

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> Δ M15	(Vieira und Messing, 1982)
ER 2566		F λ <i>fhuA2</i> [lon] <i>ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> $\Delta(mcrC-mrr)$ 114::IS10 R(<i>mcr-73::miniTn10—TetS</i>)2 R(<i>zgb-210::Tn10</i>) (<i>tet</i> ^S) <i>endA1</i> [dcm]; 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-run-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 elektrokompenter 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 Phagenabsorbktion 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 pipettiert. 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 Proteinmolekulargewichten 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 [α^{32} P]UTP nach Beck (1997)

Alle Versuche wurden in einem Gesamtvolumen von 40 μ l durchgeführt. Es wurde zunächst 1 U *E. coli*-RNAP-Holoenzym bzw. 1 U *E. coli*-RNAP-Coreenzym (Biozym) und 0.1 μ g Sigmafaktor mit 4 μ l 5 x Transkriptionspuffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.75 M KCl, 2 mM K₃PO₄, 0.5 mM DTT, 0.05 mg/ml BSA] versetzt und bis zu einem Volumen von 20 μ l DEPC-behandeltes H₂O_{bidest} zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μ l 5 x Transkriptionspuffer, 2 μ l NTP-Gemisch (MBI) [Endkonzentration pro Nukleosidphosphat 1 mM], 1 μ Ci [α^{32} P]UTP, 1 μ l RNase-Inhibitor (50 U/ μ l, MBI), DNA-Matrize [Enkonzentration 20 nM] ad 40 μ l DEPC-behandeltes H₂O_{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 μ l Probenpuffer [ad 10 ml Formamid: 10 mg Xylen Cyanol FF, 10 mg Bromphenolblau, 200 μ l 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 μ l	10% APS
	11.5 μ l	TEMED
	11.5 ml	DEPC-H ₂ O

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.