

Rolle von RpoE-homologen Sigmafaktoren in der Schwermetall-Homöostase von *Escherichia coli* und *Cupriavidus metallidurans*

Dissertation

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

vorgelegt der

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

von Monique Egler

geb. am 13.05.1977 in Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dietrich H. Nies
2. Prof. Dr. Ulla Bonas
3. Prof. Dr. Franz Naberhaus

Datum der Verteidigung: 20.12.2005

Halle/Saale, 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009507

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000009507>]

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Bakterienstämme und Plasmide	8
2.2	Kultivierungsbedingungen	10
2.2.1	Nährmedien und Zusätze	10
2.2.2	Anzucht, Induktion und Zellernte	13
2.2.3	Stammhaltung	14
2.3	Molekulargenetisches Arbeiten mit DNA	14
2.3.1	Isolierung von DNA	14
2.3.1.1	Plasmidisolierung mittels E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)	15
2.3.1.2	Isolierung genomischer DNA mittels E.Z.N.A. [®] Bacterial DNA Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)	15
2.4	DNA-Techniken	15
2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	15
2.4.2	DNA-Größenstandards	16
2.4.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	16
2.4.4	Spaltung von DNA mittels Restriktions-Endonukleasen	16
2.4.5	Reinigung und Konzentrierung von DNA	17
2.4.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	17
2.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	17
2.4.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.4.8.1	Auswahl der Primer	17
2.4.8.2	Standard-PCR	20
2.4.8.3	Reinigung von PCR-Produkten	21
2.4.9	DNA-Transfer in <i>Escherichia coli</i> und Selektion rekombinanter Klone	22
2.4.9.1	Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	22
2.4.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation nach Dower (1988)	22
2.4.9.3	Selektion plasmidtragender <i>E. coli</i> -Klone	23
2.4.9.4	Plasmidtransfer durch Konjugation	23
2.4.9.5	Inaktivierung chromosomaler Gene von <i>E. coli</i> mittels PCR-Produkten (Datsenko und Wanner, 2000)	23
2.4.9.6	Gentransfer mittels P1-Transduktion (Provence und Curtiss, 1981)	24
2.4.9.7	Herstellung chromosomaler Deletionsmutanten in <i>C. metallidurans</i>	25
2.4.9.8	Herstellung chromosomaler Reportergenfusionen in <i>C. metallidurans</i>	26
2.4.10	DNA-Sequenzierung	26
2.4.10.1	Sequenzierung unter Verwendung des dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits (Perkin-Elmer, Weiterstadt)	26
2.4.10.2	Auswertung der Sequenzdaten	27
2.5	Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	27
2.5.1	Herstellung von Sonden (<i>DIG DNA LABELING Kit</i> , Roche, Mannheim)	27
2.5.2	Digoxigenin-markierte Längenstandards	28
2.5.3	DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern (1975)	28
2.5.3.1	Gelelektrophorese und DNA- <i>Blotting</i>	28
2.5.3.2	Hybridisierung	29
2.5.3.3	Chemilumineszenz-Nachweis (<i>DIG-Luminescent Detection Kit</i> , Roche, Mannheim)	29
2.6	Zellwachstumsversuche	30
2.6.1	Wachstumsversuche in Flüssigmedien	30
2.6.1.1	Messung der Zelltrübung	30
2.6.1.2	Zellanzucht von <i>E. coli</i> - Stämmen in Wachstumsversuchen	30

2.6.1.3	Zellanzucht von <i>C. metallidurans</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen.....	30
2.6.2	Ermittlung der Minimalen Inhibitor-Konzentration (MIC).....	31
2.7	Enzymologische Methoden	31
2.7.1	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller (1972) und Ullmann (1984)).....	31
2.7.1.1	Zellwachstum, Induktion und Zellernte.....	31
2.7.1.2	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	32
2.8	Proteinbiochemische Methoden	33
2.8.1	Protein-Expression und -Reinigung über das IMPACT™ T7:One-Step <i>Protein Purification System</i> (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main).....	33
2.8.1.1	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	33
2.8.1.2	Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt.....	34
2.8.1.3	Native Proteinreinigung über Chitin-Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins.....	34
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	34
2.8.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	34
2.8.3	Elektrophoretische Methoden.....	35
2.8.3.1	Probenvorbereitung	35
2.8.3.2	Protein-Marker (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)	35
2.8.3.3	Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970).....	35
2.8.4	Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	36
2.8.4.1	Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (Weber und Osborn, 1969).....	36
2.8.4.2	Trocknung von Polyacrylamid-Gelen	37
2.9	Gelretardierungs-Experimente	37
2.9.1	Probenvorbereitung und Inkubation	37
2.9.2	Gelelektrophorese.....	37
2.10	<i>In vitro</i> Transkriptionsexperimente.....	37
2.10.1	<i>In vitro</i> -Transkription mit [α^{32} P]UTP nach Beck (1997).....	38
2.10.2	Gelelektrophorese und Autoradiographie.....	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Der ECF-Sigmafaktor RpoE _{Cm} ist an der Schwermetall-Homöostase in <i>C. metallidurans</i> beteiligt.....	39
3.1.1	Identifikation und Deletion einer <i>rpoE</i> -ähnlichen Sequenz in <i>C. metallidurans</i> CH34.....	39
3.1.2	Die Deletion von <i>rpoE</i> _{Cm} führt in <i>C. metallidurans</i> CH34 zu verminderter Resistenz gegenüber Nickelionen.....	43
3.1.3	Die Deletion von <i>rpoE</i> _{Cm} führt in <i>C. metallidurans</i> AE104 zu verminderter Resistenz gegenüber Zn(II), Cd(II), Co(II) und Ni(II)	44
3.1.4	Das Gen <i>rpoE</i> _{Cm} wird konstitutiv exprimiert	46
3.1.5	RpoE _{Cm} ist in der Lage, an die Promotoren <i>cadAp</i> , <i>zntAp</i> _{Cm} und <i>rpoEp</i> _{Cm} zu binden und davon ausgehend eine Transkription zu starten	47
3.2	Der Sigmafaktor RpoE _{Ec} ist involviert in die Schwermetall-Homöostase von <i>E. coli</i> ..	53
3.2.1	Die Deletion von <i>rpoE</i> _{Ec} führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zink-, Cadmium- und Kupferionen	53
3.2.2	Die Deletion von <i>rpoE</i> _{Ec} ist <i>in trans</i> nur durch <i>rpoErseAB</i> _{Ec} aber nicht durch <i>rpoE</i> _{Ec} allein komplementierbar.....	57
3.2.3	Der Promotor <i>rpoEp</i> _{Ec} ist durch Zink und Kupfer induzierbar	61
3.2.4	RpoE im Zusammenspiel mit Schwermetall-Resistenzsystemen.....	63
3.2.4.1	Einfluß von RpoE auf die Resistenz gegen Kupferionen.....	63

3.2.4.2	Einfluß von RpoE _{Ec} auf die Resistenz gegenüber Zink- bzw. Cadmiumionen	67
4	Diskussion	69
4.1	Metallsensitive $\Delta rpoE$ -Mutanten.....	72
4.1.1	Der Sigmafaktor RpoE _{Cm} aus <i>C. metallidurans</i>	72
4.1.2	Der Sigmafaktor RpoE _{Ec} aus <i>E. coli</i>	80
4.1.3	Die Kupfer-Resistenz von <i>E. coli</i>	82
4.1.4	Die Resistenz gegen Zink- und Cadmiumionen in <i>E. coli</i>	84
4.2	Unterschiedliche Expression der homologen Sigmafaktoren in <i>C. metallidurans</i> und <i>E. coli</i>	85
4.3	Modell der RpoE-abhängigen Antwort auf extracytoplasmatischen Stress	87
4.4	Ausblick.....	90
5	Zusammenfassung	91
6	Literatur	92

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette</i> -Transporter (Proteinfamilie)
AHT	Anhydrotetrazyklin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i> (Proteinfamilie)
<i>Cm</i>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
CSPD	Disnatrium3-(4-Methoxyspiro-(1,2-Dioxethan-3,2'- (Chlor)Triciclo[3.3.1.1.3,7] Dekan)-4-yl)-Phenylphosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	<i>extracytoplasmic function</i> (Proteinfamilie)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRT	<i>FLP recognition target</i>
G	Guanin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
ICF	<i>intracytoplasmic function</i>
IM	<i>inner membrane</i> (Cytoplasmamembran)

IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
LB	<i>lysogeny broth</i>
MFP	<i>membrane fusion protein</i> (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor-Konzentration
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NB	Nährbouillon
NRAMP	<i>natural-resistance-associated macrophage protein</i> (Proteinfamilie)
nt/n	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus
NA	Nähragar
OD	Optische Dichte
OM	<i>outer membrane</i> (äußere Membran)
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenylgalaktopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMF	<i>proton motive force</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAP	RNA-Polymerase
RND	<i>resistance, nodulation, cell division</i> (Proteinfamilie)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> -PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
UTP	Uracil-5'-triphosphat
VIS	<i>visible</i> (sichtbares Licht)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
ZIP	ZRT, IRT-ähnliche Proteine (Proteinfamilie)

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	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

Die Lebensweise von Bakterien erfordert eine ständige Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen. Zum Schutz vor äußeren Einflüssen haben Gram-negative Bakterien eine Hülle aus zwei Membranen entwickelt, die den periplasmatischen Raum abgrenzen (Hung *et al.*, 2001; Nikaido, 1996; Raetz und Dowhan, 1990). Die äußere Membran ist durchlässig für eine Vielzahl von Ionen, während aktive und passive Transportprozesse durch die innere Membran die Zellhomöostase gewährleisten. Diese Prozesse unterliegen ständiger Kontrolle und sind streng reguliert. Äußere Veränderungen wirken in erster Linie auf die in der bakteriellen Hülle enthaltenen Proteine. Hohe Temperaturen, Ethanol und andere Stressoren führen zu falsch gefalteten Proteinen in der äußeren Membran bzw. im Periplasma (Hiratsu *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995; Meccas *et al.*, 1993).

Bei der Regulation dieser Stresssituationen spielen Sigmafaktoren eine entscheidende Rolle. Als Untereinheit der RNA-Polymerase (RNAP) dirigieren sie den Enzymkomplex zur Promotorregion, wodurch spezifisch an dieser Stelle die Transkription initiiert wird (deHaseth *et al.*, 1998; Burgess, 1969). Das bakterielle RNA-Polymerase-Coreenzym, bestehend aus zwei α -, einer β -, einer β' - und einer ω -Untereinheit, wurde 1955 als erstes Nukleinsäuresynthetisierendes Enzym isoliert (Grunberg-Manago *et al.*, 1955) und konnte 2002 aus *Thermus aquaticus* kristallisiert werden (Murakami *et al.*, 2002). Die α -Untereinheiten sind für den Zusammenbau des Proteinkomplexes sowie für die Interaktion mit regulatorischen Proteinen notwendig, sie nehmen außerdem Kontakt zu sogenannten *up*-Elementen der Promotorregion auf (deHaseth *et al.*, 1998) und dienen zusammen mit der β -Untereinheit der Initiation der RNA-Synthese. Des Weiteren ist die β -Untereinheit für die Bindung der Nukleotide verantwortlich. Die ω -Untereinheit bindet den N- und C-Terminus von β' und ist *in vitro* für die Rückfaltung denaturierter RNA-Polymerase-Moleküle notwendig (Gentry und Burgess, 1993). Eine Deletion der ω -Untereinheit zeigt allerdings keinen Phänotyp (Heil und Zillig, 1970). Die wichtigste Aufgabe der β' -Untereinheit ist die Bindung des Enzyms an die DNA.

Bakterien haben verschiedene Sigmafaktoren entwickelt, die unterschiedliche Promotorstrukturen erkennen und binden können (Nies, 2004; deHaseth *et al.*, 1998; Missiakas und Raina, 1998; Wösten, 1998). Man unterscheidet zwei Gruppen, die σ^{70} -Proteinfamilie und die σ^{54} -Faktoren. RpoN (σ^{54}) ist notwendig für die Transkription von Genen, die in den Stickstoff-Stoffwechsel involviert sind (Nies, 2004; Wösten, 1998). Im Unterschied zur σ^{70} -abhängigen Transkription benötigt die Transkriptionsinitiation ausgehend von σ^{54} -abhängigen

Promotoren ein Aktivatorprotein (Wösten, 1998). RpoN wurde bisher nur in Proteobakterien und Gram-positiven Bakterien gefunden (Nies, 2004).

Die σ^{70} -Familie wird unterteilt in primäre Sigmafaktoren, nichtessentielle primäre Sigmafaktoren, alternative Sigmafaktoren, sowie Sigmafaktoren, die an der Sporulation beteiligt sind (Wösten, 1998). Jede Bakterienzelle weist mindestens einen primären Sigmafaktor auf, der für die Transkription aller konstitutiv exprimierten Gene notwendig ist. Dieser wird als RpoD bzw. σ^{70} in Gram-negativen Bakterien und als σ^A in Gram-positiven Bakterien bezeichnet. Zu den nichtessentiellen primären Sigmafaktoren gehört RpoS, der für das Überleben in der stationären Phase notwendig ist. Die alternativen Sigmafaktoren werden unterteilt in Hitzeschock-Sigmafaktoren, Sigmafaktoren, die an der Flagellenbiosynthese beteiligt sind und ECF-Sigmafaktoren (*extracytoplasmic function*) (Nies, 2004; Wösten, 1998; Lonetto *et al.*, 1994).

Die Familie der ECF-Sigmafaktoren wurde erstmals in einer Arbeit über σ^E aus *Streptomyces coelicolor* (Lonetto *et al.*, 1994) charakterisiert. Sieben Proteine aus verschiedenen Organismen wurden in diese Familie eingeordnet. Dazu gehörten CarQ aus *Myxococcus xanthus* (Browning *et al.*, 2003; Martinez-Argudo *et al.*, 1998; Gorham *et al.*, 1996), AlgU aus *Pseudomonas aeruginosa* (Firoved *et al.*, 2002; Rowen und Deretic, 2000; Mathee *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1996; Hershberger *et al.*, 1995; Schurr *et al.*, 1995b; Yu *et al.*, 1995; Deretic *et al.*, 1994; DeVries und Ohman, 1994; Martin *et al.*, 1994), HrpL aus *Pseudomonas syringae* (Wei und Beer, 1995; Xiao *et al.*, 1994), σ^E und FecI aus *Escherichia coli* (Mahren und Braun, 2003; Miticka *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2000; Angerer *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995; Wang und Kaguni, 1989), CnrH aus *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000) und SigX aus *Bacillus subtilis* (Sorokin *et al.*, 1993).

Sigmafaktoren der σ^{70} -Familie weisen vier Proteindomänen auf (Gross *et al.*, 1998). Die Domäne 1.1 ist autoinhibierend und verhindert die DNA-Bindung des Sigmafaktors, wenn dieser nicht mit dem RNAP-Coreenzym komplexiert ist (Dombroski *et al.*, 1993). Diese Region fehlt in ECF-Sigmafaktoren (Tam *et al.*, 2002). Die Bindung der RNAP findet in den Domänen 1.2, 2.1, 2.2 und 2.3 statt. Die Domänen 2 bis 4 sind für die Promotorerkennung wichtig. Dabei findet in Domäne 2 das Aufschmelzen der DNA und vor allem mit Domäne 2.4 die Erkennung der -10-Region des Promotors und mit Domäne 4.2 die Bindung an die -35-Region statt (Tam *et al.*, 2002; Raivio und Silhavy, 2001). Bei ECF-Sigmafaktoren dient die Domäne 4 unter Nichtstressbedingungen außerdem der Bindung an einen Antisigmafaktor (Tam *et al.*, 2002) (Abb. 1)

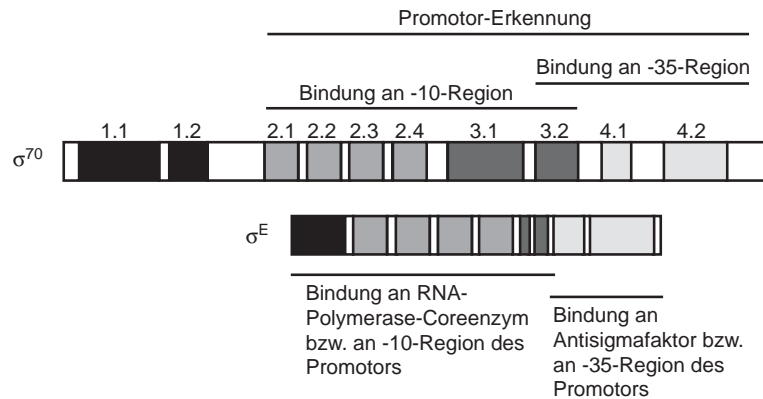


Abb. 1 Vergleich der Domänenanordnung von σ^{70} und σ^E (nach (Tam *et al.*, 2002))

Gemeinsam ist allen ECF-Sigmafaktoren, dass sie regulatorisch auf Veränderungen im Periplasma wirken. Dabei spielen sie bei verschiedenen Prozessen eine wichtige Rolle, z. B. Proteinfaltung, Zellwandbiosynthese, und Pathogenität (Bashyam und Hasnain, 2004; Kovacikova und Skorupski, 2002; Raivio und Silhavy, 2001). So sind $\Delta rpoE$ -Mutanten von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium unfähig in Mäusen zu überleben bzw. sich zu vermehren (Testerman *et al.*, 2002; Humphreys *et al.*, 1999). *Mycobacterium tuberculosis* $\Delta rpoE$ -Mutanten sind in der Fähigkeit, in Makrophagen zu wachsen und zu überleben, eingeschränkt (Manganelli *et al.*, 2001). AlgU aus *P. aeruginosa* vermittelt dem Bakterium Resistenz gegen Phagozytose (Yu *et al.*, 1996) und ist verantwortlich für den Übergang zum mucoiden Wachstum und für die Entstehung von Cystischer Fibrose im Menschen (Deretic *et al.*, 1994). Auch *Vibrio cholerae* $\Delta rpoE$ -Mutanten zeigen ein reduziertes Wachstum im Intestinaltrakt und eine verminderte Tötungsrate (Kovacikova und Skorupski, 2002). Im Pflanzenpathogen *P. syringae* kontrolliert HrpL die Transkription von Pflanzenvirulenzfaktoren als Antwort auf Pflanzenextrakte (Raivio und Silhavy, 2001). Es sind ebenfalls ECF-Sigmafaktoren bekannt, die aufgrund extrazellulärer Metallionen induziert werden. Mit Hilfe von FecI kann *E. coli* z. B. als Reaktion auf periplasmatisches Eisencitrat, die Expression von Citrat-abhängigen Fe(III)-Transportsystemen kontrollieren (Enz *et al.*, 2003; Mahren und Braun, 2003; Mahren *et al.*, 2002; Angerer *et al.*, 1995). CnrH kontrolliert in *C. metallidurans* CH34 die Expression des *cnr*-Operons, das für ein Co(II)/Ni(II)-Exportsystem kodiert (Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000).

ECF-Sigmafaktoren werden oft durch Antisigmafaktor-Komplexe gebunden. Diese verhindern zum einen die unkontrollierte Genexpression unter Normalbedingungen und ermöglichen zum anderen die Freisetzung des Sigmafaktors unter Stressbedingungen. Eines der bestuntersuchten

Systeme dieser Art ist σ^E -RseABC_{Ec} aus *E. coli*. Der Sigmafaktor RpoE_{Ec} (σ^E) wurde 1989 durch die Fähigkeit, eine Transkription ausgehend vom Promotor vor *rpoH* (Hitzeschock-Sigmafaktor) zu starten, aus Zellen isoliert, die bei 50°C gewachsen waren (Erickson und Gross, 1989). Desweiteren wurde RpoE_{Ec} als Kontamination in einer RNA-Polymerase-Präparation nach Hitzeinduktion (Wang und Kaguni, 1989) nachgewiesen. Der Sigmafaktor σ^E ist unter normalen Bedingungen an den membranständigen Antisigmafaktor RseA_{Ec} (*regulator of sigma E*) gebunden (Missiakas *et al.*, 1997). Eine Deletion von *rseA_{Ec}* führt zu einer konstitutiven Expression von *rpoE_{Ec}*, die 25-fach höher liegt als im Wildtypstamm (De Las Penas *et al.*, 1997b). RseA_{Ec} blockiert die Bindedomäne für das RNA-Polymerase-Coreenzym und verhindert dadurch die σ^E -abhängige Transkription (Brown und Hughes, 1995). Eine Komplexierung der cytoplasmatischen Domäne von RseA_{Ec} mit RpoE_{Ec} konnte mit Hilfe der Kristallstruktur von RseA_{Ec} nachgewiesen werden (Campbell *et al.*, 2003). Der C-Terminus von RseA_{Ec} ist periplasmatisch lokalisiert und interagiert mit RseB_{Ec} (Missiakas *et al.*, 1997). Durch periplasmatische Stresssituationen, die zu falsch gefalteten Proteinen in der bakteriellen Hülle führen, kommt es zur RseB_{Ec}-Abspaltung von RseA_{Ec}. Wahrscheinlich binden diese Proteine an RseB_{Ec} (Alba und Gross, 2004). Eine Deletion von RseB_{Ec} führt zu einer zweifachen Erhöhung der basalen σ^E -Aktivität (De Las Penas *et al.*, 1997a; Missiakas *et al.*, 1997). RseB_{Ec} steigert entweder die Stabilität (Ades *et al.*, 1999) oder die Aktivität (Collinet *et al.*, 2000) von RseA_{Ec}. Es wird angenommen, dass RseB_{Ec} für das „fine tuning“ der RseA_{Ec}-Aktivität unter wechselnden Stressbedingungen wichtig ist (Alba und Gross, 2004). RseA_{Ec} wird anschließend durch zwei Proteasen, DegS und YaeL, abgebaut (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002; Kanehara, 2003 #338; Dartigalongue, 2001 #490; Alba *et al.*, 2001; Kanehara *et al.*, 2001; Ades *et al.*, 1999). Durch die Proteolyse von RseA_{Ec} kommt es zur Freisetzung von σ^E und damit zur Aktivierung der σ^E -abhängigen Stressantwort (Ades *et al.*, 1999).

Neben der Nutzung von ECF-Sigmafaktoren haben Bakterien einen weiteren Mechanismus entwickelt, um durch gezielte Genexpression auf veränderte Umweltbedingungen reagieren zu können. Es handelt sich dabei um Zweikomponenten-Regulationssysteme (Stock *et al.*, 1990). Diese bestehen aus einer membranständigen Histidinkinase und einem korrespondierenden cytoplasmatisch lokalisierten *response*-Regulator, der in den meisten Fällen DNA-bindende Eigenschaften aufweist (Parkinson, 1993). Die Histidinkinase autophosphoryliert dabei als Antwort auf ein periplasmatisches Signal an einem konservierten Histidinrest (Hakenbeck und Stock, 1996) und überträgt den Phosphatrest anschließend auf einen ebenfalls konservierten Aspartatrest des *response*-Regulators (Parkinson, 1993). Dieser dient nun als

Transkriptionsaktivator, wodurch die Zelle auf das ursprüngliche periplasmatische Signal reagieren kann.

Ein sehr gut untersuchtes Zweikomponenten-System aus *E. coli* ist CpxAR (Cosma *et al.*, 1995). CpxA (Weber und Silverman, 1988) ist die membranständige Histidinkinase, die aufgrund von Veränderungen in der Membranzusammensetzung (Danese und Silhavy, 1998; Mileykovskaya und Dowhan, 1997), durch Anhäufung von falsch gefalteten Proteinen der bakteriellen Hülle (Jones *et al.*, 1997; Danese *et al.*, 1995) wie des *outer membrane*-Lipoproteins NlpE (Danese und Silhavy, 1997) und durch Veränderung des pH-Wertes (Danese und Silhavy, 1998; Nakayama und Watanabe, 1995) aktiviert wird. Ein kleines periplasmatisches Protein CpxP, das stromaufwärts des *cpxAR*-Operons in entgegengesetzter Richtung kodiert ist, dient dabei durch eine inhibierende Interaktion mit der periplasmatischen Sensordomäne von CpxA wahrscheinlich als negativer Regulator (DiGiuseppe und Silhavy, 2004). Für die Aktivierung von CpxA ist eine Freisetzung von CpxP notwendig (Raivio und Silhavy, 2001 DiGiuseppe, 2004 #377; Raivio *et al.*, 1999). In Folge der Autophosphorylierung von CpxA wird der Phosphatrest auf CpxR (Dong *et al.*, 1993) übertragen. Phosphoryliertes CpxR ist in der Lage definierte Sequenzmotive stromaufwärts σ^{70} - und σ^E -abhängiger Promotoren zu erkennen und an diese zu binden (Pogliano *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die Expression von Genen für die Zellentwicklung inklusive Proteinfaltung, -lokalisierung und -degradierung durch den Cpx-Weg kontrolliert (DiGiuseppe und Silhavy, 2004; Pogliano *et al.*, 1997) (Abb. 2).

Mindestens ein weiteres Zweikomponenten-System ist in *E. coli* für die Detektion von periplasmatischen Stresssituationen wichtig: BaeSR wurde 1993 identifiziert (Nagasawa *et al.*, 1993) und später in Microarray-Analysen untersucht. Dabei zeigten *bae*-Mutanten eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Myricetin, Gallensäure, NiCl₂ und Natriumwolframat (Zhou *et al.*, 2003). Stämme, denen sowohl *cpxR* als auch *baeR* fehlen, wiesen, relativ zu den Einzelmutanten, eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Stress auf (Raffa und Raivio, 2002).

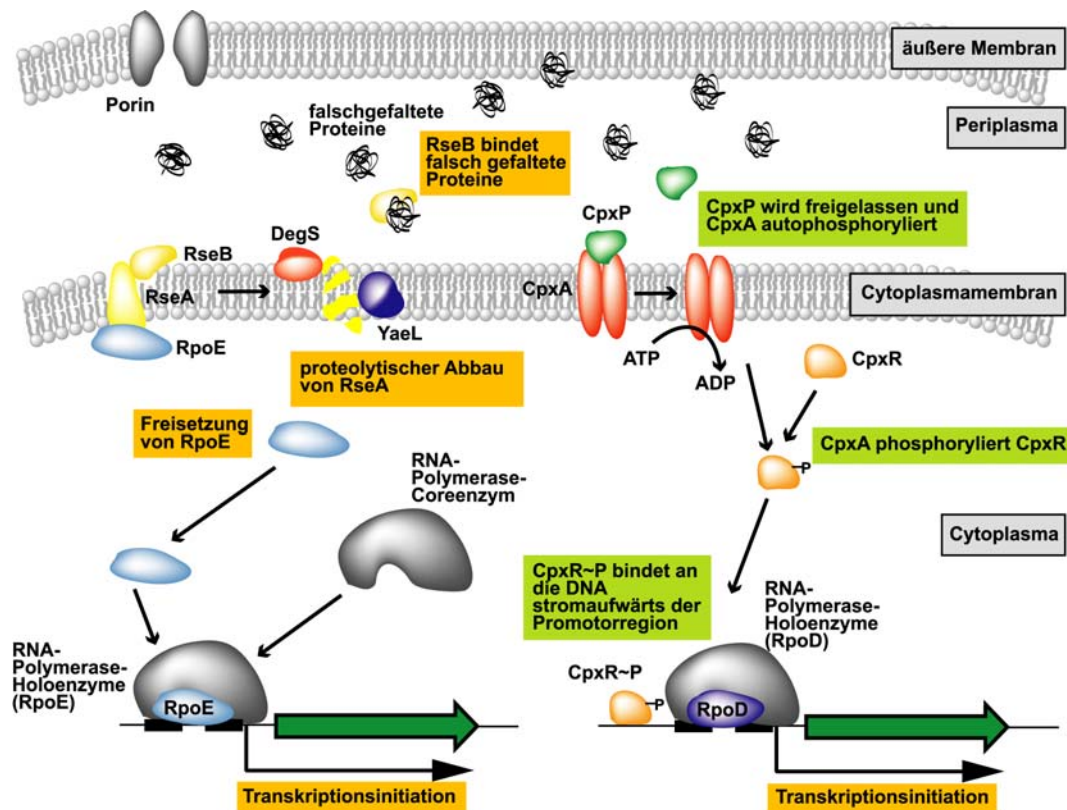


Abb. 2 Schematische Darstellung der Informationsübertragung über die Cytoplasmamembran durch das Antisigmafaktor-Sigmafaktor-System $RseAB_{Ec}$ - $RpoE_{Ec}$ und das Zweikomponenten-System CpxAR aus *E. coli*

Das Schwermetall-resistente Bakterium *C. metallidurans* CH34 ((Vandamme und Coenye, 2004), Synonyme: *Alcaligenes eutrophus* (Mergeay *et al.*, 1985) *Ralstonia spec.* (Brim *et al.*, 1999), *Ralstonia metallidurans* (Goris *et al.*, 2001; Mergeay, 2000), *Wautersia metallidurans* (Vanechoutte *et al.*, 2004)), das 1974 aus einem Zinkdekantierungstank in Belgien isoliert wurde (Mergeay *et al.*, 1978), hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich vor zu hohen Metallkonzentrationen zu schützen. Metallionen werden zwar von einem Drittel aller Proteine für die korrekte Faltung oder als Cofaktor im katalytischen Zentrum benötigt (Finney und O'Halloran, 2003), in hohen Konzentrationen wirken Metallionen allerdings toxisch auf Zellen (Worlock und Smith, 2002; O'Halloran und Culotta, 2000; Nies, 1999). Da die meisten Ionen unspezifisch aufgenommen werden (Nies und Silver, 1995), haben Bakterien Strategien entwickelt, um sich vor zu hohen Konzentrationen zu schützen. Metallionen können zum einen durch aktive Effluxprozesse wieder aus der Zelle transportiert oder an Thiolgruppen gebunden werden (Nies und Silver, 1995). Außerdem ist es möglich, einige Metallionen zu einem weniger toxischen Oxidationszustand zu reduzieren (Nies, 1999).

Die Resistenz von *C. metallidurans* CH34 basiert hauptsächlich auf dem Export der Metallionen aus der Zelle, wobei drei verschiedene Systeme genutzt werden. Zum einen die hoch effektiven

Transporter der RND-Familie (*resistance, nodulation, cell division*) (Saier, 2000; Paulsen *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 1994), die über einen Protonengradienten angetrieben werden (Goldberg *et al.*, 1999) und mit einem MFP (*membrane fusion protein*) (Kawabe *et al.*, 2000; Zgurskaya und Nikaido, 2000; Dinh *et al.*, 1994) und einem OMF (*outer membrane factor*) (Johnson und Church, 1999) beide Membranen überspannen. Dazu gehören das CzcCBA-System (Nies und Silver, 1989a; Nies *et al.*, 1987), das Resistenz gegenüber Co(II), Zn(II) und Cd(II) vermittelt, und CnrCBA, das Co(II) und Ni(II) transportieren kann (Liesegang *et al.*, 1993; Siddiqui *et al.*, 1989; Siddiqui *et al.*, 1988).

C. metallidurans CH34 weist ebenfalls Vertreter der CDF-Proteinfamilie (*cation diffusion facilitator*) auf (Paulsen und Saier, 1997; Nies und Silver, 1995). Das Protein CzcD ist z. B. in die Resistenz gegenüber Co(II), Zn(II) und Cd(II) des Bakteriums involviert (Anton *et al.*, 2004; Anton *et al.*, 1999). Die chromosomal kodierten CDF-Proteine DmeF und FieF verleihen dem Bakterium Resistenz gegen Co(II) und Cd(II) (Munkelt *et al.*, 2004).

Die dritte Proteinfamilie, die Metallionen über die Cytoplasmamembran transportieren kann, sind die Cpx-Typ ATPasen (Gatti *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1999; Solioz und Vulpe, 1996). Zwei chromosomal kodierte Vertreter, ZntA_{Cm} und CadA, transportieren Zn(II) und Cd(II) (Legatzki *et al.*, 2003; Anton, 2001).

Auch *E. coli* verfügt über Effluxsysteme, um sich vor zu hohen Metallkonzentrationen zu schützen. Für die Entgiftung von Zn(II) existieren das CDF-Protein ZitB (Grass *et al.*, 2001a) und die Cpx-Typ ATPase ZntA_{Ec} (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997), wobei letztere auch Cd(II) transportiert. Kupferionen (Cu(I)) werden über die Cytoplasmamembran durch die Cpx-Typ ATPase CopA (Petersen und Moller, 2000) transportiert, im Periplasma durch die Multicopper-Oxidase CueO (Grass und Rensing, 2001a) oxidiert bzw. über den Transportkomplex CusCBA, der homolog zum Czc- bzw. Cnr-System aus *C. metallidurans* ist, nach außen transportiert (Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001b; Munson *et al.*, 2000).

Ein Einfluß von RpoE auf Schwermetall-Resistenzen wurde bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung des Sigmafaktors RpoE_{Ec} aus *E. coli* (rpoE_{Ec} bzw. RpoE_{Ec}) und seines sequenzhomologen Proteins aus *C. metallidurans* CH34 (rpoE_{Cm} bzw. RpoE_{Cm}) hinsichtlich ihrer Beteiligung an Schwermetall-Homöostase-Prozessen. Dabei standen die Untersuchung von Deletionsmutanten, die Analyse der Expressionsbedingungen der rpoE-Gene und die Suche nach möglichen Zielgenen des σ^E -abhängigen Regulationswegs im Vordergrund.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Cupriavidus metallidurans</i>			
CH34	pMOL28, pMOL30		(Mergeay <i>et al.</i> , 1985)
AE104	plasmidfrei	keine plasmidkodierte Metallresistenz	(Mergeay <i>et al.</i> , 1985)
DN438	plasmidfrei	$\Delta cadA$	(Legatzki <i>et al.</i> , 2003)
DN439	plasmidfrei	$\Delta zntA_{Cm}$	(Legatzki <i>et al.</i> , 2003)
DN442	plasmidfrei	<i>cadA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion	(Legatzki <i>et al.</i> , 2003)
DN444	plasmidfrei	<i>zntA_{Cm}-lacZ</i> -Transkriptionsfusion	(Legatzki <i>et al.</i> , 2003)
DN462	plasmidfrei	$\Delta rpoE_{Cm}$	diese Arbeit
DN463	plasmidfrei	$\Delta rpoE_{Cm}$, <i>cadA-lacZ</i> -Transkriptionsfusion	diese Arbeit
DN464	plasmidfrei	$\Delta rpoE_{Cm}$, <i>zntA_{Cm}-lacZ</i> -Transkriptionsfusion	diese Arbeit
DN480	pMOL28, pMOL30	$\Delta rpoE_{Cm}$	diese Arbeit
DN481	plasmidfrei	<i>rpoE_{Cm}-lacZ</i> -Transkriptionsfusion (Insertion von pECD919)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>			
JM83		<i>ara</i> , $\Delta(lac - proAB)$, <i>rpsL</i> , (<i>str</i> ^r), <i>thi</i> , $\Phi 80$, <i>lacZ</i> $\Delta M15$	(Vieira und Messing, 1982)
ER 2566		F λ <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> $\Delta(mcrC-mrr)$ 114:: <i>IS10</i> R(<i>mcr-73::miniTn10—TetS</i>)2 R(<i>zgb-210::Tn10</i>) (<i>tet</i> ^S) <i>endA1</i> [<i>dcm</i>]; T7-Expressionsstamm	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
S17/1		<i>pro</i> , Tra ⁺ , <i>recA</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
EC931	pECD732	<i>rpoE_{Cm}</i> als <i>EcoRI</i> / <i>SmaI</i> -Fragment in pTYB2	(von Rozycki, 2002)
ECA060	pECD794	pLO2:: <i>lacZ</i> für Transkriptionsfusion in <i>C. metallidurans</i> (<i>kan</i> ^r)	(Scherer, 2003)

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
ECA061	pECD795	<i>zntA_{Cm}</i> ' in pECD794	(Legatzki, 2003)
ECA062	pECD796	<i>cadA</i> in pECD794	(Legatzki, 2003)
BW25113		<i>lacF^q</i> , <i>rrnB_{T14}</i> , Δ <i>lacZ_{WJ16}</i> , <i>hsdR514</i> , Δ <i>araBA-D_{AH33}</i> , Δ <i>rhaBAD_{LD78}</i>	(Datsenko und Wanner, 2000)
	pKD46	Red disruption system (γ , β , <i>exo</i> unter Kontrolle von <i>araBp</i>), (<i>amp^r</i>)	(Datsenko und Wanner, 2000)
BT340	pCP20	hitzeinduzierbare FLP Synthese, (<i>amp^r</i>)	(Datsenko und Wanner, 2000)
	pKD3	Δ <i>lacZYA514</i> , Δ <i>arcB40</i> , Δ <i>pstS605</i> Derivat von pANTS γ mit FRT-flankierter Chloramphenicol-Kassette (<i>cat</i>), (<i>amp^r</i>)	(Datsenko und Wanner, 2000)
	pINT-ts	Int λ , att POP' (<i>kan^r</i>)	(Hasan <i>et al.</i> , 1994)
K12		<i>E. coli</i> Wildtyp	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
	pGEM [®] -T Easy	<i>lacPOZ'</i> , zur Klonierung von PCR-Produkten (<i>amp^r</i>)	Promega, Madison, WI-USA
	pASK-IBA3	Expressionsvektor mit <i>Strep</i> -Tag II [®] (C-terminal) unter Kontrolle von <i>tetAp</i> , (<i>amp^r</i>)	IBA-GmbH, Göttingen
BW23474	pAH125	Δ (<i>lacIZYA argF</i>)U169 <i>rph-1</i> , <i>rpoS396</i> (Am) <i>robA1</i> , <i>creC510</i> , <i>hsdR514</i> , Δ <i>endA9</i> , <i>uidA</i> (Δ <i>MluI</i>):: <i>pir116</i> (wt), <i>recA1</i> <i>oriR_{\gamma}</i> , <i>lacZ</i> , att POP' (<i>kan^r</i>)	(Haldimann und Wanner, 2001)
ECA196	pECD890	pAH125:: <i>rpoEp-rpoE_{Ec}</i>	diese Arbeit
ECA197	pECD891	pAH125:: <i>rpoEp-rpoErseAB_{Ec}</i>	diese Arbeit
ECA200	pECD892	pAH125:: <i>rpoEp-rpoErseAB_{Cm}</i>	diese Arbeit
ECA202	pECD893	pAH125:: <i>rpoEp_{Ec}</i>	diese Arbeit
ECA218	pECD894	pAH125:: <i>cueRp</i>	diese Arbeit
ECA221	pECD895	pAH125:: <i>cueOp</i>	diese Arbeit
ECA224	pECD896	pAH125:: <i>copAp</i>	diese Arbeit
ECA101		Δ <i>rpoE_{Ec}</i>	diese Arbeit
ECA198		Δ <i>rpoE_{Ec}</i> , λ_{att} :: <i>rpoEp-rpoE_{Ec}</i>	diese Arbeit
ECA199		Δ <i>rpoE_{Ec}</i> , λ_{att} :: <i>rpoEp-rpoErseAB_{Ec}</i>	diese Arbeit
ECA203		λ_{att} :: <i>rpoEp_{Ec}-lacZ</i>	diese Arbeit
ECA204		Δ <i>copA</i>	diese Arbeit
ECA205		Δ <i>cusCFBA</i>	diese Arbeit
ECA206		Δ <i>cueO</i> :: <i>cat</i>	diese Arbeit
ECA207		Δ <i>rpoE_{Ec}</i> , Δ <i>copA</i>	diese Arbeit
ECA208		Δ <i>rpoE_{Ec}</i> , Δ <i>cusCFBA</i>	diese Arbeit
ECA209		Δ <i>rpoE_{Ec}</i> , Δ <i>cueO</i> :: <i>cat</i>	diese Arbeit
ECA210		Δ <i>copA</i> , Δ <i>cusCFBA</i>	diese Arbeit

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
ECA211		$\Delta copA, \Delta cueO::cat$	diese Arbeit
ECA212		$\Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	diese Arbeit
ECA213		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA, \Delta cusCFBA$	diese Arbeit
ECA214		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA, \Delta cueO::cat$	diese Arbeit
ECA215		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	diese Arbeit
ECA216		$\Delta copA, \Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	diese Arbeit
ECA217		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA, \Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	diese Arbeit
ECA219		$\lambda_{att::cueRp-lacZ}$	diese Arbeit
ECA220		$\Delta rpoE_{Ec} \lambda_{att::cueRp-lacZ}$	diese Arbeit
ECA222		$\lambda_{att::cueOp-lacZ}$	diese Arbeit
ECA223		$\Delta rpoE_{Ec} \lambda_{att::cueOp-lacZ}$	diese Arbeit
ECA225		$\lambda_{att::copAp-lacZ}$	diese Arbeit
ECA226		$\Delta rpoE_{Ec} \lambda_{att::copAp-lacZ}$	diese Arbeit
ECA227		$\Delta zntA_{Ec}$	diese Arbeit
ECA228		$\Delta zitB$	diese Arbeit
ECA229		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta zntA_{Ec}$	diese Arbeit
ECA230		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta zitB$	diese Arbeit
ECA231		$\Delta zntA_{Ec}, \Delta zitB$	diese Arbeit
ECA232		$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta zntA_{Ec}, \Delta zitB$	diese Arbeit
ECA261	pECD918	pCM184-Konstrukt für $rpoE_{Cm}$ -Deletion	diese Arbeit
ECA262	pECD919	$rpoE_{Cm}$ in pECD794	diese Arbeit

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien und Zusätze

A) Nährbouillon-NA (SIFIN GmbH, Berlin)

25 g Nährbouillon I bzw. 15 g Nährbouillon II

ad 1 l H_2O_{bidest}

B) Nähragar II-NB (SIFIN GmbH, Berlin)

26 g Nähragar II

ad 1 l H_2O_{bidest}

C) Lysogeny broth (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. Fertigmedium (DIFCO, Detroit, USA)

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g Natriumchlorid
NaOH ad pH 7.0
ad 1 l H₂O_{bidest}

Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt.

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

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

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

E) Spurenelementlösung SL6 (10 fach) (Pfennig, 1974)

900 ml H₂O_{bidest}
0.1 g ZnSO₄ x 7 H₂O
0.03 g MnCl₂ x 4 H₂O
0.3 g H₃PO₃
0.2 g CoCl₂ x 6 H₂O
0.01 g CuCl₂ x 2 H₂O
0.188 g NiCl₂ x 6 H₂O
0.3 g Na₂Mo₄ x 2 H₂O
ad 1 l H₂O bidest

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

Komponente A (20 fach):800 ml H₂O_{bidest}

121.1 g Tris-HCl

HCl ad pH 7.0

danach Zugabe von:

93.6 g NaCl

29.8 g KCl

21.4 g NH₄Cl4.0 g MgCl₂ x 6 H₂O0.6 g CaCl₂ x 2 H₂O

0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat

2 ml Spurenelementlösung SL6 (10 fach) (Pfenning, 1974)

ad 1 l H₂O_{bidest}Komponente B (20 fach):900 ml H₂O_{bidest}19.5 g Na₂SO₄ x 10 H₂O4.6 g Na₂HPO₄ x 12 H₂Oad 1 l H₂O_{bidest}

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Für die Anzucht von *C. metallidurans* wurde 0.2% (w/v) Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle zugegeben. Für die Anzucht von *E. coli* wurden 0.2% Glycerin und 3 g/l Casaminohydrolysat als Kohlenstoffquelle zugesetzt und mit autoklaviert.

G) Medienzusätze**Schwermetallsalze**

Die Schwermetallsalze wurden als 0.1 M (CdCl₂) bzw. 1 M wässrige Stammlösungen hergestellt. Die Stammlösung wurde im sterilen Medium auf die beschriebenen Endkonzentrationen verdünnt.

Antibiotika

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

Tabelle 2: Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium

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

Weitere Medienzusätze

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

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

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

Die Anzucht von *C. metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Minimalmedium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 0.2% (w/v) Natriumgluconat zugesetzt wurde. Als Kulturgefäße für die Anzuchten aller Stämme dienten sterile Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß maximal 1:5 betrug. Die Zugabe von Schwermetallsalzen erfolgte in den beschriebenen Konzentrationen. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C mit 250 rpm auf einem Schüttler (KS 500, IKA-Labortechnik, Staufen) bzw. für Wachstumsversuche in einem Wasserbadschüttler (HT Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung mit einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., USA) in Klett-Einheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Die Zellernte erfolgte entweder durch Zentrifugation in der Universal 30 RF-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) oder der Eppendorf Centrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) für 15 min mit 5000 rpm bei 4°C , in der Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) bei 4°C , 10 min mit 12000 rpm oder durch 10 min Zentrifugation in der Sigma Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) mit 12000 rpm.

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

B) *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C oder 37°C (Brutraum) in schräg eingespannten Reagenzgläsern auf einem Schüttler (KS500, IKA Labortechnik, Staufen; GFL 3016, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) mit 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Bio-Rad SmartSpec™ 3000, Hercules, USA) oder mit dem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., USA) in Klett-Einheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Die Zellernte erfolgte wie für *C. metallidurans* beschrieben. Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3 Stammhaltung

Die Kultivierung von *C. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agar-Platten, wobei den Megaplasmid-tragenden Stammkulturen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt wurden. Bei der Insertion von Antibiotika-Resistenz-Kassetten in das bakterielle Genom wurde das entsprechende Antibiotikum zur Selektion eingesetzt. Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so dass zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand. *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agar- bzw. NA-Platten mit 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 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 entnommen und mit Glycerin [Endkonzentration 20% (v/v)] versetzt.

2.3 Molekulargenetisches 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 Plasmidisolierung mittels E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Diese Methode diente der Gewinnung von reiner Plasmid-DNA für verschiedenste molekulargenetische Techniken, sowie für die Sequenzierung des Inserts.

Nach der Inkubation einer 3 ml-Übernachtskultur mit Antibiotikum, die bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, erfolgte eine Sedimentation der Zellen bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode).

Bei der Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach dem vom Hersteller beigefügten Protokoll vorgegangen. Die DNA wurde mit 75 µl H₂O_{bidest} eluiert.

2.3.1.2 Isolierung genomischer DNA mittels E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Diese Methode wurde benutzt, um reine genomische DNA für verschiedene molekularbiologische Techniken, wie z.B. DNA-DNA-Hybridisierung, zu isolieren.

Eine 3 ml-Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation bei 12000 rpm sedimentiert (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) und daraus, nach Angaben des Herstellers, die enthaltene genomische DNA isoliert. Die Elution erfolgte in zweimal 200 µl H₂O_{bidest}.

2.4 DNA-Techniken

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (*Easy CastTM Elektrophoresis System*, Portsmouth, USA). Dabei variierte die Gelkonzentration von 0.8% bei großen Fragmenten bis zu 2% bei kleinen Fragmenten.

Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)] eingesetzt. Die Agarose wurde dem Puffer zugegeben und in 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). Die Sichtbarmachung der Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden

erfolgte durch UV-Licht (Geldokumentationssystem INTAS, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.4.2 DNA-Größenstandards

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

2.4.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten 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.

2.4.4 Spaltung von DNA mittels Restriktions-Endonukleasen

Die Spaltung 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 10-fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37°C spaltet.

Die Überprüfung auf vollständige Spaltung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden mittels Fällung durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Volumen 96%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation, 30 min bei 12000 rpm (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) von Puffer- und Enzymresten gereinigt. Gewaschen wurde danach mit 70%igem Ethanol für 5 min bei 12000 rpm (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode).

2.4.5 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 Waschschrift, erfolgte die Elution der DNA mittels sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die DNA mit 50 μl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionsverdau eingesetzt.

2.4.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt. Das Verhältnis Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:5. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2 μl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Für die Ligation von PCR-Produkten in pGEM[®]-T Easy wurde 0.5 μl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Ligation wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.4.8.1 Auswahl der Primer

Die Ableitung der Primer erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms OLIGO aus bekannten Sequenzen. Die Oligonukleotid-Primer (Tabelle 3) wurden von der Metabion GmbH, Martinsried bezogen. Sie wurden in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst, und auf eine Endkonzentration von ca. 20 pmol/ μl verdünnt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
<u>C. metallidurans-Deletionsprimer</u>		
rpoE-cre-EcoRI	→ AAA <u>GAA TTC</u> AAC TTC GGC TTC GGC GGT	bindet ca. 300 bp stromaufwärts von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
rpoE-cre-NdeI	← AAA <u>CAT ATG</u> ATC GGC TTC GCG TTC ACT CAC	bindet direkt am GTG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
rpoE-cre-MluI	→ AAA <u>ACG CGT</u> AAG CGG TGG TAG GGG ATG TCA	bindet direkt am TAG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>MluI</i> -Schnittstelle
rpoE-cre-AgeI	← AAA <u>ACC GGT</u> GCG GAG AAT CGG GAG AGG AAG	bindet ca. 300 bp stromabwärts von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>AgeI</i> -Schnittstelle
rpoE1	→ CGC CGC CGA CCA TCA ACA TCT	Kontrollprimer, bindet ca. 400 bp stromaufwärts von <i>rpoE_{Cm}</i>
rpoE2	← CCA GCC TTT ACC GTC GCA GCC	Kontrollprimer, bindet ca. 600 bp stromabwärts von <i>rpoE_{Cm}</i>
<u>Primer für <i>rpoE_{Cm}-lacZ</i>-Konstruktion in <i>C. metallidurans</i></u>		
'rpoE-lacZ-Pst	→ AAA <u>CTG CAG</u> CGA AGT GGA GGA TGT GGC G	bindet ca. 300 bp stromaufwärts des TAG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
'rpoE-lacZ-Sal	← AAA <u>GTC GAC</u> TCA AGC GTA ATG GCG GTG CGT A	bindet direkt am TAG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>SalI</i> -Schnittstelle
<u>Primer für Gel-Retardierungsexperimente</u>		
691 oo Nde	→ AAA <u>CAT ATG</u> CGG GCT CGG CCA AGC TGT	bindet ca. 300 bp stromaufwärts von <i>cadA</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
691 ou Mun	← AAA <u>CAA TTG</u> GGA AGC AAC CAT GAT GCG GAT C	bindet am ersten vorhergesagten ATG von <i>cadA</i> , <i>MunI</i> -Schnittstelle
649 oo Nde	→ AAA <u>CAT ATG</u> GAG CTT GGC CGA TTT GCT GTC	bindet ca. 300 bp stromaufwärts von <i>zntA_{Cm}</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
649 ou Mun	← AAC <u>AAT TGG</u> TCA AAT TCC ATT GTT CTT GTT CC	bindet am ersten vorhergesagten ATG von <i>zntA_{Cm}</i> , <i>MunI</i> -Schnittstelle

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
rpoE Nde down	→ AAA <u>CAT ATG</u> AAC TTC GGC TTC GGC GGT	bindet ca. 300 bp stromaufwärts <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle
rpoE Bam	← AAA <u>GGA TCC</u> ATC GGC TTC GCG TTC ACT CAC	bindet am GTG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle
<u>Primer für in vitro-Transkriptionsexperimente</u>		
cadA up-run-off	← CGA GGT GCG AGC GGA TGA GTT	bindet ca. 450 bp stromabwärts des vorhergesagten ATG von <i>cadA</i>
zntA up-rum-off	← GTC TCC TCG GTC GGG CAA TCC	bindet ca. 300 bp stromabwärts des vorhergesagten ATG von <i>zntA_{Cm}</i>
rpoE(Rm) pASK Pst	← AAA <u>CTG CAG</u> TCA GTG TAC CGC TTT GGG C	bindet direkt am TAG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
<u>E. coli-Deletionsprimer</u>		
FRT-rpoE-Ec-down	→ TGG TTT GGG GAG ACT TTA CCT CGG ATG AGC GAG CAG TTA <u>GCG ATT GTG TAG GCT GGA GCT</u>	39 nt stimmen mit dem Start von <i>rpoE_{Ec}</i> überein, unterstrichene nt sind identisch mit pKD3
FRT-rpoE-Ec-up	← CCC TTA TTC AGT ATC CCG CTA TCG TCA ACG CCT GAT AAG <u>CCA TGG TCC ATA TGA ATA TCC TCC</u>	39 nt stimmen mit dem Ende von <i>rpoE_{Ec}</i> überein, unterstrichene nt sind identisch mit pKD3
Ec-rpoE-down	→ CTC TAA CCC TTT GCT TGC TCA	bindet ca. 100 bp stromaufwärts von <i>rpoE_{Ec}</i>
Ec-rpoE-up	← GGG TTA TGA GCC AGT TCG TTA	bindet ca. 100 bp stromabwärts von <i>rpoE_{Ec}</i>
rpoE(Ec) pASK-SacII d	→ AAA <u>CCG CGG</u> ATG AGC GAG CAG TTA ACG GAC	bindet direkt am ATG von <i>rpoE_{Ec}</i> , <i>SacII</i> -Schnittstelle
rpoE(Ec) pASK-Pst	← AAA <u>CTG CAG</u> TCA ACG CCT GAT AAG CG	bindet direkt am TGA von <i>rpoE_{Ec}</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
rseB(Ec) pASK-Pst	← AAA <u>CTG CAG</u> TCA TTG CGC TGC CCC GAA	bindet direkt am TGA von <i>rseB_{Ec}</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
rpoE 5'-pVDZ-Eco	→ AAA <u>GAA TTC</u> AGG AGG AAC AAC TTC GGC TTC GGC GGT	bindet am GTG von <i>rpoE_{Cm}</i> , <i>EcoRI</i> -Schnittstelle

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
<u>Primer für Promotor-lacZ-Fusionen in <i>E. coli</i></u>		
Ec-rpoEp-Pst	← AAA <u>CTG CAG</u> AGA ACG ATG ACC TGA TGC TGG	bindet ca. 500 bp stromaufwärts von <i>rpoE_{Ec}</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
Ec-rpoEp-Eco	→ AAA <u>GAA TTC</u> CCA GAC TCG CCA CTT TAT GCT	bindet ca. 100 bp stromabwärts des ATG von <i>rpoE_{Ec}</i> , <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
copAp-Pst	→ AAA <u>CTG CAG</u> TCG CCA GAA AGG GAA TGT AAT	bindet ca. 350 bp stromaufwärts von <i>copA</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
copAp-Eco	← AAA <u>GAA TTC</u> ATA GAC ACA TCC GCC TGC TCA	bindet ca. 100 bp stromabwärts des ATG von <i>copA</i> , <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
cueOp-Pst	→ AAA <u>CTG CAG</u> TGA GCG AAA AAG ACC AGT GCG	bindet ca. 350 bp stromaufwärts von <i>cueO</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
cueOp-Eco	← AAA <u>GAA TTC</u> GGC ATC GGT CGT GAC CAA ATC	bindet ca. 130 bp stromabwärts des ATG von <i>cueO</i> , <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
cueRp-Pst	→ AAA <u>CTG CAG</u> GAT TAT GCT GAT GAC GGC GGC	bindet ca. 400 bp stromaufwärts von <i>cueR</i> , <i>PstI</i> -Schnittstelle
cueRp-Eco	← AAA <u>GAA TTC</u> GCG TCA CCA GCC CCT TCT CTT	bindet ca. 80 bp stromabwärts des ATG von <i>cueR</i> , <i>EcoRI</i> -Schnittstelle

a) Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen.

2.4.8.2 Standard-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 (Roche, Mannheim) oder ein Gemisch mit *Taq*-Polymerase [*ExpandTM 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 Matrize eingesetzt. Die Zellen wurden dabei mittels sterilen Zahnstochers von der Agaroberfläche in steriles H₂O_{bidest} überführt.

Reaktionsansatz:

5 μ l 10 x PCR Puffer
 0,5 μ l 10 mM dNTP-Mix
 2 μ l Primer 1 (20 pmol)
 2 μ l Primer 2 (20 pmol)
 1 μ l Matrizen-DNA (ca.100 ng / μ l)
 ad 50 μ l steriles H₂O_{bidest}

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

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

- | | | | |
|----|---|---------|------------------|
| 1) | 3 min | 96°C | Hot-Start |
| | Zugabe von Polymerase (0.3-2 U). Dabei wurde die Mineralölschicht mit der Pipettenspitze durchstoßen. | | |
| 2) | 40 s | 96°C | Denaturierung |
| 3) | 30 s | x°C | Primeranlagerung |
| 4) | 1 min/kb | 68/72°C | Extension |
| | Schritt 2-4 : 25-30 Zyklen | | |
| 5) | 5-10 min | 68/72°C | Nachsynthese |
| 6) | Pause | 4°C | |

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

2.4.8.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem *QIAquick PCR Purification Protocol* (QIAGEN GmbH, Hilden) oder dem Protokoll des E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

2.4.9 DNA-Transfer in *Escherichia coli* und Selektion rekombinanter Klone

2.4.9.1 Transformation nach der CaCl₂-Methode

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

Von dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Diese wurde 1:100 in einer 100 ml Hauptkultur verdünnt und bei 37°C bis zu einem OD₆₀₀ von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden zu je 50 ml in sterile, auf Eis vorgekühlte Greiner-Röhrchen (Laborfachhandel, Leipzig) 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; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg). Das Pellet wurde vorsichtig in je 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung auf Eis resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und im Eisbad bis zur Transformation 3-24 h aufbewahrt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25% (v/v)] versetzt und bei -80°C gelagert.

Je 100 µl CaCl₂-kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit 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 für 2 min auf Eis gekühlt wurden. Nach Zugabe von 0.4 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.

2.4.9.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation nach Dower (1988)

A) Herstellung kompetenter Zellen

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

B) Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit dem *Gene Pulser* der Firma 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 (Elektrodenabstand

0.1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 μ F, 1.8 kV und 200 Ω , wodurch eine Feldstärke von 12.5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3.5-4.5 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 30°C/37°C inkubiert. Anschließend wurden 50-200 μ l des Ansatzes auf Selektionsagar ausplattiert.

2.4.9.3 Selektion plasmidtragender *E. coli*-Klone

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

2.4.9.4 Plasmidtransfer durch Konjugation

Der konjugative Plasmidtransfer (von pVDZ'2 bzw. pLO2) wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) und *C. metallidurans*-Zellen aus LB- bzw. Tris-MM-Übernachtskulturen durchgeführt. Je 200 μ l der zu konjugierenden Stämme wurden auf einer NA-Platte zusammen ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Konjuganten wurden direkt mit einer Impföse von der bewachsenen Platte entnommen, in Tris-MM-Medium resuspendiert und auf Tris-Minimalmedium-Agar-Platten mit 12.5 mg/ml Tetrazyklin bzw. 1.5 mg/ml Kanamycin ausgestrichen. Ein Wachstum von *E. coli*-Zellen auf diesen Medien wurde aufgrund von Auxotrophien bzw. inhibierenden Konzentrationen an Antibiotikum verhindert.

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

Dieses System beruht auf dem Prinzip der ortsspezifischen Rekombination unter Verwendung des λ -Red-Rekombinase-Systems. Ein chromosomales Gen wird gegen eine selektierbare Antibiotikaresistenz ausgetauscht, welche durch PCR amplifiziert wurde. Die genutzten Primer enthielten eine zum Zielgen ca. 40 nt homologe Sequenz für die Rekombination. Mit amplifiziert wurden FRT (FLP *recognition target*)-sites, die für die nachträgliche Entfernung der Antibiotikaresistenz notwendig sind.

A) Inaktivierung der Gene

Zur Gewinnung elektrokompeter Zellen wurde *E. coli* BW25113(pKD46) mit L-Arabinose (Endkonzentration 1 mM) in SOB-Medium bei 30°C angezogen und elektrokompente Zellen, wie zuvor beschrieben, hergestellt. Unter Kontrolle des Arabinosepromotors stehen die Gene des λ -Red (γ , β , *exo*)-Rekombinase-Systems. Die Zellen wurden mit gereinigten PCR-Produkten, die Sequenzen ca. 40 bp stromauf- und stromabwärts des zu deletierenden Genes, FRT-sites und Antibiotikaresistenz-Kassette enthalten, elektroporiert und auf Antibiotika-haltigen (Kanamycin bzw. Chloramphenicol) Agar-Platten selektiert. Zur Entfernung des Helferplasmides pKD46 wurden die Klone auf Antibiotika-freiem Agar ausgestrichen und bei 43°C inkubiert. Die Überprüfung erfolgte durch Selektion auf Kanamycin bzw. Chloramphenicol und Negativselektion auf Ampicillin. Der Genaustausches gegen die Antibiotikaresistenz wurde mittels PCR überprüft.

B) Eliminierung der Antibiotikaresistenz

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

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

A) Gewinnung des P1-Lysates

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

(5000 rpm, 4°C, 10 min) und der Überstand in ein neues 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von einigen Tropfen Chloroform wurde das Lysat bei 4°C gelagert.

B) P1-Transduktion

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

2.4.9.7 Herstellung chromosomaler Deletionsmutanten in *C. metallidurans*

Hierzu wurde eine Methode von Marx (2002) angewandt. Es wurden ca. 300 bp stromaufwärts und stromabwärts des zu deletierenden Genbereichs in den Vektor pCM184, der in *C. metallidurans* nicht replizieren kann, kloniert. Der Vektor pCM184 trägt zwischen den beiden *multiple cloning sites* eine von *loxP*-Erkennungstellen flankierte Kanamycin-Kassette. Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E. coli* Stamm (S17/1) mit *C. metallidurans* konjugiert werden. Es kam zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hatte, die durch Selektion auf Kanamycin und Tetrazyklin identifiziert werden konnten. Zur vollständigen Deletion von Genen wurden die Zellen zwei Tage in Tris-Minimalmedium mit 1.5 mg/ml Kanamycin angezogen, wobei die Cointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten, und es dabei zur Fragment-Integration kam. Die Kulturen wurden dreimal in neues Tris-Minimalmedium mit Kanamycin überführt und anschließend eine 1:10000-Verdünnung auf Kanamycin-haltiges Tris-Minimalmedium ausplattiert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurden Einzelkolonien auf Kanamycin- bzw. Tetrazyklin-haltige Platten gegengepickt. Durch Negativselektion auf Tetrazyklin konnten auf diese Weise Doppelaustausch-Rekombinanten isoliert werden. Nach Überprüfung mittels PCR wurde durch Konjugation ein weiteres Plasmid, pCM157, in diese Stämme gebracht. Das Plasmid pCM157 kodiert das Gen für die Cre-Rekombinase des P1-Phagens. Auf diese Weise war es möglich die Kanamycin-Resistenz-Kassette wieder aus dem Genom von *C. metallidurans* zu entfernen und eine markerlose Deletionsmutante herzustellen. Das Plasmid pCM157 konnte durch drei Passagen ohne Tetrazyklin wieder entfernt werden.

2.4.9.8 Herstellung chromosomaler Reporterfusionen in *C. metallidurans*

Hierzu wurde eine Methode von Lenz (1994) in leicht veränderter Form angewandt. Der auszutauschende DNA-Bereich wurde dazu in den Vektor pLO2-lacZ kloniert, der für eine Kanamycin-Kassette codiert. Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E. coli*-Stamm (S17/1) mit *C. metallidurans* konjugiert werden. Das Plasmid ist in *C. metallidurans* nicht replizierbar. Es kam zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hatte, die durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden konnten. Ziel war die Herstellung von *lacZ*-Expressionsmutanten durch die Integration des Vektors in den zentralen Teil bzw. stromabwärts eines Gens. Dadurch kann die β -Galaktosidase als Genprodukt von *lacZ* als Maß für die Promotoraktivität stromaufwärts der Integrationsstelle genutzt werden.

2.4.10 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.

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

Die im UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführte Sequenzreaktion enthielt folgende Komponenten:

Plasmid-DNA (0.5 μ g)	1-6 μ l
Primer (4 pM)	2 μ l
ABI-Sequencing-Reagent Premix	2 μ l
H ₂ O	ad 10 μ l

Die Reaktionsbedingungen für die Sequenzierung waren folgende:

1 min	95°C	Denaturierung
1 min	95°C	Denaturierung
30 s	max. 60°C	Annealing
2 min	60°C	Extention
Schritt 2-4: 33 Zyklen		
	4°C	Pause

Nach Ablauf des Programms wurde der Ansatz auf 20 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und die DNA zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 60 µl Ethanol zugegeben wurden. Nach 20 min Zentrifugation bei RT mit 14000 rpm und anschließendem 5 min Waschen mit 70% (v/v) Ethanol (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurde das Pellet vakuumgetrocknet 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.

2.4.10.2 Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Programms Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA). Sequenzhomologien zu den, in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen, wurden mit dem vom *National Centre For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Internet-Programms BLAST (*Basic Logic Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, (Altschul *et al.*, 1997)) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm ClustalW vom *European Biotechnology Institute* (EBI) erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit dem Internet-Programm *Compute pI/Mw ExPASy* des *ExPASy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz, <http://www.expasy.ch/>).

2.5 Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

2.5.1 Herstellung von Sonden (*DIG DNA LABELING Kit, Roche, Mannheim*)

Durch PCR wurden ca. 300 bp bis 2300 bp-Fragmente aus genomischer DNA von *C. metallidurans* AE104 bzw. *E. coli* amplifiziert, die als Sonden für den Nachweis von Nukleinsäuren dienen sollten. Diese wurden unter Verwendung des *DIG DNA Labeling and Detection Kit* (Roche, Mannheim) durch *Random Priming* mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Je 1 µg PCR-Produkt wurde in 15 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und 10 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 2 µl Hexanukleotid-Mix (10x) und dNTP-Labeling-Mix (10x) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym

(2 U/ μ l) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l 0.2 M EDTA (pH 8.0) beendet.

2.5.2 Digoxigenin-markierte Längenstandards

Um die Größe der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde ein Digoxigenin-markierter Größenstandard eingesetzt, der DIG-Marker VI (15 Fragmente mit folgenden Größen: 2176; 1766; 1230; 1033; 653; 517; 453; 394; 298; 234; 220 und 154 bp, Roche, Mannheim). Der Marker wurde mit im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht.

2.5.3 DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern (1975)

2.5.3.1 Gelelektrophorese und DNA-*Blotting*

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

Depurinieren: 5 min in 0.25 N HCl

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

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

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

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

Anschließend wurde die Position des Geles auf der Membran markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch 3 min Bestrahlung mit UV-Licht (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet bzw. zwischen Filterpapier bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.5.3.2 Hybridisierung

Die Membran mit der fixierten DNA wurde zur Entfernung von Salzresten kurz in sterilem Wasser gespült und anschließend für mindestens 1 h in 10 ml Prähybridisierungs-Lösung [5 x SSC, 10 g/l Blocking Reagenz, 10 g/l N-Lauroylsarcosin, 0.2 g/l SDS] im Hybridisierungs-ofen (OV4, Biometra, Göttingen) bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (65°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 wurde bei 65°C über Nacht durchgeführt.

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

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

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

2.5.3.3 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 zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min in Puffer 3 [0.1 M Tris-HCl, 0.1M NaCl (pH 9.5)] äquiliibriert, vorsichtig abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt und 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 30 min bis 3 h auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch Inkubation in Entwicklerlösung, bis Signale sichtbar wurden. Entwicklerreste wurden durch kurzes Spülen im Wasserbad entfernt. Die Fixierung des Filmes erfolgte in Fixierlösung. Danach wurde der Film in Wasser gespült.

2.6 Zellwachstumsversuche

2.6.1 Wachstumsversuche in Flüssigmedien

2.6.1.1 Messung der Zelltrübung

Das Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York, USA) ermöglichte die 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. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probennahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

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

Die Zelltrübungsmessungen wurden in LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Schwermetallsalzen durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte eine einheitliche, in LB-Medium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogene Vorkultur des jeweiligen Stammes. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm kultiviert und nach 16 h entnommen. Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten Kulturröhrchen. Es wurde eine zweite Vorkultur 1:400 aus der ersten Vorkultur angeimpft und 2 h bei 37°C unter schütteln inkubiert. Für die Anzucht der kontinuierlich zu vermessenden Hauptkulturen wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 10 ml LB-Medium mit der entsprechenden Vorkultur 1:400 beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln (HT Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit 200 rpm inkubiert. Das Zellwachstum wurde kontinuierlich mit einem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

Für die Messung des Zellwachstums nach 16 h wurde LB-Medium in Kulturröhrchen mit der entsprechenden Vorkultur beimpft und anschließend bei 37°C schüttelnd inkubiert (KS500, IKA-Labortechnik, Staufen). Die Messung der Optischen Dichte erfolgte bei 600 nm (Bio-Rad SmartSpec™ 3000, Hercules, USA).

2.6.1.3 Zellanzucht von *C. metallidurans*-Stämmen in Wachstumsversuchen

Die Bestimmung des Zellwachstums von *C. metallidurans* mit verschiedenen Metallkonzentrationen wurde in Tris-Minimalmedium durchgeführt. Aus einer Vorkultur, die aus einer Einzelkolonie angeimpft wurde (Wachstum 48 h bei 30°C), wurde eine zweite Vorkultur

beimpft. Diese wurde 24 h schüttelnd bei 30°C angezogen. Die Hauptkultur wurde in 18 ml Reagenzgläsern (17 mm Durchmesser) mit 3 ml Tris-Minimalmedium aus der zweiten Vorkultur angeimpft. Stämme, die pLO2-Derivate bzw. das *kan*-Gen ins Genom inseriert hatten, wurde 1 mg/ml Kanamycin in die Vorkulturen gegeben. Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten 100 ml Kolben. Die Hauptkulturen wurden bei 30°C auf einem Inkubationsschüttler (KS500, IKA-Labortechnik, Staufen) bei 200 rpm angezogen. Nach 20 h wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt (Bio-Rad SmartSpecTM 3000, Hercules, USA).

2.6.2 Ermittlung der Minimalen Inhibitor-Konzentration (MIC)

Es wurden LB-Agar-Platten (*E. coli*) bzw. NA-Platten (*C. metallidurans*) mit steigender Konzentration an Schwermetallsalzen gegossen. Aus Vorkulturen wurden die Stämme in Sektoren auf den Platten ausgestrichen und über Nacht (16 h) bei 37°C (*E. coli*) bzw. 3 Tage bei 30°C (*C. metallidurans*) inkubiert. Als Minimale Inhibitor-Konzentration wird die Metallkonzentration bezeichnet, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen.

2.7 Enzymologische Methoden

2.7.1 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller (1972) und Ullmann (1984))

2.7.1.1 Zellwachstum, Induktion und Zellernte

A) *E. coli*

Die für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *E. coli* wurden in Tris-Minimalmedium mit 2 g/l Glycerin und 3 g/l Casaminohydrolysat angezogen. Aus einer Übernachtskultur in LB wurde eine zweite Vorkultur in Tris-Minimalmedium angeimpft. Am folgenden Tag wurden Hauptkulturen angeimpft und unter Schütteln 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Aufteilung der Kultur in Kulturröhrchen und die Inkubation mit verschiedenen Metallkonzentrationen für 2 h bei 37°C. Nach dieser Zeit wurden je 0.025-0.2 ml Kultur in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 4°C, 12000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Bestimmung der Zelldichte zu diesem Zeitpunkt erfolgte als Optische Dichte bei 600 nm (Bio-Rad SmartSpecTM 3000, Hercules, USA).

B) *C. metallidurans*

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

Aus einer 48 h-Vorkultur wurde eine zweite Vorkultur angeimpft. Am folgenden Tag wurden Hauptkulturen auf 30 KE angeimpft und unter Schütteln 4-6 h bei 30°C inkubiert. Nach Verdoppelung der Kulturen wurde eine Probe von 0.2 ml genommen, dann erfolgten eine Aufteilung der Kulturen und die Inkubation mit verschiedenen Metallkonzentrationen für 3 h bei 30°C. Nach dieser Zeit wurden je 0.2 ml Kultur in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation in der Eppendorf Centrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) für 10 min bei 12 000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Parallel zu den Probenentnahmen wurde die Zelldichte der Kulturen unter Verwendung des Klett-Summerson-Colorimeters bestimmt.

2.7.1.2 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Das Zellpellet wurde in 1 ml Z-Puffer [0.6 M Na₂HPO₄, 0.4 M NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.5 M Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50 μ l Permeabilisierungspuffer [2.5 g/l CTAB, 5 g/l Natriumdesoxycholat] permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Substratlösung [4 g/l o-Nitrophenylgalactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz gemischt und die Zeit bis zur Gelbfärbung bei 30°C im Wasserbad gestoppt. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des ONPG zu o-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Natriumcarbonat erhöhte den pH-Wert des Reaktionsansatzes auf 11, wodurch die β -Galaktosidase inaktiviert wurde. Der Ansatz wurde 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (Bio-Rad SmartSpecTM 3000, Hercules, USA) gemessen.

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

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

Die β -Galaktosidase-Aktivität für *C. metallidurans* wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Aktivität [U]} = (355,6 * E_{420}) / \text{Reaktionszeit}$$

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

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

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Protein-Expression und -Reinigung über das IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main)

Die Reinigung von Proteinen über das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* (NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Frankfurt am Main) beruht auf der Überexpression eines Fusionsproteins aus *target* und Intein mit Chitin-Binde-Domäne. Dieses Fusionsprotein kann an eine Chitinsäule binden, während andere Proteine durch Waschschrte von der Säule entfernt werden. Durch Zugabe von DTT und Inkubation über Nacht bei 4°C wird in einem *self-cleavage*-Prozess das *target*-Protein vom Intein abgespalten und kann von der Säule eluiert werden, während das Intein mit Chitin-Binde-Domäne am Säulenmaterial verbleibt. Die Regeneration der Säule erfolgt mittels 1% SDS.

2.8.1.1 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 0.25 mM IPTG (Endkonzentration) und Inkubation über Nacht bei 16°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm, 4°C für 10 min (Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

2.8.1.2 Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

Das Zellpellet wurde in 10 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) 10x in 20 s-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min mit 5 000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Hettich Universal, RF, Tuttlingen).

2.8.1.3 Native Proteinreinigung über Chitin-Beads-Säule und Spaltung des Fusionsproteins

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml, QIAGEN, Hilden) 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. 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.

2.8.2 **Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

2.8.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Für die Proteinbestimmung wurden 20 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. einer 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 Verdünnungsstufen einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde. Die Bradford-Lösung wurde hergestellt, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96% Ethanol 1 h gelöst und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85%ige o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei RT im Dunkeln.

2.8.3 Elektrophoretische Methoden

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

2.8.3.1 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) auf das Gel.

2.8.3.2 Protein-Marker (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

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 175.0, 83.0, 62.0, 47.5, 32.5, 25.0, 16.5 und 6.5 kDa und der *Protein Marker, Broad Range* (#7702) mit 212.0, 158.0, 116.0, 97.2, 66.4, 55.6, 42.7, 36.5, 26.6, 20.0, 14.3, 6.5, 3.4 und 2.3 kDa verwendet.

2.8.3.3 Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach (Laemmli, 1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 10.0, 12.5, 15.0 oder 17.5%ige Gele zum Einsatz.

Trenngel:	10.0%	12.5%	15.0%	17.5%
30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid				
Stammlösung	2.0 ml	2.5 ml	3.0 ml	3.5 ml
1.88 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
0.5% SDS (w/v)	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
H ₂ O bidest	1.6 ml	1.1 ml	0.6 ml	0.1 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
APS (10%ig)	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

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 Trenngels wurde das Wasser wieder entfernt und 1.5 ml Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde.

Sammelgel: 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid-Stammlösung	0.33 ml
0.625 M Tris-HCl (pH 8.8)	0.4 ml
0.5% SDS (w/v)	0.4 ml
H ₂ O _{bidest}	0.87 ml
TEMED	2 µl
APS (10%ig)	10 µl

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

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

2.8.4 Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.8.4.1 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (Weber und Osborn, 1969)

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

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

2.8.4.2 Trocknung von Polyacrylamid-Gelen

Um die PAA-Gele aufzubewahren oder für weitere Untersuchungen (z. B. Autoradiographie) verwenden zu können, wurden sie mittels Vakuumvorrichtung getrocknet. Für die Trocknung wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Wasser benetzte Folien gelegt. Nach Anlegen des Vakuums wurde der Gelrockner (Gel Slab Dryer GSD-4, Fa. Pharmacia, Freiburg) 75 min auf 60°C erhitzt. Die Gele verblieben danach noch bis zur vollständigen Abkühlung unter Vakuum.

2.9 Gelretardierungs-Experimente

Um die Bindung von Proteinen an DNA-Fragmente nachzuweisen, wurden Gelretardierungs-Versuche in Anlehnung an Korber (1999) in Agarosegelen durchgeführt. Dabei wurde die DNA durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.9.1 Probenvorbereitung und Inkubation

Für die Gelretardierungs-Versuche wurden die zu untersuchenden Promotorbereiche aus *C. metallidurans* mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Es wurden ca. 100 ng dieser DNA mit 0.1 µg gereinigtem Sigmafaktor und 5 µl RNAP-Coreenzyme [1 U/1 µl, *E. coli*, Biozym] 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 µl Ethidiumbromid [0.5 g/l] versetzt.

2.9.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Ansätze erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophorese-Kammern (*Easy Cast™ Elektrophoresis System*, Portsmouth, NH, USA) in einem 1% igen Agarosegel. 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) durch Aufkochen gelöst 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 Elektrophorese erfolgte bei 60 V (PHERO-stab 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen) bei 4°C im Kühlraum. Die Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (Geldokumentationssystem INTAS, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.10 *In vitro* Transkriptionsexperimente

Um Expressionen ausgehend von verschiedenen Promotoren untersuchen zu können, wurden *in vitro*-Transkriptionsversuche durchgeführt.

2.10.1 *In vitro*-Transkription mit [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP nach Beck (1997)

Alle Versuche wurden in einem Gesamtvolumen von 40 μl durchgeführt. Es wurde zunächst 1 U *E. coli*-RNAP-Holoenzym bzw. 1 U *E. coli*-RNAP-Coreenzym (Biozym) und 0.1 μg Sigmafaktor mit 4 μl 5 x Transkriptionspuffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 0.75 M KCl, 2 mM K_3PO_4 , 0.5 mM DTT, 0.05 mg/ml BSA] versetzt und bis zu einem Volumen von 20 μl DEPC-behandeltes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μl 5 x Transkriptionspuffer, 2 μl NTP-Gemisch (MBI) [Endkonzentration pro Nukleosidphosphat 1 mM], 1 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP, 1 μl RNase-Inhibitor (50 U/ μl , MBI), DNA-Matrize [Enkonzentration 20 nM] ad 40 μl DEPC-behandeltes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gestartet und 20 min bei 37°C inkubiert.

Die entstandene RNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. 96% Ethanol mittels Zentrifugation 10 min bei 12000 rpm gefällt (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Das luftgetrocknete Pellet wurde anschließend in 6 μl Probenpuffer [ad 10 ml Formamid: 10 mg Xylen Cyanol FF, 10 mg Bromphenolblau, 200 μl 0.5 M EDTA (pH 8.0)] aufgenommen. Nach Erhitzen für 2 min auf 85°C wurden die Proben auf ein 6%iges denaturierendes Harnstoff-Gel aufgetragen.

2.10.2 Gelelektrophorese und Autoradiographie

Zur Auftrennung der Proben wurden 6%ige Harnstoff-Gele verwendet. Als Laufpuffer diente 0.5 x TBE [44.5 mM Tris, 44.5 mM Borsäure, 0.1 mM EDTA (pH 8.0)]. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Minigel-Twin-Kammer (Biometra, Göttingen) mit Glasplatten der Abmessung 10 x 10 x 0.1 cm. Pro Gel wurden 10 ml Gellösung hergestellt.

Gelzusammensetzung:	3.1 ml	19:1 Acrylamid: Harnstoff
	2.5 ml	10 x TBE-Puffer
	125 μl	10% APS
	11.5 μl	TEMED
	11.5 ml	DEPC- H_2O

Die Elektrophorese wurde bei maximaler Spannung mit einer Stromstärke von 15 mA pro Gel durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel in Folie getrocknet und auf einem Röntgenfilm (X-Ray Retina, Fotochemische Werke GmbH, Berlin) über Nacht exponiert. Nach Entwicklung des Films waren die Transkripte als Schwärzungen sichtbar.

3 ERGEBNISSE

3.1 Der ECF-Sigmafaktor RpoE_{Cm} ist an der Schwermetall-Homöostase in *C. metallidurans* beteiligt

3.1.1 Identifikation und Deletion einer *rpoE*-ähnlichen Sequenz in *C. metallidurans* CH34

Im Genom von *C. metallidurans* CH34 (in den Datenbanken noch als *Ralstonia metallidurans* CH34 geführt) konnten dreizehn *open reading frames* (ORF) identifiziert werden, die für mögliche alternative Sigmafaktoren kodieren. Dazu zählt der bereits untersuchte ECF-Sigmafaktor CnrH (Grass, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000). Die Vermutung lag nahe, dass einer oder mehrere dieser Sigmafaktoren an der Regulation der Schwermetall-Homöostase des Bakteriums beteiligt sein könnten. Die ORFs wurden in Anlehnung an die erste Annotation des Genoms von *C. metallidurans* CH34 im Jahr 2000 als *sig* mit der dazugehörigen *contig*-Nummer bezeichnet (Tabelle 4). Durch PCR-Analysen mit genomischer DNA des Wildtypstammes *C. metallidurans* CH34 bzw. des Megaplasmid-freien Derivates AE104 konnte die chromosomale Lokalisation aller zwölf putativen Sigmafaktor-Gene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In der genetischen Umgebung drei dieser Gene, *sig534*, *sig562* und *sig681*, lassen sich ORFs mit Homologie zu Antisigmafaktoren finden. Dies deutet auf eine posttranslationelle Regulation der entsprechenden Proteine hin. Die putativen Sigmafaktoren Sig611, Sig680 und Sig697 zeigen Homologien zu FecI aus *E. coli* und könnten in die Eisenhomöostase von *C. metallidurans* CH34 involviert sein.

Das hypothetische Produkt des Gens 271 auf *contig188* (Annotation vom 17.12.2004, http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html, vorher *sig534*) zeigte die höchste Homologie zu bekannten Sigmafaktoren des RpoE-Typs (Abb. 3) und wurde in Anlehnung an *E. coli* als RpoE_{Cm} bezeichnet (Nies, 2004).

Tabelle 4 Alternative Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34

Name	contig ^{a)}	Gen ^{a)}	genetische Umgebung
<i>sig534 (rpoE_{Cm})</i>	188	271	Antisigmafaktor-Komplex (<i>rseAB</i>)
<i>sig345</i>	222	4633	
<i>sig538</i>	202	2067	
<i>sig562</i>	205	3313	Antisigmafaktor
<i>sig588</i>	219	4156	Zweikomponenten-Regulationssystem
<i>sig593</i>	201	1691	RND-Transporter (<i>czcA</i>)
<i>sig605</i>	205	3608	
<i>sig611</i>	202	2163	Eisen-Siderophor-Rezeptor, Sensor
<i>sig679</i>	195	848	Cytochrom-c
<i>sig680</i>	205	3810	Ferric Alcaligin E, Transmembransensor
<i>sig681</i>	203	2675	Antisigmafaktor
<i>sig697</i>	222	4899	Transmembransensor, <i>response</i> -Regulator
<i>cnrH</i>	335	6263	<i>cnrXY</i>

a) Annotation vom 17.12.2004 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html)

	2.1	2.2	
RpoE_C. <i>metallidurans</i>	MSEREADQLLVERVQQGDKRAFELLVTKYHRKIIRLI	SRLVRDPAEVEDV	50
sigmaE_R. <i>solanacearum</i>	MSEREADQILVERVQQGDKRAFELLVVKYHRKIIRLI	SRLIRDAAEVEDV	50
RpoE_E. <i>coli</i>	MSEQLTDQVLVERVQKGDKAFNLLVRYQHKVASLVSRYVP	-SGDVDPDV	49
AlgU_P. <i>aeruginosa</i>	MLTQEQQDQLVERVQRGDKRAFDLLVLYQHKILGLI	VRFVHDAQEAQDV	50
	* : ** *****:***:***:*** :***:*	* : * : . : . **	
	2.3	2.4	
RpoE_C. <i>metallidurans</i>	AQDAFIKAYRALPQFRGESAFYTWLYRIAVNTAKNYLATQGRPEASSDI		100
sigmaE_R. <i>solanacearum</i>	AQDAFIKAYRALPQFRGESAFYTWLYRIAVNTAKNYLATQGRPEASSDI		100
RpoE_E. <i>coli</i>	VQEAFIKA--ALDSFRGDSAFYTWLYRIAVNTAKNYLVAQGRRP	-PSSDV	96
AlgU_P. <i>aeruginosa</i>	AQEAFIKAYRALGNFRGDSAFYTWLYRIAVNTAKNHLVARGRRP	-PSSDV	99
	.:***** ** .***:*****:*****:*****:***** .:***** .:.*:		
	3.1	3.2	4.1
RpoE_C. <i>metallidurans</i>	DAEEAETFADGEQLRDINTPESMLHTRQVADTVNRAMEALPEELRTAITL		150
sigmaE_R. <i>solanacearum</i>	DTEEAETFADGEQLRDINTPDSMLHTKQVAETVNRAMEALPEELRTAITL		150
RpoE_E. <i>coli</i>	DAIEAENFESGGALKEISNPENLMLSEELRQIVFRTIESLPEDLRMAITL		146
AlgU_P. <i>aeruginosa</i>	TAEDAEEFFEGDHALKDIESPERAMLRDEIEATVHQTIQQLPEDLRALTAL		149
	: : ** * . . * : * . * : : : : * : : : * : : * : * : *		
	4.2		
RpoE_C. <i>metallidurans</i>	REIEGLSYEEIAEAMGCPIGTVRSRIFRAREAIAEKLRLPLLGTAEGRKW		199
sigmaE_R. <i>solanacearum</i>	REIEGLSYEEIAEAMECPIGTVRSRIFRAREAIAEKLRLPLLGTAEGRKW		199
RpoE_E. <i>coli</i>	RELDGLSYEEIAAIMDCPVGTVRSRIFRAREAIDNKVQPLI-----		187
AlgU_P. <i>aeruginosa</i>	REFEGLSYEDIATVMQCPVGTVRSRIFRAREAIDKALQPLLREA-----		193
	:**:* * ** :*****:***** : : : ** :		

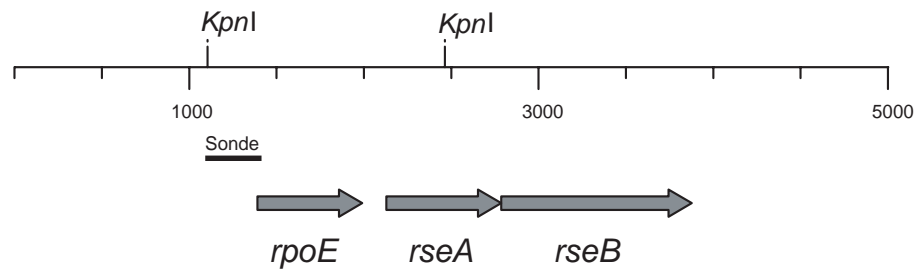
Abb. 3 Vergleich der Proteinsequenz von RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* CH34 mit SigE (*Ralstonia solanacearum*), RpoE_{Ec} (*E. coli* K12) und AlgU (*P. aeruginosa* PAO1) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

Hervorgehoben sind die konservierten Proteindomänen von ECF-Sigmafaktoren (vgl. Abb. 1).

Um zu untersuchen, ob RpoE_{Cm} an der Regulation der Metallhomöostase von *C. metallidurans* CH34 beteiligt ist, wurde das Gen *rpoE_{Cm}* deletiert. Dazu wurden ca. 300 bp stromauf- und stromabwärts von *rpoE_{Cm}* mit den Primerpaaren rpoE-cre-EcoRI und rpoE-cre-NdeI sowie rpoE-cre-MluI und rpoE-cre-AgeI amplifiziert. Durch die Primer wurden zusätzliche Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *NdeI* bzw. *MluI* und *AgeI* an die Fragmente angefügt, was eine Klonierung in der Vektor pCM184 stromauf- bzw. -abwärts einer von *loxP-sites* flankierten Kanamycin-Resistenz-Kassette ermöglichte (Marx und Lidstrom, 2002). Über Konjugation wurde das erhaltene Plasmid (pECD918) in die *C. metallidurans*-Stämme CH34(pMOL28, pMOL30) und AE104 (plasmidfrei) gebracht. Durch Doppelaustauschrekombination fanden eine Deletion von *rpoE_{Cm}* und eine Insertion des *kan*-Gens ins Genom statt. In einem zweiten Konjugationsschritt wurde das Plasmid pCM157, das die Cre-Rekombinase exprimiert, in die Stämme CH34($\Delta rpoE::kan$) und AE104($\Delta rpoE::kan$) gebracht. Nach Entfernung der Kanamycinresistenz durch die Cre-Rekombinase und anschließendem Plasmid-*curing* konnten die *C. metallidurans*-Stämme DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) und DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) erhalten werden.

Die Mutanten wurden mittels PCR und Southern-Hybridisierung überprüft. Dazu wurde die genomische DNA der Stämme CH34, CH34($\Delta rpoE_{Cm}::kan$), DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$), AE104, AE104($\Delta rpoE_{Cm}::kan$) und DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) isoliert und mit *KpnI* geschnitten. Als Sonde diente ein mit rpoE-cre-EcoRI und rpoE-cre-NdeI amplifiziertes 300 bp-Fragment, das stromaufwärts von *rpoE_{Cm}* hybridisierte (Abb. 4A). Beim Einsatz der DNA der Wildtypstämme CH34 und AE104 wurde ein 1357 bp-Fragment erwartet (Abb. 4B, Spuren 1 und 4), dieses verkürzte sich durch die Deletion von *rpoE_{Cm}* auf 790 bp (Abb. 4B, Spuren 3 und 6). Der Austausch von *rpoE_{Cm}* gegen das *kan*-Gen vergrößerte das zu detektierende Fragment auf 2116 bp (Abb. 4B, Spuren 2 und 5).

A)



B)

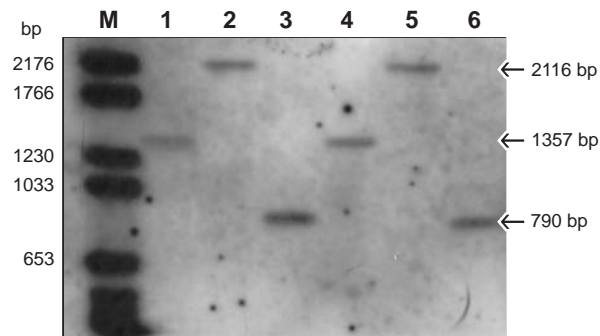


Abb. 4 Nachweis der Deletion von $rpoE_{Cm}$ in *C. metallidurans* CH34 und AE104 mittels Southern DNA:DNA-Hybridisierung

- A) Dargestellt ist die Genregion $rpoErseAB_{Cm}$. Eingezeichnet sind die relevanten *KpnI*-Restriktionsschnittstellen sowie die Lage der eingesetzten Sonde
- B) Mit *KpnI* geschnittene genomische DNA von CH34 (1), CH34($\Delta rpoE_{Cm}::kan$) (2), DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) (3), AE104 (4), AE104($\Delta rpoE_{Cm}::kan$) (5) und DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) (6) wurde in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonde erfolgte über Nacht bei 65°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz-Nachweis. Als Marker (M) diente der Digoxigenin-markierter DNA *molecular weight marker* VI (Roche, Mannheim).

3.1.2 Die Deletion von *rpoE_{Cm}* führt in *C. metallidurans* CH34 zu verminderter Resistenz gegenüber Nickelionen

Es sollte untersucht werden, ob die Deletion des Sigmafaktors *rpoE_{Cm}* zu einer Veränderung der Metallresistenz von *C. metallidurans* führt. Aus diesem Grund wurden Wachstumsversuche in Tris-Minimal-Flüssigmedium (Tris-MM) und auf Tris-Minimal-Agarplatten zur Bestimmung der Minimalen Inhibitor-Konzentration (MIC) durchgeführt. Die MIC ist dabei die Metallkonzentration, bei der kein Wachstum mehr verzeichnet wurde. DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) zeigte eine verminderte Resistenz gegenüber NiCl₂. Während die MIC von NiCl₂ beim *C. metallidurans* Stamm CH34 6 mM betrug, zeigte die *rpoE_{Cm}*-Deletionsmutante DN480 schon ab einer Konzentration von 4 mM NiCl₂ kein Wachstum mehr (Abb. 5A). Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch in Flüssigmedium (Tris-MM) nach 20 h Wachstum bei 30°C beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 3.5 mM NiCl₂ zeigte der *C. metallidurans* Stamm DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) ein deutliches Wachstumsdefizit im Vergleich zum Stamm CH34. Bei höheren NiCl₂-Konzentrationen konnte kein Wachstum des Stammes DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) nachgewiesen werden. (Abb. 5B). Die MIC von ZnCl₂, CoCl₂, CdCl₂, NiCl₂, CuCl₂ und K₂CrO₄ blieb im *C. metallidurans* Stamm DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) im Vergleich zu CH34 unverändert (Daten nicht gezeigt).

In Wachstumsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rpoE_{Cm}* in *C. metallidurans* CH34 zu einer Verringerung der Resistenz gegenüber Nickel führt. Da bei allen anderen getesteten Metallionen keine Unterschiede im Wachstum zu verzeichnen waren, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine unspezifische Reaktion auf das Fehlen des Sigmafaktors RpoE_{Cm} handelt.

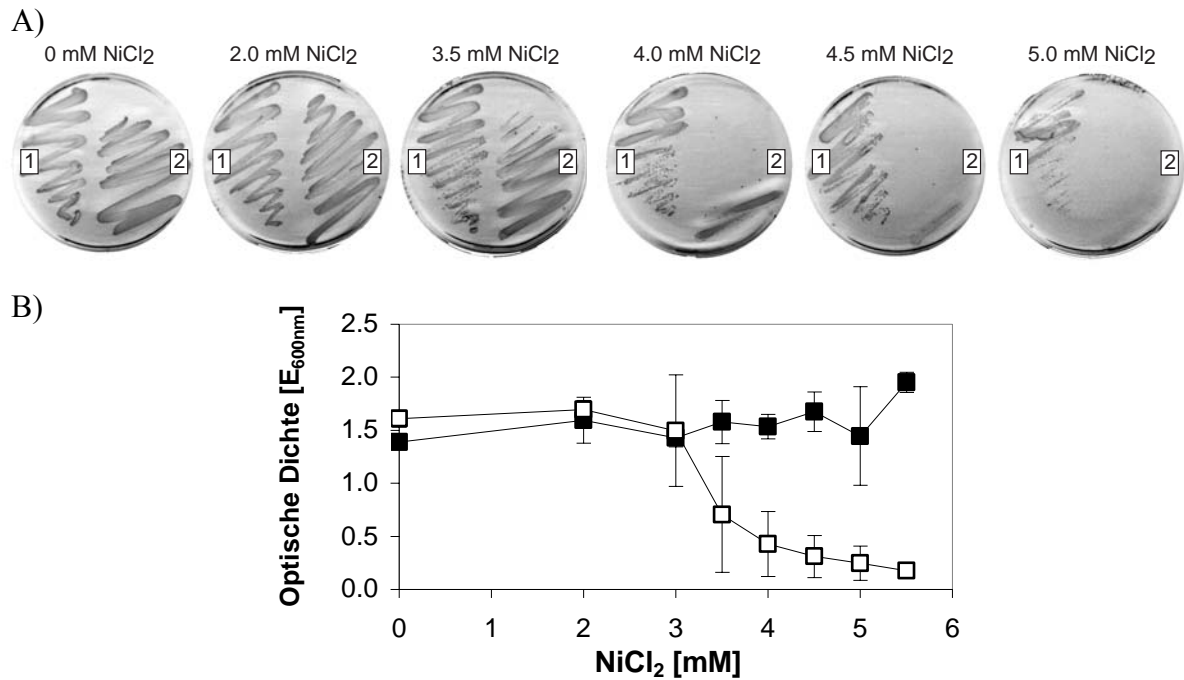


Abb. 5 Wachstum von *C. metallidurans*-Stämmen in Gegenwart von NiCl₂

- A) Wachstum von *C. metallidurans*-Stämmen CH34 (1) und DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) (2) auf Tris-Minimal-Agarplatten. Aus einer 48 h-Vorkultur wurde eine zweite Vorkultur 5%ig angeimpft (Tris-MM) und 24 h bei 30°C inkubiert. Davon wurde auf Tris-Minimal-Agarplatten mit steigenden Konzentrationen an NiCl₂ ausgestrichen und die Platten 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.
- B) Wachstum von *C. metallidurans*-Stämmen CH34 (■) und DN480(pMOL28, pMOL30, $\Delta rpoE_{Cm}$) (□) in Tris-MM-Flüssigmedium. Ausgehend von den zweiten Vorkulturen wurden 3 ml Tris-MM mit verschiedenen NiCl₂-Konzentrationen angeimpft und 20 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Endpunktbestimmung aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

3.1.3 Die Deletion von *rpoE_{Cm}* führt in *C. metallidurans* AE104 zu verminderter Resistenz gegenüber Zn(II), Cd(II), Co(II) und Ni(II)

Die Ausprägung eines metallabhängigen Phänotyps durch die Deletion eines chromosomalen Gens kann durch die Wirkung sehr effektiver plasmidkodierter Metall-Entgiftungssysteme maskiert werden (Legatzki, 2003; Legatzki *et al.*, 2003). Um diesen Effekt auszuschließen, wurde *rpoE_{Cm}* auch im Megaplasmid-freien Stamm AE104 deletiert, was zum Stamm DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) führte.

Es wurde zunächst die Minimale Inhibitor-Konzentration des Stammes für verschiedene Metalle im Vergleich zum Wildtyp AE104 auf Tris-Minimal-Agar bestimmt. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Resistenz gegenüber ZnCl₂ mit einer MIC von 150 μ M für AE104 auf 75 μ M im Falle der $\Delta rpoE_{Cm}$ -Mutante DN462 (Abb. 6a). Die MICs gegenüber Cd(II), Co(II) bzw. Ni(II),

veränderten sich geringfügig von 300 μM auf 250 μM CdCl_2 , von 300 μM auf 200 μM CoCl_2 bzw. von 350 μM auf 300 μM NiCl_2 . Keine Unterschiede zwischen beiden Stämmen konnten auf Agar mit CuCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ bzw. K_2CrO_4 beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

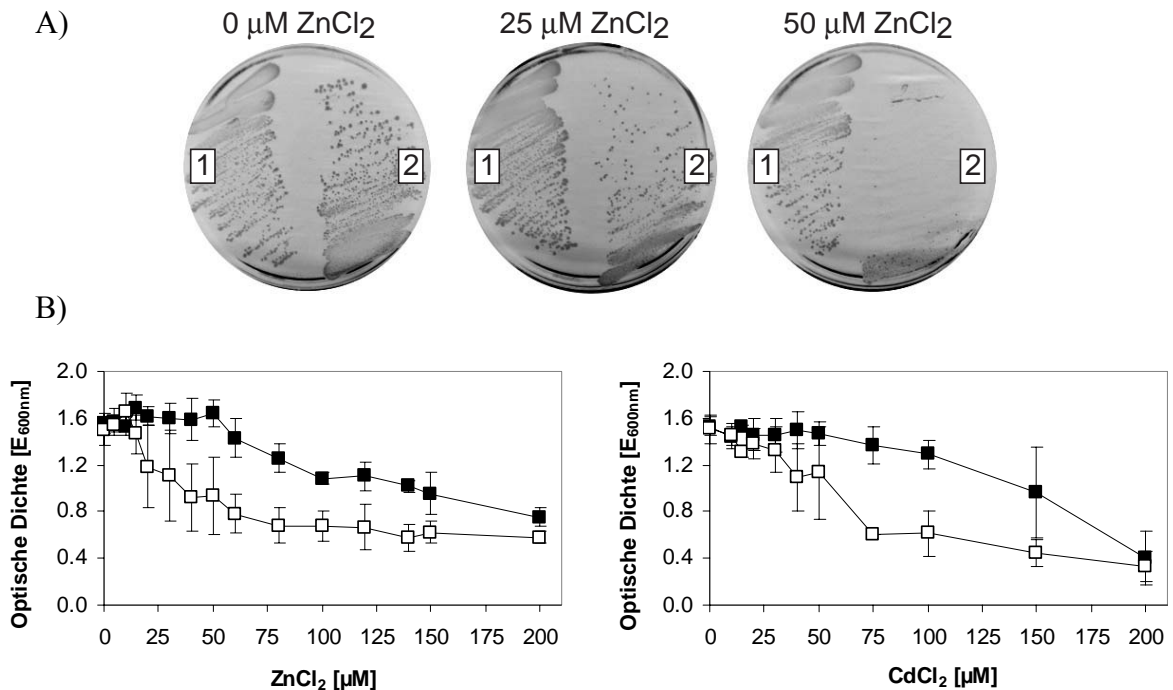


Abb. 6 Wachstum von *C. metallidurans*-Stämmen in Gegenwart von ZnCl_2 (A,B) bzw. CdCl_2 (B)

- A) Wachstum von *C. metallidurans*-Stämmen AE104 (1) und DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) (2) auf Tris-Minimal-Agarplatten. Aus einer 48 h-Vorkultur wurde eine zweite Vorkultur 5%ig angeimpft (Tris-MM) und 24 h bei 30°C inkubiert. Davon wurde auf Tris-Minimal-Agarplatten mit steigenden ZnCl_2 -Konzentrationen ausgestrichen und die Platten 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.
- B) Wachstum von *C. metallidurans*-Stämmen AE104 (■) und DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) (□) in Tris-MM-Flüssigmedium. Ausgehend von den zweiten Vorkulturen wurden 3 ml Tris-MM mit ansteigenden ZnCl_2 - bzw. CdCl_2 -Konzentrationen angeimpft und 20 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Endpunktbestimmungen aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Die Sensitivität der $\Delta rpoE_{Cm}$ -Mutante DN462 gegenüber Zink- und Cadmiumionen konnte auch in Wachstumsstudien in Flüssigmedium bestätigt werden. Wie aus Abb. 6B ersichtlich, zeigte DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) bereits bei einer Konzentration von 20 μM ZnCl_2 und 40 μM CdCl_2 ein verringertes Wachstum nach 20 h Inkubation bei 30°C.

3.1.4 Das Gen *rpoE_{Cm}* wird konstitutiv exprimiert

Wachstumsversuche machten deutlich, dass das Fehlen des Sigmafaktor RpoE_{Cm} in *C. metallidurans* zu einem metallsensitiven Phänotyp, im Stamm CH34 gegenüber Ni(II), im Stamm AE104 gegenüber Zn(II) und Cd(II), führte. Um zu untersuchen, ob die Expression von *rpoE_{Cm}* metallabhängig ist, wurde eine chromosomale Transkriptionsfusion des Gens mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen im *C. metallidurans* Stamm AE104 konstruiert. Da die Transkription von *rpoE_{Cm}* und *lacZ* ausgehend vom Promotor vor *rpoE_{Cm}* zu einer polycistronischen mRNA führte, war die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase ein Maß für die Expression von *rpoE_{Cm}*. Für die Konstruktion dieser Fusion wurde der Vektor pECD794 verwendet. Dabei handelt es sich um ein Derivat von pLO2, in das stromabwärts der *multiple cloning site* ein promotorloses *lacZ*-Gen integriert wurde (Scherer, 2003). Mit den Primern 'rpoE-lacZ Pst und 'rpoE-lacZ Sal wurden ca. 300 bp stromaufwärts des Stopp-Codons von *rpoE_{Cm}* amplifiziert und in pGEM[®]-T easy kloniert. Nach Sequenzierung wurde das Insert mittels *Pst*I und *Sal*II in pECD794 umklont. Das resultierende Plasmid pECD919(pLO2::'rpoE_{Cm}-lacZ) konnte mit Hilfe des *E. coli* Stammes S17/1 in *C. metallidurans* AE104 konjugiert werden. Durch homologe Rekombination wurde das Plasmid ins Chromosom integriert. Da pECD919(pLO2::'rpoE_{Cm}-lacZ) in *C. metallidurans* nicht replizieren kann, diente die Selektion auf die, vom Plasmid vermittelte Kanamycin-Resistenz, als Marker für die Integration ins Genom. Außerdem wurde der resultierende Stamm DN481(Φ (*rpoE_{Cm}-lacZ*)) mittels PCR auf die korrekte Integration des Konstruktes überprüft.

Für die Expressionsversuche wurde DN481(Φ (*rpoE_{Cm}-lacZ*)) in der exponentiellen Wachstumsphase mit verschiedenen Schwermetallionen sowie anderen Stressoren versetzt. Nach 3 h wurden Proben entnommen und die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Getestet wurden zunächst steigende Konzentrationen von Schwermetallsalzen (ZnCl₂, CdCl₂, CoCl₂, NiCl₂, CuCl₂, K₂CrO₄ bzw. Pb(NO₃)₂). Da sich bei diesen Versuchen keine Veränderungen der β -Galaktosidase-Aktivitäten gegenüber der nicht mit Metall versetzten Kontrolle zeigten (Ergebnis nicht gezeigt), wurden andere Stressauslöser getestet. Aber auch Versuche mit 0.05% H₂O₂, 5% Ethanol, 1 M NaCl, Sulfatkonzentrationen von 1 μ M bis 100 mM und ein Temperaturanstieg von 30°C auf 37°C bzw. 42°C zeigten keine Veränderung der Expression von *rpoE_{Cm}* (Ergebnis nicht gezeigt).

Unter den getesteten Stressbedingungen war es nicht möglich, die Expression ausgehend von *rpoE_{Cm}* zu induzieren. Das Gen für den Sigmafaktor RpoE_{Cm} scheint konstitutiv niedrig exprimiert zu werden.

3.1.5 RpoE_{Cm} ist in der Lage, an die Promotoren *cadAp*, *zntAp_{Cm}* und *rpoE_{P_{Cm}}* zu binden und davon ausgehend eine Transkription zu starten

Die Deletion von *rpoE_{Cm}* in AE104 (DN462) führte zu einem Zink- bzw. Cadmium-sensitiven Phänotyp. Die MIC-Daten entsprechen dabei auffallend denen der *C. metallidurans* Δ *zntA_{Cm}* - Mutante DN439 (Tabelle 5). ZntA_{Cm} entgiftet zusammen mit CadA das Cytoplasma von Zn(II) und Cd(II) (Legatzki, 2003; Legatzki *et al.*, 2003). Beide Proteine gehören zur Klasse der CPx-Typ ATPasen.

Tabelle 5: Minimale Inhibitor-Konzentration von ZnCl₂ bzw. CdCl₂ von *C. metallidurans*-Derivaten

Stamm	Relevanter Genotyp	Minimale Inhibitor-Konzentration ^{a)}	
		ZnCl ₂ [μ M]	CdCl ₂ [μ M]
AE104	plasmidfreier Wildtyp	150	300
DN462	Δ <i>rpoE_{Cm}</i>	75	250
DN439	Δ <i>zntA_{Cm}</i>	75	250
DN438	Δ <i>cadA</i>	150	250

^{a)} Die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 30°C nach drei bis vier Tagen sichtbar war. Vorkulturen der Stämme wurden auf Tris-MM-Agar mit ZnCl₂ bzw. CdCl₂ ausgestrichen. Die Resultate konnten durch Mehrfachbestimmung bestätigt werden.

Legt man die *consensus*-Sequenz RpoE_{Ec}-abhängiger Promotoren von *E. coli* (Rezuchova *et al.*, 2003) und die putative Promotorregion vor *rpoE_{Cm}* in *C. metallidurans* zugrunde, könnten Sequenzen stromaufwärts der Gene *cadA* und *zntA_{Cm}* von RpoE_{Cm} erkannt werden (Abb. 7). Es ist aus verschiedenen Bakterien bekannt, dass RpoE-Homologe im Komplex mit dem RNAP-Coreenzym in der Lage sind, die Transkription ausgehend vom Promotor vor dem entsprechenden *rpoE*-Gen durchzuführen. Da angenommen werden konnte, dass es sich in *C. metallidurans* ähnlich verhält, wurde der *rpoE_{Cm}*-Promotor in einem Gel-Retardierungs- und *in vitro*-Transkriptionsexperiment als Positivkontrolle eingesetzt.

	-35	-10
<i>rpoE_{P_{Cm}}</i>	TCACGGAATGCGCTCCGCGACACCCGAAATCGCCTGGATCGTA	
<i>zntA_{P_{Cm}}</i>	CAGGCGAACTGGAGCGGCAGCAATATT-GCGAGAAATACAAGC	
<i>cadA_P</i>	AGCCTGAAGTTGCCCTCGCTACGTGCAGGCTCGGGCAGCAAGC	
<i>consensus</i> RpoE _{EC} -abhängiger		
Promotoren aus <i>E. coli</i>	gAACTt	- N _{16/17} - TCnaA

Abb. 7 Vergleich der putativen Promotorregionen von *rpoE_{Cm}*, *cadA* und *zntA_{Cm}* aus *C. metallidurans* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

Dargestellt sind Sequenzabschnitte stromaufwärts der Gene *rpoE_{Cm}*, *cadA* und *zntA_{Cm}*. Putative -10- und -35-Promotorregionen sind unterstrichen.

Es wurden Fragmente stromaufwärts der Gene *cadA*, *zntA_{Cm}* und *rpoE_{Cm}* mit den Primern 691 oo Nde und 691 ou Mun, 649 oo Nde und 649 ou Mun sowie *rpoE* Nde down und *rpoE* Bam amplifiziert. Der Sigmafaktor RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* CH34 wurde aus dem *E. coli* Stamm ER2566(pECD732) über das IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System (NEW ENGLAND BioLabs, GmbH, Frankfurt am Main) gereinigt. Es wurden 100 ng DNA-Fragmente des putativen Promotors mit 0.1 µg gereinigtem RpoE_{Cm} und 5 µl RNAP aus *E. coli* (1 U/µl) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Sichtbarmachung der Signale erfolgte mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht.

Die Zugabe von RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* CH34 mit bzw. ohne RNAP-Coreenzym aus *E. coli* zu den Promotorfragmenten von *rpoE_{Cm}*, *cadA* und *zntA_{Cm}* führte zu einer Veränderung des Laufverhaltens der DNA (Abb. 8). Die Signale der Promotorfragmente, die mit RpoE_{Cm} inkubiert wurden, liefen im Gel verzögert im Vergleich zu den reinen DNA-Fragmenten. Diese Retardierung wird durch zusätzliche Zugabe des RNAP-Coreenzyms aus *E. coli* noch deutlicher. In diesen Spuren verschwand die DNA-Bande im unteren Drittel des Gels nahezu völlig. Stattdessen war ein großer Komplex im oberen Teil des Agarose-Gels nachzuweisen. Dieses verzögerte Laufverhalten deutete auf eine Bindung der RNAP-σ^E an die Promotorfragmente hin.

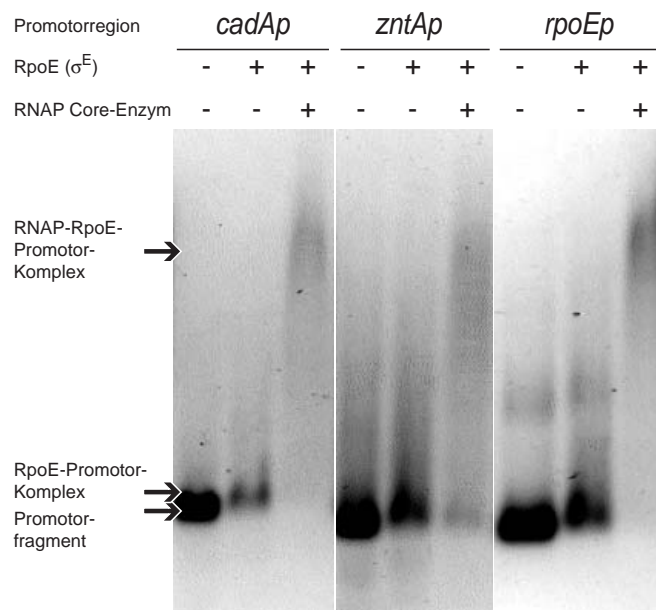


Abb. 8 Gel-Retardierungsexperiment der Promotoren *cadAp*, *zntAp_{Cm}* und *rpoEp_{Cm}* mit RNAP aus *E. coli* und RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* CH34

Nach 20 min Inkubation der DNA der Promotorbereiche von *cadA*, *zntA_{Cm}* bzw. *rpoE_{Cm}* (100 ng) mit 0.1 μ g RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* und 5 μ l RNAP-Coreenzym (1 U/ μ l) aus *E. coli* bei Raumtemperatur wurden die Proben auf einem Agarose-Gel aufgetragen. Die Sichtbarmachung der Signale erfolgte mit Ethidiumbromid und UV-Licht.

Die Bindung von RpoE_{Cm} an putative Promotorsequenzen vor den Genen *zntA_{Cm}*, *cadA* und *rpoE_{Cm}* konnte durch Gel-Retardierungsexperimente gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob durch diese Bindung auch eine Transkription der Gene initiiert werden kann, wurden *in vitro*-Transkriptions-Experimente mit radioaktivem [α -³²P]UTP durchgeführt.

Es wurden 1 U RNAP-Coreenzym (1 U/ μ l) von *E. coli* mit 0.1 μ g gereinigtem RpoE_{Cm}-Protein aus *C. metallidurans* inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Nukleotidgemisches (mit [α -³²P]UTP zur radioaktiven Markierung des Transkripts) und der DNA-Matrizen gestartet. Als Matrizen dienten PCR-Produkte, die einen Bereich von ca. 300-400 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts bis 300-500 bp nach dem Start des entsprechenden Gens umfassten. Diese wurden mit den Primern 691 oo Nde und *cadA* up-run-off (*cadAp*), 649 oo Nde und *zntA* up-run-off (*zntAp_{Cm}*) bzw. *rpoE* Nde down und *rpoE* (Rm) pASK Pst (*rpoEp_{Cm}*) amplifiziert.

Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde die Transkription gestoppt und die entstandene mRNA gefällt und anschließend in einem 6%igen Harnstoffgel aufgetrennt. Die mRNA-Signale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Abb. 9 zeigt die Autoradiogramme der *in vitro*-Transkription. Als Positivkontrolle für dieses Experiment diente die Transkription ausgehend vom *rpoEp_{Cm}* mit RpoE_{Cm}-RNAP (rechte Spur). Das Gen *rpoE_{Cm}* wurde nicht durch das

eingesetzte RNAP-Holoenzym mit σ^{70} aus *E. coli* transkribiert, sondern nur durch den Enzymkomplex mit RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans*. Als Negativkontrollen dienten die Ansätze mit RNAP-Coreenzym (ohne Sigmafaktor) und nur mit RpoE_{Cm}. Für den Promotor *zntAp_{Cm}* zeigten sich durch Einsatz des RNAP-Holoenzym (σ^{70}) aus *E. coli* zwei schwache Signale, die auch in der Spur mit RpoE_{Cm}-RNAP detektiert werden konnten. In diesem Experiment erschien allerdings noch ein weiteres starkes Signal, das spezifisch für die Transkription von *zntA_{Cm}* durch RNAP mit RpoE_{Cm} war. Auch ausgehend vom *cadAp* konnten RNA-Signale durch die Transkription mit RpoE_{Cm}-RNAP nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich jedoch nur in der Intensität, nicht in der Größe, von denen, die durch σ^{70} -RNAP zu detektieren waren.

Das RNAP-Coreenzym ist ohne Sigmafaktor-Untereinheit in der Lage, RNA auf Grundlage einer DNA-Matrize zu synthetisieren, dabei fehlt allerdings die Spezifität des Starts (Burgess, 1969). Die im Falle von *cadAp* und *zntAp_{Cm}* in den Experimenten ohne Sigmafaktor nachgewiesenen Signale entsprechen der Größe nach denen durch RNAP-Holoenzym (σ^{70}). Wahrscheinlich war das eingesetzte RNAP-Coreenzym mit σ^{70} verunreinigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, das *rpoE_{Cm}*, *zntA_{Cm}* und *cadA_{Cm}* durch *E. coli*-RNAP-Coreenzym mit RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* CH34 transkribiert werden konnten. Eine Transkription ausgehend von den Promotoren *cadAp* und *zntAp_{Cm}* war auch durch das RNAP-Holoenzym (σ^{70}) aus *E. coli* möglich.

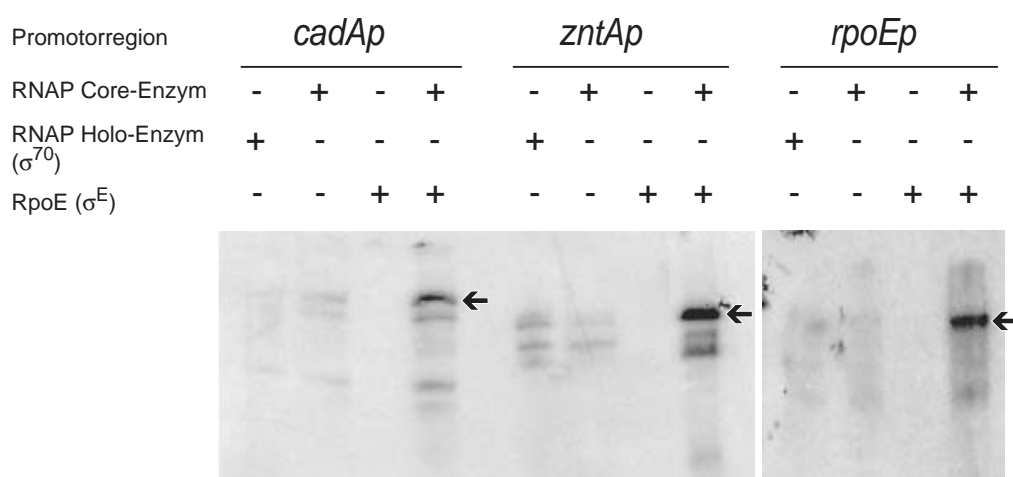


Abb. 9 Autoradiogramm der *in vitro*-Transkription von *cadAp*, *zntAp_{Cm}* und *rpoEp_{Cm}*

PCR-Produkte mit den Promotoren für *cadA*, *zntA_{Cm}* und *rpoE_{Cm}* wurden als *template* für eine *in vitro*-Transkription mit RNAP-Holoenzym (σ^{70}) bzw. RNAP-Coreenzym aus *E. coli* und RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans* eingesetzt. Entstandene RNA-Produkte wurden in einem 6%igen Harnstoffgel aufgetragen und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.1.6 Die Transkription von *zntA_{Cm}* und *cadA* ist *in vivo* nicht RpoE_{Cm}-abhängig

RpoE_{Cm} ist in der Lage, *in vitro* die Transkription ausgehend vom *zntAp* und *cadAp* zu starten. Um die Transkription von *cadA* und *zntA_{Cm}* *in vivo* zu untersuchen, wurden Fusionen der Gene *cadA* bzw. *zntA_{Cm}* mit *lacZ* (pECD796 bzw. pECD795) durch Konjugation in die AE104 $\Delta rpoE_{Cm}$ -Mutante DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) eingebracht. Die daraus resultierenden Stämme DN463($\Delta rpoE_{Cm}$, $\Phi(cadA-lacZ)$) und DN464($\Delta rpoE_{Cm}$, $\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) wurden in Southern-Hybridisierungen hinsichtlich der Deletion von *rpoE_{Cm}* verifiziert (Abb. 10, vgl. Abb.4) und anschließend in β -Galaktosidase-Tests mit ansteigenden Konzentrationen von ZnCl₂ bzw. CdCl₂ eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 11 dargestellt. Die Expression von *cadA* und *zntA_{Cm}* war im *C. metallidurans*-Stamm AE104 abhängig von steigenden Cd(II)-Konzentrationen. Außerdem ließ sich die Expression von *zntA_{Cm}* auch durch Zn(II) steigern. Eine Transkription von *cadA* als Reaktion auf ZnCl₂ ließ sich in Stamm AE104 nicht beobachten. Bei den Experimenten im $\Delta rpoE_{Cm}$ -Deletionsstamm waren keine signifikanten Unterschiede in den β -Galaktosidase-Aktivitäten im Vergleich zu AE104 erkennbar. Die Transkription von *zntA_{Cm}* war auch in DN464($\Delta rpoE_{Cm}$, $\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) durch ZnCl₂ und CdCl₂ induzierbar. DN463($\Delta rpoE_{Cm}$, $\Phi(cadA-lacZ)$) ließ sich ebenfalls durch CdCl₂, aber nicht durch ZnCl₂ induzieren (Abb. 11).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass das RNAP-Enzym mit RpoE_{Cm} in der Lage war, eine Transkription ausgehend von den Promotoren *cadAp* bzw. *zntA_{Cm}p* *in vitro* zu starten, scheint RpoE_{Cm} unter den getesteten Bedingungen nicht allein für die *in vivo*-Transkription von *cadA* bzw. *zntA_{Cm}* notwendig zu sein.

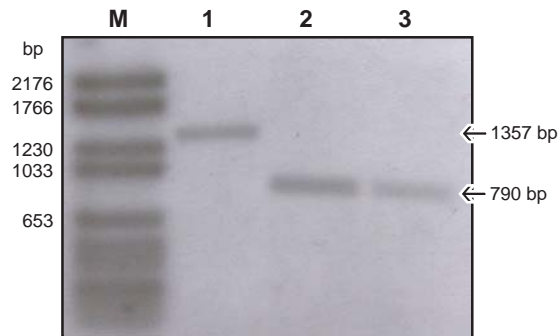


Abb. 10 Nachweis der Deletion von *rpoE_{Cm}* in *C. metallidurans* DN464($\Delta rpoE_{Cm}$ $\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) und DN463($\Delta rpoE_{Cm}$ $\Phi(cadA-lacZ)$) mittels Southern DNA:DNA-Hybridisierung

Mit *KpnI* geschnittene genomische DNA von AE104 (1), DN464($\Delta rpoE_{Cm}$ $\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) (2) und DN463($\Delta rpoE_{Cm}$ $\Phi(cadA-lacZ)$) (3) wurde in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonde (vgl. Abb. 4) erfolgte über Nacht bei 65°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz-Nachweis. Als Marker (M) diente der Digoxigenin-markierter DNA *molecular weight marker* VI (Roche, Mannheim).

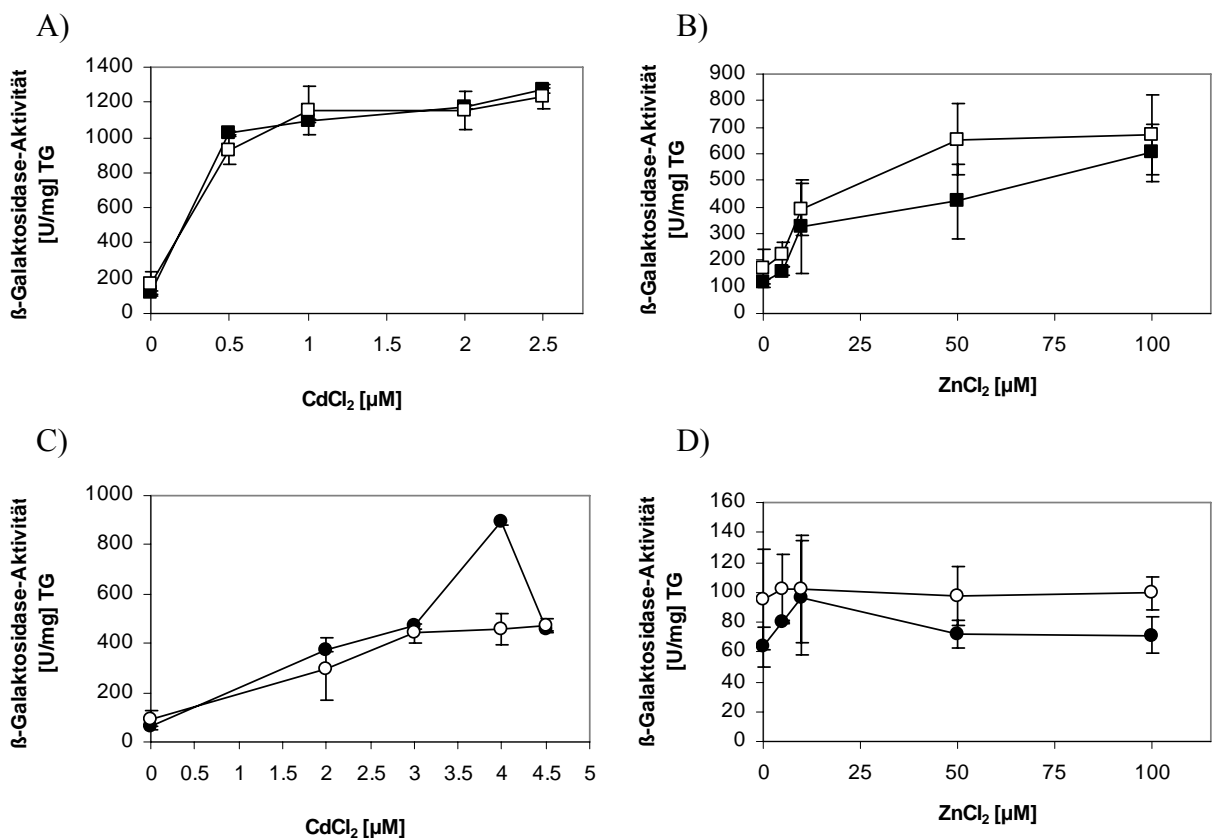


Abb. 11 β -Galaktosidase-Aktivitäten einer *cadA-lacZ*- bzw. *zntA_{Cm}-lacZ*- Operon-Fusion in *C. metallidurans*-Stämmen nach Inkubation mit $CdCl_2$ bzw. $ZnCl_2$

Vorkulturen der *C. metallidurans*-Stämme DN144($\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) (■), DN464($\Delta rpoE_{Cm}$ $\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) (□), DN442($\Phi(cadA-lacZ)$) (●) und DN463($\Delta rpoE_{Cm}$ $\Phi(cadA-lacZ)$) (○) wurden in frischem Medium (Tris-MM) verdünnt. Nach ca. 5 h Wachstum wurden die Kulturen geteilt und verschiedene Konzentrationen $CdCl_2$ (A, C) bzw. $ZnCl_2$ (B, D) zugegeben. Nach weiteren 3 h bei 30°C wurden Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität genommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichung. Die Induktionsmessungen der Stämme DN442($\Phi(cadA-lacZ)$) und DN144($\Phi(zntA_{Cm}-lacZ)$) wurden zum Teil nur einmal durchgeführt, sie entsprachen bereits publizierten Werten (Legatzki *et al.*, 2003).

3.2 Der Sigmafaktor RpoE_{Ec} ist involviert in die Schwermetall-Homöostase von *E. coli*

3.2.1 Die Deletion von *rpoE_{Ec}* führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zink-, Cadmium- und Kupferionen

Die Ergebnisse aus *C. metallidurans* sprachen für eine Beteiligung eines RpoE-Homologen an der Regulation der Metallhomöostase des Bakteriums. Es sollte analysiert werden, ob auch in *E. coli* RpoE_{Ec} in ähnliche Prozesse involviert ist.

Um dies zu untersuchen, wurde das Gen *rpoE_{Ec}* im Genom von *E. coli* deletiert. Dazu wurde zunächst die zu deletierende Genregion mit Hilfe der Primer FRT-rpoE-EC-down und FRT-rpoE-EC-up gegen eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette mit flankierenden FRT-sites ausgetauscht (Datsenko und Wanner, 2000). Die 39 Basen am 5'-Ende der verwendeten Primer waren jeweils homolog zur *rpoE_{Ec}* flankierenden Sequenz, während die 24 Basen am 3'-Ende der Primer homolog zur Sequenz des Plasmides pKD3 waren. Von pKD3 wurde mittels PCR das Gen der Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) einschließlich der flankierenden FRT-sites amplifiziert und in den *E. coli* Stamm BW25113(pKD46) elektroporiert. Über die 39 homologen Basenpaare stromauf- und -abwärts von *rpoE_{Ec}* erfolgte ein Genaustausch mittels des von pKD46 kodierten λ -Red-Rekombinase-Systems, was zur Deletion von *rpoE_{Ec}* und zur Insertion des *cat*-Gens an dessen Stelle im Genom führte. Der daraus resultierende Stamm ist BW25113(Δ *rpoE_{Ec}*::*cat*). In einem zweiten Schritt wurde die Chloramphenicol-Resistenz-Kassette über die FRT-sites mit Hilfe des Plasmids pCP20 entfernt, was zum Stamm ECA101(Δ *rpoE_{Ec}*) führte. Die relevante Genanordnung der konstruierten Stämme ist in Abb. 12A dargestellt.

Der Δ *rpoE_{Ec}*-Stamm ECA101 wurde mittels Southern-Hybridisierung überprüft. Dazu wurde die genomische DNA isoliert und mit *Bgl*I geschnitten. Als Sonde diente ein mit rpoEp-Pst und rseB(Ec)-pASK-Pst amplifiziertes 2300 bp-Fragment, das mit der Region *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* hybridisieren kann. Beim Einsatz der DNA des Wildtypstammes BW25113 wurden zwei Fragmente mit einer Größe von 3600bp bzw. 1803bp erwartet (Abb. 12B, Spur 1). Das 3600bp-Fragment ist auch in der Δ *rpoE_{Ec}*-Mutante ECA101 nachweisbar. Durch die Deletion von *rpoE_{Ec}* verkürzte sich das zweite Fragment auf 1245bp (Abb. 12B, Spur 2).

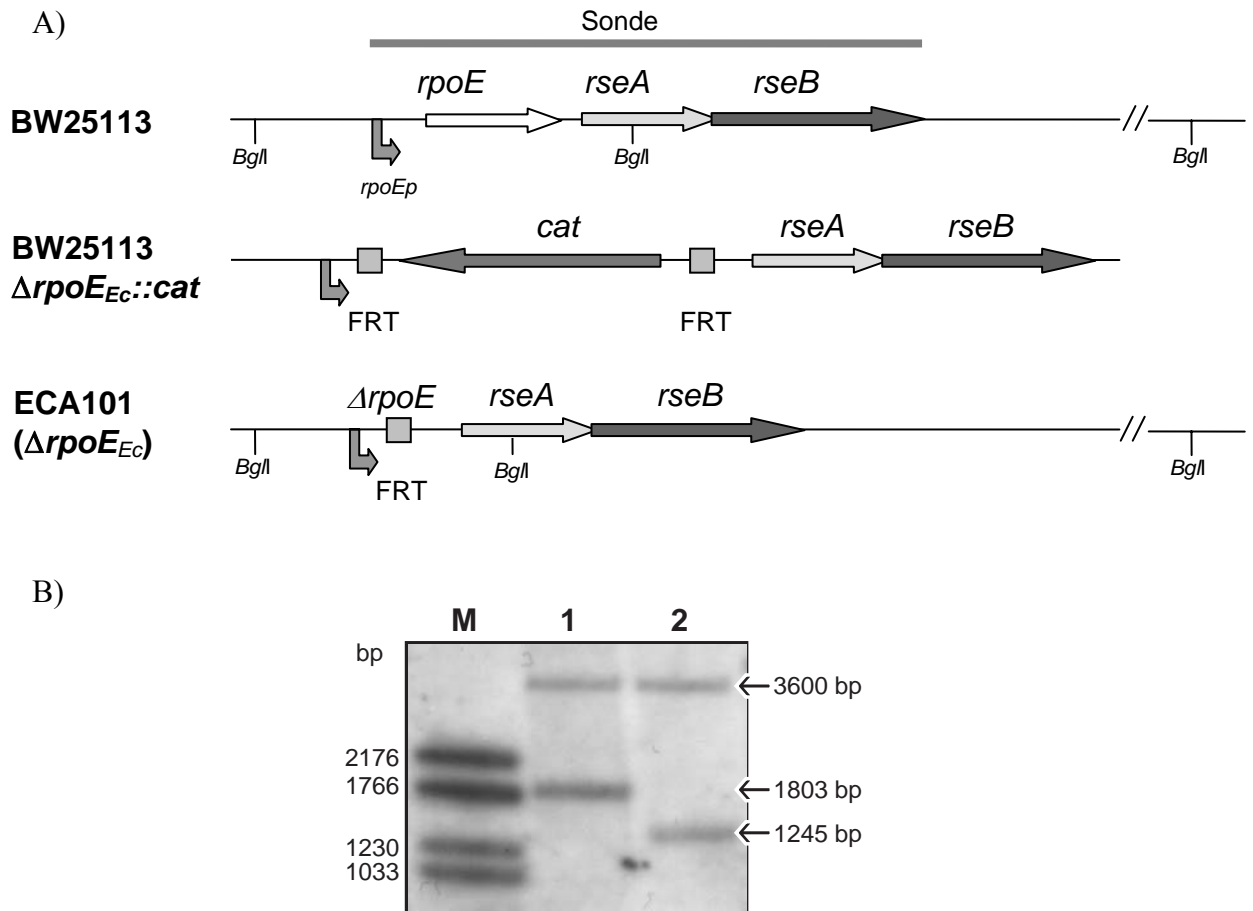


Abb. 12 Physikalische Karte der Region *rpoE-rseAB_{Ec}* in verschiedenen Derivaten von *E. coli* Stamm BW25113 und Nachweis der Deletion von *rpoE_{Ec}*

- A) Bei allen dargestellten Stämmen handelt es sich um Derivate von *E. coli* Stamm BW25113. In Stamm BW25113($\Delta rpoE_{Ec}::cat$) wurde *rpoE_{Ec}* gegen eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette ersetzt. In einem zweiten Rekombinationsschritt über die eingeführten FRT-sites, wurde in Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) die Resistenz wieder entfernt.
- B) Mit *BglI* geschnittene genomische DNA der *E. coli*-Stämme BW25113 (1) und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) (2) wurde in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonde (*rpoEp-rpoErseAB_{Ec}*) erfolgte über Nacht bei 65°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz-Nachweis. Als Marker (M) diente der Digoxigenin-markierte DNA *molecular weight marker* VI (Roche, Mannheim).

In Wachstumsversuchen mit verschiedenen Metallionen zeigte der Stamm ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) im Vergleich zum Stamm BW25113 ($rpoE_{Ec}$ -Wildtyp) erhöhte Sensitivität gegenüber $CuCl_2$, $CuCl$, $ZnCl_2$ bzw. $CdCl_2$. Dies konnte sowohl in Flüssigmedium (LB) nach einem Wachstum von 16 h bei 37°C anhand der Optischen Dichte ($E_{600\text{ nm}}$) (Abb. 13) als auch auf Festmedium (LB-Agar mit ansteigenden Schwermetallsalzkonzentrationen) nach Inkubation über Nacht bei 37°C beobachtet werden (Tabelle 6). Die MIC des $rpoE_{Ec}$ -Wildtyp-Stammes BW25113 gegenüber $CuCl_2$ betrug 3.25 mM, wohingegen der Stamm ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) bereits bei 2.75 mM $CuCl_2$ kein Wachstum mehr zeigte. Für $ZnCl_2$ konnte die MIC des Wildtypes mit 1.4 mM ermittelt werden. Für die $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutante betrug sie 1.1 mM $ZnCl_2$. Noch deutlicher war der Einfluss von $RpoE_{Ec}$ bei Wachstum auf Cadmium-haltigem Festmedium. Der *E. coli* Stamm BW25113 zeigte erst oberhalb 0.9 mM $CdCl_2$ kein Wachstum, wohingegen ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) bereits bei 0.3 mM $CdCl_2$ nicht mehr in der Lage war, zu wachsen (Tabelle 6). Keine Unterschiede im Wachstum beider Stämme zeigten sich bei Inkubation mit $NiCl_2$, $CoCl_2$, $FeCl_3$, $Pb(NO_3)_2$ und K_2CrO_4 (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Stamm BW25113 $\Delta rpoE_{Ec}::cat$ war nicht in der Lage die Optische Dichte von BW25113 oder ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) zu erreichen. Dies lag wahrscheinlich an der Zugabe von Chloramphenicol. Darüberhinaus wies BW25113 $\Delta rpoE_{Ec}::cat$ einen metallsensitiven Phänotyp bei Wachstum auf $ZnCl_2$, $CdCl_2$ bzw. $CuCl_2$ auf, der dem Verhalten von ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) entsprach (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 6: Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) von $CuCl_2$, $ZnCl_2$ bzw. $CdCl_2$ der *E. coli*-Stämme BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$)^a

<i>E. coli</i> - Stamm	Relevanter Genotyp	Minimale Inhibitor-Konzentration		
		$CuCl_2$ [mM]	$ZnCl_2$ [mM]	$CdCl_2$ [mM]
BW25113	$rpoE_{Ec}$ -Wildtyp	3.25	1.4	0.9
ECA101	$\Delta rpoE_{Ec}$	2.75	1.1	0.3

^a) Übernachtskulturen der Stämme wurden 1:100 verdünnt und nach 2 h Wachstum auf LB-Agar mit $CuCl_2$, $ZnCl_2$ bzw. $CdCl_2$ ausgestrichen. Die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 37°C über Nacht mehr sichtbar war. Die Resultate konnten durch Mehrfachbestimmung bestätigt werden.

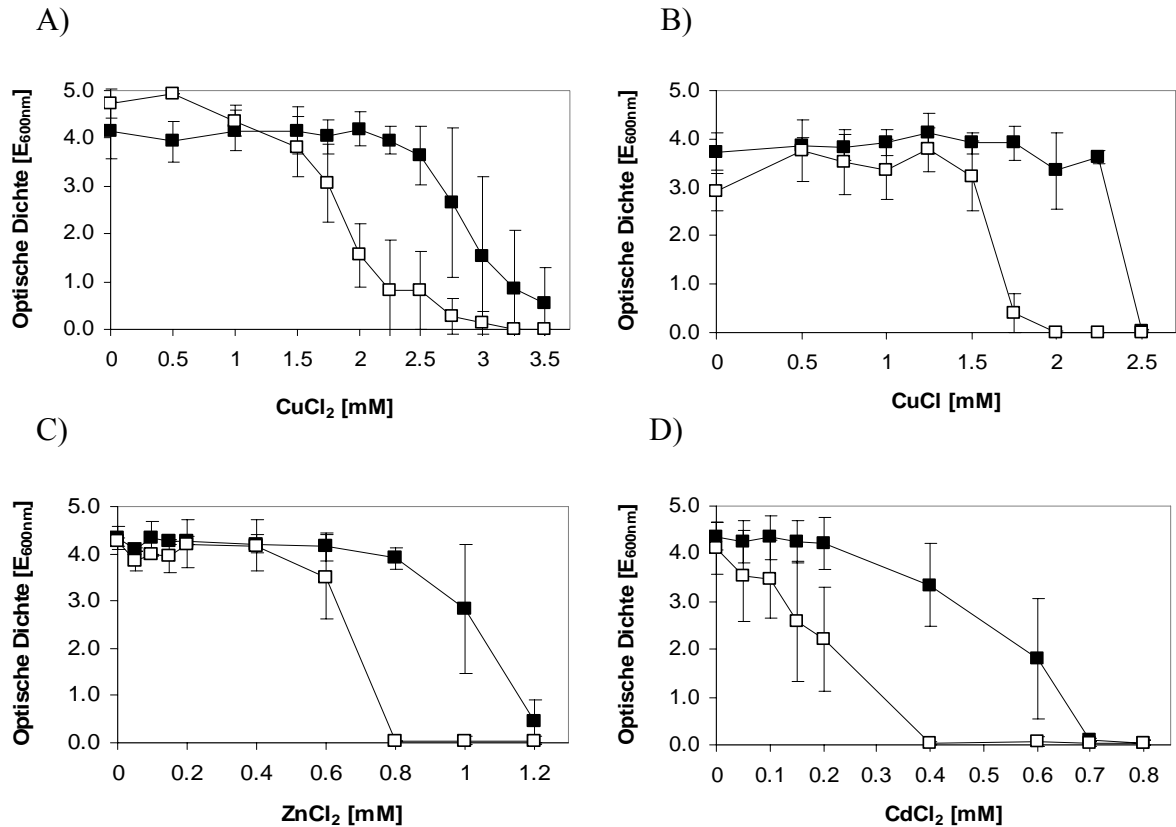


Abb. 13 Einfluß von Kupfer-, Zink- bzw Cadmiumionen auf das Wachstum der *E. coli*-Stämme BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$).

Kulturen der *E. coli*-Stämme BW25113 (■) und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) (□) wurden aus einer Vorkultur 1:100 in frischem LB-Medium mit steigenden Konzentrationen an CuCl₂ (A), CuCl (durch Zugabe von 1 mM Ascorbat) (B), ZnCl₂ (C) bzw. CdCl₂ (D) verdünnt und 16 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt und gegen die Metallkonzentrationen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Der Vorteil der Bestimmung der Minimalen Inhibitor-Konzentration nach Inkubation über Nacht auf Festmedium bzw. der Optische Dichte einer Flüssigkultur nach 16 h besteht darin, den Einfluss vieler Konzentrationen verschiedenster Metallionen zu messen. Ein vollständiger Vergleich des Wachstumsverhaltens zwischen den *E. coli*-Stämmen BW25113 und ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) wird jedoch nur gewährleistet, indem neben der Analyse der Bakteriendichte zu einem bestimmten Zeitpunkt auch deren Wachstum zeitabhängig gemessen wird. Einige Wachstumsbeispiele sind in Abb. 14 dargestellt. Es zeigte sich, dass die erhöhte Sensitivität des *E. coli* Stamms ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) gegenüber Kupfer-, Zink- und Cadmiumionen auf einer verlängerten lag-Phase beruhte.

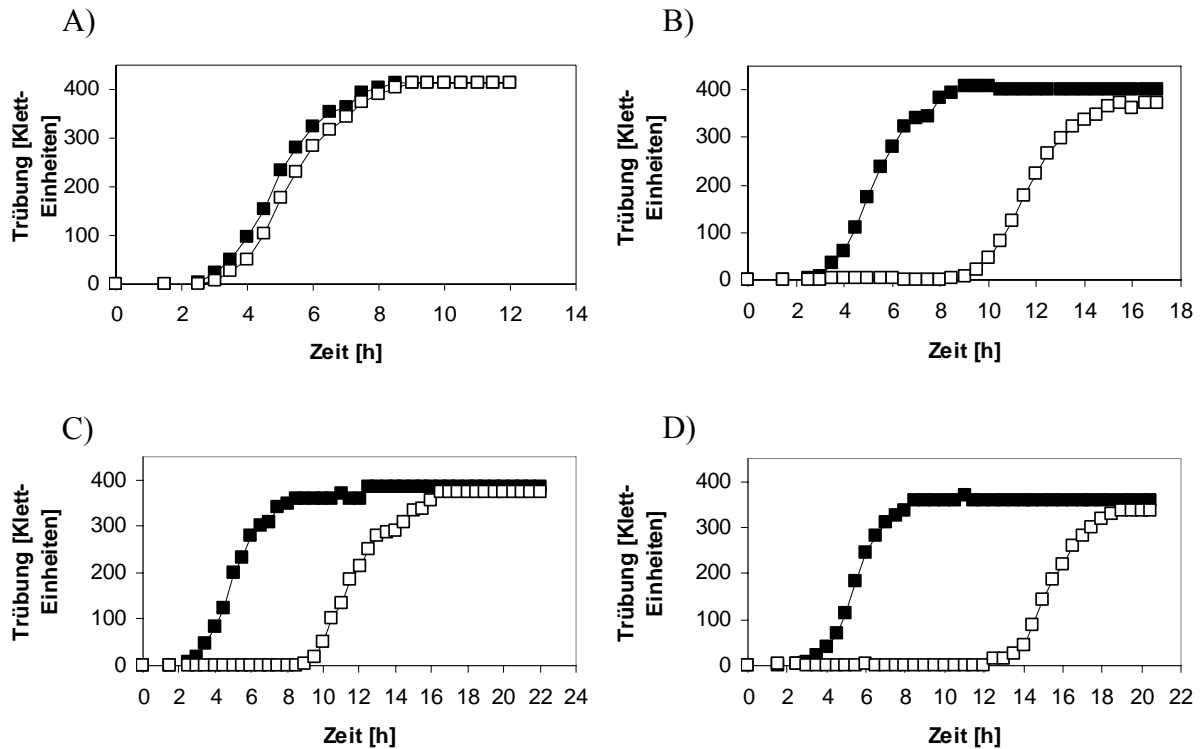


Abb. 14 Zeitabhängiges Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) in Gegenwart verschiedener Metalle.

Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme BW25113 (■) und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) (□) wurden 1:400 in frischem LB-Medium verdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Diese Vorkulturen wurden wiederum 1:400 in 10 ml LB-Medium verdünnt und ohne Metallzugabe (A), mit 2 mM $CuCl_2$ (B), 0.7 mM $ZnCl_2$ (C) bzw. 0.2 mM $CdCl_2$ (D) inkubiert und das Wachstum durch Bestimmung der Trübung in Klett-Einheiten in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Da die Kulturen so inokuliert wurden, dass das Messgerät zu Beginn 0 Klett anzeigte, wurde eine halbbl logarithmische Darstellung des Wachstums nicht verwendet.

3.2.2 Die Deletion von $rpoE_{Ec}$ ist *in trans* nur durch $rpoErseAB_{Ec}$ aber nicht durch $rpoE_{Ec}$ allein komplementierbar

Um nachzuweisen, dass die erhöhte Sensitivität gegenüber Zink-, Cadmium- und Kupferionen im *E. coli*-Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) allein auf die Deletion des Gens für den Sigmafaktor $RpoE_{Ec}$ zurückzuführen ist, wurde versucht, die Resistenz des Wildtypes durch Expression von $rpoE_{Ec}$ *in trans* wieder herzustellen. Dazu wurde zunächst das Gen $rpoE_{Ec}$ sowie die gesamte Region $rpoErseAB_{Ec}$, die neben dem Sigmafaktor auch die Gene des Antisigmafaktor-Komplexes $RseA_{Ec}$ und $RseB_{Ec}$ umfaßt, in die Überexpressionsvektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA7 (IBA, Göttingen) kloniert. Das Gen $rpoE_{Ec}$ wurde zunächst mit Hilfe der Primer $rpoE$ (Ec) pASK-SacII und $rpoE$ (Ec) pASK-Pst, die Region $rpoErseAB_{Ec}$ mit $rpoE$ (Ec) pASK-SacII und $rseB$ (Ec) pASK-Pst aus dem Genom von *E. coli* K12 amplifiziert und in

pGEM[®]-T *easy* kloniert. Dies ermöglichte eine Sequenzierung des Inserts. Beide Fragmente wurden in die Vektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA7 unter Kontrolle des *tetAp* Promotors subkloniert. Der *E. coli*-Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) wurde anschließend mit den erhaltenen Plasmiden transformiert und das Wachstum untersucht. Nach Induktion der Expression von *rpoE_{Ec}* bzw. *rpoErseAB_{Ec}* mit 50 µg/l Anhydrotetrazyklin (AHT) war kein Wachstum der resultierenden Stämme mehr zu verzeichnen. Ohne AHT-Zugabe verhielten sich die Stämme wie ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Überexpression des Sigmafaktors RpoE_{Ec} zu Veränderungen in der Zellhomöostase von *E. coli* führte, die toxisch auf die Zellen wirkten (Ergebnis nicht gezeigt).

Eine andere Möglichkeit der Komplementation stellt die Expression von *rpoE_{Ec}* unter Kontrolle des eigenen Promotors dar. Es wurden die Region *rpoEp-rpoE_{Ec}* mit den Primern Ec-rpoEp-Pst und rpoE (Ec) pASK-Pst und die Region *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* mit Hilfe der Primer Ec-rpoEp-Pst und rseB (Ec) pASK-Pst amplifiziert und in pGEM[®]-T *easy* kloniert. Nach Transformation des *E. coli*-Stamms ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) mit den resultierenden Plasmiden wurden Wachstumsversuche in Anwesenheit von Metallionen durchgeführt. Dabei verhielten sich die Stämme mit pGEM[®]-T *easy*::*rpoEp-rpoE_{Ec}* bzw. pGEM[®]-T *easy*::*rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* wie der Ausgangsstamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$). Es kam womöglich zu keiner Expression von *rpoE_{Ec}*. Auch auf diese Weise gelang keine Komplementation (Ergebnis nicht gezeigt).

Ein weiterer Versuch, den Phänotyp der Deletion von *rpoE_{Ec}* in ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) zu komplementieren, bestand darin, *rpoE_{Ec}* bzw. *rpoErseAB_{Ec}* unter Kontrolle des eigenen Promotors *rpoEp_{Ec}* als Einzelkopie wieder ins Genom von *E. coli* zu integrieren, allerdings an einer anderen Position. Diese Vorgehensweise sollte die natürliche Kopienzahl von *rpoE_{Ec}* wiederherstellen. Dazu wurden die Inserts der bereits vorliegenden Plasmide pGEM[®]-T *easy*::*rpoEp-rpoE_{Ec}* und pGEM[®]-T *easy*::*rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* über *PstI*-Schnittstellen in das CRIM- (*conditional-replication, intergration and modular*) Plasmid pAH125 (Haldimann und Wanner, 2001) subkloniert, woraus die Plasmide pECD890(pAH125::*rpoEp-rpoE_{Ec}*) und pECD891(pAH125::*rpoEp-rpoErseAB_{Ec}*) resultierten. Der *E. coli*-Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) wurde mit dem CRIM-Helferplasmid pINT-ts transformiert, wodurch eine Expression der λ -Integrase ermöglicht wurde. Die Plasmide pECD890 und pECD891 wurden durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$, pINT-ts) gebracht und ins Genom integriert. Durch PCR-Analysen und Southern-Hybridisierung konnten die resultierenden Stämme ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, λ_{att} ::*rpoEp-rpoE_{Ec}*) und ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, λ_{att} ::*rpoEp-rpoErseAB_{Ec}*) auf erfolgreichen Einbau von *rpoEp-rpoE_{Ec}* bzw. *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* überprüft werden. Mit der

Sonde *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* konnten mit *Bgl*I-geschnittenen genomischer DNA des Wildtypstamms BW25113 3600 bp und 1803 bp und im Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) 3600 bp und 1245 bp nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12). In den Komplementationstämmen ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoE_{Ec}}$) und ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}}$) waren ebenfalls die Signale bei 3600 bp und 1245 bp zu erkennen. Diese deuten auf die Deletion von *rpoE_{Ec}* hin. Hinzu kamen Signale höher laufender Restriktionsfragmente, im Stamm ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoE_{Ec}}$) mit einer theoretischen Länge von 4067 bp und im Stamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}}$) mit einer Größe von 4406 bp. Ein in Stamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}}$) ebenfalls erwartetes Signal bei 1249 bp konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, da es im Gel auf der gleichen Höhe wie das Signal bei 1245 bp läuft (Abb. 15).

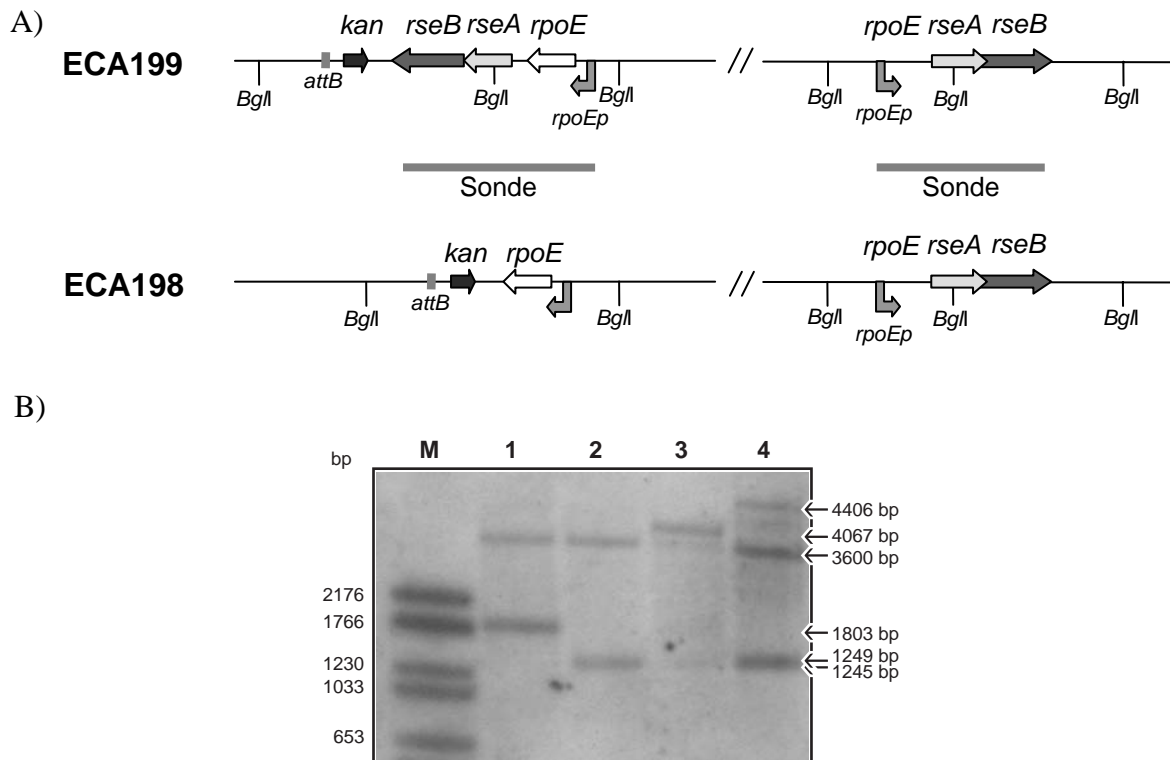


Abb. 15 Physikalische Karte der relevanten genetischen Regionen in verschiedenen Derivaten von *E. coli* und Nachweis der Deletion von *rpoE_{Ec}* sowie der Integration von *rpoEp-rpoE* bzw. *rpoEp-rpoErseAB*

- A) Bei den dargestellten Stämmen ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}}$) und ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoE_{Ec}}$) handelt es sich um Derivate von *E. coli* Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$). Dargestellt sind die Deletion von *rpoE_{Ec}* sowie die Insertion von *rpoEp-rpoE_{Ec}* bzw. *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* an der λ -attachment site von *E. coli*.
- B) Mit *Bgl*I geschnittene genomische DNA der *E. coli*-Stämme BW25113 (1), ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) (2), ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoE_{Ec}}$) (3) und ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}}$) (4) wurde in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-11-dUTP-markierten Sonde (*rpoEp-rpoErseAB_{Ec}*) erfolgte über Nacht bei 65°C, die Detektion mittels Chemilumineszenz-Nachweis. Als Marker (M) diente der Digoxigenin-markierte DNA molecular weight marker VI (Roche, Mannheim).

Beide *E. coli*-Stämme wurden in Wachstumsversuchen mit Kupfer-, Zink- und Cadmiumionen eingesetzt. Dabei verhielt sich ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::rpoEp-rpoE_{Ec}$) unter allen getesteten Bedingungen wie ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) (Ergebnis nicht gezeigt). Im Stamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$) war es möglich, die Sensitivität gegenüber $CuCl_2$ im Vergleich zu ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) aufzuheben. Wie in Abb. 16 gezeigt, wuchs der *E. coli* Stamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$) in Anwesenheit von 2 mM $CuCl_2$ nahezu wie der Wildtyp-Stamm BW25113. In Anwesenheit von Zn(II) bzw. Cd(II) verhielt sich der *E. coli* Stamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$) wie die $rpoE_{Ec}$ -Deletionsmutante ECA101 (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Wiederherstellung der Wildtypresistenz gegen Kupferionen gelang durch Expression von $rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$ im $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stamm, gegenüber Zink- und Cadmiumionen war dies nicht möglich.

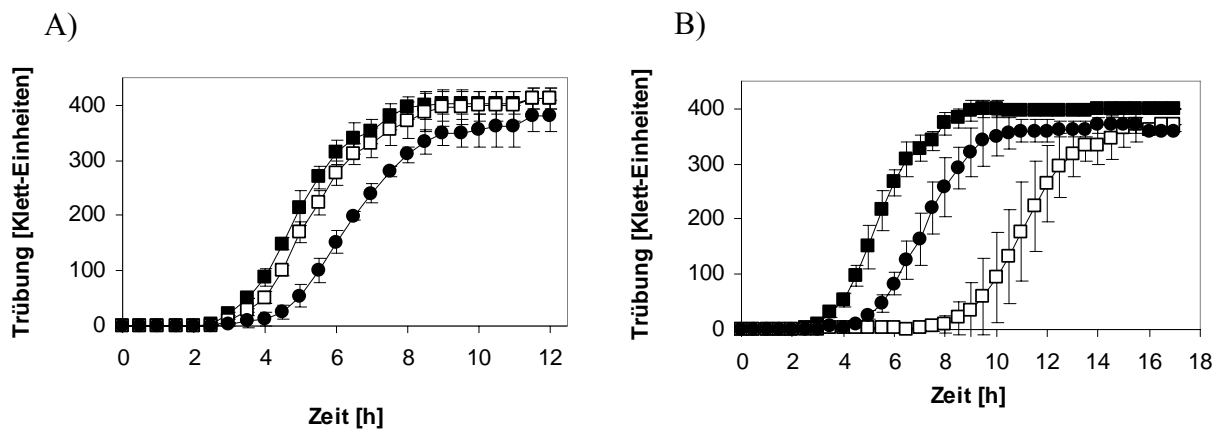


Abb. 16 Zeitabhängiges Wachstumsverhalten der *E. coli*-Stämme BW25113, ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) und ECA199 ($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Phi rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$) ohne Metallzugabe (A) bzw. in Anwesenheit von 2 mM $CuCl_2$ (B).

Übernachtskulturen der *E. coli* Stämme BW25113 (■), ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) (□) bzw. ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$) (●) wurden 1:400 in frisches LB-Medium verdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Diese Vorkulturen wurden wiederum 1:400 in 10 ml LB-Medium verdünnt und ohne Metallzugabe (A) bzw. in Anwesenheit von 2 mM $CuCl_2$ (B) inkubiert. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Trübung in Klett-Einheiten im Zeitverlauf verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichung.

Da die Kulturen so inokuliert wurden, dass das Messgerät zu Beginn 0 Klett anzeigte, wurde eine halblogarithmische Darstellung des Wachstums nicht verwendet.

3.2.3 Der Promotor *rpoEp_{Ec}* ist durch Zink und Kupfer induzierbar

Um den Sigmafaktor RpoE_{Ec} näher zu charakterisieren, sollte getestet werden, welche Stressfaktoren zu seiner Expression führen. Dazu wurde eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Promotor *rpoEp_{Ec}* und dem *lacZ*-Gen konstruiert.

Zunächst wurde ein 620 bp langes Fragment, das die Promotorregion und das 5'-Ende von *rpoE_{Ec}* umfasst, mit Hilfe der Primer Ec-rpoEp-Pst und Ec-rpoEp-Eco aus der chromosomalen DNA von *E. coli* K12 amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-T *easy* kloniert. Nach Überprüfung der Sequenz wurde das Fragment in das CRIM-Plasmid pAH125 stromaufwärts eines promotorlosen *lacZ*-Gens umklontiert, woraus das Plasmid pECD893(pAH125::*rpoEp_{Ec}*) resultierte. Das Konstrukt *rpoEp_{Ec}-lacZ* wurde an die λ -attachment-site ins Genom von *E. coli* BW25113 integriert, was zum *E. coli* Stamm ECA203(λ_{att} ::*rpoEp_{Ec}-lacZ*) führte. Auf diese Weise war die Expression des *lacZ*-Gens direkt abhängig von der Aktivität des Promotors *rpoEp_{Ec}*. Die Enzymaktivität diente als Maß für die Promotoraktivität.

Die Untersuchungen zur Induzierbarkeit des Promotors *rpoEp_{Ec}* wurden in Tris-gepuffertem Mineralsalzmedium (Tris-MM_{Ec}) durchgeführt. Bei Zugabe von steigenden Konzentrationen von CuCl₂ zeigte sich ein sigmoidaler Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität. Ein Maximum war mit ca. 42-facher (42.5 ± 16.6) Expression von *rpoEp_{Ec}-lacZ* bei 0.8 mM ZnCl₂ zu verzeichnen. Dabei war ab 0.4 mM ZnCl₂ ein nahezu linearer Anstieg zu beobachten. Die Zugabe von CuCl₂ führte zu einer Expressionssteigerung um das 26-fache (26.3 ± 14.5) bei 2.5 mM CuCl₂ (Abb. 17a). Alle anderen getesteten Chloride waren lediglich in der Lage, die β -Galaktosidase-Aktivität bei Expression von *lacZ* unter Kontrolle des Promotors *rpoEp_{Ec}* linear um das zwei- bis vierfache zu steigern. Nach Inkubation mit 100 μ M CdCl₂ kam es zu einer Induktion um das 3.86 ± 1.91 -fache, mit 1 mM NiCl₂ um das 2.13 ± 0.34 -fache und mit 50 mM MgCl₂ um das 2.02 ± 0.69 -fache. NaCl steigerte die Expression ausgehend vom Promotor *rpoEp_{Ec}* um das 4.5 ± 2.4 -fache bei 500 mM (Abb. 17c-f).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Promotoraktivität von *rpoEp_{Ec}* durch Metallchloride induziert werden konnte. Zink- und Kupferionen hatten dabei den größten Anstieg zur Folge.

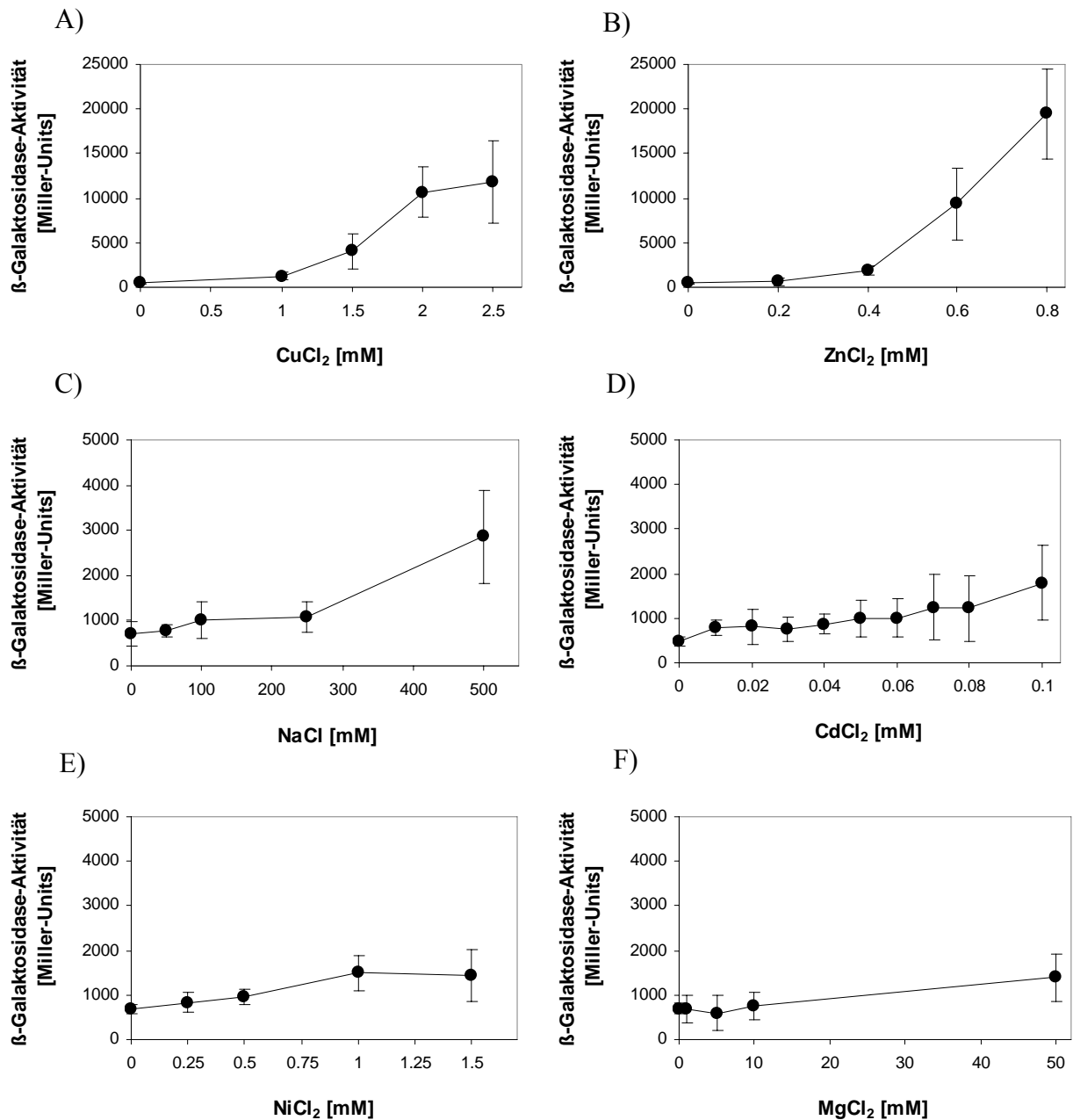


Abb. 17 β -Galaktosidase-Aktivität bei Expression von *lacZ* unter Kontrolle des Promotors *rpoE_{Ec}* im *E. coli*-Stamm ECA203 ($\lambda_{\text{att}}::rpoE_{Ec}-lacZ$)

Kulturen des *E. coli* Stamms ECA203 ($\lambda_{\text{att}}::rpoE_{Ec}-lacZ$) wurden 1:100 in frischem Medium (Tris-MM_{Ec}) verdünnt. Nach 2 h Wachstum wurden die Kulturen geteilt und verschiedene Konzentrationen CuCl_2 (A), ZnCl_2 (B), NaCl (C), CdCl_2 (D), NiCl_2 (E) bzw. MgCl_2 (F) zugegeben. Nach weiteren 2 h bei 37°C wurden Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität entnommen. Diese wurde gegen die Salzkonzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier Messungen mit Standardabweichung.

3.2.4 RpoE im Zusammenspiel mit Schwermetall-Resistenzsystemen

3.2.4.1 Einfluß von RpoE auf die Resistenz gegen Kupferionen

Das Fehlen des Sigmafaktors RpoE_{Ec} führte in *E. coli* zu einer Verminderung der Resistenz gegenüber Kupfer-, Zink- bzw. Cadmiumionen. Es sind verschiedene Systeme bekannt, die von *E. coli* sowohl unter Metallstress induziert werden, als auch für die Entgiftung der Zellen von Metallionen notwendig sind. Deshalb wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den Metall-Resistenzsystemen und dem Sigmafaktor RpoE_{Ec} gibt.

Mithilfe vorhandener P1-Phagenlysate war es möglich, die Gene *copA*, *cueO* und das *cusCFBA*-Operon einzeln sowie in Kombinationen in den *E. coli*-Stämmen BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) zu deletieren. Die erhaltenen Stämme wurden auf LB-Agar mit steigenden CuCl₂-Konzentrationen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) der einzelnen Mutanten zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Der *E. coli*-Wildtypstamm BW25113 wies bei diesen Untersuchungen eine MIC von 3.25 mM CuCl₂ auf. Die $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutante ECA101 zeigte ab 2.75 mM CuCl₂ kein Wachstum mehr. Die Deletion von *copA* wies mit einer MIC von 2.25 mM CuCl₂ den stärksten Resistenzverlust einer Einzeldelation auf. Die Deletion von *cusCFBA* oder *cueO* führte zu keiner deutlichen Änderung der Resistenz im Vergleich zum Wildtyp. Die Doppelmutanten ECA207($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta copA$), ECA208($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta cusCFBA$) und ECA209($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta cueO::cat$) wiesen im Vergleich zu den Einzelmutanten eine verminderte Resistenz gegenüber CuCl₂ auf. Die Deletion der Gene der periplasmatischen Entgiftungssysteme *CusCFBA* und *CueO* in Stamm ECA212 hatte eine MIC von 1.25 mM CuCl₂ zur Folge. Eine zusätzliche Deletion von *rpoE_{Ec}* in diesem Stamm führte zu einem weiteren Absinken der Resistenz auf 1.00 mM CuCl₂. Dieser Wert wurde auch mit der Vierfachmutante ECA217($\Delta rpoE_{Ec}$ $\Delta copA$ $\Delta cusCFBA$ $\Delta cueO::cat$) erreicht.

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, dass die Deletionen von *rpoE_{Ec}* zusätzlich zu den Genen der Resistenzsysteme *CopA*, *CueO* bzw. *CusCFBA*, die MIC im Vergleich zu den jeweiligen Einzel- bzw. Mehrfachmutanten weiter verringerte.

Tabelle 7: Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) von Kupfer in verschiedenen *E. coli*-Stämmen^a

<i>E. coli</i> - Stamm	Relevanter Genotyp	MIC CuCl ₂ [mM]
BW25113		3.25
ECA101	$\Delta rpoE_{Ec}$	2.75
ECA204	$\Delta copA$	2.25
ECA205	$\Delta cusCFBA$	3.25
ECA206	$\Delta cueO::cat$	3.00
ECA207	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA$	2.00
ECA208	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta cusCFBA$	2.25
ECA209	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta cueO::cat$	2.50
ECA210	$\Delta copA, \Delta cusCFBA$	2.25
ECA211	$\Delta copA, \Delta cueO::cat$	2.25
ECA212	$\Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	1.25
ECA213	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA, \Delta cusCFBA$	2.00
ECA214	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA, \Delta cueO::cat$	2.00
ECA215	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	1.00
ECA216	$\Delta copA, \Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	1.25
ECA217	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta copA, \Delta cusCFBA, \Delta cueO::cat$	1.00

^{a)} Die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 37°C über Nacht mehr sichtbar war. Übernachtkulturen der Stämme wurden auf LB-Agar mit CuCl₂ ausgestrichen. Die Resultate konnten durch Mehrfachbestimmung bestätigt werden.

Die Regulation der Expression von *copA* und möglicherweise auch *cueO* erfolgt cytoplasmatisch über CueR, ein Regulatorprotein der MerR-Familie (Stoyanov *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2000). Es wurden chromosomale Fusionen von *copAp-lacZ*, *cueOp-lacZ* und *cueRp-lacZ* hergestellt. Mit den Primern *copAp-Pst* und *copAp-Eco*, *cueOp-Pst* und *cueOp-Eco* sowie *cueRp-Pst* und *cueRp-Eco* wurden dazu jeweils ca. 500 bp der Promotorregionen der Gene amplifiziert und in pAH125 kloniert, wodurch die Insertion der Promotorfusionen mit dem *lacZ*-Gen ins Genom von *E. coli* ermöglicht wurde. Verglichen wurde die Expression ausgehend von den Promotoren *copAp*, *cueOp* und *cueRp* im *E. coli*-Wildtypstamm BW25113 und im Stamm ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) nach Zugabe von CuCl₂. Die Stämme wurden in Tris-MM_{Ec} angezogen und die Proben zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität zwei Stunden nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an CuCl₂ entnommen. Es zeigte sich, dass alle drei untersuchten Promotoren in *E. coli* kupferabhängig induziert wurden, wobei die stärkste Induktion jeweils bei ca. 2 mM

CuCl₂ zu verzeichnen war (Abb. 18). Vergleicht man die Expressionen in den Derivaten des *E. coli* Stammes ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) mit denen der Wildtyp-Derivate, ergab sich folgendes Bild: Die Fusion *cueRp-lacZ* ließ sich in ECA220($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::cueRp-lacZ$) mit geringeren Konzentrationen an CuCl₂ im Vergleich zum Wildtypstamm ECA219($\lambda_{att}::cueRp-lacZ$) induzieren. Die maximale β -Galaktosidase-Aktivität lag bei Inkubation mit 1 mM bis 1.5 mM CuCl₂ vor. Mit weiter steigenden Kupferkonzentrationen sank die Enzymaktivität bis auf das Ausgangsniveau ab (Abb. 18a). Die ermittelte β -Galaktosidase-Aktivität bei Expression von *lacZ* ausgehend vom Promotor *cueOp* verhielt sich bis zu einer Konzentration von 1 mM CuCl₂ in beiden Stämmen gleich. Höhere Kupferkonzentrationen führten im Wildtypstamm zu einer stärkeren Induktion, wohingegen die Enzymaktivität im *E. coli*-Stamm ECA223($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::cueOp-lacZ$) wieder abnahm (Abb. 18b). Für den Promotor von *copA* sind in diesem Experiment keine signifikanten Unterschiede zwischen ECA225($\lambda_{att}::copAp-lacZ$) und ECA226($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::copAp-lacZ$) zu beobachten gewesen (Abb. 18c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die β -Galaktosidase-Expressionen unter Kontrolle der Promotoren *cueRp* und *cueOp* sowohl im *rpoE_{Ec}*-Wildtypstamm als auch im $\Delta rpoE_{Ec}$ -Deletionstamm durch CuCl₂ induzierbar waren. Die Expression war unterhalb einer Konzentration von 1.5 mM CuCl₂ RpoE_{Ec}-unabhängig und bei höheren Konzentrationen RpoE_{Ec}-abhängig. Für die Expression ausgehend vom Promotor vor *copA* konnte eine RpoE_{Ec}-Abhängigkeit nicht gezeigt werden.

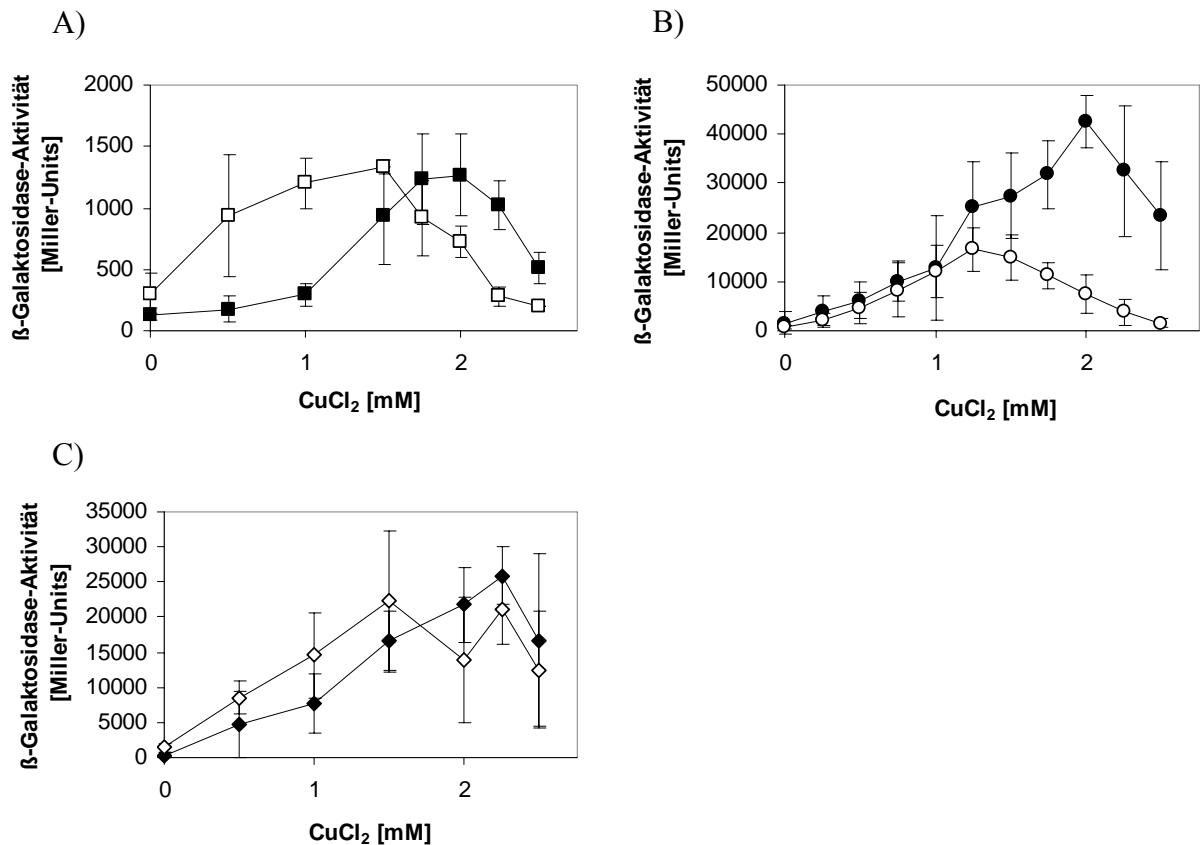


Abb. 18 Induktion der β -Galaktosidase-Aktivität von *cueRp-lacZ* (A), *cueOp-lacZ* (B) bzw. *copAp-lacZ* (C) in Derivaten der *E. coli* Stämme BW25113 und ECA101(Δ *rpoE_{Ec}*)

Kulturen der *E. coli* Stämme ECA219($\lambda_{att::cueRp-lacZ}$) [■], ECA220(Δ *rpoE_{Ec}*, $\lambda_{att::cueRp-lacZ}$) [□] (a), ECA222($\lambda_{att::cueOp-lacZ}$) [●], ECA223(Δ *rpoE_{Ec}*, $\lambda_{att::cueOp-lacZ}$) [○] (b), ECA225($\lambda_{att::copAp-lacZ}$) [◆] und ECA226(Δ *rpoE_{Ec}*, $\lambda_{att::copAp-lacZ}$) [◇] (c) wurden 1:100 in frischem Medium (Tris-MM_{Ec}) verdünnt. Nach 2 h Wachstum wurden die Kulturen geteilt und verschiedene Konzentrationen CuCl₂ zugegeben. Nach weiteren 2 h bei 37°C wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt und Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität entnommen. Diese wurde gegen die eingesetzte CuCl₂-Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis fünf Messungen mit Standardabweichungen.

3.2.4.2 Einfluß von RpoE_{Ec} auf die Resistenz gegenüber Zink- bzw. Cadmiumionen

Mit Hilfe vorhandener P1-Phagenlysate konnten die Gene *zntA_{Ec}* und *zitB*, die für Zn(II)/Cd(II)- bzw. Zn(II)-Transporter kodieren, in den *E. coli* Stämmen BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) einzeln bzw. gemeinsam deletiert werden. Mit den erhaltenen Stämmen sollte untersucht werden, ob RpoE_{Ec} einen Einfluß auf diese zellulären Entgiftungssysteme für Zn(II) und Cd(II) hatte. Deshalb wurden die Stämme zunächst in LB-Medium bei 37°C angezogen und auf LB-Agar mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnCl₂ bzw. CdCl₂ ausgestrichen. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurde die (MIC) der Stämme bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt. Den stärksten Effekt einer Einzeldelation zeigte der Stamm ECA227($\Delta zntA_{Ec}$), der eine MIC von 0.6 mM ZnCl₂ bzw. 0.04 mM CdCl₂ aufwies. Im Vergleich dazu lag die MIC des Wildtypes BW25113 bei 1.4 mM ZnCl₂ bzw. 0.9 mM CdCl₂. Eine zusätzliche Deletion von *rpoE_{Ec}* bzw. *zitB* hatte keinen Einfluß. Die Deletion aller drei Gene in Stamm ECA232($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta zntA_{Ec}$, $\Delta zitB$) führte allerdings zu einem weiteren Absinken der Resistenz gegenüber Zinkionen auf 0.4 mM. Es kam zu keiner Änderung der Resistenz gegen CdCl₂ verglichen mit den *E. coli*-Stämmen ECA227($\Delta zntA_{Ec}$) bzw. den Doppelmutanten ECA229($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta zntA_{Ec}$) und ECA231($\Delta zntA_{Ec}$, $\Delta zitB$).

Die Deletion von *zitB* allein hatte keinen Einfluss auf die Resistenzen gegenüber Zink- bzw. Cadmiumionen. Waren *zitB* und *rpoE_{Ec}* deletiert (ECA230), lag die MIC bei 1.1 mM ZnCl₂ bzw. 0.3 mM CdCl₂, was der $\Delta rpoE$ -Einzeldelationsmutante ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) entsprach.

Tabelle 8: Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) von ZnCl₂ bzw. CdCl₂ in verschiedenen *E. coli*-Stämmen^a

<i>E. coli</i> - Stamm	Relevanter Genotyp	MIC	
		ZnCl ₂ [mM]	CdCl ₂ [mM]
BW25113		1.40	0.90
ECA101	$\Delta rpoE_{Ec}$	1.10	0.30
ECA227	$\Delta zntA_{Ec}$	0.60	0.04
ECA228	$\Delta zitB$	1.40	0.90
ECA229	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta zntA_{Ec}$	0.60	0.04
ECA230	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta zitB$	1.10	0.30
ECA231	$\Delta zntA_{Ec}, \Delta zitB$	0.60	0.04
ECA232	$\Delta rpoE_{Ec}, \Delta zntA_{Ec}, \Delta zitB$	0.40	0.04

^{a)} Die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der kein Wachstum bei 37°C über Nacht mehr sichtbar war. Übernachtskulturen der Stämme wurden auf LB-Agar mit ZnCl₂ bzw. CdCl₂ ausgestrichen. Die Resultate konnten durch Mehrfachbestimmung bestätigt werden.

Um die Expression ausgehend von den Promotoren von *zntAp* und *zitBp* zu untersuchen, wurden, wie bereits beschrieben, Fusionen mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen in den *E. coli*-Stämmen BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) hergestellt. Die Expression beider Gene steigt sowohl im *rpoE_{Ec}*-Wildtypstamm BW25113 als auch im $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stamm ECA101 mit ansteigender ZnCl₂-Konzentration, wobei die maximale β -Galaktosidase-Aktivität für den Promotor *zitBp* bei 0.8 mM ZnCl₂ und für *zntAp_{Ec}* bei 0.8-1.0 mM ZnCl₂ lag (Daten nicht gezeigt).

Die Gene *zntA_{Ec}* und *zitB* scheinen nicht RpoE_{Ec}-abhängig transkribiert zu werden, da keine Unterschiede in den β -Galaktosidase-Aktivitäten im $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stamm im Vergleich zum Wildtypstamm beobachtet werden konnten.

4 Diskussion

Mikroorganismen haben Mechanismen entwickelt, um schnell und gezielt auf Veränderungen in der Umwelt zu reagieren. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Regulation der Transkription durch DNA-bindende Proteine, wie z. B. Vertreter der MerR/ZntR- bzw. ArsR/SmtB-Familie (Brown *et al.*, 2003; Busenlehner *et al.*, 2003; Hantke, 2001), sowie die Nutzung alternativer Sigmafaktoren anstelle des *house-keeping*-Sigmafaktors (Fang, 2005). Manche Bakterien besitzen mehr als 60 ECF-Sigmafaktoren für die Transkription verschiedener Gene bzw. Gengruppen als Antwort auf periplasmatischen Stress (Bashyam und Hasnain, 2004), dabei scheinen frei lebende Bakterien mehr ECF-Sigmafaktoren aufzuweisen als pathogene Spezies (Mittenhuber, 2002). So verfügt z. B. *Bacillus subtilis* über sieben, *M. tuberculosis* über zehn, *Caulobacter crescentus* über 13, *P. aeruginosa* über 19 und *Streptomyces coelicolor* sogar über 50-65 ECF-Sigmafaktoren (Nies, 2004; Helmann, 2002).

Bei der Sequenzierung von *C. metallidurans* CH34 konnten *open reading frames* für 18 Sigmafaktor-Kandidaten identifiziert werden. Je ein putatives Protein wies dabei Homologien zu RpoD, RpoS, RpoH, RpoF bzw. RpoN aus bereits sequenzierten Gram-negativen Bakterien auf (Nies, 2004; Mouz *et al.*, 2001). In Anlehnung an die erste Annotierung im Jahr 2000 wurden die ORFs als *sig* mit der dazugehörigen *contig*-Nummer bezeichnet (Tabelle 4). Bei *sig345* handelt es sich wahrscheinlich um ein Sequenzierungsartefakt, da nur der C-Terminus, bestehend aus den Domänen 1.1, 1.2, 2, 3 und 4, Homologien zu Sigmafaktoren aufweist (Nies, 2004). Somit kodiert das Genom von *C. metallidurans* CH34 für zwölf putative ECF-Sigmafaktoren. Der Modellorganismus *E. coli* besitzt dagegen nur zwei ECF-Sigmafaktoren, FecI und RpoE.

Ein bereits gut untersuchter Vertreter der ECF-Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34 ist CnrH, der für die Expression der Gene der *cnr*-Determinante (Cobalt-Nickel-Resistenz) auf dem Megaplasmid pMOL28 (Taghavi *et al.*, 1997) notwendig ist (Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000). Die restlichen elf ORFs wurden mittels PCR-Analysen als chromosomal kodiert identifiziert. In Abb. 19 ist die Zuordnung der *C. metallidurans* Sigmafaktoren zu bekannten Vertretern aus anderen Bakterien gezeigt. Von sechs Paralogen des Sigmafaktors FecI_{Ec} in *C. metallidurans* CH34 (Nies, 2004), sind Sig611, Sig697 und Sig680 auch in dem in Abb. 19 dargestellten Dendrogramm mit FecI_{Ec} gruppiert. Die putativen Proteine Sig679 und Sig681 zeigen nur entfernte Homologien zu FecI_{Ec}. Sig562 scheint sogar mehr mit RpoD und RpoH aus *C. metallidurans* CH34 und *E. coli* verwandt zu sein als mit FecI_{Ec}. Die Proteine Sig593 und Sig605 gruppieren mit den FecI-ähnlichen putativen Sigmafaktoren Sig679 und Sig681. Sig605

wird als ECF-verwandt bezeichnet (Nies, 2004). Auf Sig593 wird in dieser Veröffentlichung nicht eingegangen. Zu den RpoE-ähnlichen Proteinen zählen neben RpoE_{Cm} auch Sig538 und Sig588 (Abb. 19, (Nies, 2004)).

Interessant ist auch die genetische Umgebung der elf ORFs (Tabelle 4). Downstream von *rpoE_{Cm}* (contig/Gen aus der Annotierung vom 17.12.2004, http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ralme/ralme.home.html): 188/271) befindet sich neben den Genen für den Antisigmafaktor-Komplex RseAB_{Cm} (188/272,273) (Abb. 4) auch ein ORF (188/274), der für eine putative Serin-Protease vom DegP/HtrA-Typ kodiert und Ähnlichkeiten zu MucD aus *P. aeruginosa* aufweist (Martinez-Salazar *et al.*, 1996; Schurr *et al.*, 1996). Es könnte sich dabei durchaus um ein DegS-homologes Protein handeln, das für die initiale Degradierung von RseA_{Cm} als Reaktion auf ein periplasmatisches Stresssignal zuständig ist (Alba *et al.*, 2002; Alba *et al.*, 2001). Ein ORF, der für ein RseC-homologes Protein kodiert, konnte nicht gefunden werden. Die Gene *rpoE* und *rseABC* sind zwar oft in einem Operon organisiert, es sind aber auch Ausnahmen bekannt. So weist *Haemophilus influenzae* zwei *rseC*-homologe Gene im Operon auf, *Xanthomonas campestris* besitzt hingegen weder *rseB* noch *rseC* (Alba und Gross, 2004). Auch die ORFs *sig562* (205/3313) und *sig681* (203/2675) weisen in der näheren Umgebung ORFs für putative Antisigmafaktoren auf (205/3312 bzw. 203/2676). In der genetischen Nachbarschaft der Gene der FecI_{Ec}-ähnlichen Proteine Sig611 (202/2163), Sig680 (205/3810) und Sig697 (222/4899) befinden sich ORFs für Transmembran-Sensoren und Eisen-Siderophor-Rezeptoren, was die Vermutung unterstreicht, dass es sich hierbei um FecI_{Ec}-homologe Proteine handeln könnte (Mahren *et al.*, 2002; Angerer *et al.*, 1995).

In der Diplomarbeit von Susann Friedrich wird zurzeit die Expression der alternativen Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Vorangegangene RT-PCR-Analysen zeigten bereits, dass alle putativen Sigmafaktor-Gene, mit Ausnahme von *sig588* und *sig593*, transkribiert werden (S. Friedrich, persönliche Mitteilung).

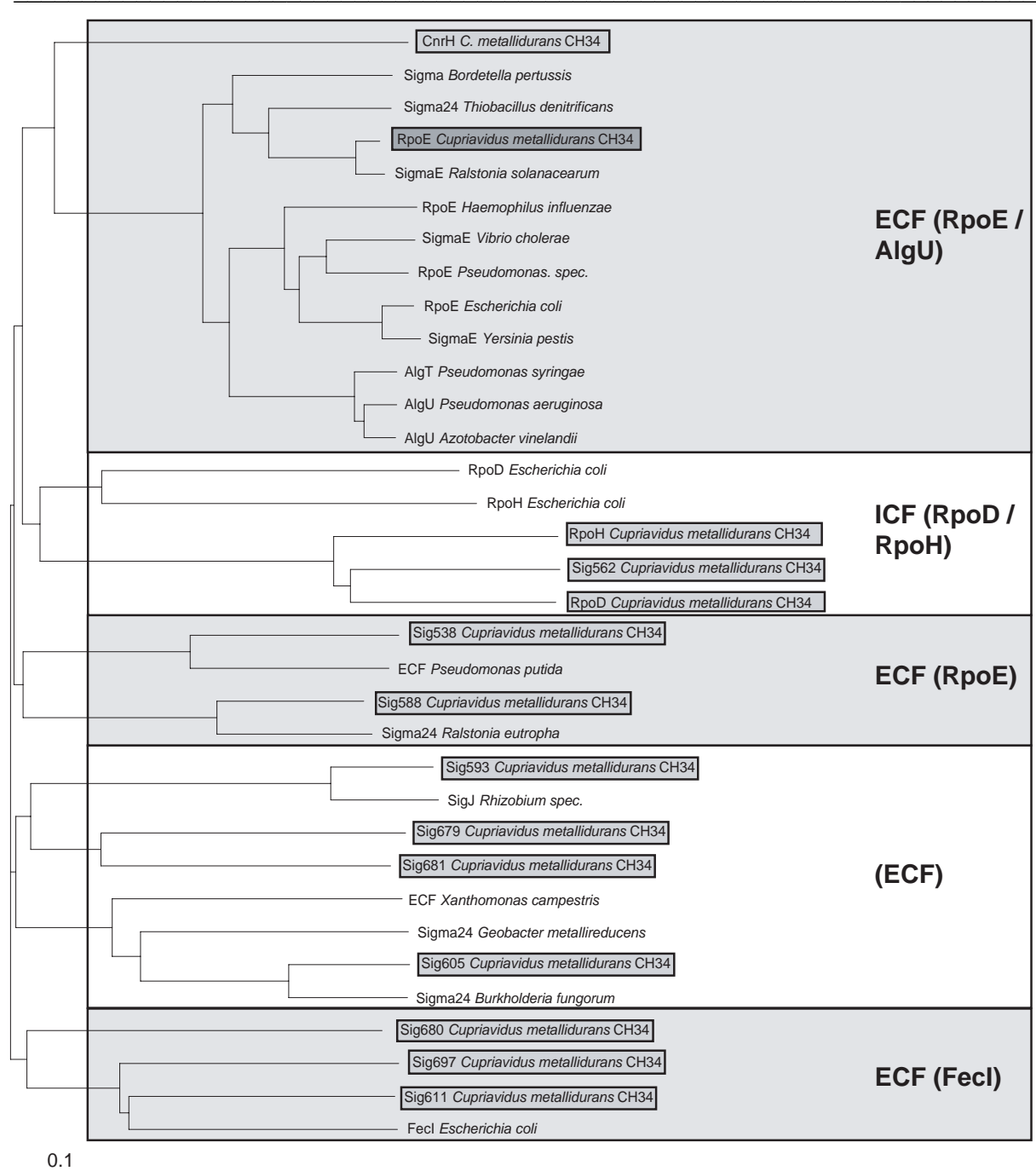


Abb. 19 Dendrogramm eines multiplen Alignments der Sequenzen der putativen Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34 mit Sigmafaktoren aus anderen Bakterien. Die Sequenzalignments wurden mit Hilfe von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> durchgeführt und das Dendrogramm mit <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> erstellt. Die Einteilung in ECF (*extracytoplasmic function*) und ICF (*intracytoplasmic function*) erfolgte in Anlehnung an Nies (2004). Die Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34 sind hervorgehoben.

Das Megaplasmid pMOL30 (Mergey *et al.*, 1985) weist die Resistenzdeterminante *czc* auf, die *C. metallidurans* CH34 ermöglicht, Cobalt-, Zink- und Cadmiumionen aus dem Cytoplasma bzw. Periplasma zu transportieren (Anton *et al.*, 1999; Nies, 1995). Zur *czc*-Determinante

gehören die Strukturgene *czcCBA*, die von zwei Regulatorregionen flankiert werden. Stromaufwärts befinden sich die Gene *czcNI* und stromabwärts *czcDRSEJ* (Scherer, 2003; Grosse *et al.*, 1999). Die Promotorregionen *czcIp*, *czcCp* und *czcDp* der Determinante weisen keine *consensus*-Sequenz bekannter σ^{70} -Promotoren auf. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass ein bisher unbekannter, chromosomal kodierter Sigmafaktor für die *czc*-Transkription notwendig ist (Grosse *et al.*, 1999). Diesen Sigmafaktor zu finden, bzw. Kandidaten auszuschließen, war Teil der vorliegenden Arbeit. Desweiteren wurde der Einfluß des ECF-Sigmafaktors RpoE (σ^E) auf die Schwermetall-Homöostase von *C. metallidurans* CH34 bzw. *E. coli* untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Charakterisierung von Deletionsmutanten der Sigmafaktoren, der Analyse der Bedingungen, unter denen die Gene exprimiert werden und der Suche nach möglichen Zielgenen des RpoE-abhängigen Regulationsweges. Dabei sollten sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten in beiden Organismen herausgestellt werden.

4.1 Metallsensitive $\Delta rpoE$ -Mutanten

4.1.1 Der Sigmafaktor RpoE_{Cm} aus *C. metallidurans*

Nickel ist als Spurenelement lebenswichtig für die Zellen, allerdings wirken Nickelionen ebenso wie Zn(II) und Cu(II) in hohen Konzentrationen toxisch (Nies, 1999). Bakterien nutzen für die Ni(II)-Aufnahme ins Cytoplasma zwei verschiedene Systeme: ein schnelles, unspezifisches System, das den chemiosmotischen Gradient über der Cytoplasmamembran ausnutzt, wie das Mg(II)-Aufnahmesystem CorA, und ein weiteres mit hoher Substratspezifität. Dieses ist langsamer und nutzt als Energiequelle die ATP-Hydrolyse, in manchen Fällen zusätzlich zum chemiosmotischen Gradienten. Zur zweiten Klasse gehören ABC-Transporter wie das Nik-System aus *E. coli* sowie die Permease HoxN aus *Ralstonia eutropha* (Eitinger und Mandrand-Berthelot, 2000; Nies, 1999). Wenn RpoE_{Cm} an der Transkription eines Nickel-Aufnahmesystems beteiligt wäre, würde ein Fehlen des Sigmafaktors zu einer verminderten Expression dieser Proteine führen und damit zu einer verminderten Nickel-Aufnahme. Dies sollte eine höhere Toleranz gegenüber Ni(II) zur Folge haben. Messungen zeigten jedoch eine gesteigerte Sensitivität der $\Delta rpoE_{Cm}$ -Mutante. Deshalb wird ein Einfluß von RpoE_{Cm} auf die Aufnahme von Ni(II) als nicht wahrscheinlich erachtet. Möglicherweise wird durch σ^E der Export von Nickelionen reguliert.

Nickel-haltige Enzyme sind in mindestens fünf metabolische Prozesse involviert, darunter den Verbrauch und die Produktion von molekularem Wasserstoff und die Harnstoffhydrolyse (Mulrooney und Hausinger, 2003; Eitinger und Mandrand-Berthelot, 2000; Bartha und Ordal, 1965). Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials von -678 mV kann Ni(II) in bakteriellen Zellen nicht reduziert werden (Nies, 1999). Gelangt Ni(II) in hohen Konzentrationen in die Zellen, wird es gebunden, in *Staphylococcus aureus* z. B. an Polyphosphate (Gonzalez und Jensen, 1998) oder exportiert (Nies, 1999). Nickelresistente Bakterien nutzen Transporter, um das Cytoplasma von Ni(II) zu entgiften. Dazu zählen die gut untersuchten Resistenzsysteme *cnr* (Cobalt/Nickel-Resistenz (Liesegang *et al.*, 1993)) mit dem RND-System CnrCBA und dem Transportprotein CnrT (Grass, 2000) auf dem Megaplasmid pMOL28 von *C. metallidurans* CH34 sowie *ncc* (Nickel/Cobalt/Cadmium-Resistenz (Schmidt und Schlegel, 1994)) und NreB (Grass *et al.*, 2001b) aus dem verwandten Bakterium *C. metallidurans* 31A. Die Deletion der Regulatorregion *cnrYXH* der *cnr*-Determinante im Stamm DN190(Φ (*cnrCBA-lacZ*), Δ *cnrYXH*) führt zu einem Verlust der Resistenz gegenüber Ni(II) und Co(II) um ca. 90% (Grass *et al.*, 2000). Das Fehlen des Sigmafaktors RpoE_{Cm} hatte lediglich eine Abnahme der Nickeltoleranz um ca. 30% der Resistenz des Wildtypstammes CH34 zur Folge. Die Resistenz gegenüber Co(II) änderte sich durch die Deletion von *rpoE_{Cm}* nicht. Da CnrCBA sowohl Co(II) als auch Ni(II) transportiert, kann somit ausgeschlossen werden, dass RpoE an der Regulation der *cnr*-Determinante zusätzlich zum Sigmafaktor CnrH beteiligt ist.

Auf dem Megaplasmid pMOL30 wurde bei der Sequenzierung von *C. metallidurans* CH34 eine Genregion bestehend aus Homologen zu *cnrC*, *cnrB*, *nccA* und *nreB* gefunden (Mergeay *et al.*, 2003; Nies, 2003). Da bereits das Fehlen des *cnr*-Systems auf pMOL28 zu einem Nickel-sensitiven Phänotyp vergleichbar mit dem des Megaplasmid-freien *C. metallidurans*-Stammes AE104 führte, wird davon ausgegangen, dass diese pMOL30-kodierte Determinante nicht funktional ist (Mergeay *et al.*, 2003; Nies, 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *nccA* weder unter Normalbedingungen noch nach Inkubation mit Metallsalzen transkribiert wird (Rehbein, 2003).

Da nur die Resistenz gegenüber Nickelionen durch die Deletion von *rpoE_{Cm}* beeinflusst wurde, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um einen Nickel-spezifischen Phänotyp handelt und nicht um eine generelle Reaktion des Bakteriums auf das Fehlen des Sigmafaktors. Zum jetzigen Zeitpunkt kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass ein Paralog von RpoE dessen Funktion in der Metallhomöostase übernehmen kann. Um dieser Problematik auf den Grund zu gehen, wäre es notwendig, ausgehend von DN480(pMOL28, pMOL30, Δ *rpoE_{Cm}*) sukzessive

Mehrfachmutanten der ECF-Sigmafaktoren herzustellen und deren Wachstumsverhalten in Anwesenheit von Metallen zu untersuchen.

Wie Ni(II) können auch die anderen getesteten Schwermetallionen Co(II), Zn(II) und Cd(II) durch unspezifische Magnesiumtransporter in die Zelle gelangen (Blencowe und Morby, 2003; Smith *et al.*, 1993; Nies und Silver, 1989b; Snively *et al.*, 1989). Es konnte außerdem ein Transport von Zn(II) und Co(II) in *E. coli* über PitA (*phosphate inorganic transport system*) gezeigt werden (Beard *et al.*, 2000; van Veen *et al.*, 1994). Für das Spurenelement Zn(II) existieren in vielen Bakterien, darunter auch *E. coli*, spezifische Transportsysteme (Hantke, 2001; Nies, 1999). Dazu zählen ZnuABC, ein ABC-Transporter (ATP-binding-cassette-Transporter, (Pater und Hantke, 2000, 1998) und ZupT aus der ZIP-Familie (ZRT, IRT-ähnliche Proteine (Grass *et al.*, 2002)). Ein Zn(II)-Transport konnte ebenfalls für das NRAMP-Protein (*natural-resistance-associated macrophage-protein*) MntH gezeigt werden (Makui *et al.*, 2000). Durch verschiedene Vertreter dieser Familien gelangen auch Co(II) und Cd(II) ins Cytoplasma (Nies, 1999). Zn(II) dient als Cofaktor für eine Vielzahl verschiedener Enzyme und DNA-bindende Proteine (Nies, 1999). Es wird unter anderem für die Funktion der RNAP benötigt (Markov *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 1995). Die Toxizität von Zn(II) könnte durch einen Zink-induzierten Kupfermangel hervorgerufen werden (Fosmire, 1990). Auch Co(II) wird für die Funktion verschiedener Proteine und Kofaktoren benötigt, z. B. in B12 und Nitrilhydratasen (Kobayashi und Shimizu, 1998). Cd(II) wird von Bakterien nicht benötigt, gelangt aber unspezifisch ins Cytoplasma. Durch seine Ähnlichkeit zu Zn(II) kann es dort mit dem Zink-Metabolismus interagieren, wodurch es toxisch auf die Zellen wirkt (Nies, 1999). Auch Zn(II) und Co(II) sind in höheren Konzentrationen giftig. Durch extrem niedrige Redoxpotentiale von -701 bis -1180 mV können Zn(II), Cd(II) und Co(II) in biologischen Systemen nicht reduziert werden. Die Entgiftung beschränkt sich auf Bindung an Glutathion oder Metallothioneine bzw. Export aus den Zellen (Nies, 1999).

Der Megaplasmid-freie *C. metallidurans*-Stamm AE104 besitzt eine relativ schwache Resistenz gegenüber Co(II), Zn(II), Cd(II) und Ni(II) mit einer MIC von 200-400 μ M (Munkelt *et al.*, 2004; Legatzki *et al.*, 2003; Grass *et al.*, 2000; Mergeay *et al.*, 1985). DN462(Δ *rpoE_{cm}*) zeigte eine verminderte Toleranz gegenüber Zn(II), Cd(II), Co(II) und Ni(II). Im Vergleich zu AE104 sank die Resistenz von DN462(Δ *rpoE_{cm}*) bei NiCl₂ auf ca. 85%, bei CdCl₂ auf ca. 80%, bei CoCl₂ auf ca. 70% und bei ZnCl₂ auf 50% der MIC (Tabelle 9).

Durch die Verfügbarkeit der Genomsequenz konnten Gene für Transporter der CDF-Familie sowie Vertreter der P-Typ ATPasen auf dem Chromosom nachgewiesen werden (Munkelt *et al.*, 2004; Legatzki *et al.*, 2003). Diese transportieren Metallionen über die Cytoplasmamembran ins

Periplasma. Die Inaktivierung der beiden chromosomal kodierten CDF-Proteine FieF und DmeF führte zu einer Verminderung der Resistenz von AE104 gegenüber Co(II) bzw. Cd(II) und im Fall von DmeF auch gegenüber Ni(II). Fehlte *dmeF* im *C. metallidurans*-Stamm CH34, hatte dies allerdings keinen Einfluß auf die Nickelresistenz des Bakteriums (Munkelt *et al.*, 2004). Im Megaplasmid-freien Stamm AE104 führte das Fehlen von DmeF zu einem Absinken der Toleranz gegenüber CdCl₂ auf ca. 40% und zu einem fast vollständigen Verlust der Co(II)-Resistenz auf 4 µM, dies entspricht 1% der Resistenz von AE104 (Munkelt *et al.*, 2004) (Tabelle 9). Ein solcher Resistenzverlust konnte durch die Deletion von *rpoE_{Cm}* im Stamm AE104 nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund ist ein Einfluss von RpoE_{Cm} auf die Expression von *dmeF* nicht wahrscheinlich. Jedoch sind paraloge Sigmafaktoren in Stamm DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) vorhanden, deshalb kann auch in diesem Fall eine mögliche funktionelle Komplementation nicht ausgeschlossen werden.

Vergleicht man die MIC-Werte der Mutante DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) mit den Effekten der Deletion der beiden chromosomal kodierten P-Typ ATPasen CadA und ZntA_{Cm} (Legatzki *et al.*, 2003), fällt ein ähnliches Verhalten von DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) und DN439($\Delta zntA_{Cm}$) auf. Sowohl das Fehlen des Sigmafaktors RpoE_{Cm} als auch der Zn(II)- und Cd(II)-transportierenden P-Typ ATPase ZntA_{Cm} haben ein Absinken der Resistenzen gegenüber Zn(II) und Cd(II) auf 50% bzw. ca. 80% der Ausgangsresistenz zur Folge. Im Stamm DN438($\Delta cada$) zeigte sich ein geringerer Verlust der Zn(II)-Toleranz und ein deutlicher Effekt bei Inkubation mit CdCl₂ (Legatzki *et al.*, 2003) (Tabelle 9).

Tabelle 9 Restresistenz gegenüber Zn(II), Co(II), Cd(II) bzw. Ni(II) in Derivaten von *C. metallidurans* AE104^{a)}

Stamm	relevanter Genotyp	ZnCl ₂	CoCl ₂	CdCl ₂	NiCl ₂
DN462	$\Delta rpoE$	50%	70%	80%	85%
DN472 ^{b)}	<i>dmeF</i> ::pLO2	100%	1%	40%	74%
DN473 ^{b)}	<i>fieF</i> ::pLO2	100%	75%	80%	100%
DN439 ^{c)}	$\Delta zntA_{Cm}$	50%	ND ^{d)}	85%	ND ^{d)}
DN438 ^{c)}	$\Delta cada$	85-100%	ND ^{d)}	71-84%	ND ^{d)}

^{a)}Die MIC des Stammes AE104 wurde mit 100% gleichgesetzt. Die MIC der Mutantenstämme entsprechend prozentual dazu angegeben.

^{b)}MIC-Werte entnommen aus (Munkelt *et al.*, 2004).

^{c)}MIC-Werte entnommen aus (Legatzki *et al.*, 2003) bzw. bestimmt.

^{d)}nicht durchgeführt

Die Genregionen von *cadA* und *zntA_{Cm}* weisen mehrere Startcodone (ATGs) auf. Die Sequenz am putativen Translationsstart von *cadA* besitzt vier ATG-Nukleotide, bei *zntA_{Cm}* sind es zwei (Abb. 20). Stromaufwärts beider Gene konnten mittels Computeranalysen und Vorhersageprogrammen (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) jeweils zwei putative Promotorstrukturen identifiziert werden. Der möglicherweise σ^{70} -abhängige Promotor von *cadA* weist eine Nukleotidsequenz von CTTGACT in der -35-Region und TCTAAT in der -10-Region auf, bei *zntA_{Cm}* sind es TTGACC in der -35-Region und TTCAAT in der -10-Region. Beide RNAP-Erkennungsstellen sind statt durch 17 Nukleotide (deHaseth *et al.*, 1998) jeweils durch 19 Nukleotide getrennt. Dazwischen befindet sich eine Palindromsequenz von CTCTA-n₇-TAGAG im Fall von *cadA* und GACCCTnTAGnnnCTAnAGGGTC bei *zntA_{Cm}*. Dies deutet auf Bindestellen für MerR-homologe Proteine hin, die in der Lage sind, die DNA-Doppelhelix zu verdrehen, um die Bindung der RNAP an den suboptimalen Promotor zu verbessern (Brown *et al.*, 2003; Legatzki, 2003). Das putative Gen 1443 auf Contig 199 stromaufwärts von *cadA* kodiert möglicherweise für ein solches MerR-homologes Protein. Eine Insertionsmutante zeigt allerdings keine veränderte Metallresistenz gegenüber Zn(II) bzw. Cd(II). Es wurde deshalb vermutet, dass ein Paralog dieses Proteins, welches ebenfalls chromosomal kodiert ist, die Funktion übernehmen kann (Legatzki, 2003). Laut Legatzki existieren sieben putative ORFs mit Homologien zu MerR in *C. metallidurans* CH34 (Legatzki, 2003), wobei es sich bei einem um *pbrR*, den Regulator der Bleiresistenz auf pMOL30 handelt (Borremans *et al.*, 2001). Andere Analysen sprechen von 15 putativen Genen, von denen 13 Metalle binden können (Brown *et al.*, 2003).

Jeweils stromaufwärts dieser putativen MerR-Bindestellen befinden sich Nukleotide, die eine Ähnlichkeit zu σ^E -abhängigen Promotoren von *E. coli* aufweisen (gAACTt-n_{16/17}-TCnaA (Rezuchova *et al.*, 2003)). Bei *cadA* würde der putative σ^E -abhängige Promotor aus GAAGTT-n₁₇-GCTCG und bei *zntA_{Cm}* aus GAACTG-n₁₆-GCGAG bestehen (Abb. 20).

<i>cadAp</i> - Region	<p>ACTTCGTCATAGAGCCTGAAGTTGCCCTCGCTACGTGCAGGCTCGGGCAGCAAGCCTTCTGACTC GTAAAAGCGCACGGTCTGCACCAAGCAATCTGCCTTCTTGCCAGTTCACCGATCCGCATCATGG TTGCTTCTATAAAAACTTGACTCTATATCTACTAGAGGTTTTTCTAATGATGGCATCCGGGGAA AACCTTGTCAATGAAGAGCGATCTATGAACAAAGAACCTTCCAGCCCATGCGCCTGCTCCGGCGG CAATGGCCAACAGACGGCGTGCGCCAGTGAGCAGGCCAGCACTGAAACCACCGTTTTCCACGTGA GCAACATGGATTGCCGCAATGAGGAAGCACTGGTGCGGCGAACGCTGGAGGGCATGCCCGGTGTC GAGCGGCTCC</p>
<i>zntAp_{Cm}</i> - Region	<p>CGCCGGCCAGGCGAACTGGAGCGGCAGCAATATTGCGAGAAATACAAGCAGTAGCGGCGCATG GGGGGCGATTATAGGCGTTTAGCGAGCGGGCAAACATTACGTTTCATGTTCATGTTTGCGCCGCTCC AAAGATTTCCGGCAGGCGCTTGACCCTGTAGCGACTAAAGGGTCTTCAATGGCAGGGAACAAGA ATCAATGGAATTTGACATGGCTCGCA</p>

Abb. 20 Putative Promotorsequenzen von *cadA* und *zntA_{Cm}* aus *C. metallidurans*

Dargestellt sind die putativen -35 und -10-Regionen von *cadA* und *zntA_{Cm}*, die von RNAP mit σ^E (**ROT**) bzw. von RNAP mit σ^{70} (**UNTERSTRICHEN**) erkannt werden könnten. Die **eingerahmten** Nukleotide kennzeichnen symmetrische Sequenzen, als mögliche Erkennungsstellen MerR-ähnlicher Proteine. Putative Translationsstartpunkte sind **GELB** dargestellt.

Um zu untersuchen, ob der Sigmafaktor RpoE_{Cm} an die putativen Promotorsequenzen vor *cadA* und *zntA_{Cm}* binden kann, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Die Bindung von CnrH an die putativen Promotoren *cnrYp* (als σ^{70} -abhängig postuliert) und *cnrHp* (als σ^E -abhängig postuliert) wurde auf ähnliche Weise getestet (Tibazarwa *et al.*, 2000). Dabei wurde gereinigtes His-CnrH zusammen mit dem RNAP-Coreenzym aus *E. coli* mit [γ -³²P]dATP-markierten DNA-Fragmenten inkubiert und in einem 5%igen Acrylamidgel unter nichtdenaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Dabei konnte eine Bindung von His-CnrH an die Promotoren *cnrHp* und *cnrYp* gezeigt werden (Tibazarwa *et al.*, 2000). In eigenen Untersuchungen wurden DNA-Fragmente benutzt, die eine Region von ca. 300 Nukleotiden stromaufwärts der Gene *cadA* bzw. *zntA_{Cm}* bis zum jeweils ersten vorhergesagten ATG umfassten. Da gezeigt werden konnte, dass ein Sigmafaktor aus *C. metallidurans* CH34 im Komplex mit *E. coli*-RNAP in der Lage war, an Promotoren aus *C. metallidurans* zu binden (Tibazarwa *et al.*, 2000), wurde auch in diesen Experimenten der heterologe Proteinkomplex aus *E. coli*-RNAP und RpoE_{Cm} eingesetzt. In Anlehnung an Korber (1999) wurden die Experimente in einem Agarosegel durchgeführt und die DNA-Fragmente mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Eine geringe Retardation der Promotorfragmente konnte bereits durch Zugabe von σ^E beobachtet werden. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf das artifizielle System zurückzuführen, da die meisten Sigmafaktoren ohne RNAP nicht in der Lage sind, an

DNA zu binden (Dombroski *et al.*, 1993). In Abwesenheit des RNAP-Enzyms kam es durch CnrH zu keiner solchen Veränderung des Laufverhaltens der DNA-Fragmente (Tibazarwa *et al.*, 2000). Die Retardation der *cadAp*-bzw. *zntAp_{Cm}*-Promotorfragmente war nach Inkubation von RNAP- σ^E noch deutlicher, da es sich in diesem Fall um einen größeren Komplex handelte. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den Untersuchungen mit dem Promotor *rpoEp_{Cm}*, da RpoE_{Cm} die eigene Transkription reguliert (Abb. 8). Diese Bindestudien können allerdings nur einen ersten Hinweis auf die Funktion von RpoE_{Cm} geben. Im Fall von CnrH findet z. B. eine Bindung an die putativen Promotoren *cnrYp* und *cnrHp* statt (Tibazarwa *et al.*, 2000). Allerdings konnte die CnrH-abhängige Transkription für einen abweichenden Promotor *cnrYp* und den Promotor *cnrCp* jedoch nicht für den postulierten Promotor *cnrHp* gezeigt werden (Grass *et al.*, 2000).

Um zu untersuchen, ob die Bindung des RNAP- σ^E -Komplexes an die Promotoren *cadAp* und *zntAp_{Cm}* auch zu einer Transkription der Gene führen kann, wurden *in vitro*-Transkriptionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden das RNAP-Core- bzw. RNAP-Holoenzym (RNAP- σ^{70}) aus *E. coli* verwendet. Der Promotor *rpoEp_{Cm}* diente in diesem Experiment wiederum als Positivkontrolle. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Transkription von *rpoE_{Ec}* in *E. coli* RpoE_{Ec}-abhängig ist (Miticka *et al.*, 2004; Miticka *et al.*, 2003; Kovacikova und Skorupski, 2002; Maeda *et al.*, 2000; Raina *et al.*, 1995). Es konnte ein spezifisches RNA-Signal ausgehend von *rpoEp_{Cm}* durch RNAP- σ^E nachgewiesen werden. Eine Transkription mit dem RNAP-Holoenzym (RNAP- σ^{70}) aus *E. coli* gelang nicht. Mit Hilfe der RNAP- σ^{70} konnte eine *in vitro*-Transkription ausgehend vom *E. coli*-Promotor *rpoEp_{Ec}* bereits gezeigt werden. Das dabei entstandene Produkt unterschied sich in der Größe jedoch vom dem durch die RNAP- σ^E (Maeda *et al.*, 2000). Ausgehend von den Fragmenten, die die Promotoren *cadAp* bzw. *zntAp_{Cm}* aufwiesen, konnten verschiedene RNA-Signale sowohl mit RNAP- σ^{70} als auch mit RNAP- σ^E nachgewiesen werden. Durch Inkubation des Promotors *cadAp* mit der RNAP- σ^E entstanden mehrere Produkte, die auch mit RNAP- σ^{70} und überraschenderweise auch mit dem RNAP-Coreenzym erhalten wurden. Das RNAP-Coreenzym ist zwar theoretisch in der Lage, DNA zu transkribieren, die Sigmafaktor-Untereinheit bindet allerdings an den spezifischen Startpunkt (Darst, 2001; deHaseth *et al.*, 1998). Die RNA-Transkripte, die mit Hilfe des RNAP-Coreenzym nachgewiesen werden konnten, entsprechen in der Größe denen des RNAP-Holoenzym mit σ^{70} aus *E. coli*. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die eingesetzte Präparation des RNAP-Coreenzym noch Spuren des *house-keeping*-Sigmafaktors von *E. coli* aufwies. Das gleiche Phänomen konnte bereits bei *in vitro*-Transkriptionsexperimenten mit den

Promotoren *czcNp*, *czcIp*, *czcCp* und *czcDp* und dem RNAP-Coreenzym aus *E. coli* beobachtet werden (von Rozycki, 2002). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei dem Experiment mit dem Promotor *zntAp_{Cm}*. Es konnten ebenfalls durch RNAP-Holo- bzw. RNAP-Coreenzym aus *E. coli* mehrere RNA-Signale detektiert werden. Durch den Einsatz von RNAP- σ^E kam es jedoch zur Bildung eines spezifischen und deutlich stärkeren Signals ausgehend vom *zntAp_{Cm}*-Promotorfragment (Abb. 9). Das Entstehen mehrere RNA-Fragmente ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Promotorregionen von *cadA* und *zntA_{Cm}* mehrere putative Bindestellen für die RNAP aufweisen (Abb. 20). In Untersuchungen zur Erkennung von *E. coli*-Promotoren durch verschiedene Sigmafaktor-Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass die ECF-Sigmafaktoren RpoE_{Ec} und FecI nicht in der Lage waren, σ^{70} -abhängige Promotoren zu erkennen (Maeda *et al.*, 2000). Wahrscheinlich besitzen sie eine hohe Selektivität für ein spezifisches Set von Promotoren, ähnlich wie σ^N , σ^H und σ^F . Die meisten σ^S -abhängigen Promotoren können hingegen auch durch σ^{70} und einige σ^{70} -abhängige Promotoren durch σ^S erkannt werden (Kolb *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). Da ausgehend von den Promotoren *cadAp* bzw. *zntAp_{Cm}* mit RNAP- σ^E zusätzliche bzw. stärkere Signale im Vergleich zu RNAP- σ^{70} nachgewiesen werden konnten, handelt es sich wahrscheinlich um spezifische, durch RNAP- σ^E entstandene Transkriptionsprodukte. Jedoch ist zu bedenken, dass die putativen Erkennungsstellen für σ^{70} vor den Genen *cadA* bzw. *zntA_{Cm}* suboptimal sind (Abb. 20). Deshalb könnten die schwachen Signalintensitäten auch daher rühren, dass das RNAP-Holoenzym nicht gut binden konnte und für eine stärkere Transkription ein zusätzliches Protein der MerR-Familie und unter Umständen Zn(II) bzw. Cd(II) notwendig wären. Ein ähnlicher Effekt konnte mit dem Promotor *zntAp_{Ec}* aus *E. coli* beobachtet werden. Hierbei war für eine optimale *in vitro*-Transkription die Zugabe von ZntR und Zn(II) notwendig (Outten *et al.*, 1999).

Da der gereinigte Sigmafaktor RpoE_{Cm} in der Lage war *in vitro* an die Promotorregionen von *cadA* und *zntA_{Cm}* zu binden und ausgehend von ihnen eine Transkription zu starten, wurde angenommen, dass RpoE_{Cm} auch *in vivo* an der Regulation der P-Typ ATPasen CadA und ZntA_{Cm} beteiligt ist. Dies wäre eine Erklärung für die Verminderung der Resistenz von *C. metallidurans* gegenüber Zn(II) und Cd(II) in der $\Delta rpoE$ -Mutante.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von *cadA-lacZ* und *zntA_{Cm}-lacZ* in *C. metallidurans* AE104 Cd(II)-abhängig verläuft. Die Transkription von *zntA_{Cm}* kann in AE104 außerdem durch Zn(II) induziert werden (Legatzki *et al.*, 2003). Die gleichen Induktionsexperimente wurden in einem $\Delta rpoE_{Cm}$ -Derivat von *C. metallidurans* AE104 durchgeführt. Dabei waren ähnliche Ergebnisse im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-

Derivaten DN442(*cadA-lacZ*) bzw. DN444(*zntA_{Cm}-lacZ*) zu verzeichnen (Abb. 11). Das Fehlen des Sigmafaktors RpoE_{Cm} hatte demnach keinen messbaren Einfluß auf die metallabhängige Expression der P-Typ ATPasen CadA und ZntA_{Cm}. Möglicherweise erfolgte die Transkription von *cadA* und *zntA_{Cm}* ausgehend von den putativen σ^{70} -abhängigen Promotoren mit Hilfe eines MerR-homologen Proteins, wie von Legatzki vorgeschlagen (Legatzki, 2003), und damit als Reaktion auf cytoplasmatische Metallionen. Es wäre weiterhin denkbar, dass ein Paralog von RpoE_{Cm} dessen *in vitro* nachgewiesene Funktion als Untereinheit der RNAP übernommen hat, und es dadurch als Antwort auf periplasmatisches Zn(II) und/oder Cd(II) zur Transkription von *cadA* und *zntA_{Cm}* kam. Aus *B. subtilis* ist beispielsweise bekannt, dass die beiden ECF-Sigmafaktoren SigW und SigX die Expression bestimmter Gene zu unterschiedlichen Zeiten kontrollieren (Huang *et al.*, 1999; Huang und Helmann, 1998). Beide Möglichkeiten geben eine Erklärung für die RpoE_{Cm}-unabhängige Expression von CadA und ZntA_{Cm} unter den getesteten Bedingungen, jedoch nicht für den Zn(II)/Cd(II)-sensitiven Phänotyp der AE104 Δ rpoE_{Cm}-Mutante DN462.

Es konnte gezeigt werden, dass alle bekannten Schwermetall-transportierenden Proteine von *C. metallidurans* *in vivo* RpoE_{Cm}-unabhängig funktionieren. Wodurch die Frage offen bleibt, warum das Fehlen des Sigmafaktors RpoE in *C. metallidurans* CH34 zu einer Absenkung der Nickelresistenz und in AE104 zu einem Zn(II)/Cd(II)-sensitiveren Phänotyp führte.

4.1.2 Der Sigmafaktor RpoE_{Ec} aus *E. coli*

Der Übergang zur Analyse von RpoE_{Ec} aus *E. coli* erfolgte aus verschiedenen Gründen. Zum einen stehen für *E. coli* als etablierten Modellorganismus vielfältige molekulargenetische Werkzeuge zur Verfügung. Zum anderen existieren in *E. coli* keine Paralogen von RpoE_{Ec}, die dessen Funktion übernehmen könnten, und weniger Transportsysteme für Metallionen als in *C. metallidurans*.

Es ist bekannt, dass eine Deletion bzw. Mutation des Gens für den ECF-Sigmafaktor RpoE_{Ec} in *E. coli* zu hitzesensitiven Mutanten führt (Hiratsu *et al.*, 1995). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass RpoE_{Ec} essentiell ist, und eine Suppression Δ rpoE_{Ec}-Mutanten ein normales Wachstum erlaubt (De Las Penas *et al.*, 1997a). Bisher konnten zwei Proteine identifiziert werden, die unter Kontrolle von RpoE_{Ec} stehen und für das Wachstum unter normalen Bedingungen notwendig sind. Es handelt sich dabei um das putative Protein EcfL sowie die Protease YaeL (EcfE), die in den Abbau des Antisigmafaktors RseA und damit in die Freisetzung von RpoE_{Ec} involviert ist (Dartigalongue *et al.*, 2001).

Dagegen ist der Einfluss von RpoE_{Ec} auf die Regulation der Schwermetall-Hömoostase in *E. coli* wenig erforscht. Es zeigte sich, dass ein Fehlen des Sigmafaktors RpoE_{Ec} ein Absinken der Toleranz gegen Cu(II) auf 85%, gegen Zn(II) auf 80% und gegen Cd(II) sogar auf 33% der Resistenz des Wildtyp-Stammes zur Folge hatte (Tabelle 6). In zeitabhängigen Wachstumskurven konnte außerdem gezeigt werden, dass die erhöhten Sensitivitäten der $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutante auf einer verlängerten lag-Phase beruhten (Abb. 14). Dabei kommt es zu einer Wachstumshemmung bzw. zum Absterben von ca. 99% der $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutantenzellen in Anwesenheit von 2 mM CuCl₂. Nach 1 h Inkubation war dies als ein drastisches Absinken der CFU (*colony-forming units*) für ca. 2 h nachweisbar. Eine Subpopulation war in der Lage weiterzuwachsen. Diese enthielt scheinbar keine Suppression, die Einfluss auf die Kupferresistenz von *E. coli* hatte, da eine Kultivierung des $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stammes in Anwesenheit von 2 mM CuCl₂ und ein anschließendes Wachstum ohne zusätzliche Metallzugabe keine Veränderung der Toleranz gegenüber Cu(II) zur Folge hatte (Egler *et al.*, 2005).

Um zu demonstrieren, dass der beobachtete, metallsensitive Phänotyp allein auf die Deletion von *rpoE_{Ec}* zurückzuführen war, wurde *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* als Einzelkopie zusätzlich ins Genom von *E. coli* ECA101 eingefügt. Auf diese Weise wurden im $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stamm sowohl RpoE_{Ec} als auch die Proteine des Antisigmafaktor-Komplexes, RseA_{Ec} und RseB_{Ec}, unter Kontrolle des nativen Promotors *rpoEp_{Ec}* exprimiert. Die geringe Wachstumsverzögerung, die dieser Komplementationsstamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att}::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}$) in Abb. 16 unter normalen Wachstumsbedingungen im Vergleich zu BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) zeigte, ist möglicherweise auf ein Ungleichgewicht zwischen RpoE_{Ec} und dem Antisigmafaktor-Komplex zurückzuführen. Im *E. coli*-Wildtypstamm werden *rpoE_{Ec}*, *rseA_{Ec}* und *rseB_{Ec}* zusammen mit *rseC_{Ec}* als eine mRNA transkribiert. Die Proteine RpoE_{Ec}, RseA_{Ec} und RseB_{Ec} liegen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 vor, was 6 ± 3 Molekülen pro Zelle entspricht (Maeda *et al.*, 2000). Im *E. coli* $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stamm ECA101 fehlt in diesem Operon das *rpoE_{Ec}*-Gen, jedoch ist der Promotor *rpoEp_{Ec}* und die Anordnung *rseABC_{Ec}* im Leseraster. Zusätzlich wurde das Konstrukt *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* an der λ -attachment-site ins Genom integriert, so dass doppelt so viel Antisigmafaktor im Vergleich zum Sigmafaktor RpoE_{Ec} von der *E. coli*-Zelle hergestellt wurde. Dennoch gelang mit Hilfe dieses Konstruktes eine teilweise Aufhebung des Wachstumsdefizits der $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutante in Anwesenheit von 2 mM CuCl₂ (Abb. 16). Mit *rpoEp-rpoE_{Ec}* oder *rpoE_{Ec}* bzw. *rpoErseAB_{Ec}* auf Plasmiden mit hoher bzw. niedriger Kopienzahl oder unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors gelang dies nicht. Auch dabei spielt sicherlich die Kopienzahl eine große Rolle. In *C. metallidurans* AE128(pMOL30) führte

beispielsweise die zusätzliche Expression von RpoE_{Cm} in Gegenwart von 4 mM CoCl₂ zum Tod der Zellen. Ein ähnliches Bild zeigte sich in *C. metallidurans* AE126(pMOL28) in Anwesenheit von 2 mM NiCl₂. Auch in diesem Fall kam es zum Absterben der Zellen (von Rozycki, 2002). Wichtig für die posttranslationale Regulation der σ^E -Aktivität ist die sofortige Bindung des Sigmafaktors an den Antisigmafaktorkomplex, wodurch eine ungewollte Expression von RpoE_{Ec}-abhängigen Genen verhindert wird (Nies, 2004; Kanehara *et al.*, 2003; Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002; Kenyon *et al.*, 2002; Kovacicova und Skorupski, 2002; Collinet *et al.*, 2000). Da diese Bindung nur im *E. coli*-Stamm ECA199($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoErseAB_{Ec}}$) und nicht in Stamm ECA198($\Delta rpoE_{Ec}$, $\lambda_{att::rpoEp-rpoE_{Ec}}$) gewährleistet wurde, könnte das die Ursache dafür sein, dass eine Komplementation nur mit RpoE_{Ec} nicht möglich war.

4.1.3 Die Kupfer-Resistenz von *E. coli*

Kupfer ist essentiell und wird vor allem in Oxidasen, Cu/Zn-Superoxiddismutasen, in der Atmungskette als reaktives Zentrum der Cytochrom c Oxidase und Cytochrom bo Oxidase und für den Eisentransport benötigt (Puig und Thiele, 2002). Die meisten dieser Enzyme sind periplasmatisch, extrazellulär oder membrangebunden (Rensing und Grass, 2003). Kupferionen (Cu(I)) gelangen vermutlich durch Diffusion ins Cytoplasma, nachdem Cu(II) unter aeroben Bindungen durch die NADH-Dehydrogenase 2 (Ndh-2) (Rapisarda *et al.*, 1999) bzw. anaerob spontan zu Cu(I) reduziert worden ist. Ein Kupfer-Aufnahmesystem wurde bisher nicht identifiziert (Outten *et al.*, 2001; Beswick *et al.*, 1976), jedoch ist es möglich, dass Kupferionen unspezifisch über andere Systeme ins Zellinnere gelangen (Blencowe und Morby, 2003). Intrazelluläres Cu(I) ist extrem toxisch für die Zelle (Lee *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 1999). Es wird gebunden oder exportiert, woraus sich eine freie Kupferkonzentration im zeptomolaren Bereich ergibt (Changela *et al.*, 2003). Diese Cu(I)-Detoxifikation unterliegt strikter Kontrolle. Zwei Regulationssysteme konnten in *E. coli* identifiziert werden. Das Zweikomponenten-System CusRS, das abhängig von periplasmatischen Kupferionen die Transkription des CusCFBA-System reguliert (Yamamoto *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2003; Oshima *et al.*, 2002; Munson *et al.*, 2000) und CueR, ein Protein der MerR-Familie, das durch Bindung von cytoplasmatischem Cu(I) die Transkription von *copA* und *cueO* induziert (Brown *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2001; Stoyanov *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2000; Petersen und Moller, 2000). Die P-Typ ATPase CopA transportiert Cu(I) aus dem Cytoplasma ins Periplasma (Rensing *et al.*, 2000), wo es von CueO zu Cu(II) oxidiert wird (Singh *et al.*, 2004). Unter anaeroben Bedingungen entfällt diese

Oxidation, da CueO strikt sauerstoffabhängig ist (Rensing und Grass, 2003) Es kommt zur Akkumulation von Cu(I) im Periplasma, was über CusRS zur Induktion des Cus-Systems und zum Export der Kupferionen ins Medium führt. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch in einem $\Delta cueO$ -Deletionsstamm (Rensing und Grass, 2003; Franke *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001b; Outten *et al.*, 2001).

Der *E. coli*-Wildtypstamm W3110 ist auf LB-Agar ab 3.50 mM CuCl₂ nicht mehr in der Lage zu wachsen (Grass und Rensing, 2001b). Eine entsprechende MIC von 3.25 mM CuCl₂ konnte auch für BW25113, der in eigenen Experimenten als *E. coli*-Wildtypkontrolle diente, nachgewiesen werden. Die Deletion von *rpoE_{Ec}* führte zu einem Absinken der MIC auf 2.75 mM CuCl₂. Damit ist der Einfluss von RpoE_{Ec} auf die Kupferresistenz deutlich stärker als der der Proteine CueO bzw. CusCFBA. Das Fehlen des *cus*-Operons hat bei aerobem Wachstum keinen Resistenzverlust zur Folge (Grass und Rensing, 2001b; Munson *et al.*, 2000). Auch die Deletion von *cueO* führte zu keinem deutlichen Absinken der Resistenz (Franke *et al.*, 2003; Grass und Rensing, 2001b). Erst bei einer Deletion beider Systeme und der dadurch bedingten Akkumulation von Cu(I) im Periplasma kam es zu einem Resistenzverlust, der sich in einer MIC von ca. 1.30 mM CuCl₂ zeigte (Grass und Rensing, 2001b). Die Deletion der Gene $\Delta rpoE_{Ec}$ und $\Delta cusCFBA$ zusammen hatte die gleiche Auswirkung, wie das Fehlen der P-Typ ATPase CopA (Grass und Rensing, 2001b). Der größte Resistenzverlust zeigte sich bei der Deletion von *rpoE_{Ec}*, *cusCFBA* und *cueO* und der Vierfach-Mutante ($\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta copA$, $\Delta cusCFBA$, $\Delta cueO::cat$). Beide wiesen eine MIC von 1.00 mM CuCl₂ auf. Ein $\Delta copA$, $\Delta cusCFBA$, $\Delta cueO::cat$ -Stamm konnte genau wie ECA212($\Delta cusCFBA$, $\Delta cueO::cat$) erst ab ca. 1.30 mM CuCl₂ nicht mehr wachsen (Grass und Rensing, 2001b), Tabelle 7). Die Bedeutung von RpoE liegt demzufolge möglicherweise darin, alternative Wege zu induzieren, um *E. coli* vor Kupferionen zu schützen, wenn die periplasmatischen Entgiftungssysteme CueO und CusCFBA fehlen.

Die Kupfer-abhängige Expression von *copA* und *cueO* konnte bereits demonstriert werden (Stoyanov und Brown, 2003; Outten *et al.*, 2001; Stoyanov *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2000). Die Expressionsraten entsprechen denen eigener Ergebnisse. So führt die Insertion einer Einzelkopie von *copAp-lacZ* ins Genom von *E. coli* nach Inkubation mit 500 μ M CuSO₄ zu einer 14-fachen Induktion der β -Galaktosidase-Aktivität. Bei *cueOp-lacZ* konnte eine dreifache Induktion gezeigt werden (Outten *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2000). Die Expression von *copA* und *cueO* war dabei abhängig von CueR. Eigene Daten zeigten, dass auch die Expression von *cueR* in Abhängigkeit von CuCl₂ erfolgte (Abb. 18). Dabei fällt auf, dass die Expression von *cueR* erst ab einer Konzentration von ca. 1.5 mM bis 2.0 mM CuCl₂ deutlich anstieg. In einer $\Delta rpoE$ -Mutante kam es zu einer starken Induktion von *cueRp-lacZ* bei niedrigen Konzentrationen und zu einem

Absinken der β -Galaktosidase-Aktivität ab ca. 1.5 mM CuCl_2 . Auch die Expression von *cueO* im *E. coli*-Wildtyp folgte einem ähnlichen Verlauf. Bis ca. 1.5 mM CuCl_2 ist die β -Galaktosidase-Aktivität in Wildtyp und $\Delta rpoE$ -Mutante nahezu gleich, erst ab dieser Konzentration sinkt die Expression von *cueOp-lacZ* in *E. coli* $\Delta rpoE_{Ec}$ auf das Ausgangsniveau ab. Die Daten deuten darauf hin, dass *E. coli* bei aerobem Wachstum ab einer Schwellenkonzentration von ca. 1.5 mM CuCl_2 entweder ein funktionierendes Cus-System oder CueO oder RpoE_{Ec} benötigt, um die Kupfertoxizität (Cu(I)) im Periplasma gering zu halten (Egler *et al.*, 2005). Unterhalb dieser Schwellenkonzentration scheint die Expression von *cueO* und dem Regulator *cueR*, RpoE_{Ec}-unabhängig, und oberhalb, RpoE_{Ec}-abhängig zu sein.

4.1.4 Die Resistenz gegen Zink- und Cadmiumionen in *E. coli*

In *E. coli* haben sich für die Aufnahme von Zn(II) spezielle Systeme entwickelt (Blencowe und Morby, 2003). Mit hoher Affinität transportiert z. B. das ZnuABC-System Zinkionen über die Cytoplasmamembran ins Innere. Die Regulation erfolgt dabei durch das Zur-Protein (Patzner und Hantke, 2000, 1998), welches in der Lage ist, sub-femtomolare Konzentrationen an cytosolischem Zn(II) zu detektieren (Outten und O'Halloran, 2001). Wenn Zn(II) vorhanden ist, kann das Zur-Dimer an die *znu*-Operatorregion binden und dadurch die Transkription verhindern (Patzner und Hantke, 2000). ZupT, ein Vertreter der ZIP-Familie, hat eine geringere Affinität zu Zn(II) als das ZnuABC-System und ist möglicherweise auch in der Lage, Cd(II), Cu(II), Co(II) und Fe(II) und zu transportieren (Grass *et al.*, 2005; Grass *et al.*, 2002). Ähnliches wird für das NRAMP-Protein MntH, das Protonen-abhängig divalente Kationen transportiert, angenommen (Blencowe und Morby, 2003; Makui *et al.*, 2000). Der Export von Zink- und Cadmiumionen geschieht in *E. coli* vor allem über die P-Typ ATPase ZntA_{Ec} (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997). In einer $\Delta zntA_{Ec}$ -Mutante konnte ein Absinken der MIC gegenüber ZnSO_4 von 2.00 mM auf 0.50 mM und gegenüber Cd(OAc)_2 von 1.50 mM auf 0.03 mM beobachtet werden (Rensing *et al.*, 1997). In eigenen Versuchen lag die MIC bei 1.40 mM ZnCl_2 bzw. 0.90 mM CdCl_2 für den *E. coli*-Wildtypstamm und bei 0.60 mM ZnCl_2 bzw. 0.04 mM CdCl_2 im Falle der $\Delta zntA_{Ec}$ -Mutante. Die Deletion des Gens für den Sigmafaktor RpoE_{Ec} hatte eine weniger drastische Erhöhung der Sensitivität gegenüber Zn(II) zur Folge. Ein $\Delta rpoE_{Ec}$ -Stamm wies ab 1.10 mM ZnCl_2 kein Wachstum mehr auf. Bei Inkubation mit CdCl_2 sank die MIC auf 0.30 mM (Tabelle 8). Zn(II) kann zusätzlich noch über das CDF-Protein ZitB ins Periplasma exportiert werden. Bei der Deletion von *zitB* kann *E. coli* das Fehlen des CDF-Proteins durch ZntA_{Ec} ausgleichen,

so dass keine Veränderung des Wachstumsverhaltens zu beobachten ist. Eine $\Delta zntA_{Ec}$, $\Delta zitB$ -Doppelmutante wies ein ähnliches Wachstumsdefizit wie die entsprechende $\Delta zntA_{Ec}$ -Mutante auf (Grass *et al.*, 2001a). Das gleiche Bild zeigte sich nach Inkubation mit $CdCl_2$. Die zusätzliche Deletion von $rpoE_{Ec}$ führte nur in Anwesenheit von $ZnCl_2$ zu einem weiteren Absinken der Resistenz. Die basale Resistenz der $\Delta rpoE_{Ec}$, $\Delta zntA_{Ec}$, $\Delta zitB$ -Mutante lag bei 0.40 mM $ZnCl_2$ bzw. 0.04 mM $CdCl_2$, allein das Vorhandensein der P-Typ ATPase $ZntA_{Ec}$ führte zu einem drastischen Anstieg der Toleranzen. Dies spricht dafür, dass $RpoE_{Ec}$ nicht in die Expression von $ZntA_{Ec}$ involviert ist. Auch Expressionsanalysen von $zntA_{Ec}$ -*lacZ* bzw. *zitB*-*lacZ* zeigten in einer $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutante eine ähnliche Zn(II)-abhängige Induktion, wie sie bereits im Wildtyp demonstriert werden konnte (Lee *et al.*, 2005; Grass *et al.*, 2001a; Binet und Poole, 2000; Brocklehurst *et al.*, 1999).

4.2 Unterschiedliche Expression der homologen Sigmafaktoren in *C. metallidurans* und *E. coli*

Für viele ECF-Sigmafaktoren aus verschiedenen Bakterien konnte gezeigt werden, dass ihre Transkription abhängig von äußeren Stressfaktoren ist. So ist z. B. Hitze ein wichtiger Induktor für $RpoE_{Ec}$ in *E. coli* (Rouviere *et al.*, 1995), AlgU in *P. aeruginosa* (Schurr *et al.*, 1995a), SigB, SigI und SigX in *B. subtilis* (Helmann *et al.*, 2001; Zuber *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1997), SigI in *Deinococcus radiodurans* (Schmid und Lidstrom, 2002) und SigH in *Mycobacterium tuberculosis* (Raman *et al.*, 2001). In *E. coli* konnte zusätzlich eine gesteigerte Expression von $rpoE_{Ec}$ nach Kälteschock (Phadtare und Inouye, 2004), bei Eintritt in die stationäre Phase (Nitta *et al.*, 2000) und bei der Biofilmbildung (Beloin *et al.*, 2004) gezeigt werden. Außerdem werden manche ECF-Sigmafaktoren bei osmotischem und oxidativem Stress verstärkt exprimiert. Dazu zählen AlgU aus *P. fluorescens* (Schnider-Keel *et al.*, 2001), SigB aus *S. coelicolor* (Lee *et al.*, 2004), SigM (Horsburgh und Moir, 1999) und SigW aus *B. subtilis* (Petersohn *et al.*, 2001) und SigH aus *M. tuberculosis* (Raman *et al.*, 2001). Die Expression von $rpoE_{Ec}$ aus *E. coli* konnte in eigenen Untersuchungen durch 500 mM NaCl um das 4.5 ± 2.5 -fache gesteigert werden. In *C. metallidurans* zeigte ein $rpoE_{Cm}$ -*lacZ*-Reporterkonstrukt keine veränderte Expression bei Hitze, oxidativem bzw. osmotischem Stress.

Untersuchungen des Sigmafaktors $RpoH_{Cm}$ (ChrH) aus *C. metallidurans* CH34 konnten eine Chromat-induzierte Transkription des Gens zeigen (Juhnke *et al.*, 2002). Bei anderen

Sigmafaktoren wurden Metalle als Induktor bisher kaum untersucht. Eine kürzlich durchgeführte globale Expressionsstudie nach Cadmiuminkubation in *E. coli* zeigt jedoch eine *rpoE_{Ec}*-Transkription (Wang und Crowley, 2005). Eigene Untersuchungen ergaben eine Steigerung der Expression ausgehend vom Promotor *rpoE_{pEc}* um das Doppelte nach Inkubation mit 100 μ M CdCl₂. Eine viel stärkere Induktion konnte mit CuCl₂ bzw. ZnCl₂ gezeigt werden. Nach Inkubation mit 0.4 mM bis 0.8 mM ZnCl₂ stieg die Expression eines *rpoE_{pEc}-lacZ*-Konstruktes auf das maximal 42 ± 16 -fache an. Bei CuCl₂ kam es zu einem deutlichen Anstieg oberhalb der Schwellenkonzentration von 1.5 mM auf das 26 ± 14 -fache bei 2.5 mM CuCl₂ (Abb. 17). Bisher veröffentlichte Microarray-Analysen wurden mit niedrigeren Metallkonzentrationen von 100-200 μ M Zn(II) bzw. 250 μ M Cu(II) durchgeführt und zeigten keine gesteigerte Transkription von *rpoE_{Ec}* (Egler *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). In *C. metallidurans* scheint die Expression von *rpoE_{Cm}* nicht Metall-abhängig zu sein. Darauf deuten sowohl eigene Experimente mit einer *rpoE_{Cm}-lacZ*-Transkriptionsfusion als auch semiquantitative RT-PCR-Untersuchungen hin (S. Friedrich, persönliche Mitteilung). Die Transkription des Sigmafaktors CnrH der Co/Ni-Resistenzdeterminante von *C. metallidurans* konnte durch Ni(II) ebenfalls nicht gesteigert werden (Grass *et al.*, 2000), jedoch reagiert das System auf periplasmatische Nickelionen. Das *cnrH*-Gen wird zusammen mit *cnrY* und *cnrX* transkribiert (Grass *et al.*, 2000; Tibazarwa *et al.*, 2000). Diese bilden einen membranständigen Antisigmafaktor-Komplex. Ist der CnrXY-Komplex ausgebildet, bindet wahrscheinlich der CnrY-Teil im Cytoplasma den Sigmafaktor CnrH. CnrX weist eine periplasmatische *leader*-Sequenz auf, die allerdings nicht abgespalten wird und somit das periplasmatische Protein in der Cytoplasmamembran verankert. Außerdem wird spekuliert, dass CnrX eine Protease ist, die aufgrund einer Konformationsänderung als Reaktion auf die Bindung eines Ni(II)-Ions, CnrY proteolytisch abbaut und damit die Freisetzung des Sigmafaktors CnrH gewährleistet (Grass, 2000). Dies geschieht wahrscheinlich durch Bindung von Ni(II) an den Antisigmafaktor-Komplex CnrXY und die dadurch bedingte Freisetzung von CnrH (Grass, 2000). Eine ähnliche Regulation des RseAB-RpoE_{Cm}-Weges ist durchaus vorstellbar.

4.3 Modell der RpoE-abhängigen Antwort auf extracytoplasmatischen Stress

Durch Microarray-Analysen wurde gezeigt, dass die Deletion von *rpoE_{Ec}* zu einer geringeren Flexibilität bei der Adaptation an Metallstress führte (Egler *et al.*, 2005). Sowohl in *E. coli* als auch in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fiel auf, dass auf das Fehlen des Sigmafaktors σ^E mit verstärkter Expression der Psp-Proteine (*phage shock proteins*) reagiert wurde (Becker *et al.*, 2005; Egler *et al.*, 2005). PspA schützt die Zelle gegen Zerstörung der PMF (*proton motive force*) unter Stressbedingungen wahrscheinlich durch Aufrechterhaltung der Integrität der Cytoplasmamembran (Adams *et al.*, 2003; Kleerebezem *et al.*, 1996). Möglicherweise hat auch das σ^E -Regulon eine ähnliche Funktion (Becker *et al.*, 2005). Vorrangig finden sich im σ^E -Regulon jedoch Faltungshelfer und periplasmatische Chaperone wie die periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerasen FkpA, Skp und SurA, die Proteasen DegP/HtrA und YaeL (EcfE), die Disulfidbrücken-Isomerase DsbC, sowie der Hitzeschock-Sigmafaktor RpoH, aber auch Elongationsfaktoren und DNA-Reparaturproteine und Proteine, die in die Biosynthese und den Transport von Lipopolysacchariden involviert sind (Rezuchova *et al.*, 2003; Dartigalongue *et al.*, 2001; Hiratsu *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995). CutC ist das einzige bisher identifizierte Mitglied des σ^E -Regulons, das möglicherweise an Schwermetall-Resistenzmechanismen beteiligt ist (Dartigalongue *et al.*, 2001). Die Deletion von *cutC* führte zu einem Kupfer-sensitiven Phänotyp (Grass und Rensing, unveröffentlichte Daten). Es wurde spekuliert, dass die Produkte der *cut*-Gene in Aufnahme, intrazelluläre Speicherung und Efflux von Kupferionen in *E. coli* involviert sind (Gupta *et al.*, 1995). Verschiedene Funktionen wie Reduktion von Methioninen in der Multicopper-Oxidase CueO, die durch Kupfer-bedingten oxidativen Stress oxidiert wurden, Veränderungen von Porinen oder die Sicherstellung korrekter Proteinfaltung wurden außerdem vorgeschlagen (Rensing und Grass, 2003).

Die Expression des Porins OmpC wird in einer $\Delta rpoE_{Ec}$ -Mutante reprimiert. Außerdem kommt es durch die Deletion von *ompC* zu dem gleichen Kupfer-sensitiven Phänotyp wie in ECA101 ($\Delta rpoE_{Ec}$) (Egler *et al.*, 2005). Eigentlich war zu erwarten, dass das Fehlen eines Porins der äußeren Membran zu geringerer Aufnahme von Kupferionen und somit zu einer Erhöhung der Resistenz führen sollte. Für Ag⁺ konnte dies bereits gezeigt werden (Li *et al.*, 1997). OmpC wird unter hochosmotischen Bedingungen über das Zweikomponenten-System EnvZ/OmpR verstärkt exprimiert (Zhou *et al.*, 2003). Es wurde ebenfalls eine Induktion von σ^E -abhängigen

Promotoren nach osmotischem Schock gefunden (Bianchi und Baneyx, 1999). Es ist weiterhin bekannt, dass die Expression von OmpC als Antwort auf falsch gefaltete Proteine im Periplasma durch das Zweikomponenten-System CpxAR induziert werden kann (De Wulf *et al.*, 2002). Die Region stromaufwärts von *ompC* weist laut Vorhersagen (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) vier putative Promotorsequenzen auf, so dass eine vielschichtige Transkriptionsinitiation möglich ist. Eine Überexpression von *ompC* führt außerdem zur Induktion von RpoE (Mecbas *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass OmpC-Peptide die Protease DegS aktivieren (Alba und Gross, 2004), was zum Abbau des Antisigmafaktors RseA und damit zur Freisetzung von σ^E führt (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002; Ades *et al.*, 1999). Möglicherweise kann *E. coli* den Transport von Kupferionen durch OmpC kontrollieren (Egler *et al.*, 2005). Sollte es durch zu hohe Kupferkonzentrationen zum Abbau von OmpC kommen, würden dadurch mindestens zwei Regulationswege induziert: der σ^E - und der Cpx-Weg. Durch σ^E werden Faltungskatalysatoren und periplasmatische Chaperone und ab einer Konzentration von 1.5 mM Cu(II) auch CueO verstärkt exprimiert, um die Schäden im Periplasma zu beheben. Der Cpx-Weg hat teilweise überlappende Funktionen (Danese und Silhavy, 1997), könnte aber durch die Induktion von OmpC und die gleichzeitige Repression von RpoE (De Wulf *et al.*, 2002) als eine Art „Rückversicherung“ fungieren, um wieder Ausgangsverhältnisse herzustellen (Abb. 21).

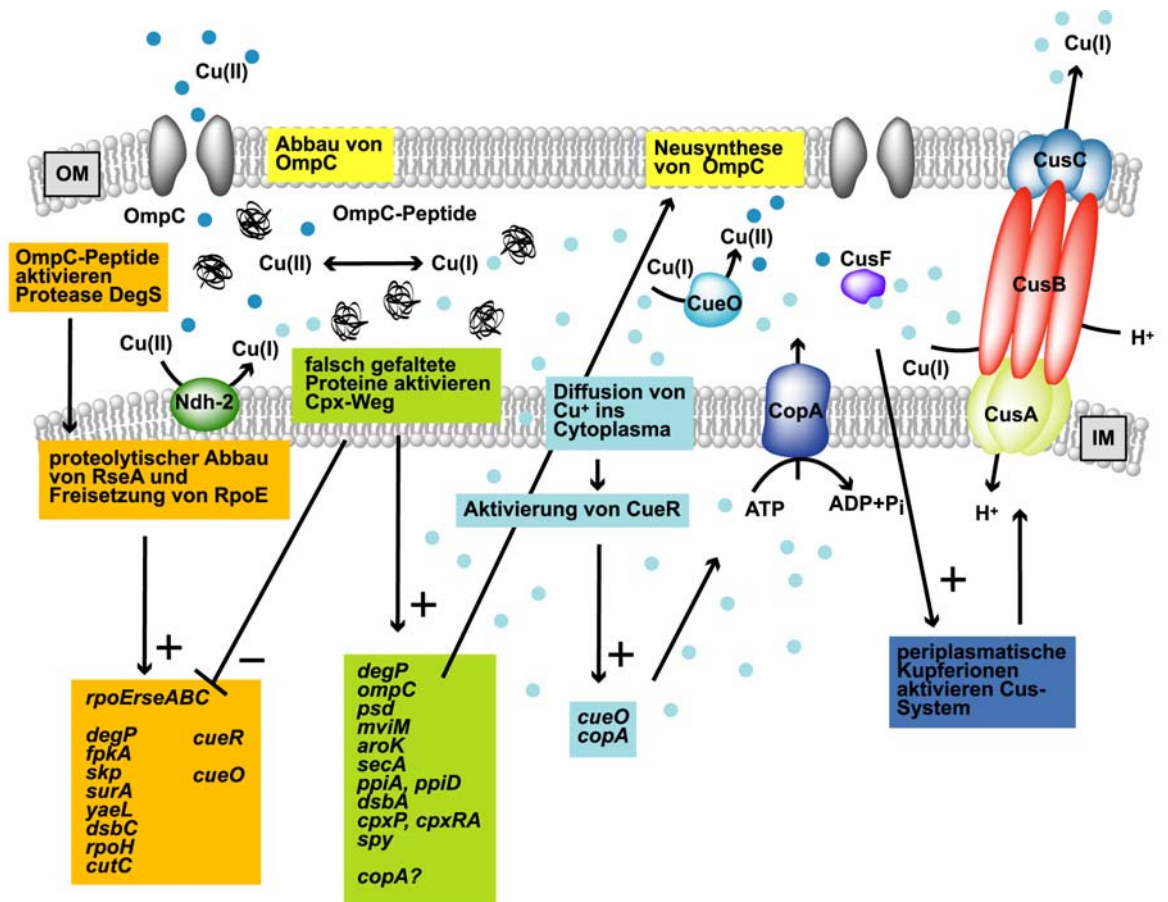


Abb. 21 Schematische Darstellung der Aktivierung verschiedener Regulationswege durch falsch gefaltete bzw. abgebaute Proteine der äußeren Membran, z. B. OmpC, sowie der zellulären Reaktion auf Kupferionen in *E. coli* (OM-äußere Membran, IM-innere Membran)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die homologen Proteine RpoE_{Cm} und RpoE_{Ec} in *C. metallidurans* bzw. *E. coli* an der Regulation der Schwermetall-Homöostase beider Organismen beteiligt sind. Die direkte Aktivierung von Entgiftungssystemen konnte nur exemplarisch für CueO und CueR in *E. coli* und *in vitro* für ZntA_{Cm} und CadA in *C. metallidurans* gezeigt werden. Mögliche funktionelle Wechselwirkungen paraloger Proteine in *C. metallidurans* sowie komplexe und bisher nur im Ansatz untersuchte regulatorische Netzwerke in beiden Bakterien erschwerten die Experimente. Der Einfluss dieser ECF-Sigmafaktoren liegt wohl vor allem in der Kontrolle der korrekten Faltung von Proteinen der bakteriellen Hülle und dem Schutz der Zelle vor potentiell tödlichem extracytoplasmatischem Stress.

4.4 Ausblick

Es konnten in *C. metallidurans* bereits drei Gene gefunden werden, deren Transkription unter bestimmten Bedingungen von dem ECF-Sigmafaktor RpoE_{Cm} abhängig war. Es handelt sich um *rpoEp_{Cm}*, *zntAp_{Cm}* und *cadAp*. Ein Schwerpunkt der weiteren Vorgehensweise sollte die Suche nach weiteren σ^E -abhängigen Genen sein. Dies könnte z. B. durch Einsatz der Microarray-Technik oder durch Insertionsmutagenese mit gekoppelten Transposon-Reporter-Gen-Fusionen geschehen. Auf diese Weise identifizierte σ^E -abhängige Promotoren könnten als Ausgangspunkt für die *in silico*-Suche nach weiteren Mitgliedern des σ^E -Regulons dienen. Ausgehend von den *C. metallidurans*-Mutantenstämmen DN480(pMOL28, pMOL30 $\Delta rpoE_{Cm}$) bzw. DN462($\Delta rpoE_{Cm}$) sollten sukzessive Mehrfachmutanten der paralogen Sigmafaktoren hergestellt werden, und deren Verhalten in Gegenwart von Metallionen untersuchen zu können.

Vergleichende Microarray-Analysen der *E. coli*-Stämme BW25113 und ECA101($\Delta rpoE_{Ec}$) mit höheren Metallkonzentrationen bzw. anderen Stressoren sind sinnvoll. Dadurch wäre es möglich, zwischen unspezifischer Antwort auf Stress und spezifischer Antwort auf z. B. Kupferionen differenzieren zu können. Interessant wäre es weiterhin zu untersuchen, ob auch die Gene *rpoErseAB_{Cm}* aus *C. metallidurans* unter Kontrolle des eigenen Promotors oder von *rpoEp_{Ec}* in der Lage sind, den $\Delta rpoE_{Ec}$ -Phänotyp in *E. coli* zu komplementieren.

5 Zusammenfassung

Sigmafaktoren dienen als Untereinheit der RNAP in Bakterien der Erkennung verschiedener Transkriptionsstartpunkte. Mit Hilfe der ECF- (*extracytoplasmic function*) Sigmafaktoren ist die Zelle in der Lage durch gezielte Genexpression, spezifisch auf Schädigung des Periplasmas und der äußeren Membran zu reagieren. Bisher war wenig über die Zusammenhänge von Schwermetall-Stress und ECF-Sigmafaktoren bekannt. Deshalb wurde dieser Aspekt der zellulären Regulation genauer untersucht. Als Untersuchungsobjekte dienten das Schwermetall-resistente Bakterium *C. metallidurans* sowie der Modellorganismus *E. coli*.

- 1) Die Deletion des Gens für den Sigmafaktors RpoE_{Cm} führte zu einer Abnahme der Nickelresistenz in *C. metallidurans* CH34(pMOL28, pMOL30) und zu einem Absinken der Toleranz gegen Zn(II), Cd(II), Co(II) und Ni(II) in dem Megaplasmid-freien Stamm AE104.
- 2) Die RNA-Polymerase aus *E. coli* war im Komplex mit heterolog gereinigtem RpoE_{Cm} in der Lage, an die Promotorregionen von *rpoE_{Cm}*, *cadA* und *zntA_{Cm}* zu binden und von ihnen ausgehend *in vitro* eine Transkription zu starten. Jedoch war RpoE_{Cm} für die *in vivo*-Aktivität der Metallkationen-entgiftenden P-Typ ATPasen CadA und ZntA_{Cm} nicht notwendig.
- 3) In *E. coli* kam es durch die Deletion von *rpoE_{Ec}* zu einer Abnahme der Resistenz gegenüber Zn(II), Cu(II) und Cd(II). Die Resistenzverluste durch das Fehlen von RpoE_{Ec} waren auf verlängerte *lag*-Phasen beim Wachstum in Gegenwart von Metallen zurückzuführen. Es war möglich den Kupfer-sensitiven Phänotyp durch eine zusätzliche, genomische Einzelkopie von *rpoEp-rpoErseAB_{Ec}* partiell zu komplementieren.
- 4) In β -Galaktosidase-Studien konnte die Expression eines *rpoEp_{Ec}-lacZ*-Konstruktes durch Metallionen, vor allem durch Cu(II) und besonders stark durch Zn(II), gesteigert werden.
- 5) Oberhalb einer Schwellenkonzentration von ca. 1.5 mM CuCl₂ war die Expression des Regulators CueR und der periplasmatischen Multicopper-Oxidase CueO abhängig von RpoE_{Ec}. Für das Überleben in Gegenwart höherer Konzentrationen an Kupferionen war RpoE oder CueO oder ein funktionierendes Cus-System notwendig.

6 Literatur

- Adams, H., Teertstra, W., Demmers, J., Boesten, R. & Tommassen, J. (2003) Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 1174-1180.
- Ades, S. E., Connolly, L. E., Alba, B. M. & Gross, C. A. (1999) The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev*, **13**, 2449-2461.
- Alba, B. M., Zhong, H. J., Pelayo, J. C. & Gross, C. A. (2001) *degS* (*hhoB*) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity. *Mol Microbiol*, **40**, 1323-1333.
- Alba, B. M., Leeds, J. A., Onufryk, C., Lu, C. Z. & Gross, C. A. (2002) DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev*, **16**, 2156-2168.
- Alba, B. M. & Gross, C. A. (2004) Regulation of the *Escherichia coli* sigmaE-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol*, **52**, 613-619.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Angerer, A., Enz, S., Ochs, M. & Braun, V. (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**, 163-174.
- Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T. & Nies, D. H. (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol*, **181**, 6876-6881.
- Anton, A. (2001) Genetische und biochemische Charakterisierung von CzcD und anderen Regulatoren der *czc*-vermittelten Schwermetallresistenz in *Ralstonia metallidurans*. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C. J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C. & Nies, D. H. (2004) Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **186**, 7499-7507.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1993) Current protocols in molecular biology. In *Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc*. New York.
- Bartha, R. & Ordal, E. J. (1965) Nickel-Dependent Chemolithotrophic Growth of Two *Hydrogenomonas* Strains. *J Bacteriol*, **89**, 1015-1019.
- Bashyam, M. D. & Hasnain, S. E. (2004) The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect Genet Evol*, **4**, 301-308.
- Beard, S. J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M. N. & Poole, R. K. (1997) Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol*, **25**, 883-891.
- Beard, S. J., Hashim, R., Wu, G., Binet, M. R., Hughes, M. N. & Poole, R. K. (2000) Evidence for the transport of zinc(II) ions via the *pit* inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **184**, 231-235.
- Beck, C., Marty, R., Klausli, S., Hennecke, H. & Gottfert, M. (1997) Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*, **179**, 364-369.

- Becker, L. A., Bang, I. S., Crouch, M. L. & Fang, F. C. (2005) Compensatory role of PspA, a member of the phage shock protein operon, in *rpoE* mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, **56**, 1004-1016.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J. A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., *et al* (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol*, **51**, 659-674.
- Beswick, P. H., Hall, G. H., Hook, A. J., Little, K., McBrien, D. C. & Lott, K. A. (1976) Copper toxicity: evidence for the conversion of cupric to cuprous copper in vivo under anaerobic conditions. *Chem Biol Interact*, **14**, 347-356.
- Bianchi, A. A. & Baneyx, F. (1999) Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **34**, 1029-1038.
- Binet, M. R. & Poole, R. K. (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **473**, 67-70.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., *et al* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1474.
- Blencowe, D. K. & Morby, A. P. (2003) Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 291-311.
- Borremans, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L. & van Der Lelie, D. (2001) Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol*, **183**, 5651-5658.
- 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**, 248-254.
- Brim, H., Heyndrickx, M., de Vos, P., Wilmotte, A., Springael, D., Schlegel, H. G. & Mergeay, M. (1999) Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Systematic and Applied Microbiology*, **22**, 258-268.
- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L. & Morby, A. P. (1999) ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **31**, 893-902.
- Brown, K. L. & Hughes, K. T. (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol*, **16**, 397-404.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 145-163.
- Browning, D. F., Whitworth, D. E. & Hodgson, D. A. (2003) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Mol Microbiol*, **48**, 237-251.
- Burgess, R. R. (1969) Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem*, **244**, 6168-6176.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 131-143.
- Campbell, E. A., Tupy, J. L., Gruber, T. M., Wang, S., Sharp, M. M., Gross, C. A. & Darst, S. A. (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* sigmaE with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol Cell*, **11**, 1067-1078.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. & Mondragon, A. (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science*, **301**, 1383-1387.

-
- Collinet, B., Yuzawa, H., Chen, T., Herrera, C. & Missiakas, D. (2000)** RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA:σE interaction in the cytoplasm and the availability of σE-RNA polymerase. *J Biol Chem*, **275**, 33898-33904.
- Cosma, C. L., Danese, P. N., Carlson, J. H., Silhavy, T. J. & Snyder, W. B. (1995)** Mutational activation of the Cpx signal transduction pathway of *Escherichia coli* suppresses the toxicity conferred by certain envelope-associated stresses. *Mol Microbiol*, **18**, 491-505.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. & Silhavy, T. J. (1995)** The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev*, **9**, 387-398.
- Danese, P. N. & Silhavy, T. J. (1997)** The σE and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **11**, 1183-1193.
- Danese, P. N. & Silhavy, T. J. (1998)** CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol*, **180**, 831-839.
- Darst, S. A. (2001)** Bacterial RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 155-162.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D. & Raina, S. (2001)** Characterization of the *Escherichia coli* {σ}E Regulon. *J Biol Chem*, **23**, 23.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000)** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6640-6645.
- De Las Penas, A., Connolly, L. & Gross, C. A. (1997a)** σE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 6862-6864.
- De Las Penas, A., Connolly, L. & Gross, C. A. (1997b)** The σE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σE. *Mol Microbiol*, **24**, 373-385.
- De Wulf, P., McGuire, A. M., Liu, X. & Lin, E. C. (2002)** Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **277**, 26652-26661.
- deHaseh, P. L., Zupancic, M. L. & Record, M. T., Jr. (1998)** RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol*, **180**, 3019-3025.
- Deretic, V., Schurr, M. J., Boucher, J. C. & Martin, D. W. (1994)** Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J Bacteriol*, **176**, 2773-2780.
- DeVries, C. A. & Ohman, D. E. (1994)** Mucoid-to-nonmucoid conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *J Bacteriol*, **176**, 6677-6687.
- DiGiuseppe, P. A. & Silhavy, T. J. (2004)** Periplasmic chaperones apparently deliver many if not all proteins to the outer membrane, suggesting they are assembled like pili. *ASM News*.
- Dinh, T., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. (1994)** A Family of Extracytoplasmic Proteins That Allow Transport of Large Molecules Across the Outer Membranes of Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol*, **176**, 3825-3831.
- Dombroski, A. J., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1993)** Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes Dev*, **7**, 2446-2455.
- Dong, J., Iuchi, S., Kwan, H. S., Lu, Z. & Lin, E. C. (1993)** The deduced amino-acid sequence of the cloned *cpxR* gene suggests the protein is the cognate regulator for the membrane sensor, CpxA, in a two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Gene*, **136**, 227-230.

- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G. & Nies, D. H. (2005) Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187**, 2297-2307.
- Eitinger, T. & Mandrand-Berthelot, M. A. (2000) Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol*, **173**, 1-9.
- Enz, S., Mahren, S., Menzel, C. & Braun, V. (2003) Analysis of the ferric citrate transport gene promoter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 2387-2391.
- Erickson, J. W. & Gross, C. A. (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**, 1462-1471.
- Fang, F. C. (2005) Sigma cascades in prokaryotic regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Finney, L. A. & O'Halloran, T. V. (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, **300**, 931-936.
- Firoved, A. M., Boucher, J. C. & Deretic, V. (2002) Global genomic analysis of AlgU (sigma(E))-dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J Bacteriol*, **184**, 1057-1064.
- Fosmire, G. J. (1990) Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr*, **51**, 225-227.
- Franke, S., Grass, G. & Nies, D. H. (2001) The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology*, **147**, 965-972.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C. & Nies, D. H. (2003) Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 3804-3812.
- Gatti, D., Mitra, B. & Rosen, B. P. (2000) *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J Biol Chem*, **275**, 34009-34012.
- Gentry, D. R. & Burgess, R. R. (1993) Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry*, **32**, 11224-11227.
- Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S. & Nies, D. H. (1999) Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem*, **274**, 26065-26070.
- Gonzalez, H. & Jensen, T. E. (1998) Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, **93**, 179-185.
- Gorham, H. C., McGowan, S. J., Robson, P. R. & Hodgson, D. A. (1996) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol Microbiol*, **19**, 171-186.
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K. & Vandamme, P. (2001) Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 1773-1782.
- Grass, G. (2000) Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Grass, G., Grosse, C. & Nies, D. H. (2000) Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol*, **182**, 1390-1398.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H. & Rensing, C. (2001a) ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**, 4664-4667.

- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Lemke, K., Schlegel, H. G. & Rensing, C. (2001b) NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A Is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J Bacteriol*, **183**, 2803-2807.
- Grass, G. & Rensing, C. (2001a) CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 902-908.
- Grass, G. & Rensing, C. (2001b) Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**, 2145-2147.
- Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L. & Rensing, C. (2002) ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**, 864-866.
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D. H., Kucharski, L. M., Maguire, M. E. & Rensing, C. (2005) The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol*, **187**, 1604-1611.
- Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J. & Young, B. (1998) The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 141-155.
- Grosse, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Santos, A. N., Lawley, B., Brown, N. L. & Nies, D. H. (1999) Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, **181**, 2385-2393.
- Grunberg-Manago, M., Oritz, P. J. & Ochoa, S. (1955) Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science*, **122**, 907-910.
- Gupta, S. D., Lee, B. T., Camakaris, J. & Wu, H. C. (1995) Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **177**, 4207-4215.
- Hakenbeck, R. & Stock, J. B. (1996) Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol*, **273**, 281-300.
- Haldimann, A. & Wanner, B. L. (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol*, **183**, 6384-6393.
- Hantke, K. (2001) Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals*, **14**, 239-249.
- Hasan, N., Koob, M. & Szybalski, W. (1994) *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated in vitro generation of ori- plasmids and their in vivo chromosomal integration and retrieval. *Gene*, **150**, 51-56.
- Heil, A. & Zillig, W. (1970) Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Lett*, **11**, 165-168.
- Helmann, J. D., Wu, M. F., Kobel, P. A., Gamo, F. J., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M. & Paddon, C. (2001) Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol*, **183**, 7318-7328.
- Helmann, J. D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol*, **46**, 47-110.
- Hershberger, C. D., Ye, R. W., Parsek, M. R., Xie, Z. D. & Chakrabarty, A. M. (1995) The *algT* (*algU*) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative sigma factor (sigma E). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7941-7945.
- Hiratsu, K., Amemura, M., Nashimoto, H., Shinagawa, H. & Makino, K. (1995) The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes sigma E, is essential for bacterial growth at high temperature. *J Bacteriol*, **177**, 2918-2922.
- Horsburgh, M. J. & Moir, A. (1999) Sigma M, an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol Microbiol*, **32**, 41-50.

- Huang, X., Decatur, A., Sorokin, A. & Helmann, J. D. (1997) The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature. *J Bacteriol*, **179**, 2915-2921.
- Huang, X. & Helmann, J. D. (1998) Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* sigma X factor using a consensus-directed search. *J Mol Biol*, **279**, 165-173.
- Huang, X., Gaballa, A., Cao, M. & Helmann, J. D. (1999) Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol Microbiol*, **31**, 361-371.
- Humphreys, S., Stevenson, A., Bacon, A., Weinhardt, A. B. & Roberts, M. (1999) The alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, **67**, 1560-1568.
- Hung, D. L., Raivio, T. L., Jones, C. H., Silhavy, T. J. & Hultgren, S. J. (2001) Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO J*, **20**, 1508-1518.
- Johnson, J. M. & Church, G. M. (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol*, **287**, 695-715.
- Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., Silhavy, T. J. & Hultgren, S. J. (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J*, **16**, 6394-6406.
- Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N., Grosse, C. & Nies, D. H. (2002) New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol*, **179**, 15-25.
- Kanehara, K., Akiyama, Y. & Ito, K. (2001) Characterization of the *yaeL* gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. *Gene*, **281**, 71-79.
- Kanehara, K., Ito, K. & Akiyama, Y. (2002) YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev*, **16**, 2147-2155.
- Kanehara, K., Ito, K. & Akiyama, Y. (2003) YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO J*, **22**, 6389-6398.
- Kawabe, T., Fujihira, E. & Yamaguchi, A. (2000) Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA. *J Biochem (Tokyo)*, **128**, 195-200.
- Kenyon, W. J., Sayers, D. G., Humphreys, S., Roberts, M. & Spector, M. P. (2002) The starvation-stress response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires sigma(E)-, but not CpxR-regulated extracytoplasmic functions. *Microbiology*, **148**, 113-122.
- Kleerebezem, M., Crielaard, W. & Tommassen, J. (1996) Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J*, **15**, 162-171.
- Kobayashi, M. & Shimizu, S. (1998) Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. *Nat Biotechnol*, **16**, 733-736.
- Kolb, A., Kotlarz, D., Kusano, S. & Ishihama, A. (1995) Selectivity of the *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 38 for overlapping promoters and ability to support CRP activation. *Nucleic Acids Res*, **23**, 819-826.
- Korber, P., Zander, T., Herschlag, D. & Bardwell, J. C. (1999) A new heat shock protein that binds nucleic acids. *J Biol Chem*, **274**, 249-256.
- Kovacikova, G. & Skorupski, K. (2002) The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, **70**, 5355-5362.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lee, E. J., Cho, Y. H., Kim, H. S., Ahn, B. E. & Roe, J. H. (2004) Regulation of sigmaB by an anti- and an anti-anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor* in response to osmotic stress. *J Bacteriol*, **186**, 8490-8498.
- Lee, L. J., Barrett, J. A. & Poole, R. K. (2005) Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J Bacteriol*, **187**, 1124-1134.
- Lee, S. M., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S. R., Yates, C. J., Stoyanov, J. V. & Brown, N. L. (2002) The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **295**, 616-620.
- Legatzki, A. (2003) Charakterisierung zweier CPx-Typ ATPasen und deren Zusammenwirken mit anderen Metal-Effluxsystemen in *Ralstonia metallidurans*. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C. & Nies, D. H. (2003) Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol*, **185**, 4354-4361.
- Lenz, O., Schwartz, E., Dervedde, J., Eitinger, M. & Friedrich, B. (1994) The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol*, **176**, 4385-4393.
- Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. (1997) Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol*, **179**, 6127-6132.
- Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R. A. & Schlegel, H. G. (1993) Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol*, **175**, 767-778.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E. & Buttner, M. J. (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 U S A*, **91**, 7573-7577.
- Maeda, H., Jishage, M., Nomura, T., Fujita, N. & Ishihama, A. (2000) Two extracytoplasmic function sigma subunits, sigma(E) and sigma(FecI), of *Escherichia coli*: promoter selectivity and intracellular levels. *J Bacteriol*, **182**, 1181-1184.
- Mahren, S., Enz, S. & Braun, V. (2002) Functional interaction of region 4 of the extracytoplasmic function sigma factor FecI with the cytoplasmic portion of the FecR transmembrane protein of the *Escherichia coli* ferric citrate transport system. *J Bacteriol*, **184**, 3704-3711.
- Mahren, S. & Braun, V. (2003) The FecI extracytoplasmic-function sigma factor of *Escherichia coli* interacts with the beta' subunit of RNA polymerase. *J Bacteriol*, **185**, 1796-1802.
- Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P. & Cellier, M. F. M. (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol*, **35**, 1065-1078.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**, 159-162.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K. & Smith, I. (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol*, **41**, 423-437.
- Markov, D., Naryshkina, T., Mustaev, A. & Severinov, K. (1999) A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev*, **13**, 2439-2448.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Yu, H. & Deretic, V. (1994) Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to sigma E and stress response. *J Bacteriol*, **176**, 6688-6696.

- Martinez-Argudo, I., Ruiz-Vazquez, R. M. & Murillo, F. J. (1998)** The structure of an ECF-sigma-dependent, light-inducible promoter from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*, **30**, 883-893.
- Martinez-Salazar, J. M., Moreno, S., Najera, R., Boucher, J. C., Espin, G., Soberon-Chavez, G. & Deretic, V. (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**, 1800-1808.
- Marx, C. J. & Lidstrom, M. E. (2002)** Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques*, **33**, 1062-1067.
- Mathee, K., McPherson, C. J. & Ohman, D. E. (1997)** Posttranslational control of the *algT* (*algU*)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). *J Bacteriol*, **179**, 3711-3720.
- Mecas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J. & Gross, C. A. (1993)** The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev*, **7**, 2618-2628.
- Mergeay, M., Houba, C. & Gerits, J. (1978)** Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch Int Physiol Biochim*, **86**, 440-442.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985)** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol*, **162**, 328-334.
- Mergeay, M. (2000)** Bacteria Adapted to Industrial Biotopes: Metal-Resistant *Ralstonia*. *Bacterial Stress Response*, **Chapter 26**.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D. & Wattiez, R. (2003)** *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 385-410.
- Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. (1997)** The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. *J Bacteriol*, **179**, 1029-1034.
- Miller, J. H. (1972)** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Press.
- Missiakas, D., Mayer, M. P., Lemaire, M., Georgopoulos, C. & Raina, S. (1997)** Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol*, **24**, 355-371.
- Missiakas, D. & Raina, S. (1998)** The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol*, **28**, 1059-1066.
- Miticka, H., Rowley, G., Rezuchova, B., Homerova, D., Humphreys, S., Farn, J., Roberts, M. & Kormanec, J. (2003)** Transcriptional analysis of the *rpoE* gene encoding extracytoplasmic stress response sigma factor sigmaE in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*, **226**, 307-314.
- Miticka, H., Rezuchova, B., Homerova, D., Roberts, M. & Kormanec, J. (2004)** Identification of nucleotides critical for activity of the sigmaE-dependent *rpoEp3* promoter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*, **238**, 227-233.
- Mittenhuber, G. (2002)** An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **4**, 77-91.

- Mouz, S., Coursange, E. & Toussaint, A. (2001) *Ralstonia metallidurans* CH34 RpoN sigma factor and the control of nitrogen metabolism and biphenyl utilization. *Microbiology*, **147**, 1947-1954.
- Mulrooney, S. B. & Hausinger, R. P. (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 239-261.
- Munkelt, D., Grass, G. & Nies, D. H. (2004) The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol*, **186**, 8036-8043.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. & O'Halloran, T. V. (2000) Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **182**, 5864-5871.
- Murakami, K. S., Masuda, S. & Darst, S. A. (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science*, **296**, 1280-1284.
- Nagasawa, S., Ishige, K. & Mizuno, T. (1993) Novel members of the two-component signal transduction genes in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, **114**, 350-357.
- Nakayama, S. & Watanabe, H. (1995) Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei virF* gene. *J Bacteriol*, **177**, 5062-5069.
- Nies, D. H., Mergeay, M., Friedrich, B. & Schlegel, H. G. (1987) Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol*, **169**, 4865-4868.
- Nies, D. H. & Silver, S. (1989a) Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, **171**, 896-900.
- Nies, D. H. & Silver, S. (1989b) Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J Bacteriol*, **171**, 4073-4075.
- Nies, D. H. (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **177**, 2707-2712.
- Nies, D. H. & Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol*, **14**, 186-199.
- Nies, D. H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 730-750.
- Nies, D. H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 313-339.
- Nies, D. H. (2004) Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Arch Microbiol*, **181**, 255-268.
- Nikaido, H. (1996) Outermembrane. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (eds F. C. Neidhardt & R. I. Curtiss).
- Nitta, T., Nagamitsu, H., Murata, M., Izu, H. & Yamada, M. (2000) Function of the sigma(E) regulon in dead-cell lysis in stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 5231-5237.
- O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem*, **275**, 25057-25060.
- Oshima, S., Hirayama, N., Kubono, K., Kokusen, H. & Honjo, T. (2002) Structural control of Schiff base ligands for selective extraction of copper(II). *Anal Sci*, **18**, 1351-1355.
- Outten, C. E., Outten, F. W. & O'Halloran, T. V. (1999) DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 37517-37524.
- Outten, C. E. & O'Halloran, T. V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalleregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, **292**, 2488-2492.

- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J. & O'Halloran, T. V. (2000)** Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. *J Biol Chem*, **275**, 31024-31029.
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A. & O'Halloran, T. V. (2001)** The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **276**, 30670-30677.
- Parkinson, J. S. (1993)** Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, **73**, 857-871.
- Patzer, S. I. & Hantke, K. (1998)** The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **28**, 1199-1210.
- Patzer, S. I. & Hantke, K. (2000)** The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **275**, 24321-24332.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (1996)** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*, **60**, 575-608.
- Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1997)** A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol*, **156**, 99-103.
- Pena, M. M., Lee, J. & Thiele, D. J. (1999)** A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*, **129**, 1251-1260.
- Petersen, C. & Moller, L. B. (2000)** Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene*, **261**, 289-298.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Volker, U. & Hecker, M. (2001)** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **183**, 5617-5631.
- Pfennig, N. (1974)** *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. microbiol.*, **100**, 197-206.
- Phadtare, S. & Inouye, M. (2004)** Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-*csp*-deletion strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **186**, 7007-7014.
- Pogliano, J., Lynch, A. S., Belin, D., Lin, E. C. & Beckwith, J. (1997)** Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev*, **11**, 1169-1182.
- Provence, D. L. & Curtiss, R. I. (1981)** Gene transfer in Gram-Negative Bacteria: Generalized Transduction in *E. coli* with Phage P1. *Gerhard, P. (Ed.) Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM, Washington, D. C.
- Puig, S. & Thiele, D. J. (2002)** Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 171-180.
- Raetz, C. R. & Dowhan, W. (1990)** Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **265**, 1235-1238.
- Raffa, R. G. & Raivio, T. L. (2002)** A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **45**, 1599-1611.
- Raina, S., Missiakas, D. & Georgopoulos, C. (1995)** The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *Embo J*, **14**, 1043-1055.
- Raivio, T. L., Popkin, D. L. & Silhavy, T. J. (1999)** The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol*, **181**, 5263-5272.
- Raivio, T. L. & Silhavy, T. J. (2001)** Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, **55**, 591-624.
- Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R., Jr. & Husson, R. N. (2001)** The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, **183**, 6119-6125.

- Rapisarda, V. A., Montelongo, L. R., Farias, R. N. & Massa, E. M. (1999) Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the *Escherichia coli* respiratory chain. *Arch Biochem Biophys*, **370**, 143-150.
- Rehbein, G. (2003) Charakterisierung neuer Transporter der RND-Familie von *Ralstonia metallidurans* CH34. *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Rensing, C., Mitra, B. & Rosen, B. P. (1997) The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14326-14331.
- Rensing, C., Ghosh, M. & Rosen, B. P. (1999) Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol*, **181**, 5891-5897.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. & Rosen, B. P. (2000) CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 652-656.
- Rensing, C. & Grass, G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 197-213.
- Rezuchova, B., Miticka, H., Homerova, D., Roberts, M. & Kormanec, J. (2003) New members of the *Escherichia coli* sigmaE regulon identified by a two-plasmid system. *FEMS Microbiol Lett*, **225**, 1-7.
- Rouviere, P. E., De Las Penas, A., Meccas, J., Lu, C. Z., Rudd, K. E. & Gross, C. A. (1995) *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *EMBO J*, **14**, 1032-1042.
- Rowen, D. W. & Deretic, V. (2000) Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol*, **36**, 314-327.
- Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol*, **11**, 841-847.
- Saier, M. H., Jr. (2000) Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol*, **182**, 5029-5035.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Scherer, J. (2003) Regulation von Schwermetall-Homöostasefaktoren in *Ralstonia metallidurans*. *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Schmid, A. K. & Lidstrom, M. E. (2002) Involvement of Two Putative Alternative Sigma Factors in Stress Response of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, **184**, 6182-6189.
- Schmidt, T. & Schlegel, H. G. (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol*, **176**, 7045-7054.
- Schnider-Keel, U., Lejbolle, K. B., Baehler, E., Haas, D. & Keel, C. (2001) The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 5683-5693.
- Schurr, M. J., Yu, H., Boucher, J. C., Hibler, N. S. & Deretic, V. (1995a) Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (sigma E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **177**, 5670-5679.
- Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Hibler, N. S. & Deretic, V. (1995b) Biochemical characterization and posttranslational modification of AlgU, a regulator of stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 874-880.

- Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Boucher, J. C. & Deretic, V. (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**, 4997-5004.
- Schwuchow, T. (1995) Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Siddiqui, R. A., Schlegel, H. G. & Meyer, M. (1988) Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J Bacteriol*, **170**, 4188-4193.
- Siddiqui, R. A., Benthin, K. & Schlegel, H. G. (1989) Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol*, **171**, 5071-5078.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology*, **1**, 748-791.
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C. & Montfort, W. R. (2004) Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **186**, 7815-7817.
- Smith, R. L., Banks, J. L., Snavelly, M. D. & Maguire, M. E. (1993) Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein. *J Biol Chem*, **268**, 14071-14080.
- Snavelly, M. D., Florer, J. B., Miller, C. G. & Maguire, M. E. (1989) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: $^{28}\text{Mg}^{2+}$ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *J Bacteriol*, **171**, 4761-4766.
- Solioz, M. & Vulpe, C. (1996) CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci*, **21**, 237-241.
- Sorokin, A., Zumstein, E., Azevedo, V., Ehrlich, S. D. & Serror, P. (1993) The organization of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome region between the *spoVA* and *serA* genetic loci, based on sequence data. *Mol Microbiol*, **10**, 385-395.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Stock, J. B., Stock, A. M. & Mottonen, J. M. (1990) Signal transduction in bacteria. *Nature*, **344**, 395-400.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. & Brown, N. L. (2001) CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol*, **39**, 502-511.
- Stoyanov, J. V. & Brown, N. L. (2003) The *Escherichia coli* copper-responsive *copA* promoter is activated by gold. *J Biol Chem*, **278**, 1407-1410.
- Taghavi, S., Mergeay, M. & van der Lelie, D. (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**, 22-34.
- Tam, C., Collinet, B., Lau, G., Raina, S. & Missiakas, D. (2002) Interaction of the Conserved Region 4.2 of sigma E with the RseA Anti-sigma Factor. *J Biol Chem*, **277**, 27282-27287.
- Tanaka, K., Kusano, S., Fujita, N., Ishihama, A. & Takahashi, H. (1995) Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing sigma 38 (the *rpoS* gene product). *Nucleic Acids Res*, **23**, 827-834.
- Testerman, T. L., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Libby, S. J. & Fang, F. C. (2002) The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol Microbiol*, **43**, 771-782.

- Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L. & van Der Lelie, D. (2000)** Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol*, **182**, 1399-1409.
- Ullmann, A. (1984)** One-step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene*, **29**, 27-31.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J., Konings, W. N. & Zehnder, A. J. (1994)** Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **33**, 1766-1770.
- Vandamme, P. & Coenye, T. (2004)** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**, 2285-2289.
- Vanechoutte, M., Kampfer, P., De Baere, T., Falsen, E. & Verschraegen, G. (2004)** *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**, 317-327.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982)** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, **19**, 259-268.
- von Rozycki, T. (2002)** Der ECF (extracytoplasmic function)-Sigmafaktor RpoE aus *Ralstonia metallidurans* CH34. *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle.
- Wang, A. & Crowley, D. E. (2005)** Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187**, 3259-3266.
- Wang, Q. P. & Kaguni, J. M. (1989)** A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **171**, 4248-4253.
- Weber, K. & Osborn, M. (1969)** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244**, 4406-4412.
- Weber, R. F. & Silverman, P. M. (1988)** The *cpx* proteins of *Escherichia coli* K12. Structure of the *cpxA* polypeptide as an inner membrane component. *J Mol Biol*, **203**, 467-478.
- Wei, Z. M. & Beer, S. V. (1995)** *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol*, **177**, 6201-6210.
- Worlock, A. J. & Smith, R. L. (2002)** ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, **184**, 4369-4373.
- Wösten, M. M. (1998)** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*, **22**, 127-150.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y. & Hutcheson, S. W. (1994)** Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol*, **176**, 1025-1036.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. & Ishihama, A. (2005)** Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **280**, 1448-1456.
- Yoo, D., Parker, M. D., Cox, G. J. & Babiuk, L. A. (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**, 437-442.
- Yu, H., Schurr, M. J. & Deretic, V. (1995)** Functional equivalence of *Escherichia coli* sigma E and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of *P. aeruginosa*. *J Bacteriol*, **177**, 3259-3268.
- Yu, H., Boucher, J. C., Hibler, N. S. & Deretic, V. (1996)** Virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the extreme-stress sigma factor AlgU (sigmaE). *Infect Immun*, **64**, 2774-2781.
- Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (2000)** Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol*, **37**, 219-225.

-
- Zhou, L., Lei, X. H., Bochner, B. R. & Wanner, B. L. (2003)** Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol*, **185**, 4956-4972.
- Zuber, U., Drzewiecki, K. & Hecker, M. (2001)** Putative sigma factor SigI (YkoZ) of *Bacillus subtilis* is induced by heat shock. *J Bacteriol*, **183**, 1472-1475.

Tabelle: putative ECF-Sigmafaktoren von *C. metallidurans* CH34

Gen	Annotation 17.12.2004		DNA-Sequenz	putative Proteinsequenz
	Contig	Gen		
<i>sig534</i> (<i>rpoE_{cm}</i>)	188	271	GTGAGTGAACGCGAAAGCCGATCAGCTTCTAGTTGAACGCGTCCAGCAGGGCGACAAACGGG CCTTTGAGTTGCTGGTACCACAAATACCCGCAAGATCATCCCGCTGATCTCCCGCTTGTCC GAGACCCCGCAAGTGGAGGATGTGGCGCAAGATGCTTTATCAAGGCATATCGCGCGCTG CCCCAGTTCGGGGCAATCCGCTTCTACCGTGGCTGTACCGGATCGCCGTCACACCGC CAAGAACTACCTGGCCACCCAGGACGGCGCGGAAAGGCTCCAGCGATATCGATGCCGAA GAGGTGAAACTTTTGGGACGGTGAGCAACTAAAGGATATCAATACGCCGAGTCCGATGCT CCACACGCCAGTTTGGGATACGGTGAAACCCGCCATGGAGGCATGGCCGGAAGAAATTAC GCACCGCCATTACGCTGGCGAGATCGAAGGCCCTCAGCTATGAGGAGATCGCGGAGGCGAT GGGTGTCGATCGGTACGGTGGCTCGGGATTTTCCGGGCGCGGAAAGCGATCGCCGAGAG AGTTGGCCCCGCTGCTGGAAACGGCAGAGGGCAAGCGGTGGTAG	MSEREADQLLVERVQQGDKRAFELLY TKYHRKIIRLISRLVRDPAEVEDVAQD AFIKAYRALPQFRGESAFYTWLYRIAV NTAKNYLATQRRRPEASSDIDAEAEET FADGEQLRDINTPESMLHTRQVADIV NNAMEALPEELRTAITLREIEGLSYEEI AEAMGCPIGTVRSRIFRAREIAIEKLRP LLGTAEGRKW
<i>sig345</i>	222	4633	ATGGCAAAGGCCAAAGCAACCGAAGGGGTAGCCGTGTAAGGGCCCTCCAAAAGCTCCCCAAT CAGGAGCGGCAAGGCGTCCGTGAAACAACCGGGCGAAGACATCGACCCGCTCATGTCAG GACGACATCAGCCCGTCTGCGCAACAAATCCGCGGAGCGCAACTGGCGCCCGCGGAT CCAATCCCGCAGGAATCGCATCCGAATAATCAAAGCCCTCGACTTCGGCACGCGAGAGC GGCAAGAGCCCAATACAAAGCGGCAAGAGCGCGTGCACCACTGAAAGGCAAGATATCA CCGTGGGAAACAGCAATAACCGAATCGGAGAGCAAGCGTGGGCAACGACGCGCCGCGCAC ACGGAGTGGAGGCGCAAGGCAAGGCAACACCGCTACCGGACGCCCAAGGCCGTCGCGCG ACTCCCGACCCGTTGATCCGAGCGTCCCGCCGCTCCCGCCGCTCAAGCCGAGCCGAAAGAA GCGTGGCCGCAAGCCCAAGCCGAGATGCAGCAAGACAGCACCATCGAAGACGTGACT GAAAGTTTTACGACAACGACGCGCCGGTACCCCTGCCGTCGCGCCCAAGCCGAAAGCA GAAAGCCAAGGACCGCAAGGCAAGGAAAGGGCGTCTCAAGGAAATTTGCCCTCGTCGAAAT CAGGCTGTAGGAGGAAGAGCTCGAGATCCGTGCCAGAAAGTCAAGGCGCTGATCAAGC TCGGCAAATCGGTGGTACCTGACTATGCGGAAATCAACGATCACCTGCCGACGACATG GTCGATTCGGAACGATCGACACGCTGGTCCGACCGTCAAGGAAATCGGATCGCCGCTCA CGAACAGGCGCCGATGCCGAGCGTGTCTACGACAACGCAACGCTCGCCGACGAGC GAGGAAAGGCGCGAAGAAAGCCGAGCCGCTGTCCGACCGTGGACTCCGAATTCGGCC GCACCAAGCCCGTCCGATGATGCGTGAATGGTACCGTGGAACTGCTGACGCGCG GAAAGGAAATCGAAATCGCAAGCGCAATGAAAGCGGCGTGAAGGACATGGTATGCGCA TCTCGGCTGCCGCTACGATCTCCGAAATCTTGCCACGCGCGAGCGGTCGCGGAAACGAA GAGATCAAGATCGAGAGTTCGTGATCGCTCGATCGACCCCAAGCAGAGGAAAGTCCAGG ACAACTCCCGGCCAGCGGTAAGCCCGGATGACAGGACGAGGACGATTCGGACGAAACGG CGACGACGCGGAAAGGAAAGACGACGAAAGCGGCGGTGGCGCGGTCGCTCGGTCGCGCAG CTCGAGGAACTGAAGTTGCGCGCTGGAAAAATTCGCGTGTATCGCCGAGCAGTTCGACAA GATGCGCGCTGCCTCGAAAAAGGAGGCTCAAAGTCAAGCCGTAACGTAAGGCCCAAGGAA GCTATCCAGGCCGAACTGATGAGCAATCGCTTCAACCGCGCGTAACGTCGAGCGCTGTGCGCA	MAKAKATEGVAVKAPSKAPQSGSGK ASVKTTAAKTSTASVRTTSARSAPAKS ARSATAPAGSARSARNRSENTKPSTSA RESGKSANTS GKSAAPVKGKSITVAK QONTEVESKRAATTAGTRSGGAKAGT TATATPKARAATPAVASERPAAPAV KPEPKRKRKPKAEMQQDDSTIEDVT EEFYDNDAPATPAAAPKTEKQKAKDR KAKEKALLKEFASNQAGSEEELEIRR QKLIKALIKGKSRGYLTYAEINDHLPD DMVDSETIDLVALINDIGIAVYEQAP DAETLLNDNAPSATSEEEAEAEAA LSTVDSEFGRITDPVRMYMREMGTV LLTREGEIEIAKRIEAGLKDMVMAISAC PVTISEILASAEVANEI KIDIEFVDGLI DPNAEEVQDNSPAQA VAADEDEDEDSD EDGDDGEEEDDES GGGAGASARQLEE LKVAALEKFRVIAEQFKMRRAFEKE GYKSPYVKAQEAIQAE LMSIRFARN VERKCDTLRGQVDEVKLERAILNIVV DKCGMPRADFVARFPNETNLDWIQT IVADNKSYSYTIVERNVPVAVHELQOKLI DLQSRVVLPLKELKDVNRKMSGEKRR AREAKREMTANLRLVISIAKKYTNRG LQFLDLIQEGNIGL MKA VDKFEYRRGY

Gen	Annotation 17.12.2004		DNA-Sequenz	putative Proteinsequenz
	Contig	Gen		
			<p>CACGCTGCGTGCCAGGTGGACGAAGTGGCAAGCTGGAAACGGCCATCCTGGAATATCGTCCG TCGACAAGTGGGCATGCCGGCCGACTTCGTGGCCGTTCCCGGGCAACGAGACGAAAC TTGGATCGATCCAGACCATCGTGGCCGACAAACAAAGTCTGACAGCACGATCGTCCGAGGTA CGTGCCCGCCGTGCAGAGCTGACAGCAAGTGTGACGATCGACTGCACTCGCGGTGGTGGTGC CGCTGAAAGAACTGAAAGGACGTCATCGCAAGTGTCCGAAAGGCGAGAAAGCGCCCGGA AGCCAAGCTGAAATGACCGAGGCCAACCTCGCTGTGGTGTCTCGATCGCGAAAGAAAGTACA CGAACCGCGGCTGCAGTTCTGTGATCTGATCCAGGAAGGCAACATCGGCCTGATGAAAGGCG GTGGAACAAGTTCGAATACCGTCCGGGTACAAGTCTCCACGTACGCCACCGTGGTGGATTCCG CCAGGCCATCAGCGCTCGATCCCGACAGGCTCGTACCATCCGTAITCCGGTTCACATGAT CGAAACGATCAACAAGATGAAACCGGATCTCGGCCAGATCCTGCAGGAAACCGGGCAACGAG CCGGATCCGGCAAACGCTGGCTGAGAAAGTGGAGATGCCGAGGACAAGATCCGCAAGATCA TGAAGATCGCCAAAGAACCGATCTCCATGGAAACGCCGATCGGTGACGACGACGATTCGCAT CTGGGCGACTTCAATCGAAGACAGAACACGCTGGCCCCGGCGAGGCTGCGCTGGATGGCTC CATGCGGACGTGGTCAAGGACGTGCTGACAGCTGACGCGCGCGAAAGCAAGGTGCTGC GCATGCGTTTCGGCATCGAAATGACACCGGACCAACGCTCGAGGAAGTCCGGCAAGCAGTTT GACGTGACGCGGAAACGATCCGCCCAGATCGAGGCAAGGCCACTGGGCAAGCTGCCGCCACC CGAGCCGCTCCGACAAGCTGAAGAGCTTCTCTGGAAGGCAACTAA</p>	<p>KFSTYATWWIRQAITRSIADQARTIRP VHMIEITINKMNRISRQILQETGNEPDP TLAEKMEMPEDKIRKIMKIAKEPISME TPIGDDDDSHLGFIEDTNTLAPAEAA LDGSMRDVVKDVLDLTPREAKVLRM RFGIEMSTDHTLEEVEVGKQFDVTRERIR QIEAKALRKLHPSRSDKLSFLEGN</p>
sig538	202	2067	<p>ATGGGTGCACATACATATTCGAAGCGATCACCCCTGAACCTCGTGACGATGTTGATCGA TCAAATCTCCGGCAGTCTCGCTGCATGAAGCCCGTCCCGAGCGCCCGGCATGGAGGC GATGGATCGGTGAGCAGCGCCCTGCGTGGCTGCTCTCGCCCGCCCTGGGTGGCGATCAGG CCGCCTATCATGCTTCTGACCGAATGACCGCCCGCTGCGGCCCTTTGTCGGCGCGCGG TCTATCAGTTGCAGGATGAAGTCGAGGACATCGTCCAGGAAACGCTCTGGCGGTGCACAAC GCCCGGCACACCTACCGCCCGAGGAACCGCTGACGGCGTGGGTCTACGCGATTGCCCGCTA CAAGCTGTGGATTTCTGCTAGCCGTTCCCGTACGGGGCGACGGAGTCCGCTGGACCGATG TCGCGGACATCCTCTGCCATAGCGACGACGGCCGGCAGCATGACAGCATCGA.CCTGAGC GGCCTGCTCGAGCAACTGCCGGAACAGCAGCGGCTACCGATCCTGCACGTGAAACTGGAGG GCCTGTCCGTTGGCGGAGACCGCCCGGCTGACGGGGCTGTCCGAAATCGGCGGTCAAGGTAGGT ATTCATCGCGGGCTCAAGGCATTGGCCCGCCAAAGCCCGCCTGTTCCACATCATGA</p>	<p>MGALTYHFEAITPEPRDDVDRSNLRV VACMKPAPERAGMEAMDAVEQRLRA LLLAGLGGDQAAAYHAFLELTGLRLA FVRRRLYQLQDEVEDIVQETLLAVHN ARHTYRAEPLTAWVYAIARYKLIDF LRSRHRGATESLDDVADILCHSDDAP AHDARLDLGLLEQLPKQRLPLHVK LEGLSVAETARLTGLSESAVKVGIHRG LKALAAKARLFTS</p>

Gen	Annotation 17.12.2004		DNA-Sequenz	putative Proteinsequenz
	Contig	Gen		
<i>sig562</i>	205	3313	TTGACGCCGCAACACGCCGCCGCTTCGACGACCTGGTGTGCTGCCGCATCTGGACGCCGC CTACAACCTCGCCCGTGGTTATCGGCAATCCGGGATGCCGATGACGTGGTGCAGGAAG CATTCCTGGCGGCTCCGGCTGTTCCGCACTCCCGGCGACCAAGCCCGCCGCTGGCTGC TGCCATCGTGCCCAACAGTGGTTCAACACTGGCAGAACGCAAGGCCGCGCCGAGGT GGAGTACGACGAAACGCCGCCCGGCTGACTACCCCACTGGCATGGCATGGCCGCCGCCGAC CCGAGCAATGGCTGGTGGCAGGAGTGGCATGGTGCATGCCGCTGGAGCGACT GCCGCTGTTCCGGAGGTACTGGTGTGCCGAACCTGGAGGAACTGCATTACCGGACA TCGCACGATCGCCGATATCCGTCGCAACCTGATGTCGCGCTGGCACCTGGCAGCGGA ATGCTGGCCCGCCGCTGGTGGCCTGGCGACGAAGGCCGCGTACGGCTGGCACATCCCGA CGCCCCAACACCCCAACGCCCGGCGGATATCGTTCAACCCCGCAGGAGGCAACCCGCCATG GACTGCAATGA	MDAANTRRRFDDLVLPHLDAAYNLA RWLCGNPGDADDVVQEAFLRAFRLFG SFRGDQPRPWLAIIVRNTWFTTWQKR KAAAEVEYDEAAPGELPDWHGGPGD PEQWLVRDEDVRLVHAALERLQV EVLVRLRELELHYRDIARIADIPVGT MSRLARGRRMLAAAVVRDEGAVR LAHPDAPNTANAPADIVQFAGGTRHG LQ
<i>sig588</i>	219	4156	GTGGCCCTGCCCGAACTCTCTTCGTTGCCCGCACCCACGGGGTTGATGTAATTG CTCGGCCGGTGGCGTTGGGGATCGGCTGGCGTGGCGCTTACGATCAGGTCGTGCC GAACTGTTCCGGCTCGGCTGCGTATCACTCGAGGCTGACTGGCGGAGGACGTGGTGC AGGAGATTTTGTGAGCATCTGGCACACCGCCGCAATACCACCCAAAGTGGCCGCTCCG ATGACGTGGATGACGACGATTTGGGCAACCCGGCGCTCGACTGCTGGCCGGCGCATGT GGCGCGCTGGCATCGCCACCTGCTGAGGACACCCCGAAGCCGATCTGAAAGACGAA CAGCATGTCGGTGGAACTGGCACAGGCCAGCAACCCCGCCGCTGAAACCGTTGCTC GCAGCCCTGGAACGCCAGCAGCCGAGCGGCTGGTGTGCTGACCTGCAGGACCTCAGCC ATGCCGAACTGGCCCGCGGCTGGCGCTGGCGCACGATCAATCGTGGATCCCGCCGT GGTCTGGAGAACTGCTGGCGCCTGCCTGGAGGCCACGCCATGA	MASSDATGDVGRVAGDRARA YDVV KGARTRRRDWADVSVSWHHAADYR VAAMTWMTTVRNRADCRRAHVARAS ATSDTADDDHGVAAARANRCDGR AVVAYDSHAAARRVGTKSRRRGKRA CATVASSSDATGDVGRVAGDRARAY DVVKGARTRRRDWADVSVSWHHA ADYRVAAMTWMTTVRNRADCRRAH VA
<i>sig593</i>	201	1691	GTGATGGTGGGACCGCGGCTTTCGGAAGCCCGGGCGGCTTCGAGCCATTCGGGCCAA GCTGATCCGCGTCGCTACCGGATGCTCGGTTCGGTTCGGGATGCGGAGGACGCGTGCAGG AAGGTTTCACTCGTTGGATGAACGCCGAGCCGCGGAGGTCGGTGTGCCGAGGGCTTCCTG CGCGCATGGTGA TGCGGATGTCCTCGACGAGTGAATCGGCGCTCACAGCGGAAAC CTACATCGGTCCCTGGTTCGCAACCGGCTCATCGAGGAAAGGAGCAGGACGACGTCACGC TGCCGCTGATGCTGGCGTCGAAACGCTCTCGCTCCTCGAGCGGCGGCTTCCTGTCGACG ACGTGTTCCGCTCGCTCGATGAGGTGGCGGACGATCCAGCGGCGAGCCGCGGCTGC CGGACGTTGGCGCGCGGCGCTGCAATGTGAGGGAATCGCGCTCCGCTTCAGCTCGA GAAAGAGCGGGCTGGCACTCGAAAGGATTCGACGCTCACGACGCGAGACATG GGCACGCTCAGCACGATGCTGGCGGCGATGTGAGCTGCATCGGACGCGCGCGGCCAGC GCCCGGCTGGCCATCCGCTGCTGGCTTCGACGAGGTAATGCTGTGCATGAACAACCTG TCGAAATCTTCCAGAAATGCTGACCTTTGCTCGCGGCTTCATCAACGGGTTGCCG GGCATCGTCACGCGGAAATCCGACGGCGAAGCTGCAGACGCGGCTAGAGATCGAGGGCG GCAAGATCGCGCAATTATGTTGGTGGCAACCCCGCAAGCTGCGGCACTCTGCATTA	MMVADAGSAAASRKRVAYRMGSVA DADV ARWMNARAVRARRMVMR MCDKSARHRTYGDVDDVDMARSRA AHDVGDVAATRAACRAARANVR SRRVVKRAKADASRSDMGSTMA ADVSHADGGGAGHVGDMRMRVHSHY KNGSTVRAANGVTTRSDGTAGGKA AYVVRNDRHHRVADAGSAAASRK RVAYRMGSVADADVVARWMNARAV RVARRMVMRCDKSARHRTYGDV DDVTMARSRAAHDVADVAATRAAC RAARARANVRSRRVKRGA

Gen	Annotation 17.12.2004		DNA-Sequenz	putative Proteinsequenz
	Contig	Gen		
<i>sig605</i>	205	3608	ATGCCACCGATCAGGAACCTCCCGACTTCTCGCAGCGCTGGACGACGCGCCTTCAAGCA GGCCGTGTTCCCGTACGGGACGACGAAGCCGCTGGACATCGTGCAGGACGCCATGATCA AGCTGGCGGAGAAATACGGCGACAATCTGCCGAGAATCCCGCTCTGTTCACGCGCATC CTCCAGAACACAATCCAGACTGGTTCGCCAGAAAGCTGGCAACAATTGGGTGACGGCT TTTTTCGAACCTGGCGACGAGCGGAGGGCGAGATAGCGACTGCTCGACACATTTGGAAG CCCAAGCCGACCGAGATGGCAGAAAGCAGCGCCGACAAGGTCGACCGCGCAGATCAT GCATATCATCGAGCAGGAAATCCAGCGTCTGCCACGCGTCAACGCGAGGCTTTCCTGATGC GTTACTGGGAGGATATGGACGTAGCCGAAACAGCAGCCGTGATGGGCTGTTCAGAGGGCAG CGTCAAGACGCACGTTCCTCCGTGCAACGCATACTCTGGCGCAAGCCTTGGCGCGCGGGGG TCCGACTATGA	MATSDASVRRRAKAVAVRDDAADVD AMKAKYGDKSAARNTHDWRKVRN TWVTSNRDRGDDSDDTAAATGMASAA DKVRAVMHRTRRAMRYWDMVATA AVMCGSVKTHCSRAHTAARARG VRMATSDASVRRRAKAVAVRDDAAD VDAMKAKYGDKSAARNTHDWRKRV RNTWVTSNRDRGDDSDDD
<i>sig611</i>	202	2163	ATGGATCCAGGTACCCGTTCCGAGGTCCGATGTCCTTACAGCCCGCATCACGCGTGGCTGCA AGGCTGGCTGTTGCGAAAGAATCGGCAATGCATCGGATCGGCGGGAACATCGCCAGGATGTAT TCGTCAGGGTGTCTCACAGGAAGTCTCGAGATCCGTGAGCCCGCACCCTACCTGGGCACC ATTGCCAATGGGCTGGTCAATCGATTTCTGGCGCGGGGAACTTGAGCAAGCATGGCTGGA GACGCTGGCTCAATGGCCGAAAGCACAATACGCCATCGCCGAAAGCCGTCTGCACTTCCTGC AGACGTTGATCGAGATCGATCAGATGCTCGATACGCTGAAGCCGACGCGCGACGGCATTC CTGCTGGCGCAGCTCGACGGCTGACTTGCCTCCGAGATCGCGGAGCGCATTTGGCATGTCGCT GGGACCGTCCGAGCGGTACATCAGCCAGGCGCTGCGCCGATGCTACGCGTTGCAGTTCCGGCG CTTAG	MDPGTRSQVDVLYSRHHAWLQGWLL RKIGNACDAADIAQDVFVRVLRKVV EIREPRTYLGTIANGLVDFWRRRELEQ AWLETLAQLPEAHTSPESRLHFLQTLI EIDQMILDILKPNARIAPLLAQLDGLTC PQIAERIGMSLATVERYISQALRRCYAL QFGA
<i>sig679</i>	195	848	ATGGAACCGTTTGAAACGTCAGTTGGTGGTACTGGCGCGCGCTTTGGCGCGCCATGCCCGTGG TCTGACCCGGCATGCCATGCTGGCCGACGATCTCGTGCAGGACACCGCTTGAGCGTGCCTGC GTTATCGCTGGAGATTCGCTTCGCCCCGGCGGTTATGGGCGGATGGCGCGGATGGGCTG CTGCCGTGGTTACTGACCCCTGATGCATCGGCTGCGCTGAAATCACTGCGCAAGAGTGTATGC GTGACCGCAATGGATACGCTGCGCGAGGTGGTTGCCCATACCGCCGACCTCGGCCTGCGTCCG CGATCTGTTACAGGCATCGGCCAGTTACCGGAGCCACAGCCGCGGCTGCTGCTCGTCA GCCTGGAGCAGTTCGTACGCCGAGGCCGCGAGGGTGTCTCGACGTTGCCGATCGGCAACCGTG ATGTCGCGCTGGCGCGCTCGCGAAACATATGCGTCCGCTGCTGGATGGCGCGCGCGGATGG TGCTGGCGCAACAACCTTCGTTGCAGCGGGTGAATGA	MEPFERQLVVLAPRLRRHARGLTGDA MLADDLVQDTLERALRYRWRFLRPG ALWGDGADGLLPWLLTMLHRLRLNH LRKSDVVTAMDITLPEVVAHTADLGLR RDLLQALGQLPEPQRAVLLLVSLQFS YAEAARVLDVPIGTVMSRLARAREHM RRLLDGGADGAATTSLQRVK

Gen	Annotation 17.12.2004		DNA-Sequenz	putative Proteinsequenz
	Contig	Gen		
<i>sig680</i>	205	3810	<p>ATGGCCTCGACGGCCCTGCGTGCCTCGGCTGTACGTGCACACTACCAAGGAGCTGGTCCGGTAC CTGGACGGCAGGCTCAGCAATCGGCACGAGGCCGAGGACCTGTGCGAAGAAGCCATGCTG CGCTGTGGAAGCCCGGTAAACGCCAGCAGCCACGCCCTATCTGCACAGACGCCCGG CAATATCCGGATCGACACCTTCCGCAAAAGAGACGGGACGAGCACTTCCCGCTTGACAGCA TCAGTTCGATTACGCACCTCCGAAATCCCGAGCCGACTGCATGCCGTGCAAGGTGCTC GCGGGCTGGAGCGCGCTGGCCAACTGCCCTTGAAGTCCCGCAGGCTTTATCTGCGCA ACGGCTGGACGGGTGCTCCAGCAGGAAATCCCGAGCGGCTGAAATATCTCGAAGAACATG GTCGAGAAAATACATGATTCGCGCGATGCGACACCTGCGCGACCAACTGGGCCAACTCTCACC TCACTAG</p>	<p>MASTRRAGYVHYVGTWTRRSNRHAD SAMRVARVTRAYHTARNADTRKRDDG VHDSHSHASGNADHVVVAGRAAKCR VWRDGCSSARNKSNMVKYMRAMRHR DGSMDASTRRAGYVHYVGTWTRRSN RHADSAMRVARVTRAYHTARNADTR KRDGHDSHSHASGNADHA</p>
<i>sig681</i>	203	2675	<p>GTGAAGGACTTGTGCAACAGGTCGAAACCGATGATTCGGCGGCTTGGCCCGCTATGCCCGCGC GCTATTGGCGGAGCAGGCGCGGACGATCTCGTGCAAGGACTGCCCTGGAAAAGGTCATCA CGTACTGGGACAGCCCGCAACCGCGCAGACACCCGTAGTTGGGTATTCGCCATCCTGCAT AACCTTGGGATGACGGCCCTGCGCCCTCATGCAAGCGCGCAAGGTTGCACGTTGGCGATCGA CGACGTGGCGGAGTCCCTCATGACCGTGGCCGCGCCAGGAGACGCACTGCGTTATCGGG ACCTGCTGAGCGCGGTGATGCCCTTCCCGCCGAAAGCGCAGTGTCTCCTGCTGGTCTCGG TGGAGGAGATGTCGTACGCCGAGACCGCACGCTTCTTGTAGATTCCCGTCGGCACCGTGATG TCGCGCCTGTCTCGCGCGGGAAAACACTACTGAGGCGAGATGGAACCCCGCCCTGAAAGCGCG CCCCGACATCCGGACTGCGGAGGGTCAAATGA</p>	<p>MKDLLQQVEPMIPALRRYARALLREQ AAADDLVQDCLEKVITYWDSRRNRAD TRSWVFAILHNLAMTALRRHSAOQL HVAIIDVAVESLMTVPPAQEDALRYRD LLSAVDDALPAEQRSVLLLVSVVEEMSYA ETARILEIPVGTVMSRLSRAREKLLRQ MEPGLKAAPTSGLRRVK</p>
<i>sig697</i>	222	4899	<p>ATGGCCCGGACGGTGGCCACATCAGGATATCCAAAGCGCTCTACAGCTGCCACCATCGCTG GCTGCTCGGCTGGTGCATCGGAAGATCGGCTGTGGCACCCGCTCAGCCGATCTCGCACATG ACACCTTCATGCGTCTGTGGCGGTGAGAAAGCCCTGGCGATCGCCGAAACCCCGCGGCTC CTGACGACCGTCCGCAACCGGTGCTGGCCAAACAGTGGCGACGCGAGAAAGCTCGAGCAGG CGTATCTGGAAGCCCTCGCCAGCCCGCGGCGCACTGGCTCCTTCCGAGGAAGAAGCGCGG ATCCTGCTGAAACCCCTCAACGACATCGTGAACGGCTCGACGGATTGCCTGTGGTGGTCAA GCGCGGTTCTGTGAGGCGAGCTCGAAAGGCCAGAGCCAGGCCGAAATGCTTCCCGCTTGC GAAATCTCGGTGACGACGGTCAAGCGCTACTGTGTTGCGCGCCGGCAAAAAGTGTCTATTTCGGG ATGTCCTCCGCATGA</p>	<p>MAADAGPHHDIQALYSCHHRWLLGW LHRKIGCWHRSAADLAHDTFMRLARE EALAIAPRAFLTTVAQRVLANQWRR EKLEQAYLEALASRPAAALAPSEERAI LLETLDIAERLDGLPVVVKRAFLMA QLEGQSQAELIASALRISVTTVVKRYLVR AGTKCYFAMSLA</p>

Danksagung

Allen voran möchte ich Professor Dr. D. H. Nies für die Überlassung des interessanten Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, danken.

Herrn Professor Dr. J. R. Andreesen danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut zu arbeiten und die anregenden Diskussionen in Rahmen unserer Montagsseminare.

Meine Arbeit wurde anfänglich im Rahmen des Graduiertenkollegs „Stress“ der DFG unterstützt. Deshalb möchte ich nicht vergessen, mich bei allen Verantwortlichen und Kollegiaten zu bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Gregor Grass. Ohne deine Anregungen und dein Interesse wäre das „*E. coli*“-Projekt wohl nicht so erfolgreich gewesen.

Ein ganz liebes Dankeschön auch an die fleißigen Korrekturleser meiner Entwürfe: vor allem Sebastian, der wirklich alles lesen musste; Sylvia, Antje und Gregor, die mir viele nützliche Tipps und Anregungen gaben und Kerstin für das finale Lesen.

Allen Mitgliedern der Labore 312, 313, 314 und 315 (besonders Ede, Antje, Sylvia, Gregor, Susi, Grit, Annett, Conny, Judith, Nadine, Markus und Daniel) danke ich für ihre Anregungen, die Etablierung verschiedener Methoden und das angenehme Arbeitsklima.

Vielen Dank auch an meine beiden Diplomanden Judith und Torsten. Ich hoffe, ihr behaltet mich trotzdem in guter Erinnerung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Grit Schleuder für die Stammhaltung, für ihre Hilfe und den Spaß, den wir hatten.

Bei Frau Dr. Cornelia Große möchte ich mich vor allem für die MicroArray-Analysen im Rahmen des *E. coli*-Papers und die Einführung in das Laborleben während meiner Diplomarbeit bedanken.

Meinen Freunden, vor allem Britt und Kerstin, danke ich für die Zerstreuung nach der Arbeit und die moralische Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken-meiner Familie. Ihr habt mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Vielen Dank.

Sebastian, dir danke ich für deine unerschütterliche Liebe, deine Anregungen und sogar für deine Kritik! Und Isabella für ihr Lächeln jeden Morgen.

Lebenslauf: Monique Egler

Persönliche Informationen

Geburtstag 13.05.1977

Geburtsort Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Familienstand ledig

Kind Isabella Monique Egler
geb. 16.10.2004

Schulbildung

09/1983-07/1991 POS Arthur-Becker / Gablenzer Schule, Chemnitz, Sachsen

09/1991-07/1995 Georgius-Agricola-Gymnasium, Chemnitz, Sachsen, Abschluß: Abitur

Studium

10/1995-12/2000 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Halle / Saale, Sachsen-Anhalt

09/1999-10/1999 Diplomprüfungen in den Fächern: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und
Tierphysiologie

11/1999-12/2000 Diplomarbeit zum Thema: „Das regulatorische Zweikomponenten-System
CzcRS aus *Ralstonia metallidurans* CH34“
Abschluß als Diplom-Biologin (Note: gut)

seit 01/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie im Fachbereich Biologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Halle, den 31.08.05

Monique Egler