proteine oder die *Outer Membrane* Faktoren für die primäre Festlegung der Substratspezifität verantwortlich sind. Die Ergebnisse lassen vielmehr den Schluss zu, dass eine vom RND-Pumpenprotein vermittelte Grundresistenz gegen ein bestimmtes Schwermetall-Kation durch OMF und MFP gesteigert wird. Auch bei Antibiotika-transportierenden Systemen konnte ein ähnliches Ergebnis erhalten werden. So führt in *Pseudomonas aeruginosa* der Austausch der Komponenten des MexEF-OprN-Systems (OprN) mit denen des MexAB-OprM-Systems (OprM) ebenfalls nicht zu einer Änderung des Substratspektrums. Demgegenüber verhalten sich aber die Kombinationen MexAF bzw. MexEB sogar wie MexEF-, MexAB-Deletionsmutanten (Maseda *et al.*, 2000; Yoneyama *et al.*, 2000).

Die mit den Kombination der Cnr-, Czc-, bzw. Ncc-Proteine gewonnenen Ergebnisse untermauern das Konzept des *Transenvelope*-Transportes (Saier *et al.*, 1994; Dmitriev *et al.*, 1999). Sein Mechanismus ist der Transport vom Cytoplasma über beide Membranen der Gram-negativen Zelle ins Außenmedium. Dabei würde CnrA, CzcA bzw. NccA als zentralen Pumpen-Proteinen die Aufgabe zukommen, die Metall-Kationen, die sie anschließend transportieren, im Cytoplasma zu binden (Rensing *et al.*, 1997). Durch seinen *Leader* wird CzcB ins Periplasma exportiert (Rensing *et al.*, 1997). Dabei ist für die Funktion von CzcB entscheidend, dass der *Leader* nicht abgespalten wird und das Protein infolge dessen Kontakt zu der Cytoplasma- als auch zu der äußeren Membran aufnehmen kann (Rensing *et al.*, 1997). Ein Modell von Johnson und Church (1999) postuliert einen Interaktions-Komplex aus je zwei MFP-Proteinen und drei OMF-Proteinen, der das Periplasma durchspannt.

In früheren Experimenten waren in der T7-Expression für CzcC zwei Größen, von 44 bzw. 42 kDa, nachgewiesen und eine N-terminale Prozessierung postuliert worden (Nies *et al.*, 1989; Rensing *et al.*, 1997). Bei anderen OMF-Proteinen wie OprK werden in der T7-Expression ebenfalls zwei Banden beobachtet (Poole *et al.*, 1993). In dieser Arbeit konnte zum einen die Prozessierung von CzcC bestätigt werden, zum anderen war es möglich, die genaue Position der Spaltung zu bestimmen. Diese Position zeigt ein AXA-Motiv ( $\text{AVA}_{26}$ ), wie es typisch für eine Prozessierung durch die LspA Signal-Peptidase ist (Pugsley, 1993). Dieser Unterschied zu Proteinen mit Membrananker wie CnrX, ermöglicht dem CzcC-Protein die postulierte Positionierung an der äußeren Membran. In Übereinstimmung dazu besitzen sowohl CnrC als auch NccC ein AXA-Motiv an Position 30 (AEA, CnrC und NccC) bzw. ein GXA-Motiv an Position 16 (GSA in CnrC, bzw. GVA in NccC). Allerdings muss die Spaltung noch nachgewiesen werden, denn Schmidt und Schlegel (1994) konnte zwar *nccC* mittels T7-Expression nachweisen, jedoch keine Prozessierung, während Liesegang *et al.* (1993) mittels

T7-Expression keine mit CnrC korrelierende Banden identifizieren konnte. Bei OprK, einem anderen Mitglied der OMF-Familie, befindet sich in der Aminosäuresequenz im Anschluss an den periplasmatischen *Leader* ein Signal-Motiv, die Lipoprotein-Box. Hier wird das N-terminalen Cystein nach der LspA-vermittelten Spaltung modifiziert (Pugsley, 1993). Dadurch erfolgt eine Assoziation an die äußere Membran. CnrC, CzcC bzw. NccC besitzen kein Cystein am Ende des (potentiellen) *Leaders*. Aus diesem Grund sollte hier ein anderer Mechanismus vorliegen. Die Schwermetall-*Outer-Membrane* Faktoren (im Besonderen CzcC) werden zur Zeit von Legatzki genauer charakterisiert (Legatzki, unveröffentlicht).

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der untersuchten Metall-Efflux-Systeme ist sehr wahrscheinlich, dass die für Czc nachgewiesenen Funktionen auch für Cnr bzw Ncc gelten dürften.

### 4.5. Die Region stromabwärts von *cnrCBA*

Die *cnr*-Determinante ist im Gegensatz zur ähnlichen *czc*-Determinante sehr einfach organisiert. Während die Expression der Cnr-CBA-Efflux-Pumpe anscheinend nur von drei Regulatoren reguliert wird, musste die Anzahl der *czc*-Regulatoren im Laufe der letzten Jahre von ursprünglich zwei (Nies, 1992) auf bisher mindestens sechs erhöht werden (Große *et al.*, 1999). Das ursprüngliche 8.5 kb *EcoRI-PstI-cnr*-Fragment, vermittelte in den Klonierungsexperimenten von Liesegang *et al.* (1994) in *Ralstonia metallidurans* AE104 die gleiche induzierbare Resistenz gegen Ni<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> wie der Wildtyp AE126. Die von den Genen *cnrYXHCBA* kodierten Proteine sollten also für die vollständige Resistenzausprägung ausreichen. Auffällig war dennoch, dass die beiden ähnlichsten Systeme *ncc* und *czc* jeweils ein *nccN*- bzw. *czcN*- Gen besitzen (Schmidt und Schlegel, 1994; Diels *et al.*, 1995, Große *et al.*, 1999), während dies für *cnr* bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte. In der *ncc*-Determinante führt die Deletion von *nccN* zu einem Absinken der Nickel-Resistenz (Schmidt und Schlegel, 1994). Im *czc*-System konnte CzcN bislang noch kein Phänotyp zugeordnet werden.

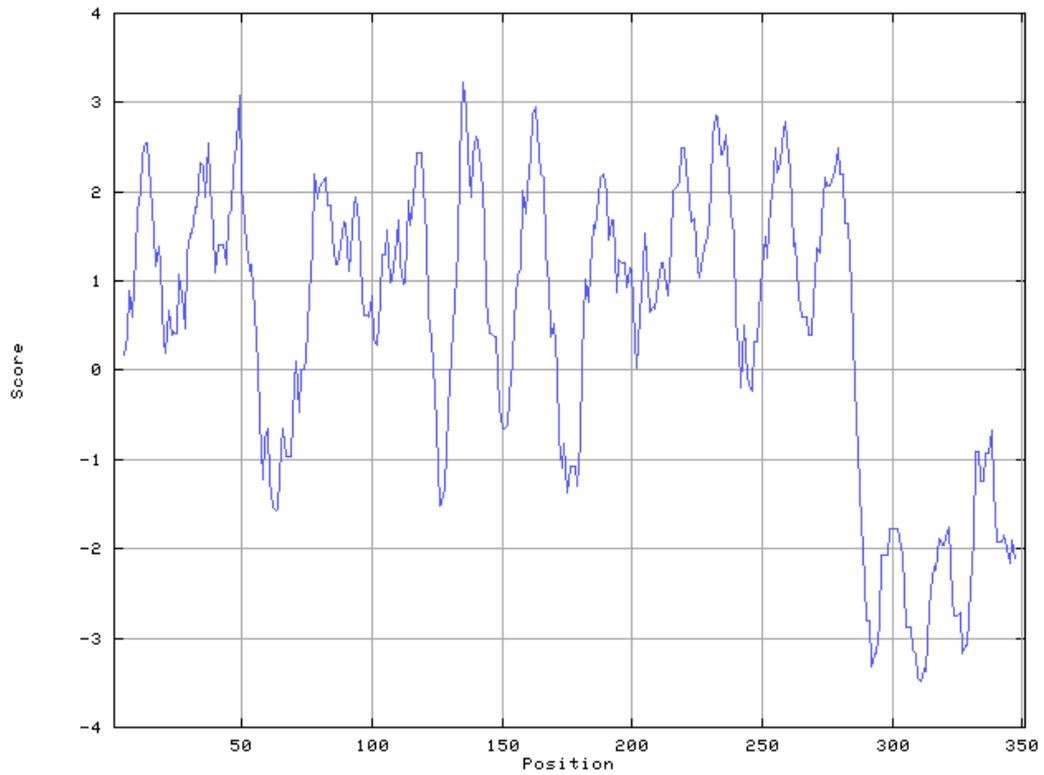
Der stromaufwärts von *cnrY* kodierende DNA-Bereich kann nicht der *cnr*-Determinante zugeordnet werden, da die Ergebnisse von RT-PCR-Experimenten nachgewiesen haben, dass kein gemeinsames Transkript von *cnrY* mit der stromaufwärtsgelegenen Sequenz existiert (Grass *et al.*, 2000) und stromaufwärts der *EcoRI*-Schnittstelle die Chromat-Resistenz-Determinante *chr* kodiert wird (Nies *et al.*, 1990, Peitzsch, 1999). Interessanterweise deuteten die RT-PCR-Experimente an, dass sich die Transkription stromabwärts über *cnrA* fortsetzt (Grass *et al.*, 2000). Aus diesen Gründen sollte der sich stromabwärts von *cnrA* befindende DNA-Bereich auf das Vorhandensein eines „*cnrN*“-Gens hin durchsucht werden. Arbeiten von Kühnemund (1999) ergaben, dass sich ein stromabwärts von *cnrA* befindlicher offener

Leserahmen *ORF104ff (cnrT)* (Grass *et al.*, 2000) über die *PstI*-Schnittstelle fortsetzt. Weiterhin konnten in einem ca. 4.3 kb DNA-Bereich bis zu der nächstfolgenden *XbaI*-Schnittstelle (Collard *et al.*, 1993; Liesegang *et al.*, 1993) das Gene einer Transposase (*tnp*) (Nakatsu *et al.*, 1991) identifiziert werden (Kühnemund, 1999). Wie im Falle der stromaufwärts von *cnrY* gelegenen *chr*-Determinante sollte stromabwärts mit dem Gen der Transposase die äußere Grenze der *cnr*-Determinante erreicht worden sein.

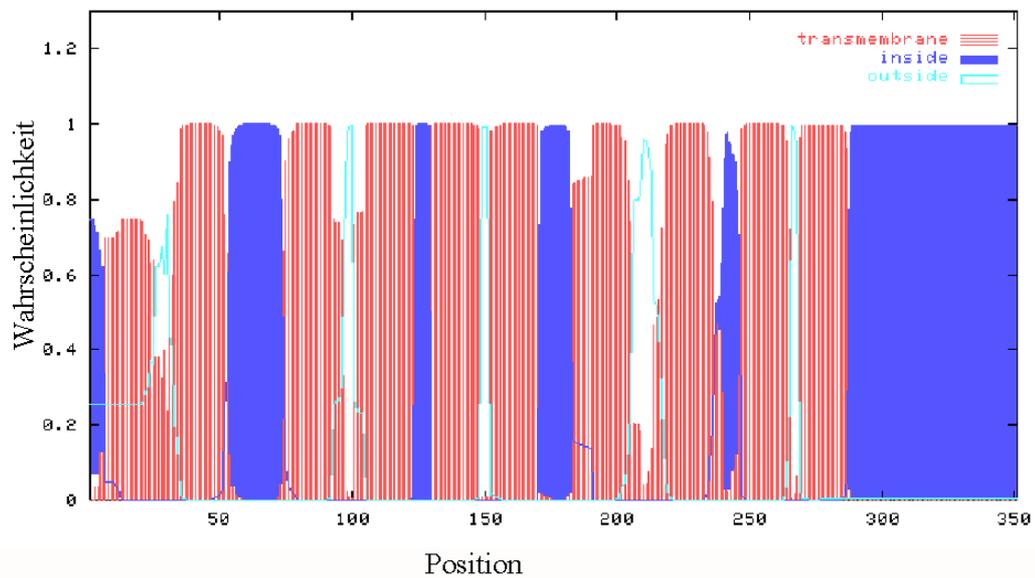
Die doppelsträngige, vollständige Sequenzierung des *PstI-XhoI*-Fragmentes ergab zwar, dass im DNA-Bereich der *cnr*-Determinante kein *cnrN*-Gen existiert, es konnte jedoch ein offener Leserahmen von 1053 bp identifiziert werden. Das sich daraus abgeleitete potentielle Protein (351 aa, ca. 37 kDa) wurde CnrT benannt. Dieses Protein weist in der Internet-gestützten BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1997), sowie bei einem CLUSTALW-Sequenz-Alignment (Thomson *et al.*, 1994) die höchsten Identitäten mit dem putativen Membranprotein SCC57A (311 aa) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (21.1 % Identität, *Accession* AL136519) (Redenbach *et al.*, 1996), dem putativen Membranprotein MTH841 (343 aa) aus *Methanococcus thermoautotrophicum* (19.4 % Identität, *Accession* AE000861) (Smith *et al.*, 1997), und dem Protein YYAM (305 aa) aus *Bacillus subtilis* (18 % Identität, *Accession* P37511) (Ogasawara *et al.*, 1994) auf. Allerdings weicht der C-Terminus von CnrT von denen der drei anderen Proteine völlig ab. Hier befindet sich bei CnrT eine Histidin-reiche Sequenz. Ein ähnlich Histidin-reiches Motiv kommt auch im Protein HypB vor. Dieses ist an der Expression einer Hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum* unter  $\text{Ni}^{2+}$ -Mangelbedingungen beteiligt, ist aber im Gegensatz zu CnrT ein lösliches Protein (Fu *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1997).

Der Hydropathie-Blot nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) lässt für CnrT zehn transmembrane Helices erkennen (nach dem Internet-Programm TMHMM 1.0, Erik *et al.*, 1998; Sonnhammer *et al.*, 1998) (Abb. 20 A, B). Für SCC57A aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurden zehn (nach TMHMM 1.0, Erik *et al.*, 1998), für das Protein YYAM aus *Bacillus subtilis* ebenfalls zehn (Ogasawara *et al.*, 1994) und für MTH841 aus *Methanococcus thermoautotrophicum* elf transmembrane Helices postuliert (Smith *et al.*, 1997). Eine genaue Funktion konnte den Proteinen noch nicht zugeordnet werden, es liegt aber nahe, für CnrT als auch für MTH841 aus *M. thermoautotrophicum* eine Transporter-Funktion zu postulieren (Smith *et al.*, 1997). In dieser Hypothese hätte der Histidin-reiche C-Terminus die Aufgabe ( $\text{Ni}^{2+}$ )-Schwermetall-Kationen zu binden, um sie dann an einen Transport-Kanal weiterzureichen, der von den transmembranen Helices gebildet wird. Ob dies wirklich der Fall ist, müssen weitere Experimente beweisen. Vor allem ist dabei die Frage entscheidend, ob CnrT als eine Efflux- oder Influx-Pumpe funktioniert. Möglicherweise wirkt CnrT der durch CnrCBA-verursachten Verarmung der Zelle an  $\text{Ni}^{2+}$  entgegen, indem es  $\text{Ni}^{2+}$  in die Zelle pumpt und anschließend durch den Histidin-reichen C-Terminus als  $\text{Ni}^{2+}$ -Speicher dient.

A.



B.



**Abb. 20: Hydropathie-Profil des putativen Proteins CnrT nach Kyte und Doolittle (1982) und Wahrscheinlichkeit der Topologievoraussage nach Sonnhammer *et al.* (1998)**

A. Hydropathie-Profil von CnrT. Die Hydrophobie (y-Achse) ist als Funktion der Aminosäure-Position (x-Achse) dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren haben positive, hydrophile negative Werte.

B. Putative Topologie von CnrT

Der Vergleich der Kodonnutzung von *cnrT* mit anderen Genen der *cnr*-Determinante (Liesegang, 1994) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung. Nach Bibb *et al.*, 1984 kann die Kodonnutzung vor allem bei G+C-reichen Bakterien als artspezifisches Merkmal betrachtet werden. Wie auch für Gene der *cnr*-, *chr*- bzw. *czc*-Determinante werden Kodons bevorzugt, die in der dritten Position ein G oder C aufweisen. Ausnahmen von dieser Regel sind TAT (Tyrosin) und CAT (Histidin), wie auch von Peitzsch (1999) für Gene der Chromat-Resistenz- (*chr*) bzw. die *czc*-Determinante beobachtet werden konnte, sowie das Kodon CCA (Prolin). Die Kodons ATA (Isoleucin), ACA (Threonin), CAA (Glutamin), AAA (Lysin) bzw. TGT (Cystein) kodieren in *cnrT* überhaupt nicht, was der Regel entspricht. Abweichend kommt das Kodon TTA (Leucin) in *cnrT* drei mal über die gesamte Sequenz verteilt vor, während es in den Genen der *cnr*-, *czc*- und *chr*-Determinante fast nicht verwendet wird. (Peitzsch, 1999; Große, 1998; Liesegang, 1994). Daher kann nicht wie bei Große (1998) für *czcN* bzw. bei Peitzsch (1999) für *chrD* ein anderes Startkodon angenommen werden. Der G+C-Gehalt des *cnrT*-Genes beträgt 61 % und damit etwas unterhalb des von Taghavi *et al.* (1997) bestimmten G+C-Durchschnittsgehaltes (67 %) für *R. metallidurans* CH34-Gene.

Die postulierte Ribosomenbindestelle von *cnrT* TT<sub>8060</sub>GATT (Eintrag AJ276513, EMBL-Datenbank) weicht von der *E. coli*-Konsensus-Sequenz AGGAGG (Shine und Dalgarno, 1974; Gold *et al.*, 1988) ab und ist daher wahrscheinlich nicht optimal. Ähnlich schwache Ribosomenbindestellen können auch bei anderen Genen der *cnr*-Determinante beobachtet werden, GG vor *cnrX* und *cnrH* bzw. GA vor *cnrC*. Diese nicht optimale Ribosomenbindestelle in Verbindung mit der fehlenden translationalen Kopplung mit *cnrA*, sowie die Nutzung des seltenen TTA-Kodons (Leucin) sprechen dafür, dass das CnrT-Protein schwach exprimiert wird.

Die Haarnadelstruktur <sub>9129</sub>CTTTGCC-N<sub>12</sub>-GGCAAAG zwischen *cnrT* und der stromabwärts in Gegenrichtung kodierten, putativen Transpose, markiert wahrscheinlich das 3'-Ende der *cnr*-Determinante. Möglicherweise ist dieser *Loop* in die Termination der *cnrCBAT*-Transkription involviert. Er besitzt eine freie Energie von -11.4 kJ/mol. Damit und aufgrund fehlender ausgeprägter AT-reicher flankierender Sequenzen kommt diese Sekundärstruktur jedoch nicht als Rho-unabhängiger Terminator (Rosenberg und Court, 1979) in Frage.

Der Kodon-Gebrauch der C-terminalen 309 Aminosäuren der potentiellen Transposase stromabwärts von *cnrT* weicht leicht von der Kodon-Nutzung der *cnr*-Gene ab. Zwar werden in der Regel ebenfalls die Kodons bevorzugt, die an dritter Stelle ein G oder C aufweisen, es kommen aber auch die seltenen Kodons, ATA (Isoleucin) 1 mal, ACA (Threonin) 3 mal, CAA (Glutamin) 6 mal bzw. AAA (Lysin) 2 mal, vor. Nur für die Kodierung von Cystein wird ebenfalls ausschließlich das TGC-Kodon verwendet. Der G+C-Gehalt dieses Teils der putativen Transposase beträgt wie bei *cnrT* 61 %. Eine andere Transposase, die ebenfalls auf pMOL28 kodiert wird, besitzt einen G+C-Gehalt von 64.5 % (Dong *et al.*, 1992). Damit liegen diese neuen Gene ebenso wie die der Durchschnitt der *chr*- bzw. *cnr*-Determinante (64.5 % bzw. 64 %) geringfügig unterhalb des *R. metallidurans* (*Alcaligenes eutrophus*)

CH34- Durchschnittswertes von 67 % G+C (Taghavi *et al.*, 1997). Möglicherweise ist dieser etwas erniedrigte G+C-Gehalt im Vergleich zum Durchschnittswert für die auf Megaplasmid pMOL28 kodierten Gene typisch. Dieser zweite ORF auf dem 1.6 kb *PstI-XhoI*-Fragment weist die höchste Ähnlichkeit (55 %) mit der Transposase vom IS-Element IS1071 in Transposon TN5271 aus *Alcaligenes* sp. BR60 (Nakatsu *et al.*, 1991) auf, sowie zu den Transposasen (jeweils 55 %) aus *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1) (Fukomori und Saint, 1997) bzw. *P. pavonis* (Poelarends *et al.*, 1999).

Es kann also mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass hier das Ende der *cnr*-Determinante erreicht ist. Ein „*cnrN*“-Gen kann zwar nicht ausgeschlossen werden. Wenn es dennoch existiert, muss es aber an einer anderen Stelle auf dem Megaplasmid pMOL28 lokalisiert sein. Realistischer ist aber, dass dieses Gen nicht existiert, denn die „*N*“-Gene in *czc* bzw. *ncc* befinden sich auf den Megaplasmiden in räumlicher Nähe zu den anderen Genen der Determinante.

### 4.6. Ausblick

Die wichtigste, noch zu klärende Frage ist, ob und an welcher Stelle CnrY von CnrX gespalten wird. Dazu muss das Spaltprodukt im weiteren noch ansequenziert werden.

Begonnene Experimente, den Einflusses der Kombinationen verschiedener Metall-Kationen auf die Expression von *cnr* oder auf die Bindung an CnrX zu untersuchen, sollten fortgeführt werden, um die Regulation des *cnr*- (und auch des *czc*-)Systems weiter zu charakterisieren.

Der DNA-Bereich stromabwärts von *cnrA* sollte genauer charakterisiert werden. Vor allem muss geklärt werden, ob der offene Leserahmen von *cnrT* für ein Protein kodiert. Dafür sollte *cnrT* im metallsensitiven *R. metallidurans*-Stamm AE104 exprimiert werden und getestet werden, ob es zur Erhöhung der Minimalen Inhibitor Konzentration gegen Ni<sup>2+</sup> oder andere Metallionen kommt. Das *cnrT*-Gen könnte außerdem im Wildtyp *in Frame* deletiert und die phänotypischen Effekte analysiert werden.

RNA-Experimente sollten klären, ob *cnrT* einen eigenen, unabhängigen Promotor besitzt oder ob nur ein gemeinsames Transkript *cnrCBAT* initiiert wird. Wenn *cnrT* einen eigenen Promotor besitzt könnte ein  $\Phi(\textit{cnrT-lacZ})$ -Reporter konstruiert werden, um zu untersuchen, unter welchen Bedingungen CnrT exprimiert wird. Um das 3'-Ende der *cnr*-Determinante zu ermitteln, sollten RT-PCR-Analysen zeigen, dass kein gemeinsames Transkript zwischen dem Bereich von *cnrT* und dem Transposase-Gen existiert.

Mit den Erfahrungen, die in der Arbeitsgruppe hinsichtlich Protein-Reinigung zur Verfügung stehen, sollte versucht werden, CnrT zu überexprimieren und zu reinigen. Es könnte dann nach Rekonstitution in Proteoliposomen seine Funktion als Transporter für Ni<sup>2+</sup> überprüft werden. Parallel dazu könnte mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie getestet werden, ob und wieviele Ni<sup>2+</sup>-Ionen von CnrT gebunden werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die *cnr*-Determinante von *Ralstonia metallidurans* CH34, die auf dem Megaplasmid pMOL28 lokalisiert ist, vermittelt dem Bakterium Resistenz gegenüber den Schwermetallen Cobalt und Nickel durch einen aktiven Efflux dieser Kationen. Der Kationen-Effluxkomplex wird durch die Strukturgene *cnrC*, *cnrB* und *cnrA* kodiert. Die Regulation der *cnr*-Determinante erfolgt durch eine Anti-Sigma-Faktor Komplex, der aus den Proteinen CnrY und CnrX gebildet wird und dem (ECF) *Extracytoplasmic Function* Sigma-Faktor CnrH. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der *cnr*-Determinante auf molekularem und physiologischem Niveau untersucht, die drei Regulatoren CnrY, CnrX und CnrH charakterisiert und der DNA-Bereich stromabwärts von *cnr* sequenziert. Desweiteren wurde untersucht, inwieweit verschiedene Proteine der Schwermetallresistenzsysteme *cnr*, *czc* und *ncc* in ihrer Funktion austauschbar sind.

1. Die Transkriptionsstartpunkte der *cnr*-Transkripte konnten mittels *Primer Extension* identifiziert werden. Daraus wurden konservierte Promotor-Sequenzen für *cnrYp* und *cnrCp* abgeleitet. Die Aktivität der Promotoren wurde mittels  $\Phi(\textit{cnrYp-lacZ})$ - bzw.  $\Phi(\textit{cnrCp-lacZ})$ -Reporter-Fusionen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Promotor *cnrCp* wichtig ist, da die Integration einer  $\Omega$ -Kassette zwischen *cnrH* und *cnrC* nicht zum Verlust der Induzierbarkeit führte.
2. Die Expression von *cnrCBA* wurde in einer  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ -Operon-Fusion unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  oder Chromat untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) der beste und Cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) ein schwacher Induktor des *cnr*-Systems ist. Andere Metalle induzieren die  $\Phi(\textit{cnrCBA-lacZ})$ -Operon-Fusion nicht spezifisch. Es wurde nachgewiesen, dass die *cnr*-vermittelte Cobalt-Resistenz durch unzureichende  $\text{Co}^{2+}$ -Induktion limitiert wird.
3. Die Regulatorgenregion *cnrYXH* wurde deletiert. Dies führt zum fast völligen Verlust der Cobalt-Nickel-Resistenz, sowie der Induzierbarkeit durch Nickel. Die Deletion ist aber *in trans* komplementierbar. In Komplementationsstudien im *cnrYXH*-Deletionsstamm konnte gezeigt werden, dass für eine induzierbare Nickel-Resistenzausprägung alle drei Regulatoren CnrY, CnrX und CnrH hinreichend und notwendig sind. CnrY (*cnrY*) ist um eine Aminosäure R<sub>44</sub> (GCG) kürzer als veröffentlicht.

4. Es wurde eine konstitutive *cnr*-Mutante konstruiert. Diese Mutante ist *in trans* durch *cnrYXH* und teilweise durch *cnrY* komplementierbar, nicht aber durch *cnrX*, *cnrYX*, *cnrH*, *cnrYH* oder *cnrXH*. Der konstitutive Phänotyp wird durch eine *Frame-Shift*-Mutation in *cnrY* verursacht.
5. Die Regulatoren NccY+X+H aus *Achromobacter xylosoxydans* 31A können die Funktion von CnrY+X+H in der *cnrYXH*-Deletionsmutante nicht komplementieren. Desweiteren verhindert NccH im *cnr*-Wildtyp die nickelabhängige Induktion, vermutlich durch Blockierung des Promotors *cnrCp*. Doch können NccY+X die Funktion von CnrY+X teilweise ersetzen. Der Regulator NccN hat keinen Einfluss auf die Expression der *cnr*-Determinante.
6. Durch PhoA-Fusionen konnte nachgewiesen werden, dass sich die Carboxy-terminalen Enden von CnrY und CnrX im Periplasma befinden. Weiterhin konnte mittels des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems gezeigt werden, dass CnrY und CnrX *in vivo* interagieren.
7. Die Regulatorproteine CnrY, CnrX und CnrH konnten heterolog in *E. coli* überexprimiert und nativ gereinigt werden. Das *Leader*-Peptid von CnrX fungiert als Membran-Anker an der Cytoplasmamembran. CnrY verfügt über einen Membrandurchgang. Dies wirkt bei der Überexpression in *E. coli* toxisch auf die Zellen. Deshalb wurde es als lösliches A<sub>58</sub>E/A<sub>59</sub>R-Mutanten-Protein gereinigt.
8. Es konnte durch *in vitro* Transkription gezeigt werden, dass CnrH als Sigma-Faktor die Transkription von den *cnr*-Promotoren *cnrYp* und *cnrCp* initiieren kann.
9. Gerichtete Mutationen E<sub>5</sub>Q/E<sub>6</sub>Q, R<sub>12</sub>T/K<sub>13</sub>T, C<sub>51</sub>S/C<sub>52</sub>S in CnrY beeinflussen seine Interaktion mit CnrH nur wenig.
10. Gerichtete Mutationen E<sub>42</sub>D, E<sub>42</sub>Q, E<sub>34</sub>D, E<sub>34</sub>Q in CnrX beeinflussen seine Funktion nur wenig. Damit war bewiesen, dass das HEXXH-Motiv in CnrX nicht für die Funktion als katalytisches Zentrum einer Zn<sup>2+</sup>-Metalloprotease notwendig ist. Durch Atom-Absorptions-Spektroskopie konnte bestimmt werden, dass pro Molekül CnrX drei Atome Ni<sup>2+</sup> gebunden werden.
11. Es gibt erste Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass es sich bei CnrX um eine Protease handelt. Dadurch wird wahrscheinlich CnrY Ni<sup>2+</sup>-abhängig von CnrX proteolytisch gespalten.

12. Stromabwärts von *cnrA* wurde ein 1.6 kb *PstI/XhoI*-DNA-Fragment sequenziert. Es konnten zwei offene Leserahmen identifiziert werden: Erstens für ein potentielles Membranprotein, genannt CnrT (351 aa), kodiert in gleicher Transkriptionsrichtung wie *cnrCBA*, zweitens weiter stromabwärts für eine Transposase, in Gegenrichtung kodiert.
13. Die Deletion von *cnrC*, *cnrB* bzw. *cnrCB* führt zur Verringerung der  $\text{Co}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ -Resistenz. Dieser Effekt ist *in trans* durch *cnrC*, *cnrB* bzw. *cnrCB* komplementierbar. Weniger gut komplementierbar sind die Mutanten durch *czcC*, *B*, *CB* bzw. *nccC*, *B*, *CB*. Dabei kommt es nicht zu einer Änderung der Substratspezifität.
14. Der *Outer Membrane Factor* (OMF) CzcC konnte heterolog in *E. coli* überexprimiert und gereinigt werden. Es wurden polyklonale Antikörper gegen CzcC gewonnen. Mit ihnen konnte gezeigt werden, dass das CzcC-Protein in *Ralstonia metallidurans* prozessiert und dabei der *Leader* nach Aminosäure A<sub>22</sub> abgespalten wird.

## 6. LITERATUR

- Ades, S. E., L. E. Connolly, B. M. Alba, und C. A. Gross.** 1999. The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* **13(18)**: 2449-61.
- Akada, R.** 1994. Quick-check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques* **17(1)**: 58.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Angerer, A., S.ENZ, M. Ochs, und V. Braun.** 1995. Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. Fecl belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimuli. *Mol Microbiol* **18(1)**: 163-74.
- Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl, und D. H. Nies.** 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* **181(22)**: 6876-81.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith, und K. Struhl.** 1993. Current protocols in molecular biology. Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.
- Barrett, A. J., und N. D. Rawlings,** MRC Peptidase Laboratory, The Babraham Institute, Cambridge, UK, and **J. F. Woessner,** Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Miami School of Medicine, Miami, USA (Ed.). 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, London.
- Beck, C., R. Marty, S. Klausli, H. Hennecke, und M. Göttfert.** 1997. Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **179(2)**: 364-9.
- Becker, A., I. Schlichting, W. Kabsch, S. Schultz, und A. F. Wagner.** 1998. Structure of peptide deformylase and identification of the substrate binding site. *J Biol Chem* **273(19)**: 11413-6.
- Berg, D. E., A. Weiss, und L. Crossland.** 1980. Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **142(2)**: 439-46.
- Bibb, M. J., P. R. Findlay, und M. W. Johnson.** 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30(1-3)**: 157-66.
- Birnboim, J. C., und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513-1523.
- Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russel-Jones, und E. C. Gottschlich.** 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal Biochem* **136**: 175-179.

- Bode, W., F. X. Gomis-Ruth, R. Huber, R. Zwilling, and W. Stocker.** 1992. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* **358(6382)**: 164-7.
- Bode, W., F. X. Gomis-Ruth, and W. Stockler.** 1993. Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* **331(1-2)**: 134-40.
- Bopp, L. H., A. M. Chakrabarty, and H. L. Ehrlich.** 1983. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **155(3)**: 1105-9.
- Botella, J. A., F. J. Murillo, and R. Ruiz-Vazquez.** 1995. A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur J Biochem* **233(1)**: 238-48.
- Boucher, J. C., M. J. Schurr, H. Yu, D. W. Rowen, and V. Deretic.** 1997. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of MucC in the regulation of alginate production and stress sensitivity. *Microbiology* **143**: 3473-80.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brim, H., M. Heyndrickx, P. de Vos, A. Wilmotte, D. Springael, H. G. Schlegel, and M. Mergeay.** 1999. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterization of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* **22(2)**: 258-68.
- Burton, Z., R. R. Burgess, J. Lin, D. Moore, S. Holder, and C. A. Gross.** 1981. The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E coli* K12. *Nucleic Acids Res* **9(12)**: 2889-903.
- Cammack, R., V. M. Fernandez, and K. Schneider.** 1986. Activation and active sites of nickel-containing hydrogenases. *Biochemie* **68(1)**: 85-91.
- Caslake, L. F., S. I. Ashraf, and A. O. Summers.** 1997. Mutations in the alpha and sigma-70 subunits of RNA polymerase affect expression of the *mer* operon. *J Bacteriol* **179(5)**: 1787-95.
- Cheng, J., A. A. Guffanti, and T. A. Krulwich.** 1997. A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na<sup>+</sup> in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore. *Mol Microbiol* **23(6)**: 1107-20.
- Chi, E., and D. H. Bartlett.** 1995. An *rpoE*-like locus controls outer membrane protein synthesis and growth at cold temperatures and high pressures in the deep-sea bacterium *Photobacterium* sp. strain SS9. *Mol Microbiol* **17(4)**: 713-26.
- Collard, J. M., A. Provoost, S. Taghavi, and M. Mergeay.** 1993. A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutations affecting regulation of the *cnr* cobalt-nickel resistance system. *J Bacteriol* **175(3)**: 779-84.
- Coy, M., C. Doyle, J. Besser, and J. B. Neilands.** 1994. Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biometals* **7(4)**: 292-8.

- De Haseth, P. L., M. L. Zupancic, und M. T. Record, Jr.** 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol* **180(12)**: 3019-3025.
- De Las Penas, A., L. Connolly, und C. A. Gross.** 1997. The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* **24(2)**: 373-85.
- Deretic, V., S. Chandrasekharappa, J. F. Gill, D. K. Chatterjee, und A. M. Chakrabarty.** 1987. A set of cassettes and improved vectors for genetic and biochemical characterization of *Pseudomonas* genes. *Gene* **57(1)**: 61-72.
- Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, und D. W. Martin.** 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J Bacteriol* **176(10)**: 2773-80.
- Derman, A. I., und J. Beckwith.** 1991. *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* **173(23)**: 7719-22.
- Diels, L., Q. Dong, D. van der Lelie, W. Baeyens, und M. Mergeay.** 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J Ind Microbiol* **14(2)**: 142-53.
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay, und D. H. Nies.** 1985. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **93**: B27-B28.
- Dinh, T., I. T. Paulsen, und M. H. Saier, Jr.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **176(13)**: 3825-31.
- Dmitriev, B. A., S. Ehlers, und E. T. Rietschel.** 1999. Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immunol* **187(3)**: 173-81.
- Dombroski, A. J., B. D. Johnson, M. Lonetto, und C. A. Gross.** 1996. The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(17)**: 8858-62.
- Dong, Q., A. Sadouk, D. van der Lelie, S. Taghavi, A. Ferhat, J. M. Nuyten, B. Borremans, M. Mergeay, und A. Toussaint.** 1992. Cloning and sequencing of IS1086, an *Alcaligenes eutrophus* insertion element related to IS30 and IS4351. *J Bacteriol* **174(24)**: 8133-8.
- Dong, Q., und M. Mergeay.** 1994. Czc/Cnr efflux: a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. *Mol Microbiol* **14(1)**: 185-7.
- Dower, W. J., J. F. Miller, und C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16(13)**: 6127-45.
- Dressler, C., U. Kües, D. H. Nies, und B. Friedrich.** 1991. Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. *Applied Environ Microbiol* **57**: 3079-3085

- Enz, S., S. Mahren, U. H. Stroehrer, und V. Braun.** 2000. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J Bacteriol* **182(3)**: 637-46.
- Erik L., L. Sonnhammer, G. von Heijne, und A Krogh.** *A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences.* In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182 Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998
- Erickson, J. W., und C. A. Gross.** 1989. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev* **3(9)**: 1462-71.
- Erickson, J. W., V. Vaughn, W. A. Walter, F. C. Neidhardt, und C. A. Gross.** 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev* **1(5)**: 419-32.
- Fernandes, N. D., Q. Wu, D. Kong, X. Puyang, S. Garg, und R. N. Husson.** 1999. A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress. *J Bacteriol* **181(14)**: 4266-4274.
- Franke, S.** 1999. Chromosomale Silberresistenz in *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Franke, S. G. Grass, und D. H. Nies.** The product of the gene *agrC* (*yclB*, *ibeB*), required in pathogenic *Escherichia coli* strains for penetration across the blood-brain barrier, is part of a chromosomal silver resistance determinant. Eingereicht
- Fricke, B., T. Buchmann, und S. Friebe.** 1995. Unusual chromatographic behaviour and one-step purification of a novel membrane proteinase from *Bacillus cereus*. *J Chromatogr A* **715(2)**: 247-58.
- Friedrich, C. G., K. Schneider, und B. Friedrich.** 1982. Nickel in the catalytically active hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **152(1)**: 42-8.
- Fu, C., J. W. Olson, und R. J. Maier.** 1995. HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(6)**: 2333-7.
- Fukumori, F., und C. P. Saint.** 1997. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1) *J. Bacteriol.* **179 (2)**: 399-408
- Fushimi, N., C. E. Ee, T. Nakajima, und E. Ichishima.** 1999. AspZincin, a family of metalloendopeptidases with a new zinc-binding motif. Identification of new zinc-binding sites (His(128), His(132), and Asp(164)) and three catalytically crucial residues (Glu(129), Asp(143), and Tyr(106)) of deuterolysin from *Aspergillus oryzae* by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **274(34)**: 24195-201.
- Gibson, M. M., D. A. Bagga, C. G. Miller, und M. E. Maguire.** 1991. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co<sup>2+</sup> resistance on the CorA Mg<sup>2+</sup> transport system. *Mol Microbiol* **5(11)**: 2753-62.

- Gold, L.** 1988. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Ann Rev Biochem* **57**: 199-233.
- Goldberg, M., T. Pribyl, S. Juhnke, und D. H. Nies.** 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem* **274(37)**: 26065-70.
- Gorham, H. C., S. J. McGowan, P. R. Robson, und D. A. Hodgson.** 1996. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol Microbiol* **19(1)**: 171-86.
- Goris, J., P. De Vos, D. Janssens, M. Mergeay, und P. Vandamme.** Polyphasic taxonomic study of *Ralstonia eutropha*-like strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (eingereicht)
- Govantes, F., J. A. Molina-Lopez, und E. Santero.** 1996. Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **178(23)**: 6817-23.
- Grass, G.** 1996. Die Transkriptionseinheiten des *czc*-Resistenzsystems für Cobalt, Zink und Cadmium aus *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Grass, G., C. Grosse und D. H. Nies.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* **182(5)**: 1390-8.
- Grass, G., S. Kühnemund, K. Sutter, S. Menge, G.-J. Krauß, B. Fricke, und D. H. Nies.** Signal transduction pathway involved in regulation of the *cnr* cobalt/nickel resistance determinant from *Ralstonia metallidurans* CH34. In Vorbereitung
- Grass, G., D. H. Nies, und B. Fricke.** DNA-sequence and transcriptional analysis of a novel Zn<sup>2+</sup>-metallo-protease from *Bacillus cereus*. In Vorbereitung
- Groche, D., A. Becker, I. Schlichting, W. Kabsch, S. Schultz, und A. F. Wagner.** 1998. Isolation and crystallization of functionally competent *Escherichia coli* peptide deformylase forms containing either iron or nickel in the active site. *Biochem Biophys Res Commun* **246(2)**: 342-6.
- Gross, C. A.** 1996. Function and regulation of the heat shock proteins in *Escherichia coli* and *Salmonella*: *Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. C. et al., Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 1382-1399.
- Große, C.** 1998. Regulation des *czc*-Resistenzsystems für Cobalt, Zink und Cadmium aus *Alcaligenes eutrophus* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Große, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. Navarrette-Santos, B. Lawley, N. L. Brown, und D. H. Nies.** 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **181(8)**: 2385-93.
- Gruber, T. M., und D. A. Bryant.** 1997. Molecular systematic studies of eubacteria, using sigma70-type sigma factors of group 1 and group 2. *J Bacteriol* **179(5)**: 1734-47.
- Gupta, A., K. Matsui, J.-F. Lo, und S. Silver.** 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* **5(2)**: 183-188.

- Hassan, M. T., D. van der Lelie, D. Springael, U. Romling, N. Ahmed und M. Mergeay.** 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238(2)**: 417-25.
- Healy, F. G., R. A. Bukhalid und R. Loria.** 1999. Characterization of an insertion sequence element associated with genetically diverse plant pathogenic *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* **181(5)**: 1562-8.
- Helmann, J. D., B. T. Ballard und C. T. Walsh.** 1990. The MerR metalloregulatory protein binds mercuric ion as a tricoordinate, metal-bridged dimer. *Science* **247(4945)**: 946-8.
- Helmann, J. D. und M. J. Chamberlin.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**: 839-72.
- Hooper, N. M.** 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354(1)**: 1-6.
- Hottenrott, S., T. Schumann, A. Pluckthun, G. Fischer, und J. U. Rahfeld.** 1997. The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem* **272(25)**: 15697-701.
- Huang, X., K. L. Fredrick, und J. D. Helmann.** 1998. Promoter recognition by *Bacillus subtilis* sigmaW: autoregulation and partial overlap with the sigmaX regulon. *J Bacteriol* **180(15)**: 3765-70.
- Huang, X., A. Gaballa, M. Cao, und J. D. Helmann.** 1999. Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol Microbiol* **31(1)**: 361-71.
- Huang, X., und J. D. Helmann.** 1998. Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* sigma X factor using a consensus-directed search. *J Mol Biol* **279(1)**: 165-73.
- Hultberg, M.** 1998. Rhizobacterial glutathione levels as affected by starvation and cadmium exposure. *Curr Microbiol* **37(5)**: 301-5.
- Humphreys, S., A. Stevenson, A. Bacon, A. B. Weinhardt, und M. Roberts.** 1999. The alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **67(4)**: 1560-8.
- Jiang, W., und J. S. Bond.** 1992. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett* **312(2-3)**: 110-4.
- Jishage, M., und A. Ishihama.** 1995. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J Bacteriol* **177(23)**: 6832-5.
- Johnson, J. L.** 1981. Genetic characterization. In: Gerhardt, P. (Ed.) Manual of methods of general bacteriology. American Society of Microbiology. Wahington. USA: 540-472.
- Johnson, J. M., und G. M. Church.** 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* **287(3)**: 695-715.
- Jones, C. H., und C. P. Moran, Jr.** 1992. Mutant sigma factor blocks transition between promoter binding and initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **89(5)**: 1958-62.
- Juhnke, S.** 1997. Einfluß von Punktmutationen im *czcA*-Gen auf die Funktion des CzcA-Proteins. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Karamyshev, A. L., Z. N. Karamysheva, A. V. Kajava, V. N. Ksenzenko, und M. A. Nesmeyanova.** 1998. Processing of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: role of the primary structure of the signal peptide cleavage region. *J Mol Biol* **277(4)**: 859-70.
- Kim, J. F., Z. M. Wie, und S. V. Beer.** 1997. The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. *J Bacteriol* **179(5)**: 1690-7.
- Klimpel, K. R., N. Arora, und S. H. Leppla.** 1994. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol* **13(6)**: 1093-100.
- Kühnemund, S.** 1999. Charakterisierung von CnrX und CnrH, Regulatoren der Cobalt-Nickel-Resistenz in *Ralstonia* sp. CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kumar, A., B. Grimes, N. Fujita, K. Makino, R. A. Malloch, R. S. Hayward, und A. Ishihama.** 1994. Role of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *J Mol Biol* **235(2)**: 405-13.
- Kyte, J., und R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lazar, S. W., und R. Kolter.** 1996. SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol* **178(6)**: 1770-3.
- Legatzki, A.** 1998. Einfluß der starken oder schwachen Expression der *czc*-Determinante auf die Schwermetallresistenz in *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Le Moual, H., B. P. Roques, P. Crine, und G. Boileau.** 1993. Substitution of potential metal-coordinating amino acid residues in the zinc-binding site of endopeptidase-24.11. *FEBS Lett* **324(2)**: 196-200.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Dervedde, M. Eitinger, und B. Friedrich.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* **176(14)**: 4385-93.
- Lewis, K.** 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem Sci* **19(3)**: 119-23.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, und H. G. Schlegel.** 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **175(3)**: 767-78.
- Liesegang, H.** 1994. Die Cobalt- und Nickelresistenz (*cnr*) aus *Alcaligenes eutrophus* CH34: Nukleotidsequenz, beteiligte Gene und Genprodukte. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen
- Lipinska, B., S. Sharma, und C. Georgopoulos.** 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* **16(21)**: 10053-67.

- Lipinska, B., M. Zylicz, und C. Georgopoulos.** 1990. The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J Bacteriol* **172(4)**: 1791-1807.
- Loewen, P. C., und R. Hengge-Aronis.** 1994. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* **48**: 53-80.
- Lonetto, M. A., K. L. Brown, K. E. Rudd, und M. J. Buttner.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **91(16)**: 7573-7.
- Maeda, H., M. Jishage, T. Nomura, N. Fujita, und A. Ishihama.** 2000. Two extracytoplasmic function sigma subunits, sigma(E) and sigma(FecI), of *Escherichia coli*: promoter selectivity and intracellular levels. *J Bacteriol* **182(4)**: 1181-4.
- Mallick, N., und L. C. Rai.** 1992. Metal induced inhibition of photosynthesis, photosynthetic electron transport chain and ATP content of *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*: interaction with exogenous ATP. *Biomed Environ Sci* **5(3)**: 241-50.
- Mandel, M., und A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Markov, D., T. Naryshkina, A. Mustaev, und K. Severinov.** 1999. A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev* **13(18)**: 2439-48.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. Govan, B. W. Holloway, und V. Deretic.** 1993. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **90(18)**: 8377-81.
- Martinez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Najera, J. C. Boucher, G. Espin, G. Soberon-Chavez, I., und V. Deretic.** 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J Bacteriol* **178(7)**: 1800-8.
- Maseda, H., H. Yoneyama, und T. Nakae.** 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-oprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44(3)**: 658-64.
- Meccas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, und C. A. Gross.** 1993. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* **7(12B)**: 2618-28.
- Mergeay, M., C. Houba, und J. Gerits.** 1978. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch. Int Physiol Biochem* **86**: 440-441.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, und F. van Gijsegem.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a fakultativ chemolithotroph with plasmid bound resistance to heave metals. *J Bacteriol* **162**: 328-334.

- Mergeay, M.** 2000. Bacteria adapted to industrial biotopes: Metal-resistant *Ralstonia metallidurans* in Bacterial Stress Responses Kapitel 26 Seite 404-414. Editor G. Storz und R. Hengge-Aronis ASM Press Washington DC.
- Merrick, M. J.** 1993. In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* **10(5)**: 903-9.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Mills, S. D., C. A. Jasalavich, und D. A. Cooksey.** 1993. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **175(6)**: 1656-64.
- Mills, S. D., C. K. Lim, und D. A. Cooksey.** 1994. Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (*cop* box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. *Mol Gen Genet* **244(4)**: 341-51.
- Missiakas, D., J. M. Betton, und S. Raina.** 1996. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol Microbiol* **21(4)**: 871-84.
- Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos, und S. Raina.** 1997. Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* **24(2)**: 355-71.
- Missiakas, D., und S. Raina.** 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* **28(6)**: 1059-66.
- Moore, M. J., S. M. Miller, und C. T. Walsh.** 1992. C-terminal cysteines of Tn501 mercuric ion reductase. *Biochemistry* **31(6)**: 1677-85.
- Nakatsu, C., J. Ng, R. Singh, N. Straus, und C. Wyndham.** 1991. Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **88 (19)**: 8312-8316
- Nelson, D. L., und E. P. Kennedy.** 1971. Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J Biol Chem* **246(9)**: 3042-9.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley, und S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28(3)**: 239-42.
- Newman, J. D., M. J. Falkowski, B. A. Schilke, L. C. Anthony, und T. J. Donohue.** 1999. The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and the target promoters *cycA* P3 and *rpoE* P1. *J Mol Biol* **294(2)**: 307-20.
- Nies, D., M. Mergeay, B. Friedrich, und H. G. Schlegel.** 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **169(10)**: 4865-8.
- Nies, A., D. H. Nies, und S. Silver.** 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171(9)**: 5065-70.

- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu, und S. Silver.** 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86(19)**: 7351-5.
- Nies, D. H., und S. Silver.** 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171(2)**: 896-900.
- Nies, A., D. H. Nies, und S. Silver.** 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* **265(10)**: 5648-53.
- Nies, D. H.** 1992. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **174(24)**: 8102-10.
- Nies, D. H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51(6)**: 730-50.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **178(20)**: 5853-9.
- Nomark, S., S. Bergström, T. Edlund, T. Grundström, B. Jaurin, F. P. Lindberg, und O. Olsson.** 1993. Overlapping genes. *Annu Rev Genet* **17**: 499-525.
- Oelmüller, U., N. Krüger, A. Steinbüchel, und C. G. Friedrich.** 1990. Isolation of procaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J Microbiol Meth* **11**: 73-84.
- Ogasawara, N., S. Nakai, und H. Yoshikawa.** 1994. Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin *DNA Res* **1 (1)**: 1-14
- O'Halloran, T., und C. Walsh.** 1987. Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the *merR* gene: isolation and characterization. *Science* **235(4785)**: 211-4.
- Olafson, R. W., W. D. McCubbin, und C. M. Kay.** 1988. Primary- and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. *cyanobacterium*. *Biochem J* **251(3)**: 691-9.
- Olson, J. W., C. Fu, und R. J. Maier.** 1997. The HypB protein from *Bradyrhizobium japonicum* can store nickel and is required for the nickel-dependent transcriptional regulation of hydrogenase. *Mol Microbiol* **24(1)**: 119-28.
- Osterman, A. L., N. V. Grishin, S. V. Smulevitch, M. V. Matz, O. P. Zagnitko, L. P. Revina, und V. M. Stepanov.** 1992. Primary structure of carboxypeptidase T: delineation of functionally relevant features in Zn-carboxypeptidase family. *J Protein Chem* **11**: 561-570.
- Owens, R. A., und P. E. Hartman.** 1986. Glutathione: a protective agent in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* as measured by mutagenicity and by growth delay assays. *Environ Mutagen* **8(5)**: 659-73.
- Paget, M. S., E. Leibovitz, und M. J. Buttner.** 1999. A putative two-component signal transduction system regulates sigmaE, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **33(1)**: 97-107.

- Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60(4)**: 575-608.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier, Jr.** 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **156(1)**: 1-8.
- Peitzsch, N., G. Eberz, and D. H. Nies.** 1998. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl Environ Microbiol* **64(2)**: 453-8.
- Peitzsch, N.** 1999. Der Chromatstoffwechsel des schwermetallresistenten Bakteriums *Alcaligenes eutrophus* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch Microbiol* **100**: 197-206.
- Poelarends, G. J., L. A. Kulakov, M. J. Larkin, J. E. T. Van Hylckama Vlieg, und D. B. Janssen.** 1999. The role of horizontal gene transfer and gene integration in the evolution of 1,3-dichloropropene- and 1,2-dibromoethane-degradative pathways. EMBL-Datenbank-Eintrag
- Poole, K., K. Krebes, C. McNally, und S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* **175(22)**: 7363-72.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57(1)**: 50-108.
- Rabilloud, T., G. Carpentier, und P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9(6)**: 288-91.
- Raina, S., D. Missiakas, und C. Georgopoulos.** 1995. The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *Embo J* **14(5)**: 1043-55.
- Rawlings N. D., und A. J. Barrett.** 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290**: 205-218.
- Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, und D. A. Hopwood.** 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome *Mol Microbiol* **21 (1)**: 77-96
- Reed, R. R., R. A. Young, J. A. Steitz, N. D. Grindley, und M. S. Guyer.** 1979. Transposition of the *Escherichia coli* insertion element gamma generates a five-base-pair repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* **76(10)**: 4882-6.
- Rensing, C.** 1996. Bakterielle Schwermetallresistenzen und ihre Expression in Eukaryonten. Dissertationsschrift. Freie Universität Berlin
- Rensing, C., T. Pribyl, und D. H. Nies.** 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol* **179(22)**: 6871-9.
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, und B. P. Rosen.** 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(2)**: 652-6.
- Rensing, C., B. Mitra, und B. P. Rosen.** 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(26)**: 14326-31.

- Rey, L., J. Imperial, J. M. Palacios, und T. Ruizargueso.** 1994. Purification of *Rhizobium leguminosarum* HypB, a nickel-binding protein required for hydrogenase synthesis. *J Bacteriol* **176**: 6066-6073.
- Roderick, S. L., und B. W. Matthews.** 1993. Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry* **32**: 3907-3912.
- Rosenberg, M., und D. Court.** 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann Rev Genet* **13**: 319-353.
- Rossmann R., Sauter, M., Lottspeich, F., und A. Böck.** 1994. Maturation of the large subunit (HycE) of hydrogenase 3 of *Escherichia coli* requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur J Biochem* **220**: 377-384.
- Rossmann R., T. Maier, F. Lottspeich, und A. Böck.** 1995. Characterisation of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem* **227**: 545-550.
- Rouviere, P. E., und C. A. Gross.** 1996. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* **10(24)**: 3170-82.
- Rudner, D. Z., P. Fawcett, und R. Losick.** 1999. A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(26)**: 14765-70.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer, und J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11(5)**: 841-847.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, und A. R. Coulson.** 1977. DNA-Sequencing with chain terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5463-5467.
- Santini, C. L., B. Ize, A. Chanal, M. Muller, G. Giordano, und L. F. Wu.** 1998. A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *Embo J* **17(1)**: 101-12.
- Schägger, H., G. von Jagow.** 1987. Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379
- Schiering, N., W. Kabsch, M. J. Moore, M. D. Distefano, C. T. Walsh, und E. F. Pai.** 1991. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607. *Nature* **352(6331)**: 168-72.
- Schmidt, T., und H. G. Schlegel.** 1989. Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 315-328.
- Schmidt, T., und H. G. Schlegel.** 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* **176(22)**: 7045-54.

- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, und C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:5857
- Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting, und P. Bork.** 2000. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains *Nucleic Acids Res* **28**: 231-234
- Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martinez Salazar, J. C. Boucher, und V. Deretic.** 1996. Control of AlgU, a member of the sigma-E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J Bacteriol* **178(16)**: 4997-5004.
- Schwuchow, T.** 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sensfuss, C., und H. G. Schlegel.** 1988. Plasmid pMOL28-encoded nickel resistance to nickel is due to specific efflux. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 4188-4193.
- Sharma, R., C. Rensing, B. P. Rosen, und B. Mitra.** 2000. The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)- translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275(6)**: 3873-8.
- Shi, J., W. P. Lindsay, J. W. Huckle, A. P. Morby, und N. J. Robinson.** 1992. Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett* **303(2-3)**: 159-63.
- Shine, J., und L. Dalgarno.** 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Nat Acad Sci USA* **71(4)**: 1342-1346.
- Siddiqui, R. A., H. G. Schlegel, und M. Mayer.** 1988. Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J Bacteriol* **170**: 4188-4193.
- Siddiqui, R. A., K. Benthin, und H. G. Schlegel.** 1989. Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol* **171**: 5071-5078.
- Silver, S., und T. K. Misra.** 1988. Plasmid mediated heavy metal resistances. *Ann Rev Microbiol* **42**: 717-743.
- Simon, R., U. Prierer, und A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H.-M., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicare R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrovski S., Church G. M., Daniels C.J., Mao J.-I., Rice P., Nolling J., und J. N. Reeve.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* **179**: 7135-7155.

- Smith, R. L., and M. E. Maguire.** 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol Microbiol* **28(2)**: 217-26.
- Smith, R. L., L. J. Thompson, and M. E. Maguire.** 1995. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of  $Mg^{2+}$  transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J Bacteriol* **177(5)**: 1233-8.
- Sonnhammer, E. L. L., G. von Heijne, and A. Krogh:** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182. Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen, Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998
- Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Stockand, J., A. Sultan, D. Molony, T. DuBose, Jr., and S. Sansom.** 1993. Interactions of cadmium and nickel with K channels of vascular smooth muscle. *Toxicol Appl Pharmacol* **121(1)**: 30-5.
- Stöcker W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F.-X. Gomis-Rüth, D. B. McKay, and W. Bode.** 1995. The metzincins- topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* **4**: 823-840.
- Taghavi, S., M. Mergeay, and D. van der Lelie.** 1997. Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid* **37(1)**: 22-34.
- Tao, T., M. D. Snavely, S. G. Farr, and M. E. Maguire.** 1995. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by  $Mg^{2+}$  in a manner similar to that of the MgtB P-type ATPase. *J Bacteriol* **177(10)**: 2654-62.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Tibazarwa, C., S. Wuertz, M. Mergeay, L. Wyns and D. van der Lelie.** 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol* **182(5)**: 1399-409.
- Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutman, A. B. Oppenheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki et al.** 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *Embo J* **14(11)**: 2551-60.
- Tseng, T.-T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, and M. H. Saier, Jr.** 1999. The RND Permease Superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Molec Microbiol Biotechnol* **1(1)**: 107-125.
- Turner, J. S., A. P. Morby, B. A. Whitton, A. Gupta, and N. J. Robinson.** 1993. Construction of  $Zn^{2+}/Cd^{2+}$  hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J Biol Chem* **268(6)**: 4494-8.

- Ullmann, A.** 1984. One-step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene* **29(1-2)**: 27-31.
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay, und D. H. Nies.** 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* **23(3)**: 493-503.
- Varma, A. K., C. Sensfuss, und H. G. Schlegel.** 1990. Inhibitor effects on the accumulation and efflux of nickel ions in plasmid pMOL28-harboring strains of *Alcaligenes eutrophus*. *Arch Microbiol* **154**: 42-49.
- Vicente, M., K. F. Chater, und V. De Lorenzo.** 1999. Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol Microbiol* **33(1)**: 8-17.
- Vieira, J., und J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19(3)**: 259-68.
- Voos, H., U. Winkler, R. Jakobi, N. H. Hewitt, C. Schwager, J. Zimmermann, W. Ansorge, und W. Pyerin.** 1991. Structure of the gene encoding human casein kinase II subunit  $\beta$ . *J Biol Chem* **226**: 13706-13711.
- Ward, M. J., H. Lew, A. Treuner-Lange, und D. R. Zusman.** 1998. Regulation of motility behavior in *Myxococcus xanthus* may require an extracytoplasmic-function sigma factor. *J Bacteriol* **180(21)**: 5668-75.
- Watt, R. K., und P. W. Ludden.** 1998. The identification, purification, and characterization of CooJ. A nickel-binding protein that is co-regulated with the Ni-containing CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* **273(16)**: 10019-25.
- Weber, K., und M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244(16)**: 4406-12.
- Wei, Z. M., und S. V. Beer.** 1995. HrpL activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol* **177(21)**: 6201-10.
- Weiner, J. H., P. T. Bilous, G. M. Shaw, S. P. Lubitz, L. Frost, G. H. Thomas, J. A. Cole, und R. J. Turner.** 1998. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93(1)**: 93-101.
- Wessel, D., und V. J. Flügge.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143.
- Xie, Z. D., C. D. Hershberger, S. Shankar, R. W. Ye, und A. M. Chakrabarty.** 1996. Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J Bacteriol* **178(16)**: 4990-6.
- Yabuuchi, E., Y. Kawamura, Y. Kosako, und T. Ezaki.** 1998. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. *Microbiol Immunol* **42(6)**: 429-38.
- Yoneyama, H., H. Maseda, H. Kamiguchi, und T. Nakae.** 2000. Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-oprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *J Biol Chem* **275(7)**: 4628-34.

**Yoo, D., M. D. Parker, G. J. Cox, und L. A. Babiuk.** 1995. Zinc-binding of the cysteine-rich domain encoded in the open reading frame of 1B of the RNA polymerase gene of coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **380**: 437-42.

**Yura, T., H. Nagai, und H. Mori.** 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **47**: 321-50.

**Zgurskaya, H. I., und H. Nikaido.** 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J Mol Biol* **285(1)**: 409-20.

**Zgurskaya, H. I., und H. Nikaido.** 1999. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(13)**: 7190-5

## Danksagung

Als erstes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. D. H. Nies, der mir als Doktorvater die größtmögliche Freiheit bei der Entfaltung meiner wissenschaftlichen Ideen, sowie des Themas gewährte, für seine konstruktiven Vorschläge und fruchtbaren Diskussionen und der mir mit großem Vertrauen die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen danke ich, dass er es mir ermöglichte, die experimentellen Arbeiten an seinem Institut durchzuführen und für die kritische Diskussion meiner Ergebnisse in den Montagsseminaren.

Mein ganz besonderer Dank geht an Sylvia, die nicht nur die Bürde des Korrekturlesens auf sich genommen hat, sondern sich auch viel Zeit für meine Experimente genommen hat.

Ebenso möchte ich mich bei meiner *Bench*-Nachbarin Antje für das Korrekturlesen bedanken und für die ruhige, freundliche Atmosphäre im Lab.

Danken möchte ich auch Conny, unserem Postdoc, für die hitzigen Diskussionen um eigene Ergebnisse und Modelle.

Meiner Protease-Kooperationspartnerin Frau Dr. B. Fricke danke ich für interessante Diskussionen, die Bereitstellung von Literatur und auch für ihre Mühen bei der Herstellung der Antikörper und des Protease-Assays.

Kristin Sutter vom Graduiertenkolleg „Adaptive biochemisch-physiologische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“, ebenso wie Frau Dr. S. Menge danke ich für die Unterstützung bei der AAS-Analyse bzw. für die Durchführung der HPLC.

Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß danke ich für die Möglichkeit am Graduiertenkolleg „Adaptive biochemisch-physiologische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ als assoziiertes Mitglied teilnehmen zu dürfen.

Ede danke ich für seine geduldige Unterstützung bei den (unvermeidlichen) Software-Problemen und seine Fähigkeit die Stimmung im Lab auch an trüben Tagen aufzuhellen.

Andrea, Denise und Dr. Andreas Pich danke ich für hilfreiche Tips und wissenschaftliche Diskussionen.

Bei Grit Schleuder und Ute Lindenstrauß möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzierarbeiten bedanken

Für die Überlassung von *A. xylosoxydans* 31A und *E. coli*-Stämmen mit der *ncc*- und der *cnr*-Determinante für meine Experimente bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. G. Schlegel.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Halle/Saale, den 21.3.2000

Gregor Grass

## Lebenslauf

Name: Gregor Boris Grass  
Geburtsdatum: 8. Juni 1970  
Geburtsort: Frankfurt/Main

09/1981-07/1990 Bildungszentrum Reutlingen/Nord, Gymnasium  
Abschluss: Abitur

10/1990-09/1991 Mitarbeiter der Firma Riedel, Reutlingen

10/1991-09/1996 Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/1995-10/1995 Diplom-Prüfung in den Fächern Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie, Biochemie und Genetik

11/1995-09/1996 Diplomarbeit zum Thema „Die Transkriptionseinheiten des *czc*-Resistenzsystems für Cobalt, Zink und Cadmium aus *Alcaligenes eutrophus* CH34“  
Abschluss: Diplom-Biologe

seit 10/1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg