

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und  
Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Transkriptionsregulation der  
Arsenresistenzdeterminanten in  
*Halobacterium salinarum R1*

Christoph Schwarz



aus Linz  
2010

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 24.09.2010



.....  
Christoph Schwarz

Dissertation eingereicht am: 18.07.2010

1. Gutacher: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
2. Gutacher: Prof. Dr. Dietmar Martin

Mündliche Prüfung am: 21.08.2010

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1	HALOBACTERIUM SALINARUM .....	5
1.2	ARSENRESISTENZ .....	5
1.2.1	<i>Mechanismen der Arsenresistenz</i> .....	5
1.2.2	<i>Arsenitmethylierung</i> .....	7
1.3	ARSENRESISTENZ IN <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> .....	9
1.4	TRANSKRIPTION IN ARCHAEA .....	9
1.4.1	<i>Basale Transkription</i> .....	9
1.4.2	<i>Archaeales Chromatin</i> .....	11
1.5	REGULATION DER ARCHAEALEN TRANSKRIPTION .....	11
1.5.1	<i>Regulation der lytischen Gene im Halophagen PhiH</i> .....	12
1.5.2	<i>Regulation der Gasvesikelbiosynthese</i> .....	12
1.5.3	<i>Das Bakteriorhodopsin Regulon</i> .....	13
1.6	TRANSKRIPTIONSREGULATION DES ARS-OPERONS IN <i>E. COLI</i> .....	14
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>17</b>
3.1	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....	17
3.1.1	<i>Kultur und Stammhaltung von Halobacterium salinarum</i> .....	17
3.1.2	<i>Agardiffusionstest</i> .....	17
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	17
3.2.1	<i>RNA-Isolierung aus Halobacterium salinarum</i> .....	17
3.2.2	<i>Qualitativer Nachweis der RNA-Integrität mittels Kapillarelektrophorese</i> .....	18
3.2.3	<i>Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA</i> .....	18
3.2.4	<i>Northern Blot Hybridisierung</i> .....	18
3.2.5	<i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i> .....	19
3.2.6	<i>Bestimmung von Transkriptionsstarts mittels Primer Extension</i> .....	19
3.2.7	<i>Bestimmung von Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE</i> .....	20

3.2.8	<i>Transkriptionsanalyse mittels Microarray-Hybridisierung</i> .....	20
3.2.8.1	Herstellung und Prozessierung von Microarrays.....	20
3.2.8.2	cDNA-Synthese und Hybridisierung.....	21
3.2.9	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> .....	22
3.2.10	<i>Qualitative RT-PCR und quantitative Echtzeit-RT-PCR</i> .....	22
3.2.11	<i>Klonierung von PCR-Produkten</i> .....	23
3.2.12	<i>Klenow-Polymerase-Behandlung</i> .....	23
3.2.13	<i>Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	23
3.2.14	<i>Ligation</i> .....	24
3.2.15	<i>Verwendete Mutageneseverfahren</i> .....	24
3.2.16	<i>DNA-Sequenzierung</i> .....	24
3.2.17	<i>Präparation kompetenter Zellen und Transformation in E. coli</i> .....	25
3.2.18	<i>Transformation von Halobacterium salinarum</i> .....	26
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	27
3.3.1	<i>Heterologe Expression und Aufreinigung von 6 x HIS Proteinen</i> .....	27
3.3.2	<i>Rückfaltung und Dialyse von rekombinantem Protein</i> .....	28
3.3.3	<i>Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese von Protein</i> .....	28
3.3.4	<i>Silberfärbung nach Blum (1987)</i> .....	28
3.3.5	<i>Thiolgruppenbestimmung</i> .....	28
3.3.6	<i><math>\beta</math>-Galactosidase Reporter Assay</i> .....	29
3.3.7	<i>Präparation halobakterieller Zellfreiextrakte</i> .....	29
3.3.8	<i>Analytische Gelfiltration</i> .....	30
3.4	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN.....	30
3.4.1	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i> .....	30
3.4.2	<i>Circular Dichroism (CD) Spektroskopie</i> .....	31
3.4.3	<i>Thermische Denaturierung</i> .....	31
3.5	VERWENDETE MATERIALIEN .....	32

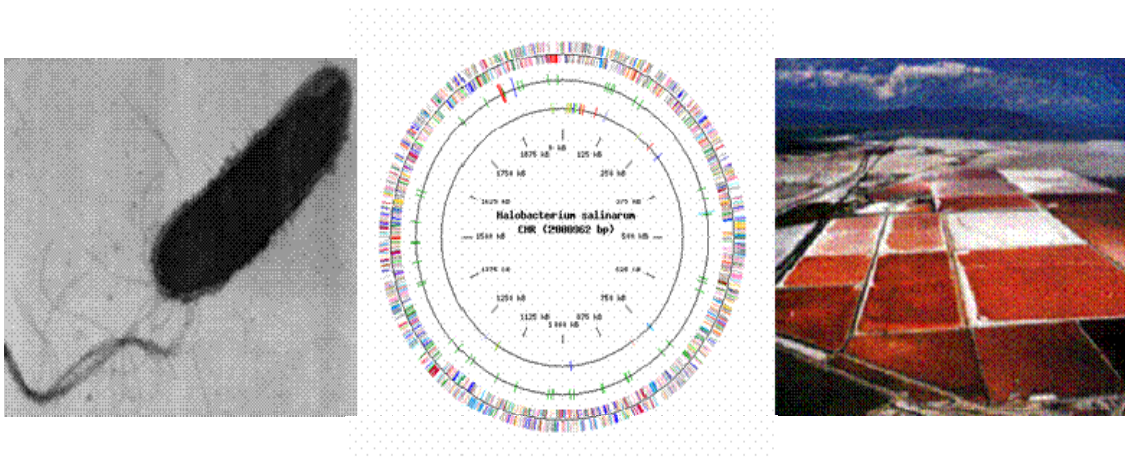
3.5.1	<i>Geräte</i> .....	32
3.5.2	<i>Verwendete Enzyme und Kits</i> .....	32
3.5.3	<i>Verwendete Reagenzien</i> .....	33
3.5.4	<i>Computerprogramme und Datenbanken</i> .....	34
3.5.5	<i>Bakterienstämme und Plasmide</i> .....	34
3.5.6	<i>Verwendete Oligonukleotide und Primer</i> .....	36
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
4.1	ASIII/SbIII-STRESS: GLOBALE VERÄNDERUNGEN.....	39
4.2	VALIDIERUNG DER MICROARRAYDATEN MITTELS QUANTITATIVER ECHTZEIT-RT-PCR.....	43
4.3	QUALITATIVE RT-PCR ZUR BESTIMMUNG VON TRANSKRIPTIONSEINHEITEN.....	45
4.4	METALLOID-ABHÄNGIGE INDUKTION DER <i>ARS</i> -TRANSKRIPTION.....	46
4.4.1	<i>Metallspezifität der arsM-Induktion</i> .....	46
4.4.2	<i>Zeitlicher Verlauf der As<sup>III</sup>-Induktion</i> .....	48
4.4.3	<i>Stabilität der ars-Transkripte</i> .....	50
4.5	BESTIMMUNG VON TRANSKRIPTIONSSTARTS.....	51
4.5.1	<i>Primer Extension: Evaluierung der Methodik</i> .....	53
4.5.2	<i>Transkriptionsstarts der Arsenresistenzgene</i> .....	54
4.5.3	<i>Transkriptionsstarts weiterer ausgewählter Gene aus Halobacterium salinarum</i> .....	57
4.6	KONSTRUKTION DES REPORTERPLASMIDS PREPORT.....	60
4.7	REPORTERGENANALYSEN DER ARS-PROMOTOREN.....	62
4.7.1	<i>Verkürzung des arsR-Promotors am 5'-Ende</i> .....	62
4.7.2	<i>Mutationsanalyse des arsR-Promotors</i> .....	63
4.7.3	<i>5'-Deletion und Mutation des ArsD-Promotors</i> .....	68
4.7.4	<i>Mutation der arsD-Leit-RNA</i> .....	70
4.8	VERGLEICHENDE SEQUENZANALYSE DER POTENTIELLEN REPRESSORBINDESTELLE.....	74
4.9	<i>H. SALINARUM</i> ARSR UND ARSR2, ZWEI VERTRETER DER ARSR/SMTB-FAMILIE.....	75
4.10	HETEROLOGE EXPRESSION DER TRANSKRIPTIONS-FAKTOREN ARSR, ARSD UND ARSR2.....	78

4.11	ANALYTISCHE GELFILTRATION ZUR MOLEKULARGEWICHTS-BESTIMMUNG .....	79
4.12	ARSR UND ARSR2: FALTUNG UND STABILITÄT .....	80
4.13	INTERAKTION VON ARSR UND ARSR2 MIT DEN METALLOIDEN .....	81
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
5.1	DIVERSITÄT VON METALLOIDRESISTENZGENEN .....	84
5.2	METALLOIDRESISTENZMECHANISMEN IN HALOPHILEN ARCHAEA .....	86
5.3	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION BEI $Sb^{III}$ -STRESS .....	87
5.3.1	<i>Spezifische Metalloid-induzierte Genexpression</i> .....	87
5.3.2	<i>Allgemeine Antwort auf (oxidativen) Stress</i> .....	88
5.4	TRANSKRIPTIONSINITIATION UND CHARAKTERISIERUNG DER ARSR-OPERATORELEMENTE	91
5.5	<i>H. SALINARUM</i> ARSR UND ARSR2, ZWEI VERTRETER DER ARSR/SMTB-FAMILIE.....	94
5.6	MODELL ZUR METALLOID-ABHÄNGIGEN REGULATION .....	96
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
6.1	DEUTSCHE VERSION .....	98
6.2	SUMMARY .....	99
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Halobacterium salinarum

*Halobacterium salinarum*, früher *Halobacterium halobium*, ist ein fakultativ anaerober, extrem halophiler Vertreter der Gattung Halobacteriales (Euryarchaeota), welcher sich durch seine Fähigkeit zu photoheterotrophem Wachstum auszeichnet. Das Genom von *Halobacterium salinarum* R1 (DSM671) wurde von Pfeifer et al. (2007) entschlüsselt und besteht aus einem 2Mbp Chromosom sowie vier Megaplasmiden (284, 194, 147 und 40 kbp). Es besitzt einen hohen GC-Gehalt von 68% und kodiert nach aktueller Annotation ([www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)) für ca. 2750 offene Leserahmen von denen ca. 70% in Proteomstudien bestätigt werden konnten (Tebbe et al. 2005, Falb et al. 2006, Bisle et al. 2006, Klein et al. 2007). Der von Ng et al. (2000) sequenzierte Stamm *NRC-1* unterscheidet sich auf chromosomaler Ebene lediglich durch 8 Nukleotidsubstitutionen von R1, trägt allerdings zwei andere Megaplasmide *pNRC100* und *NRC200*.



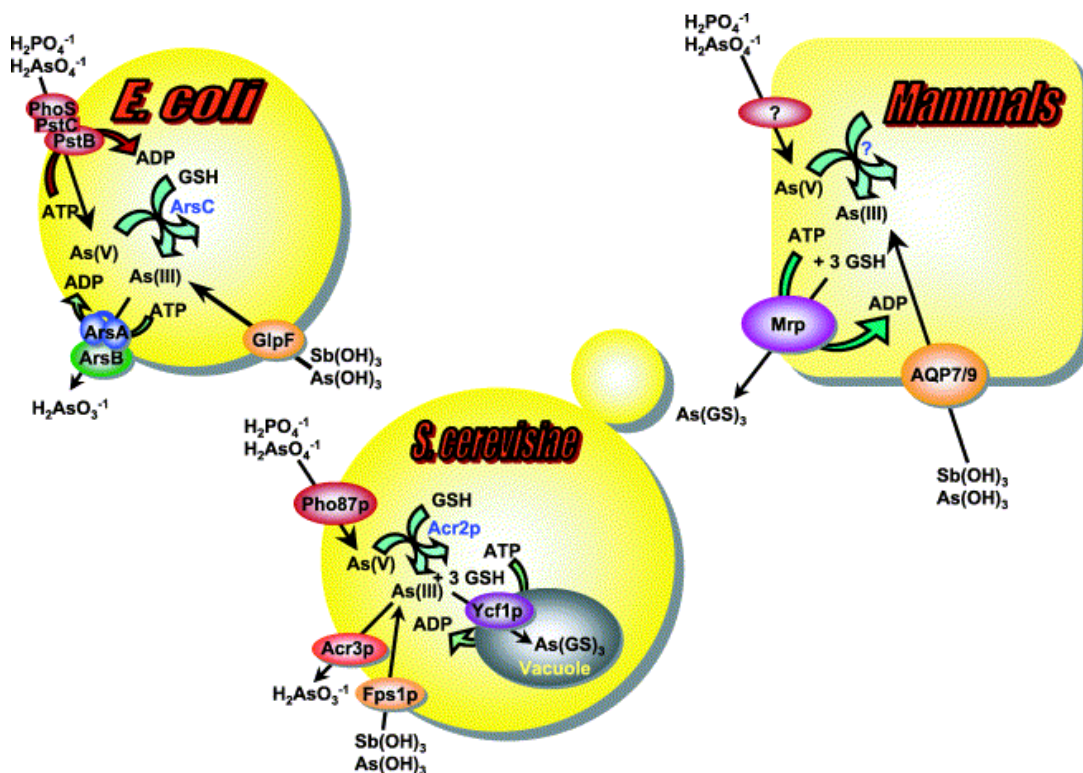
**Abbildung 1.1.1** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Halobacterium salinarum* (links). Genomkarte von *Halobacterium salinarum* R1 (Mitte). Halobakterielles Massenvorkommen in Meerwasserverdunstungsbecken der San Francisco Bay (rechts).

## 1.2 Arsenresistenz

### 1.2.1 Mechanismen der Arsenresistenz

Arsen steht in der 5. Hauptgruppe des Periodensystems und findet sich in der Natur vorwiegend in vier Oxidationsstufen ( $\text{As}^0$ ,  $\text{As}^{-\text{III}}$ ,  $\text{As}^{+\text{III}}$ ,  $\text{As}^{+\text{V}}$ ), vor allem als Arsenat ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) oder Arsenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ). Neben anthropogenem Einfluß, wird Arsen vorwiegend durch vulkanische Aktivität und chemische oder mikrobielle Laugung von geologischen Gesteinsformationen (z.B: Arsenopyrit) in den geochemischen Kreislauf unserer Biosphäre

eingetragen. Arsenverbindungen reagieren mit Thiolgruppen von Cysteinen sowie dem Imidazol Stickstoff von Histidinen und entfalten somit ihre toxische Wirkung auf Proteine. Arsenat kann aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Phosphat dieses in biologischen Systemen substituieren und führt zu oxidativem Stress, zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und dem Verlust von intrazellulären Kohlehydratspeichern. Deshalb finden sich, bei Betrachtung der Vielzahl an bekannten Genomsequenzen, viel häufiger Arsenresistenzgene als Biosynthesegene für Tryptophan.



**Abbildung 1.2.1.1** Schematische Darstellung der Mechanismen zur Arsendetoxifikation in Prokaryoten und Eukaryoten übernommen aus Rosen (2002). Arsenat ( $\text{As(V)}$ ) wird über den Phosphattransportweg, Arsenit ( $\text{As(III)}$ ) durch Aquaglyceropore (GlpF in *E. coli*, Fps1p in *Saccharomyces cerevisiae* sowie Aqp7 und Aqp9 in Säugern) in die Zelle aufgenommen. In Säugetieren sind die an der Aufnahme und Reduktion des Arsenats beteiligten Proteine noch nicht bekannt. In beiden einzelligen Modellorganismen wird Arsenat von einer Arsenat-Reduktase (*E. coli* ArsC beziehungsweise Acr2p der Hefe) zu Arsenit reduziert. Als Quelle für Reduktionsäquivalente dienen hierfür Glutathion und Glutaredoxin. In *E. coli* wird  $\text{As(III)}$  von dem Membranprotein ArsB oder von der ATP-abhängigen ArsAB Pumpe aus der Zelle entfernt. In Hefe wird Arsenit von Acr3p, einem Arsenit Efflux Membranprotein aktiv aus der Zelle ausgeschleust oder über Ycf1p, einem Protein aus der MDR-Familie (Multidrug Resistance Pump) der ABC-Transporter in Form von  $\text{As(GS)}_3$  in Vakuolen transportiert und dort akkumuliert. In Säugerzellen übernimmt den Export von  $\text{As(III)}$  wiederum als  $\text{As(GS)}_3$  ein Multidrug Resistenzprotein der MRP-Familie.

Aus Studien in den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* weiß man, dass Arsenat und Arsenit über den Phosphattransportweg (Yompakdee et al. 1996,



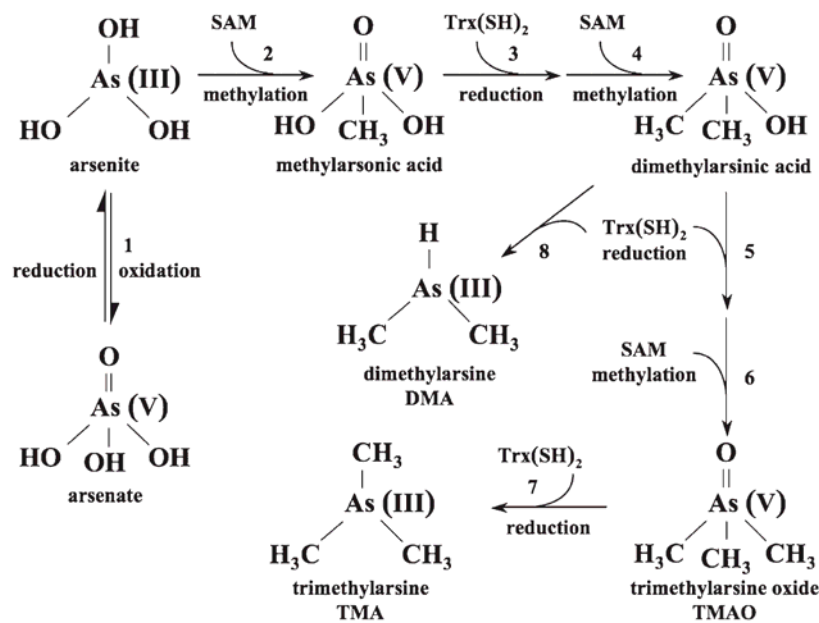
Willsky & Malamy 1980) beziehungsweise über Aquaglyceroporine (Sanders et al. 1997, Wysocky et al. 2001) in die Zelle gelangen. Im Cytoplasma wird Arsenat ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) dann von der Arsenatreduktase zum noch toxischeren Arsenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) reduziert. Der Schritt der Arsenreduktion wird notwendig, da Arsenat dem Phosphat sehr ähnelt und die Zelle bei der Ausschleusung von Arsen nicht zwischen den beiden Anionen unterscheiden kann. Bislang kennt man drei konvergent entstandene Familien von Arsenatreduktasen (Mukhopadhyay et al. 2002). Anhand von Kristallstrukturen der Arsenatreduktasen aus *E. coli* R773 (Martin et al. 2001), *Staphylococcus aureus* (Zegers et al. 2001, Messens et al. 2004) und des Enzyms aus *Bacillus subtilis* (Bennett et al. 2001) konnte ihr Reaktionsmechanismus detailliert charakterisiert werden. Arsenat bindet im ersten Schritt des Reaktionszyklus an die Argininreste Arg60, Arg94 und Arg107 der *E. coli* R773 Arsenatreduktase. In einem weiteren Schritt kommt es zur Ausbildung kovalenter Arsenat-Thioesterintermediate mit dem reaktiven Zentrum, dem N-terminalen Cystein Cys12 (Martin et al. 2001). Dieses wird in zwei Stufen durch Glutaredoxin und Glutathion reduziert. Shi et al (1999) konnten zeigen, dass in *E. coli* alle der drei vorkommenden Glutaredoxine, bevorzugt aber Grx2 als Redoxpartner der  $\text{As}^{\text{V}}$ -Reduktion fungieren. Für Arsenit sind im Laufe der Evolution mehrere Exportwege entstanden (Rosen 1999). In *E. coli* übernimmt die ATP-verbrauchende ArsAB-Effluxpumpe die Ausschleusung von Arsenit, während in Säugerzellen  $\text{As}^{\text{III}}$  vorwiegend komplexiert mit Glutathion über Multidrugresistenzproteine (MDR-1) exportiert wird. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt zwei unterschiedliche Arsenittransporter. In der Cytoplasmamembran findet man *ACR3* (Wysocki et al. 1997, Gosh et al. 1999), ein Homolog des *Bacillus subtilis*  $\text{As}^{\text{III}}$ -Exportproteins *YqcL* (Sato & Kobayashi 1998), welches spezifisch  $\text{As}^{\text{III}}$ , nicht aber  $\text{Sb}^{\text{III}}$  transportiert (Bobrowicz et al. 1997). Zusätzlich akkumuliert Hefe mittels *YCF1* (Yeast Cadmium Resistance Factor), einem Vertreter der MDR-Familie von ABC-Transportern, Metall-GS-Konjugate in Vakuolen (Lie et al. 1997, Lie et al. 1997).

### 1.2.2 Arsenitmethylierung

Seit den Arbeiten von Gmelin (1839), Hofmeister (1894) und Gosio (1892) weiß man über die natürliche Entstehung toxischer methylierter Metalloidverbindungen. Bartolomeo Gosio (1892) konnte die Freisetzung flüchtiger Arsenverbindungen aus Tapetenpapier erstmals auf die biologische Aktivität von Pilzen (*Mucor mucedo* und *Penicillium brevicaulis*) zurückführen. Die als Gosiogas in die Geschichte eingegangene flüchtige Verbindung mit charakteristischem Knoblauchgeruch konnte später von Challenger (1945) als Trimethylarsin identifiziert werden. Nachdem Crecelius (1977) auch methylierte Arsenverbindungen in Urin

nachwies, wurden in den darauffolgenden Jahren  $\text{As}^{\text{III}}$ -Methyltransferasen (Cyt19) aus humanen Hepatocyten (Zakharyan et al. 1999), sowie Hasen- (Zakharian & Aphosian 1999) und Rattenleber charakterisiert (Lin et al. 2002). Arsenmethylierung als Resistenzmechanismus wurde allerdings erstmals für das anoxygen phototrophe Purpurbakterium *Rhodopseudomonas pallustris* beschrieben (Qin et al. 2005). *Rhodopseudomonas* kodiert in einem von zwei chromosomalen Arsenresistenzclustern eine S-Adenosylmethionin-abhängige  $\text{As}^{\text{III}}$ -Methyltransferase ArsM, welche Arsenit in Abhängigkeit von Glutathion zu Mono-, Di-(DMA) und Trimethylarsin (TMA) methyliert. DMA und TMA stellen flüchtige Verbindungen dar und werden somit unmittelbar in die Gasphase abgegeben. Überexpression von ArsM aus *Rhodopseudomonas* in einem Arsen-sensitiven *E.coli*  $\Delta\text{arsB}$  Deletionstamm resultierte einerseits in der Bildung von Trimethylarsin andererseits in deutlich erhöhter Resistenz gegenüber anorganischem Arsenit (Qin et al. 2005).

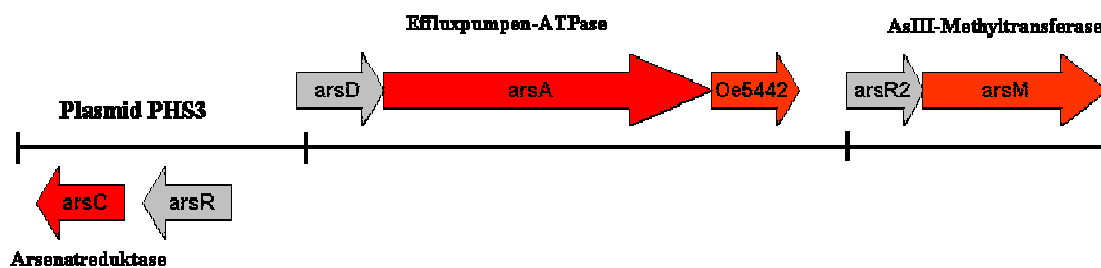
Ob für die in dem von Messens & Silver (2006) veröffentlichten Reaktionsschema angeführten Reduktionsschritte (siehe Abbildung 1.3) während der  $\text{As}^{\text{III}}$ -Methylierungskaskade *in vivo* die Arsenatreduktaseaktivität essentiell ist, wurde bislang noch nicht ausreichend geklärt.



**Abbildung: 1.2.2.1** Hypothetisches Reaktionsschema der redox-gekoppelten Methylierung von Arsen nach Messens & Silver (2006). 1) Reduktion von AsV nach AsIII 2) SAM-abhängige oxidative Monomethylierung von AsIII 3) Zweite Reduktion 4) Zweite SAM-abhängige Methylierung 5) Reduktion und 6) Methylierung von Dimethylarsinsäure zu Trimethylarsinnoxide. 7) Reduktion zum Trimethylarsin. 8) Reduktion zu DMA.

### 1.3 Arsenresistenz in *Halobacterium salinarum*

*Halobacterium salinarum* NRC-1 enthält ein Megaplasmid *pNRC100* auf dem das Arsenresistenzgencluster *arsADRC*, *arsR<sub>2</sub>M* liegt. Zusätzlich findet man auf dem Chromosom ein *ArsB*-Homolog. Wang *et al.* (2004) konnten zeigen, dass eine Deletion des gesamten Clusters *arsADRC* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Arsenit und Antimonit, nicht aber Arsenat führte. Ein Knock-out eines vermuteten *arsB* (siehe 1.2.1) zeigte keinen Effekt auf das Resistenzverhalten gegenüber *AsIII*. Hingegen konnte bei Deletion des *arsM*-Gens eine sehr deutliche Verminderung der *AsIII*-Resistenz festgestellt werden. *ArsM* besitzt Homologie zu Ubichinonmethyltransferasen und fungiert wahrscheinlich als S-Adenosylmethionin-abhängige *AsIII*-Methyltransferase (Wang *et al.* 2004).



**Abbildung 1.3.1** Schematisches Modell des Arsenresistenz-Genclusters in *Halobacterium salinarum* Stamm RI. Dieses enthält die Strukturgene kodierend für die Arsenatreduktase *ArsC*, eine Metallefflux-ATPase *ArsA* und eine *AsIII*-Methyltransferase, *ArsM* (*Oe5444*), sowie Gene für drei potentielle Transkriptionsfaktoren (*ArsR*, *ArsD*, *ArsR2*; in grau dargestellt).

## 1.4 Transkription in Archaea

### 1.4.1 Basale Transkription

Der basale Transkriptionsapparat der Archaea stellt eine ursprüngliche Form des eukaryotischen Polymerase II Kernkomplexes dar. *In vitro* reicht ein minimaler Komplex bestehend aus TATA-Bindeprotein TBP, TFB, einem Homolog des eukaryotischen Transkriptionsfaktors IIB, und RNA-Polymerase Holoenzym (RNAP) zur Initiation der archaealen Transkription (Hethke *et al.* 1996, Qureshi *et al.* 1997). TBP erkennt und bindet an die T/A(TATA)-Box, welche sich bei -25 bis (-30) bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (+1) befindet. TFB bindet spezifisch das BRE-Element (Transcription factor **B** recognition element) um -35 bp stromaufwärts der TATA-Box, stabilisiert damit den Präinitiationkomplex und legt die Polarität der Transkription fest (Qureshi & Jackson 1998, Bell *et al.* 1999, Littlefield *et al.* 1999). Der Transkriptionsfaktor TFE $\alpha$ , ein Homolog des

eukaryotischen TFIIE ist für die Transkriptionsinitiation nicht essentiell, spielt allerdings eine Rolle bei suboptimaler Promotorerkennung. TFE $\alpha$  stimuliert die TBP-Bindung an schwach konservierte TATA-Boxelemente und aktiviert damit die Transkription spezifischer Promotoren ca. 3 - 4-fach (Bell et al. 2001). Neuere Arbeiten von Grünberg *et al.* (2007) deuten auf eine stabilisierende Funktion von TFE $\alpha$  während der Transkriptionselongation hin. Homologe zu den basalen Komponenten der eukaryotischen PolIII-Transkription TFIIA, TFIIF, TFIIH bzw. TAF's (TBP associated factors) des TFIID-Komplexes konnten in Archaea bislang nicht entdeckt werden.

In archaealen, vor allem aber in sequenzierten, halophilen Genomen finden sich oftmals mehrere Kopien von TBP- und TFB-Genen (Reeve et al. 1997). *Halobacterium salinarum R1* besitzt beispielsweise 5 TBP's und 8 intakte TFB's, *Natronomonas pharaonis* 1 TBP und 8 TFB's, *Haloarcula marismortui* 1 TBP und 8 TFB's sowie *Haloquadratum walsbyi* 2 TBP's und 10 TFB's. Dies führte zu der Hypothese, daß möglicherweise unterschiedliche Kombinationen der basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB in Analogie zu alternativen bakteriellen Sigmafaktoren eine Mittel zur differentiellen Steuerung der globalen Genregulation darstellen (Dennis & Shimmin 1997, Baliga et al. 2000). Experimentelle Daten über die Hitzeschockinduktion spezifischer TFB's in *Haloferax volcanii* und *Pyrococcus furiosus* (Thompson et al. 1999, Shockley et al. 2003) sowie eine unterschiedliche mRNA Stabilität der beiden TFB's in *Sulfolobus solfataricus* (Bini et al. 2002) scheinen diese Annahme zu bestaetigen. In *Halobacterium NRC-1* sind unter Standardwachstumsbedingungen fünf von acht TFB's (B, D, E und H) sowie drei von sechs TBP's essentiell. Mittels Microarrayanalysen der Deletionsmutanten  $\Delta tpbD$  und  $\Delta tfbD$  konnte eine differentielle und von den jeweiligen basalen Transkriptionsfaktoren abhängige Regulation von 15% bzw. 18% aller Gene gezeigt werden (Coker & DasSarma 2007): Facciotti et al. (2006) fanden in Coimmunopräzipitationsstudien sieben von 42 vermuteten TBP-TFB-Kombinationen und konnten in einem Chip-basierenden DNA-Protein Interaktionsassay spezifische Zielengruppen bestimmen. Ähnliche regulatorische Mechanismen sind beispielsweise von den TRF's (TBP Related Factors) aus höheren Eukaryoten bekannt (Rabenstein et al. 1999). TRF aus *Drosophila* besitzt 56% Sequenzidentität zu TBP und bindet im Gegensatz zu diesem sehr spezifisch an wenige, für die Steuerung Gewebe-spezifischer Entwicklung relevante Gene (Hansen et al. 1997).

## 1.4.2 Archaeales Chromatin

Mit Ausnahme von *Thermoplasma* findet man in allen Euryarchaeota Histon-Homologe. Methanogene Archaea kodieren ein bis sechs Histone (Sandman & Reeve 2005), welche vergleichbar mit dem eukaryotischen H3-H4 Homo- und Heterodimere ausbilden. Diese assemblieren als Tetrasom, Histontetramere auf welchen jeweils 92 bp DNA (TLS : Tetrasome localized DNA Sequences) zu Chromatin-ähnlichen Strukturen (Tomschik et al 2001) aufgewickelt werden (Marc et al.2002, Xie & Reeve 2004). In *Methanococcus voltae* findet man vier unterschiedliche chromosomale Proteine, Histon HstA, HstB, eine Variante mit C-terminaler Verlängerung, das Histon-ähnliche HmvA und Alba (Heinicke et al. 2004). Deletionsanalyse der einzelnen Gene zeigte allerdings lediglich im Falle von HstA Auswirkungen auf das Zellwachstum. Im Gegensatz dazu scheinen die Gene kodierend für Histon HstA und das chromosomale Protein MC1 in *Halobacterium salinarum* (Schwarz unveröffentlicht) und *Haloferax volcani* (Mevarech unveröffentlicht) essentiell zu sein, da eine Deletion der jeweiligen Gene in beiden Organismen erfolglos blieb. In archaealen Histonen fehlen N- und C-terminale Bereiche, welche im eukaryotischen H3-H4 als Zielsequenzen für posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung oder Methylierung dienen. Diese Modifikationen wurden in Archaea bislang nicht gefunden (Dinger et al. 2000, Forbes et al. 2004). Crenarchaeota wie beispielsweise *Sulfolobus solfataricus* besitzen keine Histone (She et al. 2001). Allerdings fand man, dass die chromosomalen DNA-Bindeproteine Sul7d und Alba (Ssh10b, Sso10b, Sac10b) aus *Sulfolobus* differentiell methyliert beziehungsweise acetyliert werden (White & Bell 2003, Edmondson & Shriver 2001). Vermittelt durch die Acetyltransferase Pat (Marsh et al. 2005) sowie die Deacetylase Sir2 (Bell et al. 2002) wird Alba an Lysin 16 reversibel (de)acetyliert. Eine Acetylierung führt zu verminderter Affinität gegenüber DNA (ca. 30-fach). Alba (Acetylation Lowers Binding Affinity) zeigt anders als die Histone keinen Einfluß auf die Kompaktierung der chromosomalen DNA.

## 1.5 Regulation der archaealen Transkription

Die Regulation der archaealen Transkription wird vorwiegend von Regulatorproteinen mit Homologie zu bakteriellen Transkriptionsfaktoren bewerkstelligt. Im folgenden sind einige bekannte Beispiele von Transkriptionsregulation in halophilen Archaea dargestellt.

### 1.5.1 Regulation der lytischen Gene im Halophagen PhiH

Unter den archaealen Viren zählt der temperente Halophage  $\phi$ H zu den am besten charakterisierten. Lysogene *Halobacterium salinarum*-Stämme enthalten die L-Region des linearen 59 kb  $\phi$ H-Genoms in Form eines 12 kb Plasmids (Schnabel & Zillig 1984, Schnabel et al. 1992). In resistenten Zellen wird die Transkription der früh-lytischen Gene *T4* und *T1* durch zwei unterschiedliche Mechanismen reprimiert. In Analogie zum *E. coli*  $\lambda$ -Phagen *cI/cro*-System wird *T4* von dem invers orientiert transkribierten Repressor Rep (T6) kontrolliert. Der Repressor bindet an den 127 bp langen intergenischen Bereich zwischen *T4*- und *rep*-Gen. In Methylierungsinterferenzstudien konnte seine DNA-Bindestelle ATTCCT-N<sub>6</sub>-GAGAAG-N<sub>4</sub>-CTTCCT-N<sub>6</sub>-GAGAAG im Bereich -36 bis -75 relativ zum *T4*-Transkriptionsstart charakterisiert werden (Ken & Hackett 1991). Das Transkript T9, welches alleine keinen Effekt auf die Phagenvermehrung oder Immunität ausübt, zeigte allerdings kooperative Wirkung auf den Repressor Rep (Stolt & Zillig 1993c). Hier findet man Parallelen zum Coliphagen P1 Bof-Protein, welches als Modulator die Repressor-DNA-Bindung verstärkt (Velleman et al. 1990, Lehnerr et al. 1992). Die *T1*-Transkription hingegen wird über eine zu den ersten 151 bp von T1 komplementäre Antisense-RNA *Tant* reguliert (Stolt & Zillig 1993a). Die doppelsträngige *T1/Tant*-RNA wird spezifisch von RNAsen erkannt und prozessiert. Stolt & Zillig (1993b) konnten den beschriebenen Antisense-RNA-Regulationsmechanismus, wenngleich auch mit deutlich niedrigerer Effizienz, zur Prozessierung des *T4*-Transkriptes anwenden.

### 1.5.2 Regulation der Gasvesikelbiosynthese

Die 14 Gene der Gasvesikelbiosynthese in *Halobacterium salinarum* *PHH1* werden von 4 Promotoren *pA*, *pD*, *pF* und *pO* in zwei unterschiedlichen Leserichtungen transkribiert. Die Transkription von *pA* und *pD* wird von GvpE verstärkt, von *pF* und *pO* jedoch nicht beeinflusst (Hofacker et al. 2004). Dies konnte in Reporteranalysen bestätigt werden. Der Transaktivator GvpE enthält in seiner Primärsequenz ein Leucin-Zipper (b-ZIP) Motiv welches man bereits als Charakteristikum mancher eukaryotischer Transkriptionsfaktoren (z.B. cFos, cJun and GCN4) kennt. Mutationen in der Leucin-Zipperregion des cGvpE Proteins führten zum Verlust der Homodimerisierung. Hierbei zeigten sich V159, L166, L173 und K104 als für die Aktivierung der *cgvpA*-Expression essentiell (Plößer & Pfeifer 2002). Über Scanningmutagenese des *pA*-Promotors konnte die Aktivatorbindestelle von GvpE im und stromaufwärts des BRE-Elementes lokalisiert werden. Mutanten, welche neben einem *pA*-Promotor-Reporterkonstrukt und GvpE zusätzlich GvpD exprimierten, zeigten verringerte

$\beta$ -Galactosidaseaktivität. GvpD trägt am N-Terminus ein konserviertes, aus GTP/ATP-bindenden Proteinen wie der Adenylatkinase, RecA, Ras, G-Proteinen und Elongationsfaktoren bekanntes p-loop motif ( ${}_{36}\text{LYNGAPGTGKT}_{46}$ ) (Pfeifer et al. 2001). In Pulldown Experimenten konnte mittels Protein-Affinitätschromatographie eine direkte Interaktion von GvpD mit GvpE in beiden Richtungen gezeigt werden (Zimmermann & Pfeifer 2003). GvpD scheint also als negativer Regulator zu fungieren. Für die *mc-vac* Gene in *Haloferax mediteranei* konnte eine Abhängigkeit von Salzkonzentration und Wachstumsphase gezeigt werden. Die *mc-gvpA*-mRNA wird unter Niedrigsalz (16% NaCl) doppelt so schnell abgebaut, wie in Hochsalz. Die mittels Northernblot detektierten Transkripte mit Längen von 0,32; 1,8; 2,4; 3,0 für *gvpACNO* und 0,45; 1,3; 2,0; 3,0 kb für *gvpDEFGHIJKLM* wiesen mRNA-Halbwertszeiten von 4-80min auf und könnten durch RNA-Prozessierung oder über deren Stabilität eine mögliche Rolle bei der Regulation spielen (Jager et al. 2002).

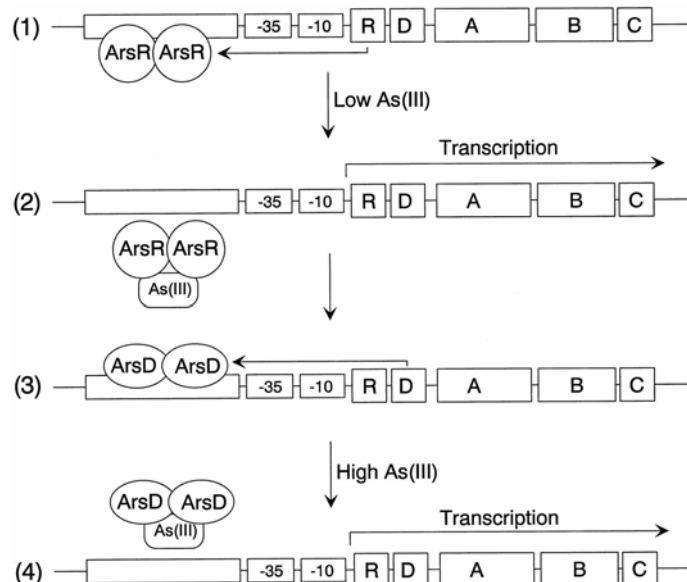
### 1.5.3 Das Bakteriorhodopsin Regulon

*Halobacterium salinarum* Zytoplasmamembranen bestehen zu einem großen Anteil aus zweidimensional kristallinem Bakteriorhodopsin, der Purpurmembran. Bakteriorhodopsin ist ein Retinalprotein und fungiert als Licht-getriebene Protonenpumpe. Diese dient der archaealen Zelle, im besonderen unter anoxigenen Bedingungen zur Synthese von ATP. Die Expression des für Bakteriorhodopsin kodierenden *bop*-Gens wird in der spätexponentiellen Phase des Wachstums, in Abhängigkeit von Licht und Sauerstoff, stark (45-fach) induziert (Shand & Bettlach 1991). Lange Zeit wurde die beobachtete Regulation alleinig auf den Transkriptionsfaktor Bat zurückgeführt. Transkriptom- und Proteomanalysen in *bat*-Mutanten zeigten reduzierte Expression der Bakteriorhodopsin-, Carotinoid- sowie Isoprenoid-Biosynthesegene und eine Induktion der Argininfermentation (Baliga et al. 2002). Unter phototrophen Wachstumsbedingungen konnte im Wildtypstamm *Halobacterium NRC-1* genau der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Bat besitzt neben einem AraC HTH-DNA-Bindemotiv eine wahrscheinlich der Photoperzeption dienende GAF- und eine Redox-abhängige PAS/PAC-Domäne. Mittels Scanning Mutagenese des *bop*-Promotors konnte ein als UAS (Upstream Activating Sequence) bezeichneter Bereich stromaufwärts der TATA-Box als Aktivatorbindestelle definiert werden (Baliga & DasSarma 2000). Bat stellt den transaktivierenden Faktor des UAS-Elementes im *bop*- aber auch anderer Gene der Bakteriorhodopsinbiosynthese dar (Baliga et al. 2001). An Untersuchungen des *bop*-Promotors konnte eine als RY-Box bezeichnete 11 bp Region stromabwärts der TATA-Box

identifiziert werden, welche sich aus alternierenden Purin-Pyrimidinabschnitten aufbaut und unter anoxigenen Bedingungen in nicht-B-DNA Struktur vorliegt (Yang et al. 1996, Baliga & DasSarma 2000). Positive DNA-Superspiralisierung im Bereich der RY-Box korreliert mit erhöhter *bop*-Transkription und zeigte Sensitivität gegenüber dem Topoisomerase II Hemmstoff Novobiocin (Yang & DasSarma 1990). Jüngere Arbeiten von Tarasov et al. (2008) konnten einen zweiten Regulator, Brz (Bacteriorhodopsin regulating zinc finger protein), ein kleines Protein mit Zinkfinger-Motiv identifizieren, dessen ORF unmittelbar stromaufwärts des *bop*-Genlokus liegt. Deletion des *brz* sowie Mutationen des Brz-Zinkfingermotivs führten unter anderem zu einer deutlichen Reduktion der Transkription von *bop* und *crtB1* (Phytoene Synthase Gen).

## 1.6 Transkriptionsregulation des Ars-Operons in *E.coli*

Der Repressor ArsR bindet als Homodimer mit hoher Affinität an den *arsR*-Promotor und kontrolliert so die basale Transkription der *ars*-Strukturgene (Xu & Rosen 1997). Mittels DNase-I Footprinting Analysen des auf dem Plasmid R773 kodierten (Wu & Rosen 1993a) sowie des chromosomalen *arsR*-Promotors (Xu et al. 1996) konnte eine Konsensus-DNA-Erkennungssequenz TCA-N7-TTTG bestimmt werden.



**Abbildung 1.6.1:** Schematisches Modell der Regulation des *ars*-Operons in *E. coli* nach Chen u. Rosen (1997). Reaktion der Transkription des Arsenresistenzoperons in Abwesenheit von Arsen (1), bei niedrigen Konzentrationen an Arsen (2, 3) und bei sehr hohen Arsenkonzentrationen (4). Die Gene *arsR*, *D*, *A*, *B*, *C* sind mit den im Gennamen vorkommenden Großbuchstaben angezeigt. Die Transkription des Operons wird von den beiden Schlüsselregulatoren ArsR (Induktion der basalen Expression) und ArsD (Feineinstellung nach Induktion) kontrolliert.



Bei Interaktion von ArsR mit den Metalloiden  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{Sb}^{\text{III}}$ ,  $\text{Bi}^{\text{III}}$  oder dem organischen Phenylarsinoxid (PAO) dissoziiert dieses von der DNA und induziert somit die Transkription der *ars*-Strukturgene (Wu & Rosen 1993a). In ArsR-Homologen findet man ein konserviertes Aminosäuresequenzmotiv, ELCVCDL welches als Metallbindungsstelle der Proteine identifiziert wurde (Shi & Rosen 1994). Mit Hilfe anomaler Dispersion (röntgenkristallographisch) und Phenylarsinoxid-Affinitätschromatographie an ArsR gezeigt werden konnte, sind drei Cystein-Thiolgruppen (Cys-32, Cys34 Cys-37) an der Metallbindung beteiligt, wovon nur Cys-32 und Cys-34 für eine funktionelle Konformationsänderung vonnöten sind (Shi et al. 1996). Der zweite Repressor des *ars*-Operons, ArsD, bindet an dieselbe Operatorstelle wie ArsR, besitzt allerdings eine ca. 100-fach niedrigere Affinität für *arsRDABC*-Promotor-DNA (Chen & Rosen 1997). Erst eine hohe Abundanz des ArsD-Proteins bei starker Induktion der Gene führt zu einer Repression der Transkription des *Ars*-Operons. ArsD erkennt ebenfalls Arsenit ( $K_d = 60 \mu\text{M}$ ), Antimonit ( $K_d = 2 \mu\text{M}$ ) oder Phenylarsinoxid (Chen & Rosen 2001), allerdings mit, verglichen an ArsR, geringerer Affinität. Die Metallbindung weist eine positive Kooperativität zwischen den 4 beteiligten Cysteinpaaren (Cys-12-Cys-13, Cys-112-Cys-113) des Dimers mit einem Hill Koeffizienten von 4 auf (Li et al. 2002, Li et al. 2003). Nur in Anwesenheit sehr hoher Metalloidkonzentrationen wird diese Regulationseinheit durch Dissoziation des ArsD aufgehoben. Dieser Mechanismus soll eine für die bakterielle Zelle toxische Überexpression der Effluxpumpe ArsAB verhindern (Wu et al. 1992, Chen & Rosen 1997).

## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Primäre Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung von Transkription und Regulation der Arsen- bzw. Antimon- Stressantwort in *Halobacterium salinarum* R1. Im speziellen sollte die Transkription und Regulation des archaealen Arsenresistenzoperons unter Verwendung von *in vivo* und *in vitro* Methoden analysiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultur und Stammhaltung von *Halobacterium salinarum*

*H. salinarum* Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben aerob bei 40° C (100 rpm; ohne Licht) in Komplexnährmedium (Oesterhelt & Krippahl 1983) kultiviert. Für experimentelle Zwecke wurden Batchkulturen (35 ml) verwendet, welche ausgehend von einer Stammkultur mindestens zweimal subkultiviert wurden. Zur Langzeithaltung wurden Halobakterienstämme in 15ml-Aliquots bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt und alle 4 Monate in frisches Medium überimpft. Eine klassische Form der Stammhaltung über Gefriertrocknung, bzw Glycerin/DMSO-Gefrierkulturen wurde für *Halobacterium salinarum* vermieden, da man vermutet, daß diese die Aktivität endogener Transposasen induziert und somit zu chromosomalem Rearrangement und genetischer Instabilität führt.

#### 3.1.2 Agardiffusionstest

*Halobacterium salinarum* wurde nach 2-maliger Subkultur in Flüssigmedium in 200 µl Aliquots auf Agarplatten mit Komplexmedium ausplattiert. Nun wurden Nitrozellulosefilterplättchen (Ø = 5 mm) auf den Agar aufgebracht mit je 10 µl Arsenit- oder Arsenatstammlösungen in mehreren Konzentrationen versehen und über mehrere Tage bei 40°C inkubiert. Nach Ausbildung definierter Hemmhöfe wurden die Petrischalen mittels eines konventionellen Scanners eingelesen und die jeweiligen Hemmhofdurchmesser bestimmt.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 RNA-Isolierung aus *Halobacterium salinarum*

Zur Isolierung von RNA wurden Aliquots von 10 ml *H. salinarum* Kultur bei 10 000 g für 5 min (4°C) geerntet, unmittelbar in 5 ml peqGOLD RNAPure (PeqLab) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das somit gewonnene phenolische Lysat wurde anschließend mit 1 Vol Chloroform extrahiert und die beiden Phasen durch Zentrifugation bei 15 000 g für 5 min getrennt. Nach einer zweiten Chloroformextraktion wurde die obere wässrige Phase mit 1 Vol Isopropanol für 15 min bei -20°C gefällt. Nach Sedimentation durch Zentrifugation (15 000g für 5 min; 4°C) und zweimaligem Waschen in kaltem 80%igem Ethanol wurde das

Nukleinsäurepräzipitat für 10min luftgetrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Lagerung von RNA-Proben erfolgte bei -80°C.

### **3.2.2 Qualitativer Nachweis der RNA-Integrität mittels Kapillarelektrophorese**

Um die Unversehrtheit der Nukleinsäurepräparationen zu prüfen wurden 1:10 Verdünnungen der Proben mittels Kapillarelektrophoresechip System „RNA6000 Nano“ (Agilent) aufgetrennt. Als Kriterium für die Qualität der RNA wurde die Integrität der 16S- und 32S rRNA betrachtet.

### **3.2.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA**

Zur Auftrennung von RNA wurden 1,2% Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und konstanter Spannung von 80 V in 1 x MOPS-Puffer. RNA-Proben wurden vor dem Auftrag für 5 min bei 65 °C denaturiert. Zur Visualisierung der RNA im Gel wurde nach Abkühlen der Proben 1 µl einer Ethidiumbromid-stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt. Vor einer Verwendung für RNA-Auftrennungen wurden die Gelelektrophoreseapparaturen durch Inkubation mit 0,1 N NaOH, 1% SDS von RNAsen befreit und 2 x mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O gewaschen.

10 x MOPS-Puffer: 5 mM NaAcetat; 1 mM EDTA; 20 mM MOPS (pH 6,3)

RNA-Auftragspuffer: 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 60% (v/v) Glycerin

### **3.2.4 Northern Blot Hybridisierung**

10-15 µg RNA wurden in 1,2%igen denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels eines Abwärtskapillarblottingverfahrens nach Chomczynski (1992) auf Nylonmembran (Hybond N+) transferiert. Die Effizienz des Transfers wurde durch EtBr-Färbung der Membranen überprüft sowie die geblottete RNA über UV-Quervernetzung oder 2-stündiges Backen bei 80°C fixiert. Zur Markierung von DNA/RNA-Sonden wurden DIG-(d)NTP's verwendet. Der als Längenstandard verwendete RNA 6000 Ladder (Agilent) wurde nach EtBr-Visualisierung auf den jeweiligen Blots eingezeichnet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C (DNA-Sonden) oder 68°C (RNA-Sonden) in DIG EasyHyb Puffer. Hybridisierung, Wasch- und Detektionsschritte

wurden exakt nach dem Boehringer Handbuch „The DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ durchgeführt.

### 3.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen wurden entweder über Agarose-Gelelektrophorese gegen einen Marker mit bekannter Konzentration ( $\lambda$  Hind III) oder spektrophotometrisch bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht nach Sambrook *et al.* (1989) bei einer Wellenlänge von 260 nm 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA, 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Um die Qualität der Nukleinsäurepräparationen abwägen zu können wurde parallel bei den Wellenlängen 280 und 320 nm gemessen. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gibt Aufschluß über die Qualität der Nukleinsäurepräparation und sollte bei 2 beziehungsweise 1,8 für RNA und DNA liegen.

### 3.2.6 Bestimmung von Transkriptionsstarts mittels Primer Extension

Primer Extension Experimente wurden vorwiegend mittels fluoreszenzmarkierter Primer und unter Verwendung des automatischen Kapillarsequencers ABI 3730 48 durchgeführt. Alle initialen Versuche zur Optimierung der Spezifität wurden unter Verwendung von radioaktiver Primermarkierung nach Ausübel *et al.* (1993) durchgeführt.

Aliquots von 10-50  $\mu\text{g}$  bereits mit DNase I (DNA-free<sup>TM</sup>, Ambion) behandelte RNA wurden mit 0,5-5 pmol 6-FAM-markiertem Primer in Hybridisierungspuffer für 2 min bei 80°C denaturiert und anschließend in einem linearen Temperaturgradienten (1°C/min) bis 1°C unter die Annealingtemperatur der jeweiligen Primer abgekühlt. Um eine unspezifische Hybridisierung der Primer zu minimieren wurde dann unmittelbar mit 2,5 Vol 98% Ethanol (-20°C) 1/10 Vol 4,3 M Natriumacetat (pH 5,4) gefällt. Die Synthese der cDNA erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 3.5.2.3 angeführten Primer. Markierte cDNAs wurden nach alkalischer Hydrolyse der RNA und Neutralisation unter Verwendung von YM-30 Mikrokonzentrator-säulchen (Microcon) auf ein Volumen von ca. 10-20  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert. cDNA-Ansätze mit RNA-Mengen < 10  $\mu\text{g}$  wurden mittels Sephadex G50-Säulchen gereinigt, mit jeweils 0,3  $\mu\text{l}$  GeneScan<sup>TM</sup> 500 LIZ<sup>TM</sup> Längenstandard gemischt, eingedampft und in 5  $\mu\text{l}$  Formamid aufgenommen. Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Produkte erfolgte mittels Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines ABI 3730 48 Sequenziergerätes. Zur Größenbestimmung wurde das Programm GeneMapper® verwendet. Die markierte Primer

Extension-Proben wurden neben den zugehörigen Sequenzreaktionen auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetragen.

Hybridisierungspuffer:	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5
First strand Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 75 mM KCl; 3 mM MgCl <sub>2</sub>
Sequenzierungs-Ladepuffer:	95 % (v/v) Formamide; 0,04% (w/v) Xylencyanol; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau; 10 mM EDTA (pH 8)

### 3.2.7 Bestimmung von Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE

5'-RACE-Experimente wurde exakt nach der Methode von Eyal et al. (1999) durchgeführt. Hierzu wurden für die cDNA-Synthese 5'-phosphorylierte Gen-spezifische Primer verwendet. Die somit erhaltene cDNA wurde mittels QIAEX-Silikasäulchen (Qiagen) aufgereinigt und nach Verdünnung mit T4-RNA-Ligase (NEB) zirkularisiert. Nun konnte mittels inverser PCR die cDNA in Volllänge amplifiziert, TA-kloniert und sequenziert werden.

### 3.2.8 Transkriptionsanalyse mittels Microarray-Hybridisierung

#### 3.2.8.1 Herstellung und Prozessierung von Microarrays

Die in dieser Arbeit verwendeten *Halobacterium salinarum* Genomchips basieren auf PCR-Produkten, entsprechend den relevanten 2700 in [www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de) annotierten offenen Leserahmen, und wurden in unserer Arbeitsgruppe hergestellt (Twellmeyer et al. 2008). Zu diesem Zweck wurden PCR-Produkte der jeweiligen Leserahmen mit einer Länge von jeweils 500 bp (in einigen Fällen auch kürzere) generiert, mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und über MultiScreen 96-well Mikrofiltrationsplatten (Millipore) aufgereinigt. Zur Qualitätssicherung wurden die verwendeten PCR-Produkte in Stichproben einer DNA-Sequenzierung unterzogen. DNA-Sonden wurden jeweils in 5-facher Ausführung auf CMT-GAPS-beschichtete Glasobjektträger (Corning) gedruckt. Das Bedrucken der Microarrays wurde von Dr. Markus Panhuysen am Max Planck Institut für Psychiatrie (München) mittels des Mikroarraydruckers ChipWriter Pro (Virtek) durchgeführt. Die Fixierung der DNA auf den Objektträgern erfolgte durch Erhitzen (80°C für 10 sec) und anschließender UV-Quervernetzung (3000 x 100 µJ). Zur weiteren Prozessierung wurden die Microarrays für 1 Stunde in Prozessierungslösung (1,25 g Succinanhydrid in 250 ml 1,2-Dichlorethan + 3,1 ml 1-Methylimidazol) inkubiert, 1 x in 250 ml Dichlorethan, 1 x für 2 min

in heißem H<sub>2</sub>O (95°C) und 1 x für 1 min in heißem Ethanol (95°C) gewaschen sowie durch Zentrifugation (5 min, 1500 g) getrocknet.

### 3.2.8.2 cDNA-Synthese und Hybridisierung

Die Synthese der cDNA erfolgte unter Verwendung CyScribe First Strand cDNA- Labelling Kit (Amersham) nach Anleitung des Herstellers. Hierzu wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA mit Hilfe von Random-Nonamer Primern über 90 min bei 42°C revers transkribiert. Die Markierung der beiden zu vergleichenden Proben erfolgte in getrennten Reaktionen über den Einbau von Cy3dUTP beziehungsweise Cy5dUTP während der cDNA-Synthese. RNA wurde unter Zugabe von 2,5 µl EDTA (pH 8,0) und 5 µl 1 M NaOH über 30 min bei 65°C alkalisch hydrolysiert und anschließend mit 12,5µl 1M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert. Um überschüssige Cy3-/Cy5-Nucleotide und Primer zu entfernen wurden die Reaktionsansätze nach Vereinigung von grün- und rotmarkierten cDNA's mit 420µl TE-Puffer + 1µl Hefe-tRNA (4mg/ml) verdünnt sowie mittels MicroCon Ym-30 Ultrazentrifugationssäulchen (Milipore) auf ein Endvolumen von maximal 17 µl konzentriert.

Unmittelbar vor Verwendung wurden die Mikroarrays für 30 min einer Prähybridisierung in PH-Puffer (3,5 x SSC, 0,1% SDS, 1% BSA Fraktion V) bei 50°C unterzogen. Nach 2 x 30 sec Waschen in 250 ml H<sub>2</sub>O wurden die Mikroarrays kurz in Isopropanol getaucht und über Zentrifugation (5min, 1500g) getrocknet.

Die cDNAs wurde nun in einem Gesamtvolumen von 30 µl in Hybridisierungspuffer (Endkonzentrationen: 2,5 x SSC, 2 x Denhardts) für 2 min bei 98°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zusatz von 2 µl 1%-iger SDS-Lösung wurde der Hybridisierungsansatz als Mikrofilm zwischen Deckglas und dem Mikroarray verteilt. Die Hybridisierung erfolgte in Corning-Hybridisierungskammern (mit Alufolie vor Licht geschützt) über 8-12h bei 64°C.

50 x Denhardtsloesung: 2 % Ficoll 400, 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % BSA V, pH 7.0

20 x SSC: 3M NaCl, 300 mM Na<sub>3</sub>Citrat, pH 7.0

Waschloesung I: 0.5 x SSC, 0.001 % SDS

Waschloesung II: 0.06 x SSC, 0.01 % SDS

### 3.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für alle durchgeführten PCR-Anwendungen wurden ausschließlich die Polymerasen Vent (NEB), LA-Taq (TAKARA) und Taq (NEB) verwendet. Die Amplifikation wurde mit einem Gradienten-Thermocycler PT200 (MJ Research) durchgeführt. Für einen Standardansatz der PCR-Reaktion wurden Endkonzentrationen von 250 µM dNTP's, je 0,5 µM der jeweiligen Primer, 10 ng Template und 1.25 Units Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 x PCR-Puffer eingesetzt. Bei Problemen bezüglich der Spezifität der Amplifikation wurde das Produkt mit der erwarteten Länge über Touch-down PCR oder in einem Temperaturgradienten präamplifiziert, über präparative Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert oder auch im Gel als Matrize („Core Sample PCR“) für weitere PCR-Reaktionen benutzt.

**Table 3.2.9.1** Darstellung der zumeist verwendeten PCR-Programme. TX entspricht hierbei der jeweiligen Annealingtemperatur des Primers minus 0,5°C. Bei Verwendung modifizierter Primer mit nicht homologen 5'-Enden wurde mit niedriger Stringenz präamplifiziert und nötigenfalls eine 2.PCR-Reaktion mit dem Produkt richtiger Länge durchgeführt.

Standardprogramme		Modifizierte Primer		Sequenzierung	
95°C	1min	95°C	1min	95°C	2min
95°C	30sec	95°C	30sec	95°C	20sec
T <sup>x</sup> °C	1min	30°C	1min	T <sup>x</sup> °C	15sec
72°C	2min	72°C	1min	60°C	4min
72°C	10min	95°C	30sec	4°C	∞
4°C	∞	50°C	1min		
		72°C	1min		
		72°C	10min		
		4°C	∞		

### 3.2.10 Qualitative RT-PCR und quantitative Echtzeit-RT-PCR

RNA-Proben für die Reverse Transcription wurden 2 x 30 min bei 37°C mit RNase freier DNase I (DNA-free<sup>TM</sup>, Ambion) verdaut. Die Reverse Transkription erfolgte mit Superscript<sup>TM</sup> III Reverse Transkriptase H<sup>-</sup> (Invitrogen) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Als Primer für die Reverse Transkription dienten Random Hexamere (Applied Biosystems) oder genspezifische Primer. Die so erhaltene cDNA wurde als Matrize in eine Standard-PCR-Reaktion mit 35 - 40 Amplifikationszyklen eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde DNase verdaute RNA mit gleicher Konzentration eingesetzt. Die Echtzeit RT-PCR wurde in 25 µl-Ansätzen mit dem SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)



unter Verwendung des Gene Amp 5700 Sequenzdetektionssystems (Applied Biosystems) durchgeführt. Als interner Standard diente die 16S rRNA. Alle für die Echtzeit-RT-PCR verwendeten Primer wurden mittels des Softwarepackets „Primer Express“ ausgewählt (Vorgabe: Produktlänge  $\approx$  100 bp;  $T_m=59-60^\circ\text{C}$ , Primerlänge mind. 20 bp). Die Spezifität der Primer wurde über gelelektrophoretische Analyse ihrer Produkte überprüft. Die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz wurde bei 2 nM gewählt.

### **3.2.11 Klonierung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte zur Klonierung wurden standardmäßig mit Vent-Polymerase (NEB) generiert und nach Verdau mit Restriktionsenzymen über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Alternativ dazu wurden Pfx-Produkte für 10min ( $72^\circ\text{C}$ ) mit Taq-Polymerase (MBI) behandelt und mittels Topo-TA-Vektoren laut Vorschrift des Herstellers (Invitrogen) subkloniert. Für die Klonierung offener Leserahmen für eine spätere Überexpression wurden relevante offene Leserahmen mit den Schnittstellen Nde I und Xho I versehen.

### **3.2.12 Klenow-Polymerase-Behandlung**

Restriktionsverdaute DNA wurde bei  $70^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert um die restliche Aktivität der verwendeten Endonukleasen zu zerstören. Um überhängende Enden „blunt end“ aufzufüllen wurden dNTP's (2,5 mM Endkonzentration) zugesetzt und mit Klenow-Polymerase (1 U/ug DNA) 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurde die Klenow-Polymerase für 20 min bei  $70^\circ\text{C}$  hitzeinaktiviert.

### **3.2.13 Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Restriktion von DNA wurden ausschließlich Enzyme der Hersteller NEB und MBI Fermentas in den empfohlenen Konzentrationen eingesetzt. Dabei wurde für analytische Restriktion 1-2 h, für präparative Ansätze 2-8 h bei  $30/37^\circ\text{C}$  verdaut. Präparative Verdaue mit Enzymen ohne Star-Aktivität wurden über Nacht inkubiert. Schnitt ein Enzym nicht nur an der gewünschten Stelle, sondern mehrmals in einer spezifischen Vektorsequenz, so wurde vorerst ein Probeverdau vorgenommen sowie anschließend partiell verdaut. Geschnittene Vektor-DNA wurde in der Regel mit 10 U Alkalischer Phosphatase (Promega) pro nmol DNA dephosphoryliert.

Die Elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 0,8-2%igen Agarosegelen bei 80-100 V in 1x TBE. Als Größenstandards bzw. zur Konzentrationsabschätzung wurden die kommerziell erhältlichen Marker  $\lambda$ /Hind III (Boehringer) und 1kb-Leiter (Promega) verwendet.

10 x TBE: 0,89 M Borsäure; 25 mM EDTA; 0,89 M Tris-HCl (pH 8,3)

5 x Probenpuffer: 50% (v/v) Glycerin; 50% (v/v) 10 x TBE; Bromphenolblau (0,2 g/ml)

### **3.2.14 Ligation**

Für Ligationen wurden generell ca. 150 ng Vektor pro Ansatz und ein Vektor:Insert Verhältnis von 1:1 – 1: 10 verwendet. DNA wurde hierzu in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert, in 10 µl Ligationsmix (5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 50 µgBSA/ml; 0,5 mM ATP; 50 mM Tris-HCl; pH 7,6) plus 1 Unit T4-DNA-Ligase (NEB) wieder gelöst sowie für 16 h unter zyklischem Wechsel zwischen 10°C und 30°C (Lund et al. 1996) im Thermocycler inkubiert. Bei Ligationen von Fragmenten mit glatten Enden wurde 50% PEG oder gegebenenfalls Restriktionsendonuklease zugesetzt um die Religation des Vektors zu reduzieren.

### **3.2.15 Verwendete Mutageneseverfahren**

Um Fusionen zweier DNA-Fragmente herzustellen, beispielsweise zur Klonierung von Deletionsfragmenten oder zur Insertion von Mutationen wurde eine ursprünglich als „Splicing by Overlap extension“ in die Literatur eingegangene PCR-Methode nach Aiyar *et al.* (1996) verwendet. Punktmutationen oder Insertionen wurden mit den von Geiser *et al.* (2001) und Salerno *et al.* (2005) beschriebenen (analog QuickChange<sup>TM</sup>-Protokolle; Clontech) PCR-basierenden Verfahren generiert. Zur Mutation von Promotorregionen bzw. um Expressionskassetten (Leserahmen inklusive Promotor und Terminator) in einem Schritt herzustellen, wurden analog zu MacFerrin *et al.* (1990) relevante Sequenzelemente als 5'-Extensionen mittels sehr langer PCR-Primer in die gewünschten Produkte eingebaut.

### **3.2.16 DNA-Sequenzierung**

Generell wurde die DNA-Sequenzierung mittels des ABI Prism BigDye Cycle Sequencing Kits III (Applied Biosystems) nach der Kettenabbruchmethode (Sanger 1977) durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem unter 3.2.9 beschriebenen Temperaturprogramm durchgeführt, unter Verwendung von MicroSpin G50 Säulchen (Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und im ABI Prism 377 DNA Sequencer analysiert.

Radioaktive Sequenzierungen für die Analyse von Primer Extension Produkten wurde mit dem fmol Cycle Sequencing Kit (Promega) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die

Elektrophorese erfolgte bei 1000-1500 V unter Verwendung der Sequenzierapparatur SQ3 von Hoefer.

**Rezeptur für 40ml 6% PA-Gel:** 5 ml 40% Polyacrylamidlösung, 21 g Harnstoff, 5 ml 10 x TBE,  
 28 ml H<sub>2</sub>O, 500 µl DMSO, 350 µl APS (10%), 50 µl TEMED  
 Haftsilan: 5% (v/v) Dichlordimethylsilan, 95% (v/v) Chloroform  
 Trennsilan: 25% (v/v) Ethanol, 0,75% (v/v) 10%ige Essigsäure, 0,075% (v/v)  
 3-Trimethoxy-silylpropylester

### 3.2.17 Präparation kompetenter Zellen (*E. coli*)

Zur Präparation kompetenter Zellen wurde ein 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB befüllt, mit ca. 2 ml einer frischen Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes beimpft und bei 37°C sowie 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in Oakridge Zentrifugenröhrchen (4°C) überführt, kurz auf Eis gekühlt und dann bei 1000g (4°C) über 10min geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert, ca. 30 min auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert und abschließend in 2ml CaCl<sub>2</sub>-Puffer (25% Glycerin) aufgenommen. 100-300 µl-Aliquots dieser Präparation wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C über mehrere Wochen gelagert. Um die Qualität der kompetenten Zellen zu überprüfen wurde vor einer weiteren Verwendung erst die Transformationseffizienz mit dem Kontrollplasmid pUK18 ermittelt.

Zur Transformation in *E. coli* wurden kompetente Zellen auf Eis getaut und in 50 µl Aliquots mit der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 42 sec wurde kurz (≈ 2 min) auf Eis gekühlt, mit 500 µl LB oder SOC supplementiert und für ca. 1 h bei 37°C im Schüttler (250 rpm) inkubiert. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurden Aliquots von 10-200 µl der Zellsuspension auf LB-Selektivagar ausplattiert.

Zur Selektion positiver Klone wurde bei den Vektoren pBluescript SK<sup>-</sup>, pCR II und pCR4 TOPO ein blau-weiß-Screening verwendet. Hierbei wurden vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes 40 µl IPTG (100 mM) und 40 µl X-Gal (40 mg/ml) auf die verwendeten LB-Platten aufgebracht. Positive Klone tragen eine Insertion im β-Galactosidasegen der genannten Vektoren, können somit den Farbstoff X-Gal nicht umsetzen und bleiben im Gegensatz zu den blauen, negativen Kolonien farblos.

LB:	Bactotrypton (10g/l), Hefeextrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l); pH=7 Agar (15 g/l)
SOC:	2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose (erst nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zusetzen!)
CaCl <sub>2</sub> -Puffer:	25 mM Tris (pH 7,5); 10 mM NaCl; 50 mM CaCl <sub>2</sub>

### 3.2.18 Transformation von *Halobacterium salinarum*

Zur Transformation von *Halobacterium salinarum* wurde eine PEG-vermittelte Methode in Anlehnung an Cline & Doolittle (1987) verwendet. *H. salinarum* Kulturen wurden mindestens zweimal unter Standardwachstumsbedingungen subkultiviert und bei einer optischen Dichte von ca. 50 Klett in 2 ml Aliquots über Zentrifugation (5000 rpm, 5 min) geerntet. Nach Resuspension der Zellen in 200 µl SPH-Puffer wurde durch Zugabe von 1/10 Vol 0,5 M EDTA (pH 8,0) die stark Magnesium-abhängige Glycoproteinhülle von den Zellen gelöst (Inkubation 5 min; RT). Die so erhaltenen Sphäroplasten wurden mit 1-5 µg DNA (in 2,5 M NaCl) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie anschließend mit 220 µl 60%iger PEG600 (in SPH-Puffer) Lösung versetzt und mehrmals invertiert. Um die PEG-Konzentration wieder zu minimieren wurden die Sphäroplasten in 1 ml REG-Lösung verdünnt und für 10 min bei 4000 rpm sedimentiert. Nach Resuspension in 2 ml Komplexmedium wurde über Nacht bei 100 rpm und 40°C inkubiert und in Aliquots (50-250 µl) auf Selektivagarplatten mit Mevinolin (10-15 µg/ml) oder Novobiocin (0,1-0,15 µg/ml) ausplattiert.

SPH-Puffer:	2M NaCl	REG-Puffer:	4.3 M NaCl
	25 mM KCl		80 mM MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O
	15 % Saccharose		27 mM KCl
	50mM Tris-HCl, pH 8.75		50 mM Tris-HCl, pH 7.4
			1.4 mM CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O
			10 mM Na <sub>3</sub> Citrat*2 H <sub>2</sub> O
			15 % Saccharose

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von 6 x HIS Proteinen

Zur Expression von 6 x HIS Fusionsproteinen wurde das PET-System (Novagen) und der *E. coli* Expressionsstamm *BL21 (DE3)-RIL* verwendet. Überexpressionen wurden in der Regel im 1-3 L Maßstab durchgeführt. Hierzu wurde mit 1/1000 Vol einer frisch transformierten Übernachtskultur inokuliert, bei 200 rpm und 37°C im Schüttler kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,6-0,9$ . In Abhängigkeit vom Aufreinigungsverfahren (Nativ oder Denaturierend) wurden hierbei 0,1-0,5 mM IPTG verwendet und für 90 min exprimiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 g (4°C) für 10 min. Zum Aufschluß der Zellen wurden diese in 10 Vol. Lysepuffer resuspendiert und in zwei Durchläufen mittels French Pressure Cell bei 1000 psi aufgebrochen. Bei denaturierender Aufreinigung in 8 M Harnstoff wurde lediglich mit einem Dounce Potter homogenisiert und mittels Ultraschall (3 x 30 sec; 50% output control; Branson Sonifier) aufgeschlossen. Hierbei werden Inclusion bodies wieder resolubilisiert und die im Lysat befindliche visköse chromosomale DNA durch Scherkräfte fragmentiert. Zellwandbruchstücke und Hochmolekulare Proteinkomplexe wurden in einer anschließenden Ultrazentrifugation bei 40 000g für 1 h (4°C) sedimentiert.

Die Aufreinigung von 6 x HIS-Fusionsproteinen wurde mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Ni-NTA Superflow; Qiagen) durchgeführt. Der lösliche Überstand aus der Ultrazentrifugation wurde hierzu für 1 h mit 3 ml Ni-NTA pro L Expressionskultur (Bindungskapazität: ca. 5 mg/ml) bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Transfer des an das Säulenmaterial gebundenen Proteins in 10 ml Polypropylen-Handsäulen wurde 3 x mit 10 Säulenvolumina Puffer W2 gewaschen und in 3 x 2 ml Puffer E3 eluiert.

Lysispuffer I	8M Harnstoff; 0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10mM Tris-HCl; pH 8,0
Lysispuffer II	2,15 M NaCl, 40mM MgSO <sub>4</sub> , 13,5mM KCl, 10mM Na <sub>3</sub> Citrat, 10mM HEPES; pH 8,0
Puffer W2	Lysispuffer mit 20mM Imidazol
Puffer E3	Lysispuffer mit 250mM Imidazol, pH 7,0

### 3.3.2 Rückfaltung und Dialyse von rekombinantem Protein

Zur Rückfaltung von halophilen Proteinen wurden diese in Dialyseschläuchen (Ausschlußgröße 10 kDa) mit Arginin als chemisches Chaperon (Endkonzentration 1M) für 2x 2h bei 20°C gegen Hochsalzpuffer (4,3 M NaCl, 80 mM MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O, 27 mM KCl, 10 mM Na<sub>3</sub>Citrat, 20 mM HEPES, pH 7,0) dialysiert. Anschließend wurden die Proteinlösungen 2 x gegen 1000 Vol des gewünschten Puffers, in der Regel ½ Basalsalz dialysiert um letzte Rückstände von Imidazol oder Harnstoff zu entfernen.

### 3.3.3 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese von Protein

Die Auftrennung von Proteinen im Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes wurde nach Laemmli (1970) oder Schagger & Jagow (1987) durchgeführt. Vor dem Auftrag wurden Proben in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 90°C denaturiert sowie dabei entstehende Aggregate bei 15 000g für 1 min abzentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von ca. 40mA. Zur Färbung von Proteinen im Gel wurde Coomassie Brilliantblau R250 verwendet. Polyacrylamidgele wurden für 1 Stunde in Färbelösung (0,1% Coomassie, 50% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert sowie anschließend mit Fixierlösung (16% Isopropanol, 10% Essigsäure) 2 x 30 min entfärbt.

### 3.3.4 Silberfärbung nach Blum (1987)

Polyacrylamidgele wurden durch Inkubation für mindestens 2 x 30 min in 50% Methanol, 12% Essigsäure und 3 x 20 min Schütteln in 50% Ethanol fixiert, 1 min in 2mM Thiosulfatlösung inkubiert und 2 x 1 min in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte für 20 min in 24mM Silbernitrat, 0,055% Formaldehyd. Nach erneutem Waschen in deionisiertem H<sub>2</sub>O wurde mit 1,13M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0,08% Thiosulfat, 0,074% Thiosulfat entwickelt, kurz in Wasser getaucht und in 1% Essigsäure bei 4°C aufbewahrt.

### 3.3.5 Thiolgruppenbestimmung

Zur Bestimmung von freien Thiolgruppen wurden homogene Proteinlösungen (10-50 µM) in ¼ Basalsalzpuffer (Reaktionsvolumen 1ml) mit 90 µl 2,5 mM DTNB-Lösung (Ellmans-Reagens) versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze bei 412nm photometrisch vermessen (Extinktionskoeffizient  $\epsilon = 13,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.3.6 $\beta$ -Galactosidase Reporter Assay

Als Reporter gen für Genexpressionsstudien wurde die halophile  $\beta$ -Galactosidase BgaH aus *Haloferax alcalanti* verwendet. Zur Bestimmung von Expressionsniveaus der zu untersuchenden Gene wurden deren Promotoren in den Reportervektor *pReport* kloniert und in *Halobacterium salinarum* transformiert. Unter der Voraussetzung einer Substratsättigung liefert die gemessene Enzymaktivität Rückschlüsse auf die eingesetzte Enzymmenge und somit unter Vernachlässigung der Translationseffizienz auf die Transkriptionsstärke.

Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Zellsaten wurde mittels des Substratanalogons ONPG (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) colorimetrisch ermittelt. Jeweils 100  $\mu$ l Zellsuspension wurden in 700  $\mu$ l Testpuffer (2,5 M NaCl, 10  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>, 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2) aufgenommen, mit 100  $\mu$ l 2% Triton X-100 unter mehrmaligem invertieren lysiert. Die enzymatische Reaktion wurde unmittelbar vor der Messung mit 100  $\mu$ l ONPG (8 mg/ml) gestartet. Das farbige Produkt o-Nitrophenol ( $\epsilon = 3,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wurde über 30-60 min als Absorptionsänderung bei 405 nm verfolgt. Ein Unit ist definiert als die Menge an Enzym, welche 1  $\mu$ M ONPG in 1min bei 37°C hydrolysiert. Bei zu hohen oder zu niedrigen Aktivitäten wurden Zellen entweder verdünnt oder für 5 min bei 10 000 rpm sedimentiert und in der benötigten Zelldichte wieder resuspendiert.

$$\text{Lambeert-Beersches Gesetz: } \Delta A_{405} / \Delta t = \epsilon \cdot d \cdot \Delta c / \Delta t$$

A = Absorption bei 405nm

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

c = Konzentration [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]

t = Zeit in min

### 3.3.7 Präparation halobakterieller Zellfreiextrakte

*Halobacterium salinarum* Kulturen wurden zu diesem Zweck bei 8000 rpm (Sorvall GS3 Rotor) geerntet und in CFE-Puffer (1ml/g Naßgewicht) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (2 x 15 sec, output control 5, duty cycle 50%; Branson Sonifier). Zellwandbruchstücke und Membranen wurden anschließend bei 14 000rpm (4°C) in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der somit gewonnene Überstand wurde mit ¼ Vol. 50% PEG<sub>6000</sub> (in CFE) versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und erneut 10 min bei 14 000rpm zentrifugiert.

CFE-Puffer		
Substanz	Konzentration	Festeinwaage/L
KCl	3 M	223,68 g
NaCl	1 M	58,44 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,4 M	21,39 g
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,04 M	8,13 g
Tris-HCl (2 M), pH 7,5	0,01 M	5 ml

### 3.3.8 Analytische Gelfiltration

Die Größenausschlußchromatographie wurde einerseits zur annähernden Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen sowie zum Nachweis von oligomeren Komplexen verwendet. Hierzu wurden Sephadex S75 und S200 Säulen an einem „SMART“ FPLC-System (Pharmacia) mit einer Flußrate von 40 µl/min benutzt.

## 3.4 Biophysikalische Methoden

### 3.4.1 Fluoreszenzspektroskopie

In dieser Arbeit wurde vorwiegend die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von Proteinen und deren Änderung durch Ligandenbindung gemessen. Die erhaltene relative Fluoreszenz wird vom Gehalt an aromatischen Aminosäuren sowie der Konformation und Umgebung des Proteins bestimmt. Hierbei tragen Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin in einem Verhältnis von 1100:200:8 zum Signal bei. Alle Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm mittels eines Shimazu F-2000 Fluoreszenzspektrophotometers durchgeführt. Die Liganden-induzierte Fluoreszenzabnahme wurde in %  $F_x - F_0 / F_0$  angegeben.

Fluoreszenzmarker	Ex $\lambda_{max}$	Em $\lambda_{max}$
ROX	576 nm	601 nm
6-FAM	495 nm	520 nm
Cye3	550 nm	570 nm
Cye5	649 nm	670 nm
GFP	480 nm	520 nm
CFP (CFP-YFP)	432 nm	475 nm
YFP (CFP-YFP)		525 nm



### 3.4.2 Circular Dichroism (CD) Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie bedient sich des unterschiedlichen Absorptionsverhaltens optisch aktiver Substanzen für links- beziehungsweise rechts zircular polarisiertes Licht. Gemessen wird hierbei die Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$ . Sie beschreibt die Differenz der Absorptionskoeffizienten einer Substanz für links- beziehungsweise rechtspolarisiertes Licht und wird auch als Cotton-Effekt bezeichnet. Die CD-Spektroskopie liefert in der Fern-UV-Region (170-250 nm), in der vorwiegend die Peptidbindung absorbiert, Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen. Im Nah-UV-Bereich (250-300 nm) wird das CD-Signal vor allem von assymetrischen aromatischen Aminosäureresten verursacht, woraus Aussagen über die Tertiärstruktur abgeleitet werden können. CD-Spektroskopische Analysen wurden mit dem Spektropolarimeter Jasco-J715 (Jasco, Tokio, Japan) durchgeführt. Spektren wurden in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1-2 mm aufgenommen, über 8 Messungen gemittelt und gegen den Meßpuffer korrigiert. Die gemessene relative Elliptizität in mDegree wurde nach folgender Formel als molare Elliptizität eines spezifischen Proteins dargestellt. Um Protein-DNA-Interaktionen zu messen wurde im Nah-UV-Bereich bei 250-340 nm gemessen. In diesem Wellenlängenbereich dominiert vorwiegend die Nukleinsäureabsorption.

$$\Theta_{\text{MRE}} = \Theta * M * 100 / (c * d * N_{\text{AA}})$$

$$\Theta_{\text{MRE}} = \text{Molare Elliptizität in Degree} * \text{cm}^2 * \text{d} * \text{mol}^{-1}$$

$$\Theta = \text{Elliptizität in mDegree}$$

$$M = \text{molare Masse des Proteins}$$

$$c = \text{Proteinkonzentration in mg/ml}$$

$$d = \text{Schichtdicke der Küvette in cm}$$

$$N_{\text{AA}} = \text{Anzahl an Aminosäuren des gemessenen Proteins}$$

### 3.4.3 Thermische Denaturierung

Um Informationen über die Stabilität von Proteinen in Lösungen unterschiedlicher Beschaffenheit zu erhalten wurden thermische Denaturierungsübergänge mittels CD-Spektroskopie analysiert. Hierbei wurden Proteinproben in einem Temperaturgradienten von 25-90°C (0,5°C / min) denaturiert und dabei die Elliptizität bei einer Wellenlänge von 222 nm gemessen. Um Artefakte verursacht über temperaturabhängige Puffersubstanzen zu vermeiden wurde ausschließlich Phosphatpuffer verwendet.

Für reversible Entfaltungsübergänge konnten mittels nachstehender Formel thermodynamische Parameter bestimmt werden.

## 3.5 Verwendete Materialien

### 3.5.1 Geräte

Bioanalyser 2100 Kapillarelektrophorese	Agilent, Karlsruhe
Elektroporationsgerät Genepulser	BIORAD
Gene Amp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Hybridisierungsöfen OV5	Biometra, Göttingen
Ultraschallaufschluß Sonifier 450 Branson	Branson, Dunbury, US
ChipWriter Pro™	Virtek, Waterloo, US
Klett Summerson Photoelectric Colorimeter	Klett Manufacturing
Ultrospec 3000 Spektrophotometer	Amersham Bioscience
F-2000 Fluoreszenzspektrophotometer	Shimazu, Japan
Spektropolarimeter Jasco-J715	Jasco, Tokio, Japan
French Pressure cell	American Instruments, Silver Spring, US
Multi Cycler PTC200	MJ Research
MultiScreen 96-well Vakuum Konzentrador	Millipore, Eschborn
SMART FPLC System	Pharmacia Biotech
Scanner Gene Pix 4000B	Axon Instruments Inc.
UV-Stratalinker™ 2400	Stratagene, Amsterdam, NL
Victor 3 1420 96-well plate reader	Perkin Elmer

### 3.5.2 Verwendete Enzyme und Kits

CyScribe First strand cDNA-labelling Kit	Amersham Biosciences
Cy3- und Cy5dUTP	Amersham Biosciences
ABI Prism BigDye Cycle Sequencing Kits III	Applied Biosystems
DIG Easy Hyb Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG-dNTP-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
CSPD Chemilumineszenzsubstrat	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Wash and Block buffer set	Roche Diagnostics, Mannheim
DNAfree™	Ambion, Huntingdon, UK
peqGOLD RNAPure	Peqlab, Erlangen

QIAprep Plasmidextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNA6000 Nano Labchip Kit	Agilent
SeeBlue2 Protein Marker	Invitrogen
Microarray-Hybridisierungskammern	Corning, Schiphol, NL
MicroCon Ym 30 Mikrokonzentratoren	Millipore, Eschborn
Multiscreen 96-well PCR Aufreinigungsplatten	Millipore, Eschborn
Polyprep-L-Lysin Microarrayträger	Corning, Schiphol, NL
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen
RNA 6000 LabChip	Agilent, Karlsruhe
T4 RNA-Ligase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	Invitrogen
GeneScan™ 500 LIZ™ Längenstandard	Applied Biosystems
1 kb Ladder	Gibco BRL
Lambda/Hind III Längenstandard	NEB
Taq- und Vent <sup>R</sup> - Polymerasen	NEB
Restriktionsenzyme, CIAP	NEB
RNAse-Inhibitor, cloned	Ambion, Huntingdon, UK
LA-Taq	TAKARA BIO Inc., Shiga, Japan
Random Hexamers	Applied Biosystems
DNA-Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
RnaseZap	Ambion, Huntingdon

### 3.5.3 Verwendete Reagenzien

1,2-Dichlorethan	Merck, Darmstadt
1-Methylimidazol	Fluka
Natriumarsenit	Sigma-Aldrich
Natriumarsenat	Sigma-Aldrich
Bismuthnitrat	Fluka
MOPS	Biomol
TEMED	Carl Roth
IPTG	Gerbu
Coomassie R-250	Serva
Antimon(III)chloride	Merck

Ni-NTA superflow	Qiagen, Hilden
Streptavidin-Sepharose	Amersham Biosciences
$\gamma$ - <sup>32</sup> P ATP	Amersham Biosciences
Bäckerhefe tRNA	Roche Diagnostics

Hier nicht aufgelistete Standardlaborchemikalien und Medienbestandteile wurden bei den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Carl Roth bzw. Difco Laboratories bezogen.

### 3.5.4 Computerprogramme und Datenbanken

GeneAmp 5700 SDS	Applied Biosystems, Foster City, US
GenePixPro 4.0	Axon Instruments Inc., Union City, US
Primer Express 2.0	Applied Biosystems, Foster City, US
DNA Tools	<a href="http://biology.semo.edu/cgi-bin/dnatools.pl">http://biology.semo.edu/cgi-bin/dnatools.pl</a>
BioEdit 7.0.5.3	Hall TA (1999)
TIGR MeV 3.0.3	(Saeed et al. 2003)
Clonemanager 7.0	Sci Ed Central
Halolex	<a href="http://www.halolex.mpg.de/">http://www.halolex.mpg.de/</a>
ExPASy	<a href="http://www.expasy.ch/tools/">http://www.expasy.ch/tools/</a>
R-Statistikprogramme	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
R-Erweiterungsprogramme	(Twellmeyer et al. 2007)
NCBI BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
RNAstructure 4.11	Mathews DH (2006)
SigmaPlot 2000	SYSTAT Software Inc.; San Jose, US
Corel Draw 11	COREL
Microsoft	Microsoft
RSAT	<a href="http://rsat.ulb.ac.be/rsat/">http://rsat.ulb.ac.be/rsat/</a>
Prodoric Virtual Footprint	<a href="http://prodoric.tu-bs.de/vfp/">http://prodoric.tu-bs.de/vfp/</a>
BEST	(Che et al. 2005)
WebLogo 3.0	<a href="http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi">http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi</a>

### 3.5.5 Bakterienstämme und Plasmide

**Tabelle 3.5.5.1** Verwendete *E.coli* und *Halobacterium salinarum* Stämme

<i>E.coli</i> Stämme	Genotyp	Referenz / Hersteller
XL1Blue	Sup E44, hsdR17, recA1, gyrAS46, thi-1, relA1, lac <sup>-</sup> ,	Bullock et al. (1987)

	[F'proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> lacZΔM15, Tn10(tet <sup>Y</sup> )]	
DH5α	F <sup>-</sup> endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, o80dlacZ M15	Stratagene Gibco-BRL
BI21(DE3)-RIL	F <sup>-</sup> opmT, hsdS(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), dcm <sup>+</sup> , tetr, galλ(DE3), endA, Hte [argU, ileY, leuW, Cam <sup>r</sup> ]	Studier & Moffatt (1986), Phillips et al. (1984), Stratagene
Rosetta-gami 2 (DE3)	K12; Δ(ara-leu)7697, ΔlacX74, ΔphoA, PvuII phoR, araD139, ahpC, gale, galK, rpsL, (DE3), F''[lac <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> pro], gor522::Tn10, trxB, pRARE2, (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Studier et al. (1990),  Studier (1991)  Novagen
<b><i>H. salinarum</i> Stämme</b>		
R1 Wildtyp (DSM 671)		DSMZ
S9	BR <sup>++</sup> , Car <sup>-</sup>	
TOM	Br <sup>-</sup> , HR <sup>-</sup> , SRI <sup>+</sup> , SRII <sup>+</sup> , Car <sup>-</sup> , Rub <sup>-</sup> , Ret <sup>+</sup>	
ΔArsM		diese Arbeit
ΔArsC		diese Arbeit

**Tabelle 3.5.5.2** Verwendete Plasmide

<b>Plasmidvektoren</b>		<b>Resistenzmarker</b>	<b>Hersteller / Referenz</b>
Pet36b		Km <sup>R</sup>	Novagen
Pet22b		Amp <sup>R</sup>	Novagen
pbluescript		Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pKD46	<i>λ bet, gam, exo</i>	Amp <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner (2000)
pMKK100	<i>bgaH</i>	Amp <sup>R</sup> , Mev <sup>R</sup>	Koch et al. (2005)
pNP22	<i>Bop-Promotor</i>	Amp <sup>R</sup> , Mev <sup>R</sup>	Patenge et al. (2000)
pReport	<i>bgaH</i>	Amp <sup>R</sup> , Mev <sup>R</sup>	diese Arbeit
pNP26-R	<i>fdx-Promotor</i>	Amp <sup>R</sup>	Patenge et al. (2000)
pMLH32	<i>bgaH</i> , pHK2- oriV	Amp <sup>R</sup> , Nov <sup>R</sup>	Holmes et al. (2000)
pBlueSilenceII	<i>bop</i> ,  <i>aph-P</i>	Amp <sup>R</sup> , Mev <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 3.5.6 Verwendete Oligonukleotide und Primer

Tabelle 3.5.6.1 Primer für die qualitative RT-PCR

Primername	Sequenz	Tm	Produktlänge
P2ArsC(+200)rev	TCGAATCCTTCCTCACCCATTAC	68°C	540bp
P1ArsR(-240)fw	GCCCTTGCTAACGAGACACGAT	68°C	
P1ArsD	ATGACTCAACTCACCTGTACGA	68°C	447bp
ArsA(+120)rev	TTGCCGTGGCACAGCTGACAG	68°C	
ArsA(-335)fw	TTGCGTTCGTGATGTACCCCGA	68°C	445bp
5442(+120)rev	TGCCTCGAGTGCCTCGCGTG	68°C	
P1.5443(360)fw	ATGGTTCAGGACGCAACCGCTG	70°C	503bp
P2.5444(+150)rev	ACAGCAACCACCGTCGCCAGA	68°C	
ArsA(-335)fw + P2.5444(+150)rev			1575bp

**Tabelle 3.5.6.2** Primer für die quantitative Echtzeit-RT-PCR Analyse. Alle aufgelisteten Primer wurden mit dem Programm Primer Express ausgewählt und besitzen Annaelngtemperaturen von 59-61°C Die erwartete Produktlänge liegt zwischen 80 und 150 bp.

Primername	Sequenz	Primername	Sequenz
P1.16SrRNA	TGGTCCGAAGGAATGAGGATT	P2.16SrRNA	TGTCACCAAACCATCAAGGCTAA
P1.RT-bgaH	GCCTACGAACGGTTAGTAACGAC	P2.RT-bgaH	GTGAAAAACCACCATGAAGTTG
P1.RT-grx1	GAAACGAAACTCGACGAGCT	P2.RT-grx1	CGTCGATGTCTGGTTCGG
P1.RT-TrxA	CAGGATCCGATCCTCGAAGA	P1.RT-TrxA	GGTACTCGTTTTGCGACGTCC
P1.RT-ArsR	GATGTCAGTGACAGCGCGATT	P2.RT-ArsR	ACTTTCGCCATTTCCCGTCT
P1.RT-ArsD	AAGAAGCGATGTGCTGTTC	P2.RT-ArsD	CGTTTTCGAGTTGGTTCGAGG
P1.RT-5443	GGCGCAAGGAAGGATCGT	P2.RT-5443	TCGTCGAGCGTTTCGAGC
P1.RT-ArsC	GATGCAGAAACGGTTCGATGTC	P2.RT-ArsC	CCGAATCTCCCGAACCTGTT
P1.RT-ArsA	GCCAGCGAAAGAAGTTGTTGA	P2.RT-ArsA	CGTGGCACAGCTGACAGTACTC
P1.RT.ArsM	TCGACGATCTCAAAGCTATGCTT	P2.RT.ArsM	CGTCCCAGTTCGCTGATGAAC
P1Oe1838.RT	GTACGACACGGTCGTGTTC	P2Oe1838.RT	GACAACCAGCGCCGTTC
P1yqjM.RT	GACATAGAAGACGTCGTGGA	P2yqjM.RT	TGGTGGATGAGGTAGCCGT
P1noxC.RT	TCCGGACACAACCTTCGACC	P2noxC.RT	CGTCTGAACGGCGACGA

**Tabelle 3.5.6.3** Primer zur Bestimmung von Transkriptionsstarts

Pe-Primer	Tm	Primerlänge	Sequenz 5'-3'	Position (relativ zum jew.ATG)
Pe.ArsR	68°C	23bp	TGATAATACACCTACGTCCGCT	(127) – (150)
Pe.ArsR (II)	70°C	24bp	GCTATGTGGAGGATTCGGATAATC	(176) – (200)
Pe.ArsR (III)	70°C	23bp	TCACAGACACAGAGCTCTTACC	(202) – (224)
Pe.ArsD	68°C	22bp	TTGCATATTGCTCGCGACACG	(128) – (150)
Pe.5443	68°C	21bp	ACTGTGGCTTCGAGGTCCGAG	(179) – (200)
Pe.5443 (II)	74°C	22bp	GCGTCGGAGGAGTTCGTACCGG	(128) – (150)
Pe.ArsC	74°C	23bp	GGCTGGATGGGTCCCTCCAGTAA	(127) - (159)
Pe1.DpsA	74°C	24bp	CTTCTTGAGCTGGTGGTAGAGGAC	(126) – (150)
Pe2.DpsA	74°C	23bp	AGGAACAGGTGCAGGTCCCGGAA	(177) – (200)
Pe.Grx3949	74°C	23bp	GGTCTGTCCGCTGACCGATTCCA	(127) – (150)
Pe.hsp70	74°C	22bp	CAGCAACTCGCCGTCGTCTGG	(128) - (150)
Pe.GrpE	74°C	21bp	GGCGTTGTCCGGTCCAGCGC	(129) – (150)
Pe.TBPE	74°C	22bp	CTGCGTGCGGTAGACCAGGCCG	(128) – (150)
Pe.hsp20	70°C	22bp	GGTTTTCGTGAACGTCGACGTGG	(128) - (150)
PE.TrxA2	74°C	23bp	CTCGTTTTGCGACGTCTCCGGCTT	(127) – (150)
Pe.Oe3112	72°C	22bp	TCGATGCGGACGACGCCGTCG	(127) – (150)
Pe.Oe3112 (II)	70°C	22bp	CGTGACTTGATCGTCGATCCC	(178) – (200)
Pe.hsp5	70°C	21bp	CTCGGATCGAAGCCCCGCAT	(127) – (150)
Pe.hsp5 (II)	70°C	21bp	TGTTCCGGCGGCGATGTTGAGGA	(178) – (200)
Pe.TfbB	74°C	22bp	ACAGACCGACTCGCCGTGCTCC	(127) – (150)
Pe.TfbG	74°C	23bp	GTCGTTGCAGACCAATTCCGCGC	(127) – (150)
Pe.Oe4509	70°C	23bp	TAGATGTGGATCTTGTCCGGTCCC	(177) – (200)

Pe.HistonA1	72°C	22bp	ACGATCCCCTCGAAGTCGGACG	(178) – (150)
Pe.P45 (rspA)	74°C	23bp	GTTCCCGTCCACCATCGTGGTCT	(127) – (150)
Pe. trpC	70°C	21bp	CCGCTGTGTTCCGGTGTCCGGTG	(129) – (150)
Pe.ribC	72°C	22bp	TTCGACGGTGAGACAGACGCCG	(128) – (150)
Pe.Dodecin	74°C	22bp	CTCGACGGCGCCGATTTCCGACG	(128) – (150)
Pe.HQArsR	70°C	23bp	GAGTTCGACATCTTCGTTCCAGCG	(127) – (150)
Pe.HQArsR (II)	70°C	24bp	TGGAGAATGCGAACGATCTTGATAC	(176) – (200)
Pe.HQArsD	70°C	24bp	CATATTTGCTCGCGAGATATCGAC	(126) – (150)
Pe.HQArsD (II)	70°C	25bp	ATCAGTTCGGAGATAGATTGCATCT	(175) – (200)
<b>Kontrollen</b>				
Pe.bop	70°C	21bp	AACGCGATGGCTGGGACGAGC	
Pe.ArcC	74°C	23bp	GACTCCGCCTCCTCGTTCTGCAA	

**Tabelle 3.5.6.4** Primer zur Klonierung von Expressionskonstrukten

P1ArsR.ex	TTTTTTCATATGTCATCGACCGAGCGGT
P2ArsR.ex	TTTTTCTCGAGTCTGCGGGATCCGTTCACT
P1ArsD.ex	TTTTTCAATGACTCAACTCACCTGTAC
P2ArsD.ex	TTTTTCTCGAGCGCTTCTGTGGGCTGGGGA
P1ArsD(Y7-W)	TTTTTTCATATGACTCAACTCACCTGTGGGAAGAAGCGATGTG
P2ArsD(Y7-W)	TTTTTCTCGAGCGCTTCTGTGGGCTGGGGA
P1ArsR2.ex	TTTTTTCATATGGTTCAGGACGCAACCGC
P2ArsR2.ex	TTTTTCTCGAGTTCATGGTTGCCTCGCAGGTC

**Tabelle 3.5.6.5** Primer zur Klonierung von Promotor-Reporterkonstrukten

**Deletion des *arsR*-Promotors**

P1.PrArsR (342 bp)	TTTTTTGGATCCTTCGTGGATCGAAGGGAGTTG
P1.PrArsR (242 bp)	TTTTTTGGATCCTGTGTATAAGCGCTTTGGTC
P1.PrArsR (142 bp)	TTTTTTGGATCCAAGCTTCTGCTTTCTCGAACG
P1.PrArsR (113 bp)	TTTTTTGGATCCGTCTATTCGTTAAGATGGGCGA
P1.PrArsR (82)	TTTTTTGGATCCTACTAAGCAGCCAAATGTGCGA
P1.PrArsR (62 bp)	TTTTTTGGATCCTCAATTAGAGACCCGTGGCTC
P2.PrArsR	TTTTTCTGCAGTGACATGGCTCTGATTTAAGCAT

**5'-Deletion des *arsD*-Promotors**

P1PrarsD(342)	TTTTTTGGATCCGTGTTGTGTACGGAGCCACG
P1.PrArsD(166)	TTTTTTGGATCCTCACAGACACCGTTTCTCCTGAT
P1.PrArsD(133)	TTTTTTGGATCCTGTCTTGAAGATACTGACCAAAG
P2.PrArsD	TTTTTCTGCAGCATTCTGGATCGAAGGGAGT

**Mutation des *arsD*-Promotors**

P2PrArsD(Z)	TTTTTCTGCAGCATAACGATTACACGTTGTTGTCTCATTTTACTGT
P2PrArsD(Z1)	TTTTTCTGCAGCATAACGATTACACGTTG <b>CC</b> TGTCTCATTTTACTGT
P2PrArsD(Z2)	TTTTTCTGCAGCATAACGATTACACGTTGTTGTCTCA <b>CC</b> TACTGT
P2PrArsD(Z2)	TTTTTCTGCAGCATAACGATTACACGTTGTTGTCTCATTTTACTGT <b>C</b> <b>C</b> GTTCATATG
P2PrArsD(Z3)	TTTTTCTGCAGCATAACGATTACACGTTGTTGTCTCATTTTACTGTC CGTTCAT <b>CC</b> GTGTATAAGCG
P2.PrArsD(A)	TTTTTCTGCAGCATTNNNNGATCGAAGGGAGTTGTTTCGA
P2.PrArsD(B)	TTTTTCTGCAGCATTCTGGATNNNNGGGAGTTGTTTCGATTGAG
P2.PrArsD(C)	TTTTTCTGCAGCATTCTGGATCGAAGGGNNNNGTTTCGATTGAGTAG GCGA
P2.PrArsD(D)	TTTTTCTGCAGCATTCTGGATCGAAGGGAGTTGTTNNNNTGAGTAG GCGATACACC

P2.PrArsD(E)	TTTTTCTGCAGCATTTCGTGGATCGAAGGGAGTTGTTTCGATTGANNNN GCGATACACCGAGTC
P2.PrArsD(F)	TTTTTCTGCAGCATTTCGTGGATCGAAGGGAGTTGTTTCGATTGAGTAG GCGNNNNACCGAGTCATCTCCAGC
P2.PrArsD(G)	TTTTTCTGCAGCATTTCGTGGATCGAAGGGAGTTGTTTCGATTGAGTAG GCGATACACNNNNCATCTCCAGCACTG
P2.PrArsD(H)	TTTTTCTGCAGCATTTCGTGGATCGAAGGGAGTTGTTTCGATTGAGTAG GCGATACACCGAGTCATCNNNNGCACTGAGCTG
P1PromArsC	TTTTTTGGATCCGAGACAGCGCCGCACGAGG
P1PromArsC	TTTTTTCATATGCATACTTATTCGACTCTTTG
P1Prom5443	TTTTTTGGATCCGCGGCCGAATCCCTCGG
P2Prom5443	TTTTTTCATATGCATATCAGCTCTAGCTTATAACAATCAAGC
P1PromArsM	TTTTTTGGATCCATCGCGAACGCCGACGAC
P1PromArsM	TTTTTCTGCAGGACCATCGTCTCGTTGTCATTA

**Tabelle 3.5.6.6** Primer für die Sequenzierung

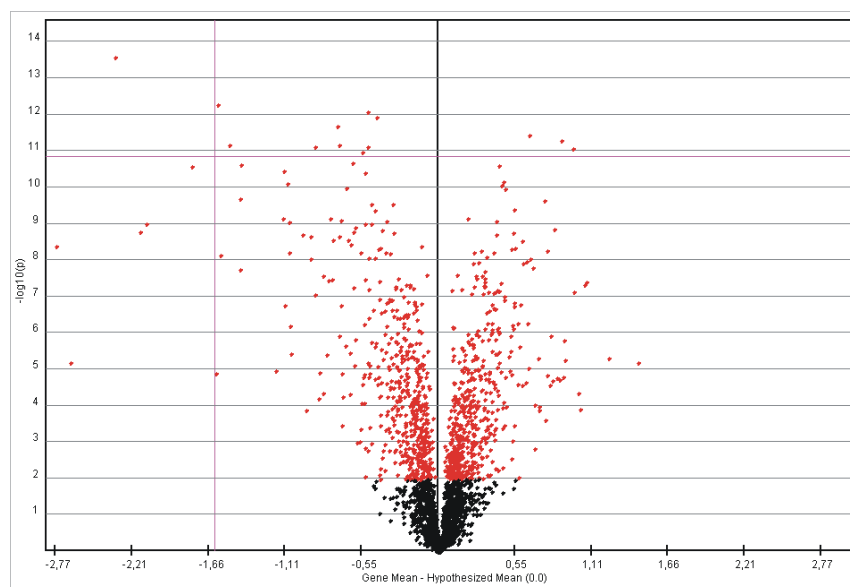
BgaHrev(sequencing)	CTCTCGCGACCAGTGCTCCGG	72°C
His-tag.rev (sequencing)	GTGATGGTGATGGTGATGCGA	64°C
T7-Terminator (PET)	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	60°C
T7-Promotor (PET)	TAATACGACTCACTATAGGGAG	62°C
P2sequ.β-Mast	TCCCATGCCACTCTTCACAC	62°C
P1sequ.β-Mast	GTACCACCGTGAGAGACAC	60°C
P1sequ.BPH	AGCTCGGAATTAACCCTCAC	60°C
pSTblue-1(f)	TGACCATGATTACGCCAAG	56°C
pSTblue-1(r)	CCATTTAGGTGACACTATAG	56°C



## 4 Ergebnisse

### 4.1 As<sup>III</sup>/Sb<sup>III</sup>-Stress: Globale Veränderungen

Im Gegensatz zu *Haloferax volcanii* toleriert *Halobacterium salinarium* R1, wie auch *Halobacterium NRC-1* (Wang et al. 2004) und *Haloquadratum walsbyi*, relativ hohe Arsenitkonzentrationen im millimolaren Bereich. Um nähere Informationen zur generellen Stressantwort zu erhalten beziehungsweise um spezifisch Arsenit- beziehungsweise Antimonit-abhängig regulierte Gene zu finden wurde eine globale Genexpressionsanalyse mittels Microarrays durchgeführt. Hierzu wurden RNA's aus unbehandelten und mit 25 µM Antimonit für eine Stunde bei (40°C, 100 rpm, im Dunkeln) inkubierten Zellen gewonnen. Diese wurden wie in Material und Methoden beschrieben in getrennten Reaktionen mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Synthese der cDNA wurden für die Antimonit-behandelten bzw. unbehandelten Proben Desoxyribonukleotide mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern (Cye3, Cye5) verwendet. Nach Aufreinigung wurden cDNA's von unbehandelter und Antimonit-behandelter Probe vereint und wie von Twellmeyer *et al.* (2007) beschrieben zur Hybridisierung von *Halobacterium salinarum* Gesamtgenom DNA-Microarrays verwendet.



**Diagramm 4.1.1** Vulkan-Diagramm, welches die Verteilung der einzelnen Datenpunkte des Antimonit-Microarrayexperimentes um den Mittelwert darstellt und eine Unterscheidung von signifikant (rote Punkte) beziehungsweise nicht signifikant (schwarze Punkte) regulierten Genen (t-Test,  $p \leq 0,001$ ) ermöglicht.

Die in Tabellen 4.1.1 und 4.1.2 dargestellten signifikant, positiv und negativ, differentiell exprimierten Gene stellen das Ergebnis einer einzelnen biologischen Probe mit technischer Reproduktion dar. Eine detaillierte Beschreibung zur Datenprozessierung und statistischen Auswertung ist in Twellmeyer et al. (2007) nachzulesen.

**Tabelle 4.1.1** Liste der unter  $Sb^{III}$ -Stress (25 $\mu$ M; Expositionsdauer = 2 h) positiv regulierten Gene: Regulationsfaktoren sind als Log2-Regulationsfaktoren und X-fache Regulation durch einen Farbkode: rot  $x \geq 2,5$  orange  $x = 1,5 - 2,5$  und grau  $x \leq 1,5$  gekennzeichnet. Gene, welche als Operon vorliegen beziehungsweise auf einem polycistronischen Transkript liegen, wurden mit einem Stern ( \* ) markiert.

Gen	Halolex-Code	Funktion oder Homologie	Regulation-Regulationsfaktor	Log2	SD
<b>Arsenresistenz</b>					
<i>arsD</i>	<i>Oe5438F</i>	$As^{III}$ -abhängiger Transkriptionsregulator	6,36	-2,67	0,91
	<i>Oe5442F</i>	Konserviertes <i>ars</i> -Operon ORF	4,47	-2,16	0,28
<i>arsM</i>	<i>Oe5444F</i>	SAM-abh. Arsenitemethyltransferase	2,69	-1,43	0,12
<i>arsA</i>	<i>Oe5440F</i>	$As^{III}$ -efflux treibende ATPase	2,13	-1,09	0,13
<i>arsR2</i>	<i>Oe5443F</i>	$As^{III}$ -abhängiger Transkriptionsregulator	1,50	-0,58	0,38
<b>Schwermetallresistenz (außer <math>As^{III}</math> / <math>Sb^{III}</math>)</b>					
<i>oxr4</i>	<i>Oe1698</i>	Put. Oxidoreduktase	5,06	-2,34	0,09
		aldo/keto-Reductasefamilie			
<i>yvgX</i>	<i>Oe2042F</i>	Put. Kupfertransport - ATPase	4,35	-2,12	0,26
	<i>Oe2046F</i>	Konserviert. Hypothetisches Protein	1,72	-0,78	0,14
<i>merA</i>	<i>Oe1260R</i>	Put. Quecksilberreduktase	1,67	-0,74	0,05
<i>CadA</i>	<i>Oe1245F</i>	Zink/Cadmiumexport-ATPase	1,54	-0,62	0,08
<b>Oxidativer Stress und allgemeine Stressantwort</b>					
<i>Grx</i>	<i>Oe3949R</i>	Glutaredoxin Homolog	6,82	-2,77	0,40
*	<i>Oe2357</i>	Alkanalmonooxygenase Homolog	3,43	-1,78	0,15
	<i>Oe1838R</i>	Chaperon Hsp31 Homolog	3,07	-1,62	0,60
		DJ-1/ThiJ/PfpI-Superfamilie			
<i>yqjM*</i>	<i>Oe2360R</i>	NADH-Oxidase Homolog Flavin	3,03	-1,60	0,09
<i>noxC*</i>	<i>Oe2364R</i>	NADH-Oxidase (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -bildend)	2,71	-1,44	0,25
*	<i>Oe3114</i>	Hypothetisches Protein	2,17	-1,12	0,10
<i>Fer1</i>	<i>Oe3974R</i>	dnaJ N-terminal domaine / Ferredoxin Fusion	1,91	-0,93	-0,13
<i>cctB</i>	<i>Oe3925R</i>	Thermosom $\beta$ -Kette	1,85	-0,89	0,39
	<i>Oe2473</i>	Glutathion S-Transferase N-terminal	1,74	-0,80	0,15
<i>bcp</i>	<i>Oe2717R</i>	Thioredoxin-abhängige Hyperperoxidperoxidase	1,73	-0,79	0,09
*	<i>Oe3116</i>	Sialidase Homolog	1,65	-0,72	0,05
<i>trxA2</i>	<i>OE4648F</i>	Thioredoxin	1,52	-0,60	0,39

<i>pan1</i>	<i>Oe1765</i>	Pot. Proteasom regulat. Funktion	1,49	-0,57	0,33
<i>trxB2</i>	<i>Oe2805R</i>	Thioredoxinreduktase (NADPH)	1,46	-0,55	0,04
<i>aaa3</i> *	<i>Oe3112</i>	AAA <sup>+</sup> -Typ ATPase	1,46	-0,55	0,21
*	<i>Oe2359</i>	Hypothetisches Protein	1,45	-0,54	0,14

### DNA- und RNA-modifizierende Enzyme

<i>ISH</i>	<i>Oe5225</i>	Pot. Transposase (ISH3/ISH27)	2,10	-1,07	0,34
<i>ISH</i>	<i>Oe1070R</i>	IS1341-Typ Transposase (TCE32)	1,95	-0,96	0,48
<i>zim</i>	<i>Oe3197F</i>	ortsspezifische DNA-Methyltransferase	1,85	-0,89	0,20
	<i>Oe7017R</i>	Pot. Transposase	1,79	-0,84	0,36
	<i>Oe1083R</i>	Pot. Transposase (ISH3/ISH27)	1,56	-0,64	0,28
<i>epf2</i>	<i>Oe1592</i>	mRNA 3'-End Prozessierungsfaktor	1,45	-0,54	0,05
	<i>Oe6165R</i>	Pot. Transposase (ISH3/ISH27)	1,42	-0,51	0,18
	<i>Oe5433</i>	Pot. Transposase (ISH3/ISH27)	1,42	-0,51	0,21

### Zentraler Metabolismus

<i>adh5</i>	<i>Oe2199F</i>	Alcoholdehydrogenase Homolog	2,87	-1,52	0,11
<i>aldH1</i>	<i>Oe4529</i>	Aldehyddehydrogenase Homolog	2,71	-1,44	0,15
<i>hisC1</i>	<i>Oe2507R</i>	Histidinolphosphat Transaminase	2,27	-1,18	0,43
<i>sucB</i>	<i>Oe3195F</i>	Succinat-CoA Ligase (ADP-bildend) β-Untereinheit	2,19	-1,13	0,13
<i>oxr6</i>		Pot. Oxidoreduktase	2,11	-1,08	0,16
	<i>Oe2970R</i>	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase	1,97	-0,98	0,13
<i>sucA</i>	<i>Oe3196F</i>	Succinat-CoA Ligase (ADP-bildend) α-Untereinheit	1,87	0,90	0,18
<i>pmm</i>	<i>Oe4190</i>	Pot. Phosphohexomutase	1,72	-0,78	0,11
<i>ocd2</i>	<i>Oe2945</i>	Pot. Ornithincyclodeaminase	1,87	-0,90	0,06
<i>tssA</i>	<i>Oe4355R</i>	Thiosulphat-Sulfurtransferase Homolog	1,56	-0,63	0,05
<i>nhaC3</i>	<i>Oe5204</i>	Arginin/Ornithin-Antiporter	1,46	-0,55	0,22
<i>argA</i>	<i>Oe5208R</i>	Arginindeiminase	1,44	-0,53	0,50
<i>cysK1</i>	<i>Oe1916F</i>	Cysteinsynthase	1,44	-0,53	0,10
<i>korA</i>	<i>Oe1711</i>	Oxoglutarat-Ferredoxin Oxidoreduktase	1,36	-0,44	0,17

### Transportfunktion ohne klare Substratzuordnung

	<i>Oe3692</i>	ABC-Transport peripl. Bindeprotein	2,11	-1,08	0,28
<i>mrpF</i>	<i>Oe1853</i>	Na <sup>+</sup> /Cholat-Effluxprotein Homolog	1,58	-0,66	0,09
	<i>Oe1994F</i>	ABC-Typ Transportsystem	1,46	-0,57	0,09
		ATP-Bindeprotein			
	<i>Oe1420F</i>	ABC-Typ Transport Permease	1,46	-0,55	0,20

<i>trp1</i>	<i>Oe1202F</i>	ABC-Typ Transportsystem ABC-Bindeprotein/Permease	1,42	-0,51	0,10
<i>potB</i>	<i>Oe3627R</i>	ABC-Typ Transportsystem Permease	1,42	-0,51	0,19
*	<i>(Oe3118)</i>	RND-Superfamilie Exporter	1,23	-0,30	0,09

**Tabelle 4.1.2** Liste der unter Sb<sup>III</sup>-Stress (25µM; Expositionsdauer = 2 h) negativ regulierten Gene: Regulationsfaktoren sind durch einen Farbkode: dunkelgrün  $\geq 2,5$  hellgrün 1,5 - 2,5 und  $\leq 1,5$  grau (5%) gekennzeichnet. Gene, welche als Operon vorliegen beziehungsweise auf einem polycistronischen Transkript liegen, wurden mit einem Stern ( \* ) markiert.

### Transkription, Translation und Signaltransduktion

<i>sirR</i>	<i>Oe1797R</i>	Fe/Mn-abhängiger Transkriptionsfaktor	2,07	1,05	0,20
<i>tbp D2</i>	<i>Oe8046R</i>	TATA-Box Bindeprotein	2,00	1,00	0,44
<i>tbpD1</i>	<i>Oe7214F</i>	TATA-Box Bindeprotein	1,75	0,81	0,22
<i>basB</i>	<i>Oe3612</i>	Chemotaxis, Signaltransduktion Periplasm. Substratbindeprotein	1,61	0,69	0,33
<i>tbpC1</i>	<i>Oe7186F</i>	TATA-Box Bindeprotein	1,53	0,62	0,25
<i>phoU</i>	<i>Oe1681F</i>	PhoU-regulator Homolog	1,43	0,52	0,14
<i>Orc6</i>	<i>Oe4184</i>	Zellteilungskontrollprotein cdc6	1,42	0,51	0,18

### Transportfunktion ohne klare Substratzuordnung

	<i>Oe2348R</i>	ABC-Typ Transport periplasm. Substratbindeprotein	1,97	0,98	0,20
	<i>Oe4576</i>	ABC-Typ Transport periplasm. Substratbindeprotein	1,96	0,97	0,07
<i>dppC2*</i>	<i>Oe4303R</i>	ABC-Typ Transportsystem Permease	1,87	0,90	0,34
<i>dppD</i>	<i>Oe4551F</i>	ABC-Typ Transport periplasm. Substratbindeprotein	1,78	0,83	0,11
<i>ykfD *</i>	<i>Oe4301R</i>	ABC-Typ Transportsystem ATP-Bindeprotein	1,70	0,76	0,08
<i>dppB1*</i>	<i>Oe4304R</i>	ABC-Typ Transportsystem Permease	1,52	0,60	0,08
<i>tmpC</i>	<i>Oe2170</i>	Periplasm. Substratbindeprotein (membrane lipoprotein tmpC homolog)	1,46	0,55	0,08

### DNA- und RNA-modifizierende Enzyme

<i>repl2</i>	<i>Oe8010G1F</i>	Pot. Replikationsprotein	2,35	1,23	0,40
<i>repJ1</i>	<i>Oe7194F</i>	Plasmid-Replikationsprotein	2,03	1,02	0,50
	<i>Oe7185F</i>	ATP-abhängige Helikase	1,77	0,82	0,32
	<i>Oe7176R</i>	Helikase Homolog	1,66	0,73	0,36
<i>pcn</i>	<i>Oe4165R</i>	DNA-abhängige DNA-Polymerase	1,50	0,58	0,55

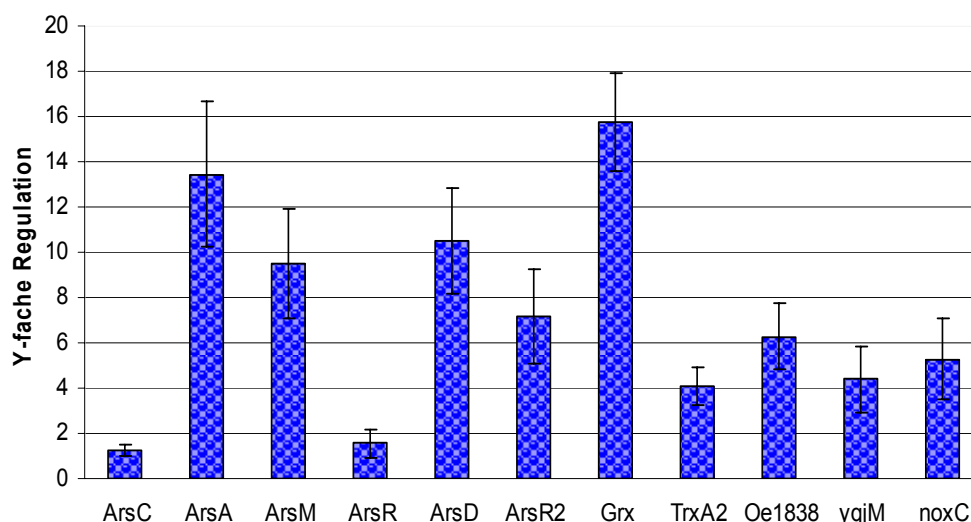
	<i>Oe1073F</i>	IS200-Typ Transposase (ISH12)	1,44	0,53	0,41
<i>carA</i>	<i>Oe3556R</i>	Carbamoylphosphatsynthase kleine UEH	2,71	1,44	0,49
<i>purE</i>	<i>Oe1952F</i>	Phosphoribosylaminoimidazol- Carboxylase katalyt. UEH	1,71	0,77	0,41
<i>purB</i>	<i>Oe1623F</i>	Adenylosuccinatlyase	1,46	0,55	0,12
<i>purD</i>	<i>Oe2864F</i>	Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase	1,45	0,54	0,31
<i>purF</i>	<i>Oe3139R</i>	Amidophosphoribosyltransferase	1,43	0,52	0,16

Für eine genaue Beschreibung der erhaltenen Expressionsmuster und deren Interpretation im biologischen Kontext wird auf den Diskussionsteil dieser Arbeit verwiesen.

## 4.2 Validierung der Microarraydaten mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR

Die Verwendung von Microarrays zur Analyse der Genexpression kann in der Regel als Screeningverfahren zur Erfassung differentieller Regulation betrachtet werden. Wenngleich diese Methodik einen Eindruck in die globale Regulation gibt, so ist ihre quantitative Aussage nur als Trendlinie zu betrachten. In vielen Fällen unterscheiden sich die mittels Microarrays ermittelte Regulationsfaktoren signifikant von jenen mit genaueren Methoden, beispielsweise der quantitativen RT-PCR bestimmten Werten. Selbst unter gut kontrollierten, reproduzierbaren und stringenten Hybridisierungsbedingungen muß man von einem Anteil an Fehlhybridisierung ausgehen. Wie bei jedem Hochdurchsatzverfahren sind auch falsch positive Resultate möglich. Um nun die mittels Microarrays erhaltenen Daten zu validieren und mittels einer zweiten Methode zu quantifizieren, wurde die Expression einiger ausgewählter Gene als Stichprobe mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR gemessen.

Besonderes Augenmerk galt hierbei jenen Genen mit offensichtlichen Homologien zu bereits bekannten Metalloidresistenzgenclustern, welche in weiterer Folge in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden. Für alle ausgewählten und im Microarray-Experiment hochregulierten Gene konnte eine positive Korrelation zu den gemessenen Daten aus der RT-PCR hergestellt werden. Bei einem direkten Vergleich der Regulation zwischen Microarray- mit RT-PCR-Resultaten (siehe Tabelle 4.2.2) zeigt sich, dass die tatsächliche Quantifizierung mit letzterer Methode in der gewählten Stichprobe um bis zu 3,5-fach höhere Faktoren misst.



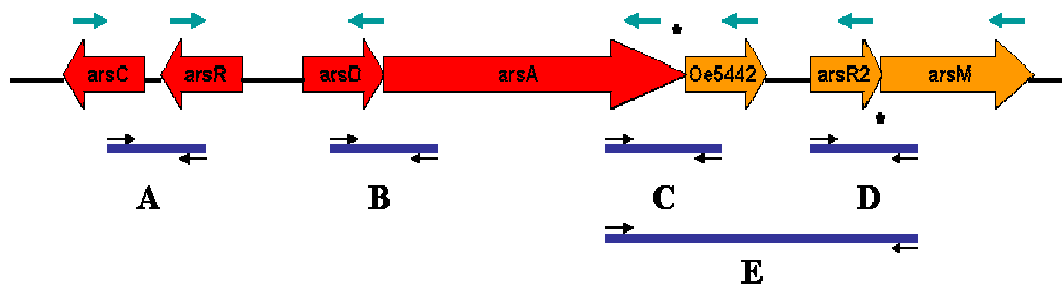
**Diagramm 4.2.1** Induktion der Genexpression unter Antimonitstressbedingungen (25  $\mu$ M für 1h). Dargestellt sind Regulationsfaktoren einer relativen Quantifizierung mittel qEchtzeit-RT-PCR und representieren den Mittelwert aus den Medianen dreier unabhängiger biologischer Proben. Als interner Standard wurde die 16S-rRNA herangezogen. Jeweils drei biologische Proben wurden in drei Replikaten gemessen, Mediane der jeweiligen biologischen Proben gemittelt und mittels der  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Methode (Bustin et al 2005, Lutfalla & Uze 2006) ausgewertet.

**Tabelle 4.2.2** Differentielle Genexpression unter Antimonitstress (25 $\mu$ M; 1h). Vergleich der über qRT-PCR und Microarrayanalyse ermittelten Regulationsfaktoren für einige ausgewählte Gene.

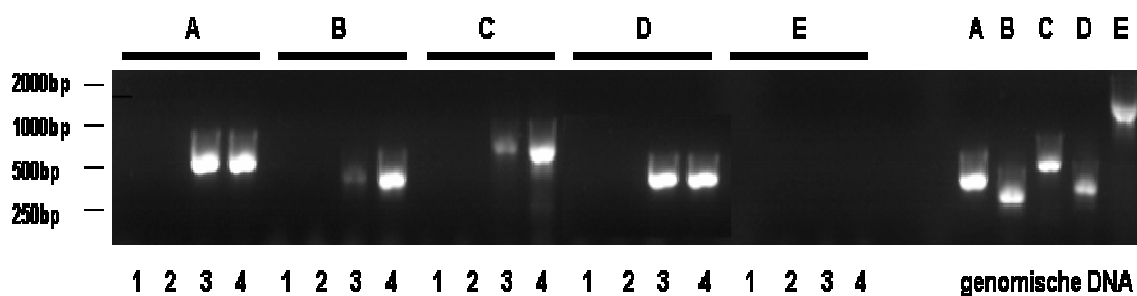
Gen	Halolex-code	Gen-Lokus	Funktion	Regulationsfaktor	Regulationsfaktor
				Microarray	qRT-PCR
<i>arsM</i>	<i>Oe5444</i>	PHS3	SAM-abhängige As <sup>III</sup> -Methyltransferase	2.69 $\pm$ 0.12	9.51 +/- 2.40
<i>arsC</i>	<i>Oe5436</i>	PHS3	Arsenatreduktase	1.20 $\pm$ 0,07	1.28 +/- 0.24
<i>arsA</i>	<i>Oe5440</i>	PHS3	As <sup>III</sup> Efflux-treibende ATPase	2.13 $\pm$ 0.13	13.45 +/- 3.22
<i>arsR</i>	<i>Oe5437</i>	PHS3	As <sup>III</sup> /Sb <sup>III</sup> -abhängiger Transkriptionsfaktor	1.31 $\pm$ 0.23	1.57 +/- 0.63
<i>arsD</i>	<i>Oe5438</i>	PHS3	Transkriptionsfaktor, Modulator der ArsA-ATPase-Aktivität	6.36 $\pm$ 0.91	10.48 +/- 2.34
<i>arsR2</i>	<i>Oe5443</i>	PHS3	As <sup>III</sup> /Sb <sup>III</sup> -abhängiger Transkriptionsfaktor	1.5 $\pm$ 0.38	7.2 +/- 2.08
<i>grx</i>	<i>Oe3949</i>	Chr	Glutaredoxin	6.82 $\pm$ 0.40	15.77 +/- 2.18
<i>trxA2</i>	<i>Oe4648</i>	Chr	Thioredoxin	1.52 $\pm$ 0.39	4.06 +/- 1.44
<i>Oe1838</i>	<i>Oe1838</i>	Chr	Hsp31-Homolog	3.07 $\pm$ 0.60	6.28 +/- 1.46
<i>yqjM</i>	<i>Oe2360</i>	Chr	NADH-Oxidase Homolog Flavin	3.03 $\pm$ 0.09	4.41 +/- 1.46
<i>noxC</i>	<i>Oe2364</i>	Chr	NADH-Oxidase (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -bildend)	2.71 $\pm$ 0.25	5.28 +/- 1.82

### 4.3 Qualitative RT-PCR zur Bestimmung von Transkriptionseinheiten

Zur Bestimmung von Transkriptlängen, beziehungsweise um monocistronische und polycistronische mRNA-Organisation unterscheiden zu können, wurde eine qualitative RT-PCR-Analyse unter Verwendung der in Abbildung 4.3.1 dargestellten Primer durchgeführt. Hierzu wurde ausgehend von RNA-Präparationen aus Arsenit-induzierten bzw. nicht induzierten *Halobacterium*-Kulturen cDNA synthetisiert. Für die reverse Transkription wurden die in Abb. 4.3.1 grün markierten Gen-spezifischen Primer herangezogen. Nun wurde versucht Produkte zu amplifizieren, welche zwei oder mehrere Leserahmen überlappen. Bei Verwendung von cDNA als Matrize führt dies nur dann zu positiven Ergebnissen, wenn zwei oder mehrere Gene als gemeinsames polycistronisches Transkript existieren.

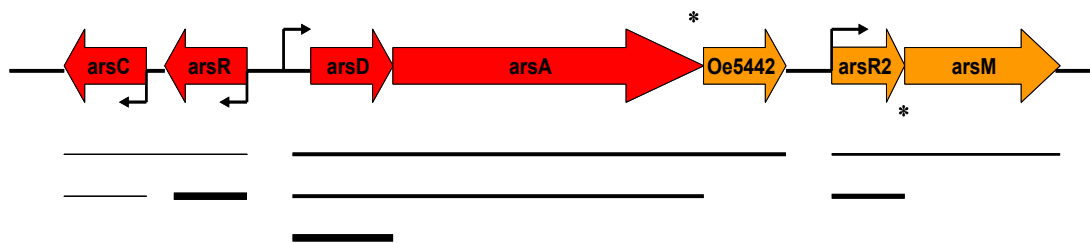


**Abbildung 4.3.1** Schematische Darstellung der Positionen von Primern (cDNA-Synthese: grüne; PCR: schwarze Pfeile) bzw. der in RT-PCR Experimenten gewählten Amplifikationsprodukte (blaue Balken) innerhalb des ars-Operons. Primersequenzen und erwartete Produktlängen sind einer Tabelle in Material und Methoden zu entnehmen.



**Abbildung 4.3.2** Qualitative RT-PCR mit den in Abbildung Y beschriebenen Primerkombinationen (A: *arsR-C*, B: *arsD-A*, C: *arsA-OE5442*, D: *arsR2-M*). Das dargestellte EtBr-gefärbte, 1,5%ige Agarosegel zeigt für jede Primerkombination nicht-RT Kontrollreaktionen (1, 2) und RT-PCR Produkte (3, 4). Für die cDNA-Synthese wurde jeweils RNA aus nicht induzierten (3) sowie aus As<sup>III</sup>-induzierten (4) *Halobacterium*-Kulturen verwendet. Als Positivkontrolle wurden PCR-Reaktionen mit genomischer DNA als Matrize (A-E; rechts) aufgetragen. Produkte B-E wurden in 30, A in 45 Reaktionszyklen amplifiziert.

Wie aus Abbildung 4.3.2 ersichtlich, konnten sowohl für *arsRC* als auch für *arsDA*, *arsA5442* und *arsR2-M* polycistronische Transkripte nachgewiesen werden. Das parallele Vorkommen von monocistronischen *ars*-mRNA's wurde mittels dieser Methode nicht weiter verfolgt, sondern in Kapitel 4.4.2 mittels Northern Blotting untersucht. Wenngleich hier als Zielsetzung keine quantitative Aussage angestrebt wurde, so konnte dennoch anhand der Intensität der Amplifikationsprodukte bemerkt werden, dass die Transkripte *arsDA* bzw. *arsDA5442* in nicht induzierten Zellen deutlich niedriger abundant vorkommen. Abbildung 4.3.3 fasst qualitative und quantitative Informationen aus RT-PCR und den in Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 beschriebenen Northern Blot- sowie 5'-mRNA Kartierungsexperimenten zusammen.



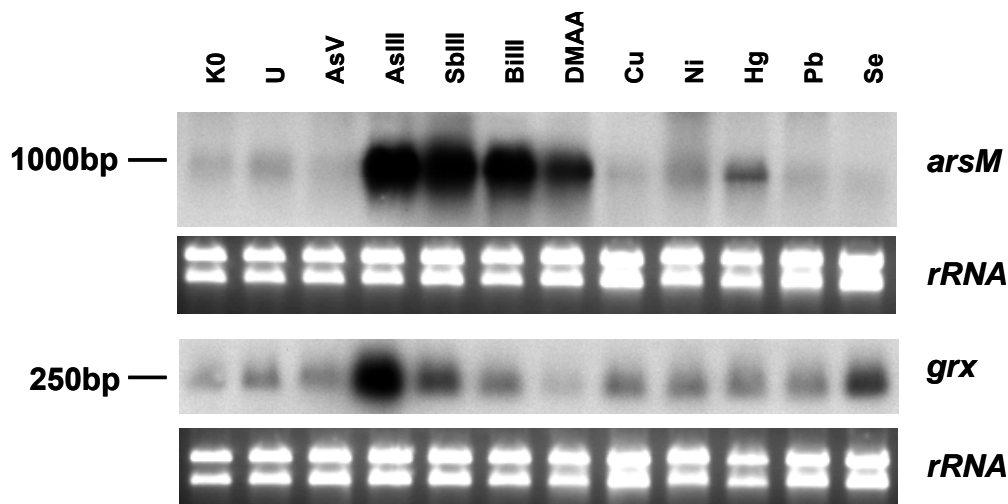
**Abbildung 4.3.3** Struktur des Plasmid-kodierten (*PHS3*) *ars*-Operons in *Halobacterium salinarum* R1. Längen und Abundanzen der jeweiligen Transkripte sind durch Balken unterschiedlicher Stärke dargestellt. Überlappende Leserahmen sind durch Stern, Transkriptionsstarts durch Pfeile gekennzeichnet.

## 4.4 Metalloid-abhängige Induktion der *ars*-Transkription

### 4.4.1 Metallspezifität der *arsM*-Induktion

Die Transkription von Arsenresistenzgenen wurde bereits in mehreren Prokaryoten und Eukaryoten untersucht und zeigt sich in allen bislang beschriebenen Operons als Arsenit- bzw. Antimonit-induzierbar. *ArsM* besitzt Homologien zu Genen der *UbiE/COQ5*-Familie S-Adenosylmethionin-abhängiger Methyltransferasen. *UbiE* aus *E. coli* beispielsweise ist an Methylierungsreaktionen im Zuge der Ubichinon- beziehungsweise Menachinonbiosynthese beteiligt, während *PmtA* in *Sinorhizobium meliloti* an der Synthese von Phosphatidylcholin beteiligt ist (Karel et al. 2000). Nachdem von Wang et al. (2004) bereits als S-Adenosylmethionin-abhängige Arsenit-Methyltransferase beschrieben, wurde hier die Metallspezifität der Transkriptionsinduktion von *arsM* in *Halobacterium salinarum* geklärt.



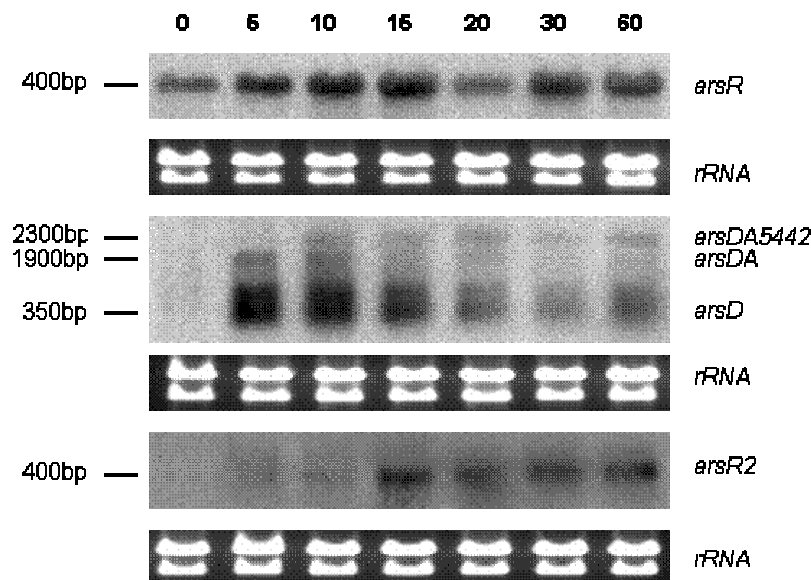


**Abbildung 4.4.1.1** Metallspezifität der Induktion von *arsM* (Arsenitmethyltransferase) und *grx* (Glutaredoxin). Northern Blot Hybridisierung mittels Sonden gegen *arsM* beziehungsweise *grx*. Kontrolle ohne Metallzusatz (K0), Uran (U), Arsenat (AsV), Arsenit (AsIII), Antimonit (SbIII), Bismut III (BiIII), Dimethylarsinsäure (DMAA), Kupferchlorid (Cu), Nickelchlorid (Ni), Quecksilberchlorid (Hg), Bleichlorid (Pb) und Selenid (Se). Als Ladekontrollen wurden 16- und 32SrRNA Banden nach EtBr-Färbung dargestellt.

*ArsM* wird spezifisch in Anwesenheit der Metalloide  $As^{III}$ ,  $Sb^{III}$ ,  $Bi^{III}$  und  $As^V$  induziert. Die *arsM*-Genexpression in Kulturen, welche mit anderen Schwermetallen supplementiert wurden, zeigte geringfügig erhöhte Werte für Quecksilber und keinen signifikanten Effekt für alle weiteren Metalle. Die im Northern Blot (Abb. 4.4.1.1) gemessene Transkriptlänge für *arsM* von ca. 1000bp unterscheidet sich deutlich von der basierend auf der aktuellen Annotation (<http://www.halolex.mpg.de>) erwarteten Länge des Leserahmens von 846 bp. Möglicherweise liegt im *arsR2*-Gene ein zusätzlicher interner Promotor. Ähnliches wurde von Ruepp & Soppa (1996) über das Transkriptionsmuster des *arcRABC*-Clusters berichtet. Eine mRNA-Prozessierung an definierter Stelle, wie bereits Stolt & Zillig (1993a, b) beschrieben, wäre ebenso denkbar. Da sich in den in Kapitel 4.1 beschriebenen Microarray Experimenten Glutaredoxin als das unter Arsenit/Antimonit-Stress am stärksten hochregulierte Gen fand, wurden im vorliegenden Versuch auch die Metallspezifität der Glutaredoxinexpression überprüft. Glutaredoxin wird ebenfalls stark unter Arsenit- und Antimonitstressbedingungen transkribiert, scheint aber auch von anderen divalenten Metallionen, wie Kupfer(II), Nickel(II), Quecksilber(II), Blei (II) und Selen induziert zu werden. Eine entscheidende Rolle von Glutaredoxin bei der Antwort auf oxidativen Stress ist seit längerem bekannt (Ferandes & Holmgren 2004, Li et al. 2004).

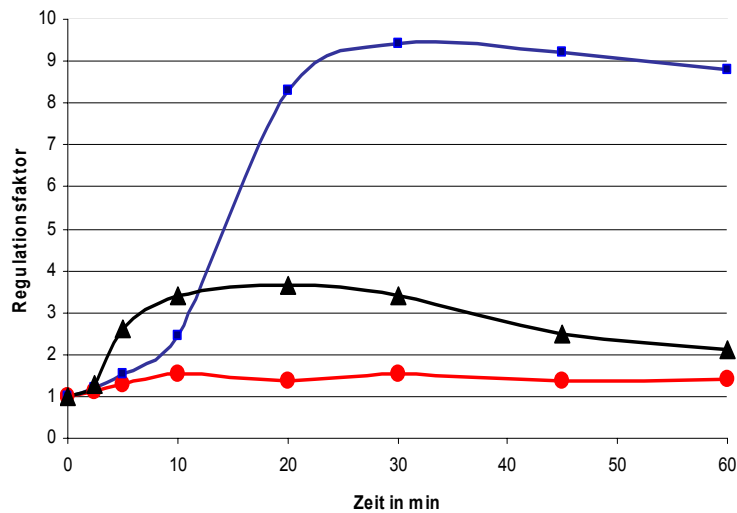
#### 4.4.2 Zeitlicher Verlauf der As<sup>III</sup>-Induktion

Aus Arbeiten am bislang einzigen, detailliert untersuchten Arsenresistenzoperon aus *E. coli* (Wu & Rosen 1993, Cai et al. 1996, Carlin et al. 1995) weiß man, dass die As<sup>III</sup>/Sb<sup>III</sup>-Resistenz-vermittelnden Strukturgene einer stringenten Kontrolle auf Ebene der Transkription unterliegen. Um den Induktionsverlauf der *ars*-Gene in *Halobacterium salinarum* zu untersuchen und darüber mögliche Rückschlüsse auf die dafür verantwortlichen Regulationsmechanismen zu erlangen, wurde ein Zeitreihenexperiment unter As<sup>III</sup>-Stressbedingungen (25 µM NaArsenit) durchgeführt.



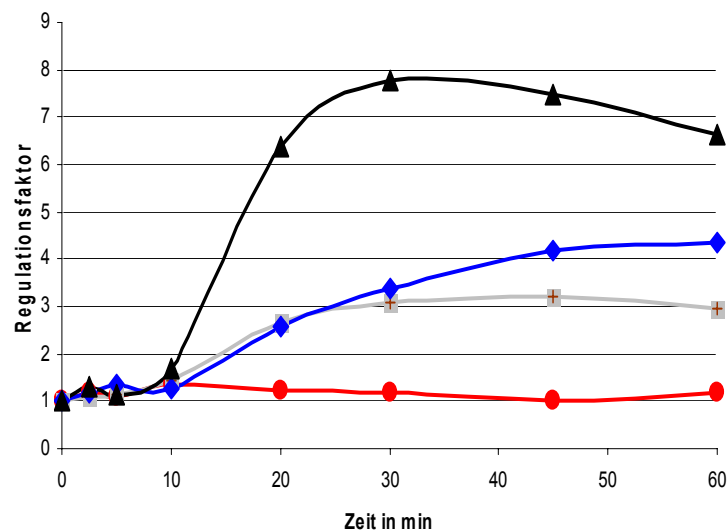
**Abbildung 4.4.2.1** Zeitreihe zur Arsenit-Induktion der *ars*-Gentranskription (in Minuten nach Induktion mit 25µM As<sup>III</sup>). Northern Blot Hybridisierung mit Sonden gegen *arsD*, *arsR*, *arsR2*. Als Ladekontrolle wurden 16S- und 32S rRNA (EtBr-gefärbt) dargestellt

Wie aus dem Zeitreihenexperiment in Abbildung 4.4.2.1 ersichtlich wird *arsR* (400bp) konstitutiv sehr stark exprimiert. Aus dem Northern Experiment wird lediglich eine sehr geringfügige Arsenit-abhängige Regulation ersichtlich. Die Transkripte für *arsD* (350bp) und *arsR2* (400bp) hingegen sind im nicht induzierten Zustand nicht detektierbar, werden aber bei Induktion mit 50µM As<sup>III</sup> innerhalb von 5 min gebildet. Die Transkriptabundanz von *arsD*, *arsDA*, und *arsDA5442* erreichen bereits nach 10 min ihren Höhepunkt. Die *arsR2*-Transkription steigt ebenfalls nach Induktion, erreicht allerdings sein Maximum erst nach 15 min. Ergänzend zu den Daten aus der qualitativen RT-PCR (Abb. 4.3.2) konnten im Northern Blot mittels der Sonde gegen *arsD* auch die polycistronischen Transkripte *arsDA* und *arsDA5442* und *arsRC* nachgewiesen werden.



**Diagramm 4.4.2.1a** Quantitative Echtzeit-RTPCR. Analyse der AsIII-abhängigen Induktion (10µM) von *arsR* (rot), *arsR2* (schwarz) und *arsD* (blau) Transkripten. Dargestellt sind die Regulationsfaktoren der jeweiligen Zeitpunkte gegenüber dem nicht induzierten Zustand (t=0). Als interner Standard wurde die 16S-rRNA herangezogen.

Der Induktionsverlauf der Transkription für die Arsenresistenz-Strukturgene *arsC*, *arsA* und *arsM* wurde aus Gründen der besseren Quantifizierbarkeit nur mittels qEchtzeit-RT-PCR (Diagr. 4.4.2.1) betrachtet. Deutlich erkennbar, scheint *arsC* konstitutiv exprimiert oder nur sehr schwach induziert zu sein. *ArsA* und *arsM* werden durch  $As^{III}$  induziert und erreichen maximale Expressionsniveaus nach ca. 10-15 Minuten im Northern Blot Experiment. Nach einem anfänglichen Peak, 10-15 Minuten nach Zusatz von Metalloiden, sinken die Transkriptabundanzen von *arsA* und *arsM* nach bereits 20 Minuten wieder.



**Diagramm 4.4.2.1b** Quantitative Echtzeit-RTPCR. Analyse der AsIII-abhängigen Induktion (10µM) von *arsC* (rot), *arsA* (grau), *Oe5442* (blau) und *arsM* (schwarz) Transkripten. Dargestellt sind die Regulationsfaktoren der jeweiligen Zeitpunkte gegenüber dem nicht induzierten Zustand (t=0). Als interner Standard wurde die 16S-rRNA herangezogen.

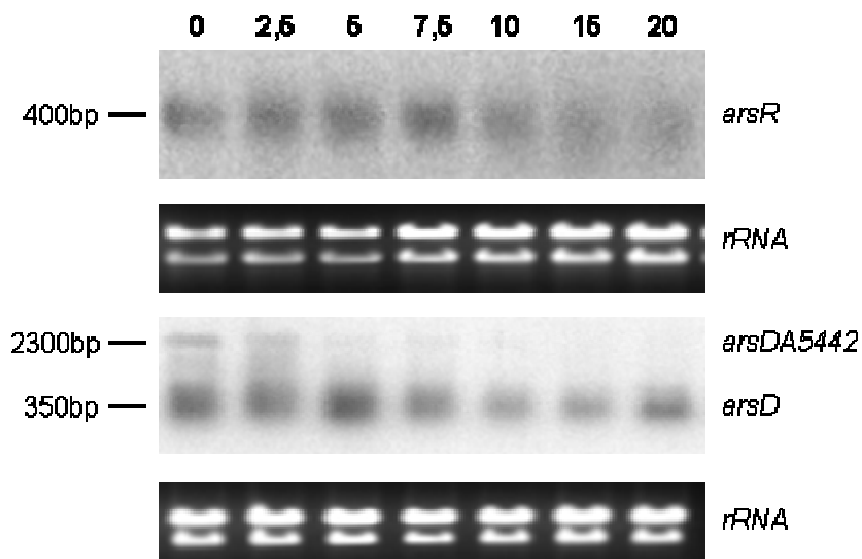
In einem parallel durchgeführten Experiment wurden diese Ergebnisse mittels Microarray-Hybridisierung (hier nicht gezeigt) sowie Echtzeit RT-PCR verifiziert. Wie aus Abbildungen 4.4.2.1a und 4.4.2.1b ersichtlich bestätigte sich der bereits aus Northern Blots bekannte Induktionsverlauf. Die hier sehr präzise ermittelten Regulationsfaktoren von maximal ca. 1.5, 9.5 und 3.5 für die Transkripte der Transkriptionsregulatoren *ArsR*, *ArsD* und *ArsR2* zeigen einerseits eine sehr schnelle Transkriptionsantwort (Induktion) im Falle der Expression von *ArsR2*, welche bereits nach 20-30 Minuten wieder abklingt. Während die Transkription von *arsR* nur wenig, wenn überhaupt signifikant steigt, steigt *arsD* erst nach 5 Minuten deutlich und findet ihr Maximum erst nach ca. 25 Minuten. Die mRNAs für die Strukturgene *arsA* und *Oe5442* werden, wenn auch möglicherweise nicht exklusiv, als polycistronisches Transkript abgelesen (siehe 4.3). Die Regulationsfaktoren für *arsD*, *arsA* und *Oe5442* korrelieren gut in ihrem zeitlichen Verlauf nach Induktion, unterscheiden sich allerdings hinsichtlich ihrer Stärke. Dies begründet sich einerseits in der geringeren Transkriptionseffizienz von stromabwärts liegenden Genen in Operons, andererseits spiegelt dieses Resultat eine posttranskriptionale Prozessierung sowie eine, wie in 4.4.3 gezeigt, unterschiedliche Stabilität der mRNA wieder. Ähnliches gilt für die Expression der Transkripte *arsR2* (*Oe5443*) und *arsM*, welche ebenfalls als dicistronisches Transkript abgelesen werden können. Da die halobakterielle Zelle im nicht induzierten Zustand lediglich *ArsR* exprimiert, ist anzunehmen, dass dieser Transkriptionsfaktor für die Induktion von *arsDA-Oe5442* sowie von *arsR2* verantwortlich ist. Ob der zweite Transkriptionsregulator vom *ArsR*-Typ, *ArsR2*, in weiterer Folge die Genexpression von *arsM* reguliert kann mit diesen Daten nicht erklärt werden.

#### 4.4.3 Stabilität der *ars*-Transkripte

Die Stabilität beziehungsweise Halbwertszeit definierter mRNA's ist als Resultat eines Wachstumsphasen-abhängigen beziehungsweise Entwicklungs-spezifischen aber auch von äußeren Determinanten (Temperatur, Salinität) beeinflussten Zusammenwirkens von mRNA-Prozessierung und Abbau. Dieses ist vom enzymatischen Inventar des jeweiligen Organismus abhängig und stellt ein wesentliches Kriterium posttranskriptionaler Genregulation dar.

Um die Langlebigkeit und Prozessierung der Transkripte *arsR*, *arsD* und *arsDA5442* *in vivo* zu untersuchen wurde die halobakterielle Transkription bereits  $As^{III}$ -induzierter Kulturen mit 100µg/ml Actinomycin D inhibiert. In einer globalen Microarraystudie zum mRNA-Abbau in *Halobacterium salinarum* konnten Hundt et al. (2007) mittels  $^3H$ -Uridine Inkorporation

zeigen, daß Actinomycin D in Konzentrationen von 100-200 µg/ml zu einer annähernd vollständigen Inhibition der Transkription führt.



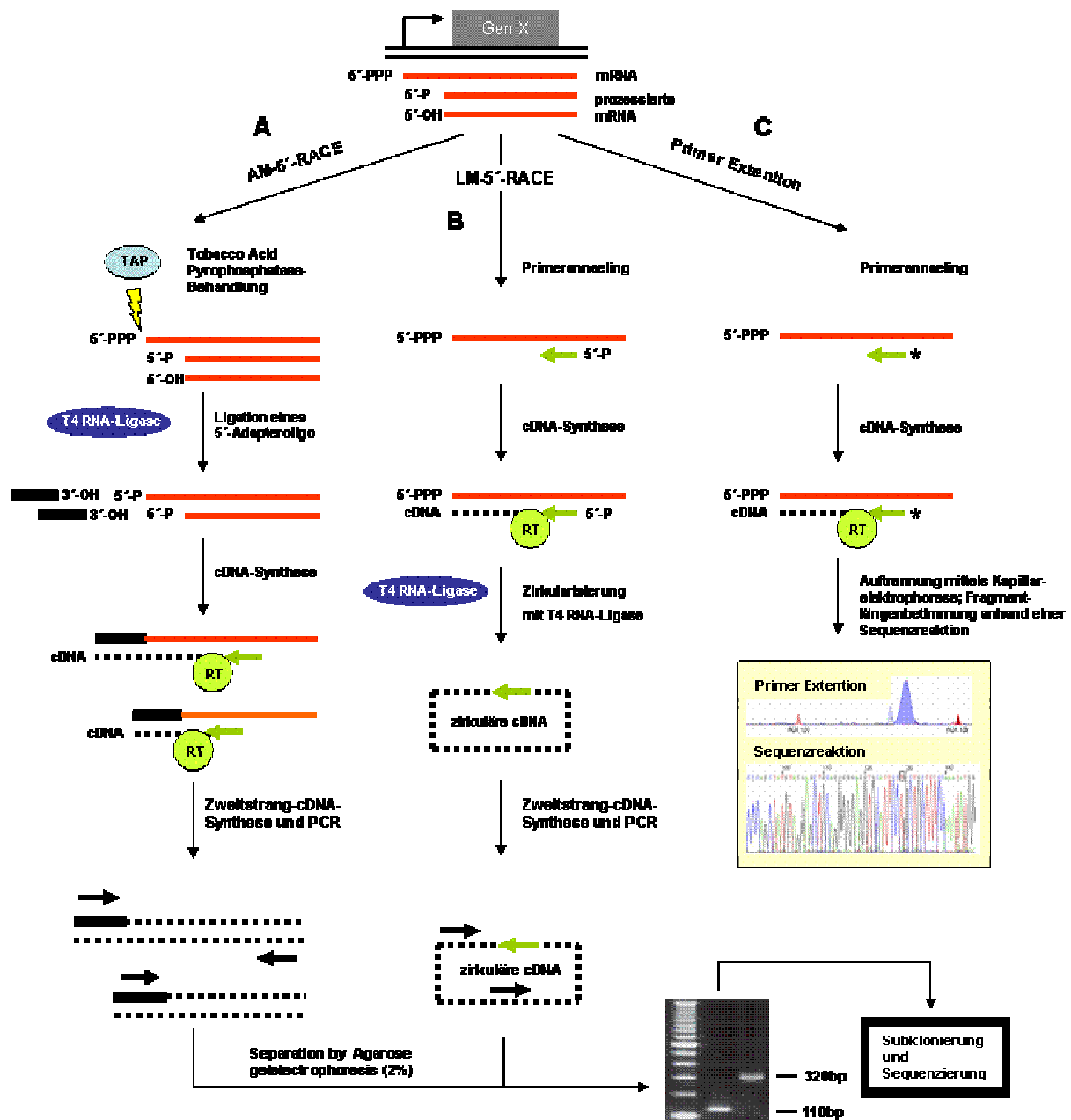
**Abbildung 4.4.3.1** Transkriptstabilität und mRNA-Halbwertszeiten nach Inhibition der Transkription mit 100µg/ml Actinomycin D. Northern Blot Hybridisierung mit Sonden gegen *arsR* und *arsD*. Als Ladekontrolle wurden 16S- und 32S rRNA (EtBr-gefärbt) dargestellt. Zeitverlauf nach Induktion in Minuten von links nach rechts.

Die Halbwertszeiten der Transkripte *arsD* und *arsDA5442* wurden densitometrisch über zwei unabhängig voneinander durchgeführte Northern Blots (Abb. 4.4.3.1) abgeschätzt. Für die mRNA's *arsR* und *arsD* konnten Halbwertszeiten von ca. 10-15 min ermittelt werden, während das polycistronische Transkript *arsDA5442* viel schneller abgebaut wurde ( $t_{1/2} \approx 2,5 - 5$  min). In Genom-weiten Analysen zum mRNA-Abbau fand man vergleichsweise mittlere Halbwertszeiten von 3-8 min in *E. coli* (Bernstein et al. 2002) und *Bacillus subtilis* (Hambraeus et al. 2003), 5 min in *Sulfolobus solfataricus* (Andersson et al. 2006) 3 bis größer 90 min in *Saccharomyces cerevisiae* (Wang et al 2002) und wenige Minuten bis zu 10 h für humane Transkripte (Meyer et al. 2004, Yang et al. 2003).

## 4.5 Bestimmung von Transkriptionsstarts

Zur Identifizierung von mRNA-5'-Enden wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet. Einerseits wurde eine 5'-RACE (Random Amplification of cDNA Ends)-Technik nach Eyal et al. (1999), andererseits der klassische Primer Extension Ansatz (Ausübel et al. 1999) mit Modifikationen nach Fekete et al. (2003) verwendet. Abbildung 4.5.1 zeigt eine schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte dreier Methoden zur Bestimmung von mRNA-5'-

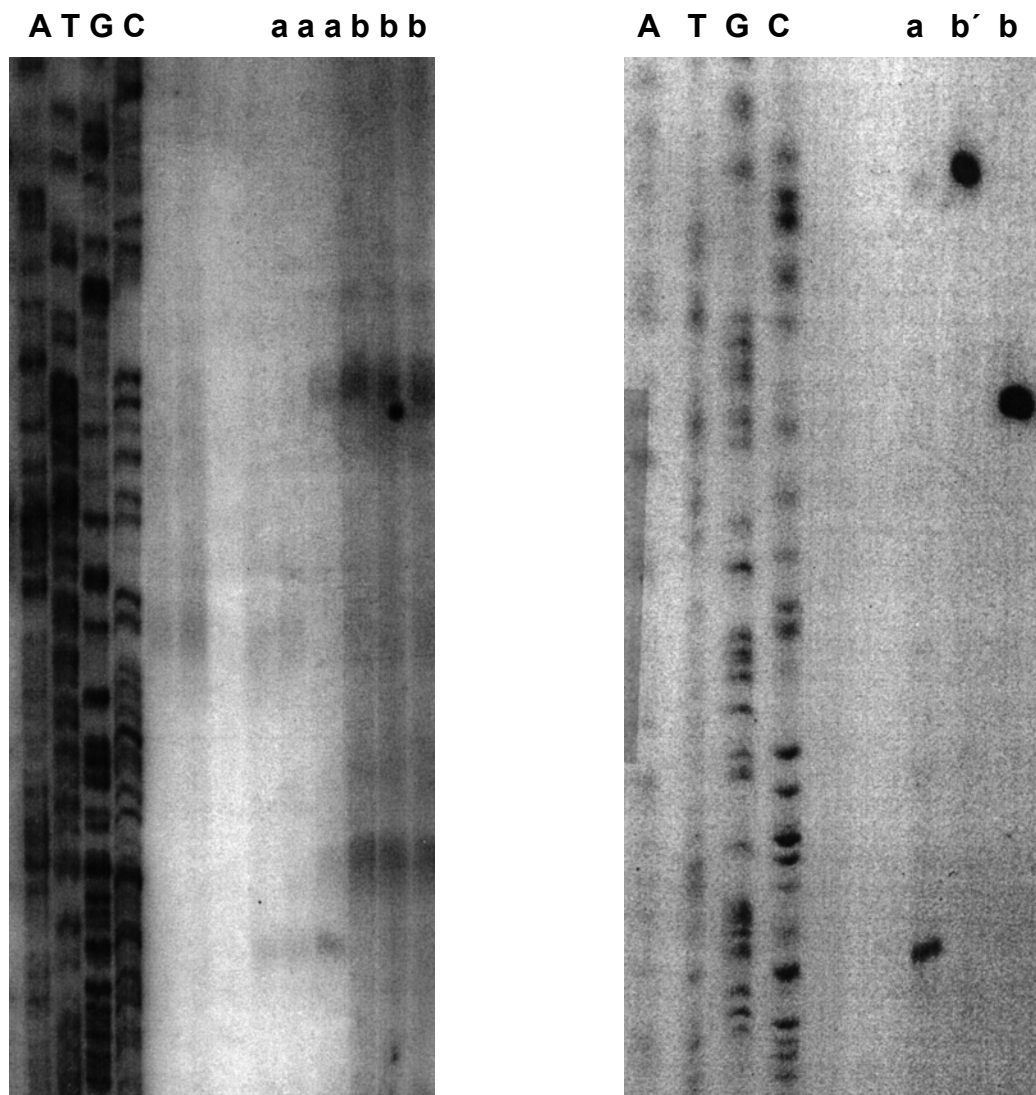
Enden. In dieser Arbeit wurden B und C verwendet, wobei sich die Methode C sowohl in ihrer Hochdurchsatzfähigkeit als auch bezüglich des benötigten Arbeitsaufwands bewährte.



**Abbildung 4.5.1** Vergleich von drei Methoden zu Bestimmung von mRNA-5'-Enden. Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zweier RACE-Protokolle A: nach Volloch *et al.* (1994), Marujama & Sugano (1994) und B: nach Eyal *et al.* (1999) sowie der in dieser Arbeit vorwiegend verwendeten und als FLOE (Fluorescence Labeled Oligonucleotide Extension) bezeichneten Primer Extension Methode nach Fekete *et al.* (2003).

### 4.5.1 Primer Extension: Evaluierung der Methodik

Um die Spezifität der Primeranlagerung an die jeweiligen mRNA-Matrizen zu optimieren wurde zunächst mittels  $^{32}\text{P}$ -markierter und gen-spezifischer Primer cDNA synthetisiert welche mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (6%, Harnstoff) aufgetrennt wurde. Zur exakten Laengenbestimmung wurden die jeweiligen, ebenfalls mit den selben Primern markierten Sequenzreaktionen herangezogen. Entscheidend für eine erfolgreiche Applikation der Primer Extension Methodik zur Bestimmung von mRNA-5'-Enden ist einerseits die Auswahl der Primer (Spezifität) und die Einhaltung stringenter Hybridisierungsbedingungen während der Primeranlagerung. Deshalb wurde ein optimiertes Programm sowohl für die Primeranlagerung als auch die Synthese der cDNA (Material und Methoden; Kapitel 3.2.6 ) verwendet und mit einem Standardprotokoll (Primeranlagerung durch Abkühlen auf 42°C bei RT; cDNA-Synthese bei 42°C) verglichen. Wie aus den in Abbildung 4.5.1.1 dargestellten Autoradiogrammen ersichtlich, zeigte sich dass erhöhte Stringenz der Primeranlagerung (rechts), wie auch der cDNA-Synthese verglichen mit dem Standardprotokoll zu deutlich spezifischeren Ergebnissen führte. Hohe Spezifität ist für die verwendete Methodik entscheidend. Da es sich hierbei lediglich um eine Bestimmung der cDNA-Fragmentlängen handelt, können Autoradiogramme bzw. Elektropherogramme mit mehreren Banden/Peaks nicht ausgewertet werden. Um standardisierte Auftrennungsbedingungen zu gewährleisten und um einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen wurden alle weiteren Experimente mit Fluoreszenz-markierten Oligos [Carboxyfluorescein (6-FAM)] durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte hierbei mittels Kapillarelektrophorese an einem ABI 3730 48 Sequenziergerät. Zur Fragmentlängenbestimmung wurde in allen Einzelläufen ein Längenstandard (GeneScan™ 500 LIZ™) mitaufgetragen. Die erhaltenen Daten konnten so mittels der Software Genemapper v3.5 ausgewertet werden. Im Gegensatz zur klassischen Primer Extension Methode, bei der jede einzelne cDNA anhand einer Sequenzreaktion mit ein und dem selben Primer analysiert wird, können bei Größenbestimmung mit einem Standard unterschiedlicher Sequenz geringfügige Längenabweichungen im Rahmen von wenigen Basenpaaren auftreten. Ein unterschiedlicher Sequenzenanteil an Nukleotiden mit Purinbasen (Adenin Guanin) zu Pyrimidinbasen (Thymin und Cytosin) wirkt sich auf das Migrationsverhalten von DNA-Fragmenten aus. Deshalb wurde für die in Kapitel 4.5.2 dargestellten Transkriptionsstarts eine Fragmentlängenbestimmung mittels parallel laufender spezifischer Sequenzreaktion durchgeführt. Alle in Kapitel 4.5.3 bestimmten 5'-Enden wurden lediglich mit Hilfe eines Längenstandards bestimmt.



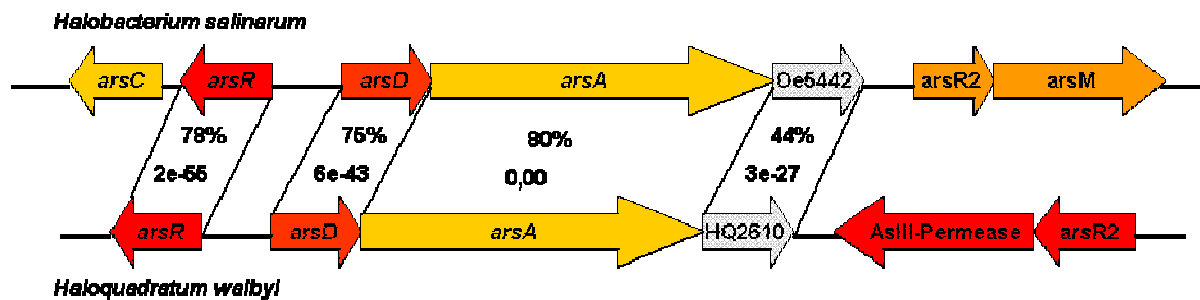
**Abbildung 4.5.1.1** Primer Extension Analyse zur Identifizierung von Transkriptionsstarts. Dargestellt sind zwei 6% denaturierende Polyacrylamidgele. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels  $^{32}\text{P}$ -markierter genspezifischer Primer. Links: Primeranlagerung durch Abkühlen auf 42°C. cDNA-Synthese bei 42°C Rechts: Primeranlagerung unter kontrollierten Bedingungen (80°C für 2min, Abkühlen (0,5°C/min) auf 1°C unter die jeweilige Schmelztemperatur der Primer, anschließendes Einfrieren in Flüssigstickstoff; cDNA-Synthese mittels Temperaturgradienten (30min bei 55°C, 10min 60°C, 5min 65°C). Primer a: Pehsp70 (+150bp) b') Pe1cctB (+170bp) b) Pe2cctB (+150bp)

#### 4.5.2 Transkriptionsstarts der Arsenresistenzgene

Im folgenden wurden Transkriptionsstarts der Arsenresistenzgene aus *Halobacterium salinarum* und der, in ihrer Operonstruktur analog aufgebauten, *ars*-Gene aus *Haloquadratum walsbyi* bestimmt. Der direkte Vergleich sowohl der Anordnung und Homologien als auch experimenteller Daten zur Genexpression bzw. Regulation zwischen zwei nahe verwandten Organismen verbessert das Verständnis der dafür verantwortlichen Funktionsmechanismen. Die in Abb. 4.5.2.1 dargestellten Arsenresistenzoperons aus *Halobacterium salinarum* und *Haloquadratum walsbyi* besitzen einen teilweise analogen Organisationsaufbau, weshalb hier

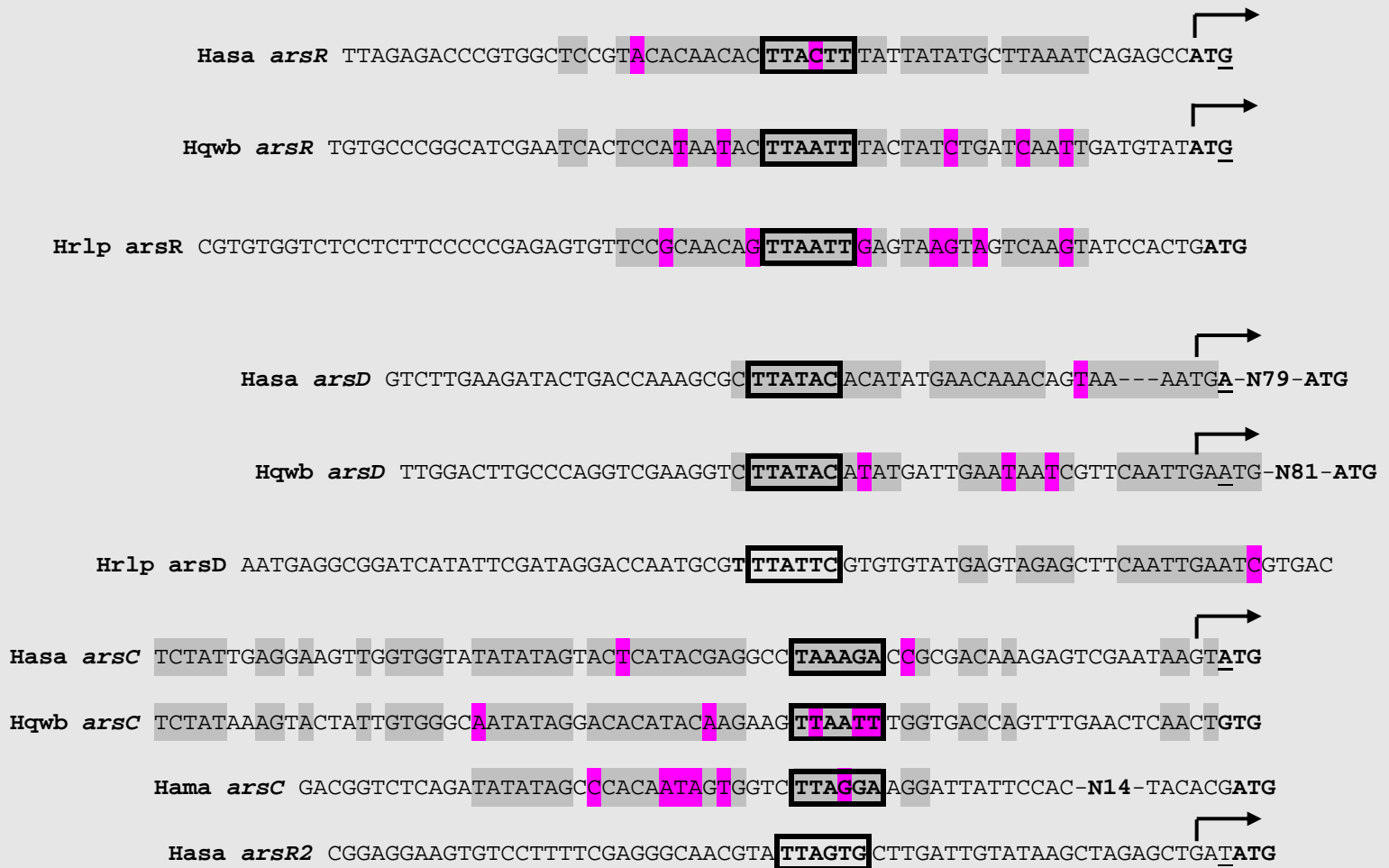


die Transkriptionsstarts für die Gene *arsR* und *arsD* aus beiden Organismen bestimmt wurden. Alle wie folgend dargestellten mRNA-5'-Enden wurden mittels Primer Extension Analyse (6-FAM-Markierung) nach Fekete *et al.* (2003) durchgeführt. Die jeweiligen Elektropherogramme von cDNA-Auftrennung und dazugehörigen Sequenzreaktionen sind dem Anhang zu entnehmen.



**Abbildung 4.5.2.1** Vergleich der Organisation der Arsenresistenzoperons von *Halobacterium salinarum* und *Haloquadratum walsbyi*. Sequenzidentität und Homologie zwischen den beiden Organismen wurden in Prozent bzw. mittels e-Value angegeben.

Wie bereits aus der Literatur bekannt (Bell 2005, Gropp *et al.* 1989, Soppa 1999) besitzt der Großteil haloarchaealer Transkripte keine untranslatierte oder lediglich sehr kurze (wenige bp lange) mRNA-Leitsequenzen. Dies bestätigte sich in den vorliegenden Resultaten mit Ausnahme der *arsD*-Transkripte aus *Halobacterium salinarum* R1 und *Haloquadratum walsbyi*. Die 5'-Enden der mRNA's *arsR*, *arsR2* und *arsC* aus *Halobacterium* sowie *arsR* aus *Haloquadratum* beginnen entweder direkt am Translationsstart oder 1-2 bp davor (siehe Abbildung 4.5.3.1). Für *arsD*-Transkripte sowohl in *Halobacterium* als auch in *Haloquadratum* konnten allerdings mRNA-Leitsequenzen mit einer Länge von ca. 80 bp detektiert werden. In mehreren Haloarchaea konservierte Sequenzbereiche innerhalb von spezifischen Promotoren können als gutes Indiz für eine essentielle Funktion dieser DNA-Sequenzen bei der basalen Transkription bzw. der Genregulation betrachtet werden. Im konkreten Fall der Promotoren von *arsR* und *arsD* beinhalten diese neben einer konservierten TATA-Box potentielle Repressorbindestellen welche in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für Mutationsanalysen gewählt wurden.



**Abbildung 4.5.2** Promotorsequenzen von Arsenresistenzgenen aus drei extrem halophilen Archaea. Transkriptionsstarts der Gene *arsR*, *arsD*, *arsC* und *arsR2* aus *Halobacterium salinarum* (*Hasa*) sowie *arsR* und *arsD* aus *Haloquadratum walsbyi* (*Hqwb*) sind durch Pfeile markiert. In zwei oder mehreren Promotoren konservierte Sequenzbereiche sind grau unterlegt, darin enthaltene Abweichungen violett markiert. TATA-Box Elemente sind fett umrahmt, Translationsstarts in dick gedruckter Schrift und unterstrichen dargestellt. *Halorubrum lacusprofundi* (*Hrlp*), *Haloarcula marismortui* (*Hama*)

### 4.5.3 Transkriptionsstarts weiterer ausgewählter Gene aus *Halobacterium salinarum*

Neben jenen der Arsenresistenzgene wurden zusätzlich auch die in Abbildung 4.5.2.2 dargestellten Transkriptionsstarts bestimmt, welche, wie im Diskussionsteil noch eingehend erläutert, für die Ermittlung von Konsensusmotiven für die TATA-Box und das BRE-Element verwendet werden. Da alle in diesem Kapitel aufgeführten Transkriptionsstarts mittels einer Fragmentlängenbestimmung im Vergleich mit einem kommerziellen Längenstandard (GeneScan<sup>TM</sup> 500 LIZ<sup>TM</sup>) bestimmt wurden, sind die erhaltenen 5'-Enden mit einer Ungenauigkeit von  $\pm 2$  bp zu betrachten. Diese Ungenauigkeit wurde anhand von drei bereits bekannten und veröffentlichten Transkriptionsstarts für die Gene *bop*, *arcC* und *fdx* (Baliga & DasSarma 1999, Ruepp & Soppa 1996, Danner & Soppa 1996) mit der hier verwendeten Methode experimentell ermittelt. Die experimentell ermittelten 5'-Enden der drei Kontrollgene waren um 2 bp kürzer als die bereits publizierten. Deshalb wurde der gemessene Transkriptionsstart mit Unterstrichen gekennzeichnet und die tatsächlichen (mit Pfeilen dargestellt) um 2 bp korrigiert. Elektropherogramme der einzelnen Kapillarelektrophoreseläufe und eine Tabelle, welche die Anzahl der für die cDNA-Synthese verwendeten Oligonukleotide sowie der Reproduktion der Ergebnisse zeigt, sind dem Anhang zu entnehmen.

*cctB* TCCGATCCGAGACGATTTCAAAGGATTTATATAGAAATGGCAATCAATCTATCTACTGAACATG

*lrp* ATGCGAGACAGAATTGGACGTTTCGTAAACTTCTATACGGTGGAGACGGTAGCCGGACGCATG

*hsp20* TCCCACGGCGGCGCTGGCTGTGCACACAGTGACACAGCCCGAACCCTTTTCCACAGTCCACACTTACCTCGGGCCATG

*hsp5* GTAATAATACATACATATTTGTGTTTTGATAGAAAATTTTTTACGAAATGCGGACATAGTTTTGGCTGG -- N17 – ATG

*hsp70* GCCTGTTCTCGGCGTCGGTTCGCACTAGCAAGGCTTAAACAGAAAACGCTCCGTAAGTGTTCGGGTAACATG

**Oe3112** TACGAACTCCCCGTTCCGGACGGTGACTCAACGCGGGCCTTCATCAACAACGGCGTCGTAACAGTCGAGGTGTCACGATG

*glnA* CTCGCATCGCAATCACTTACACCGAGCGATACTCATTTATCCATGCAGTGAACAACACGTACCGTACATCGAATG

*trpD* CCCACGACACGCTTAAGTTAGCGTACAGTCTTGTAACACTACAACCCAACATCGTTCATTGGTGACCACAATG

*dpsA* ATTTGTTTTTGGTACGCCAAACAAAATTTGGATGCAGCGGAAAGCTTTAAGTGGCAGGCGGTCCAACGTGTAATCGTTATG

*grxA2* ATCCGCGAACCGGCTGTTCTGCTCGGTCCACCGCACTCTTCACTCGCTGCCCCGTATACTGGTGTATG

*trxA2* CCGGCAACAGACGTGCCGTGAGAAACCCTTAACCACGAAGCCCCGCAATTCGGAGTATATCGATG

*dod* GGCCTGTACCTGGCTGGCGTCGCGTAGCACGCCCCGCCGGCGCATAGT**TTTAT**GCCGGCCCCAGCGGAATGCTGTCATAT**G**

*ribC* TGTGCGTGCGCAGGCGAAAAACAGTTGTCGTCGCCACGAACCGGTACG**TTTTC**GTGATGCGTCCCGAATCTGGAACT**G**T**G**

*tfbG* GCGTGGTATTGTGTTGGATTGAAGACCGCTCAATACTGCCAATGGAT**TTTAT**GAGTGTGCGCGACACTAATAAAAAATG**C**G**A**T**G**

*tfbB* GGAAACATTTAAGTACTTGTGCTCTTACTTTGAT**TT**CACGACAAGCCGGGCGCACCAGCGCCATCTCC**C**G-N14-ATG

**OE4509** ATCATTCCGGCCTGCTTATAAGCGAACGCCAAGAATCGCCGACATAT**TTTAT**CCCTCCGGCCTTGTGTTTGCATCCCACGA**A**GAAACCATG

*histA1* GTCACGGAGTCGTGACTCGCGTCGAGGTAACGGAAACAAT**TAAG**CGTGCGAGCGCCACGATGTGACGCAT**G**

*bop* TCCGTCACGAGCGTACCATACTGATTGGGTCGTAGAG**TTACAC**ACATATCCTCGTTAGGTACTGTT**G**C**A**T**G**

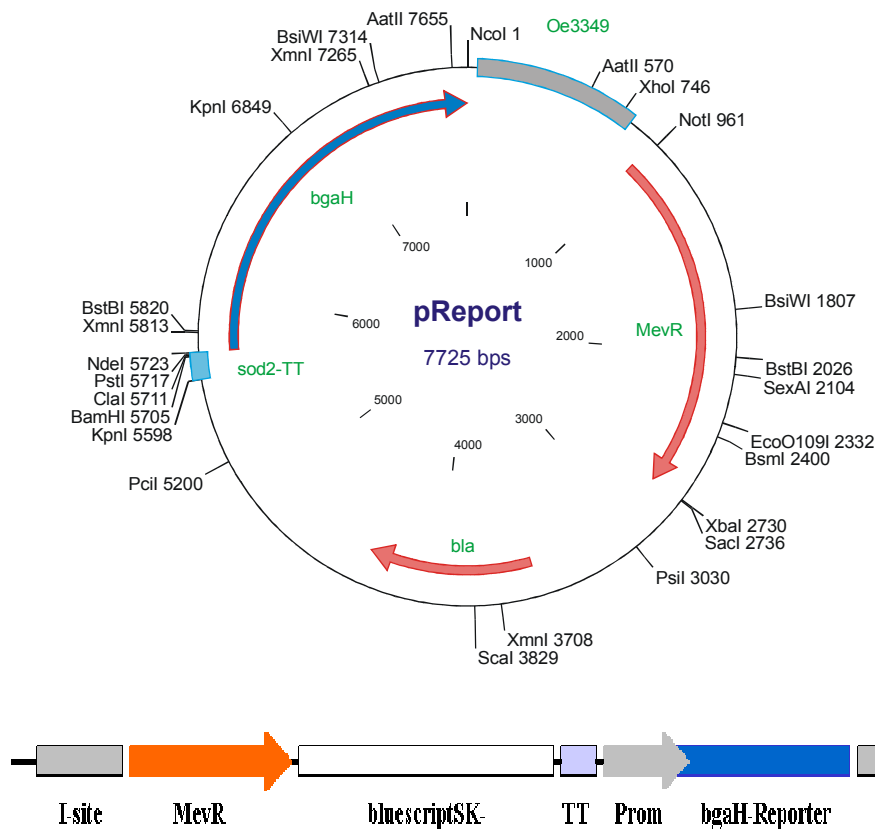
*arcC* TTCTGCACGGGGTCGACGGGTGGGAACCGGCGCAAGAG**TTTTT**GCGTCACCCGTGTA**A**ACTACGAGGC**A**CCCATG

*fdx2* CACACCCGGGCTTTCGTGGCAGTACGCTGGCCCCGAACAGCAACTACTATGCGTTCGGAAGCCGA**A**ACTCTGCAG**T**G**A**T**G**

Abbildung 4.5.3: Transkriptionsstarts ausgewählter Promotoren aus *Halobacterium salinarum*. Startpositionen sind durch Pfeile, vermutete TATA-Box Elemente der jeweiligen Promotoren in fetter Schrift angezeigt. Transkriptionsstarts der orange umrahmten Promotoren wurden mittels 5'-RACE, alle anderen Ergebnisse mittels Primer Extension Analyse ermittelt. Als Qualitätskontrollen wurden drei bereits bekannte und publizierte 5'-Enden (Baliga & DasSarma 1999, Ruepp & Soppa 1996, Danner & Soppa 1996) für die Gene *bop*, *arcC* und *fdx*, bestimmt. Experimentell bestimmte Startpositionen (unterschiedlich) aus Primer Extension Experimenten wurden um 2 bp korrigiert.

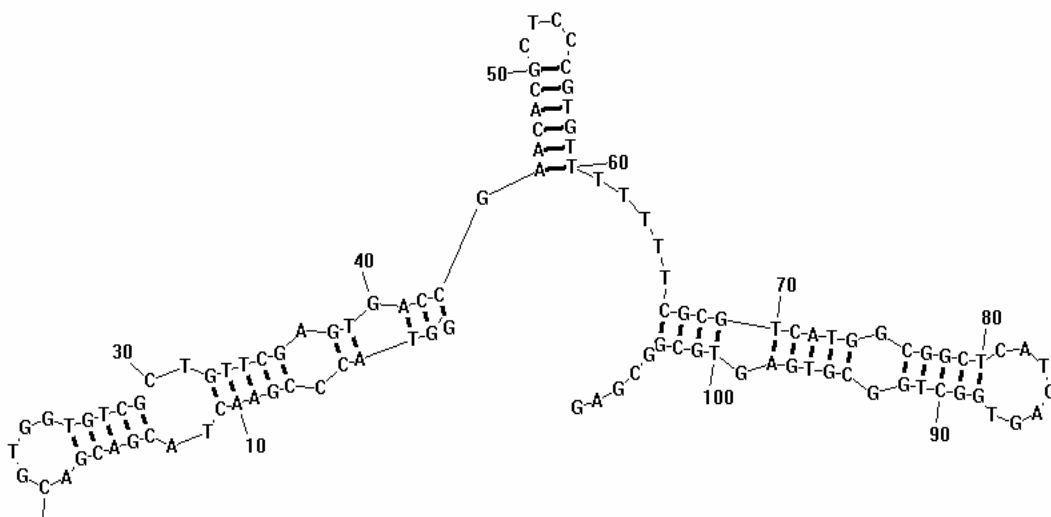
## 4.6 Konstruktion des Reporterplasmids pReport

Als Reporter gen wurde in dieser Arbeit das von Holmes & Dyall-Smith (2000) beschriebene *bgaH*, kodierend für die  $\beta$ -Galactosidase aus dem halophilen Archaeon *Haloferax alcantearii* herangezogen. Das im folgenden beschriebene Reporterplasmid pReport stellt eine Modifikation des von Patenge et al (2000) publizierten Vektors pNP22 dar.



**Abbildung 4.6.1** Schematische Darstellung des Integrations-Shuttlevektors „pReport“. Dieses Plasmid trägt einen Mevinolin-Resistenzmarker (MevR), kodierend für die HMG-CoA Reduktase, zur Selektion in *Halobacterium salinarum*, eine multiple Klonierungsstelle vor dem eigentlichen Reporter gen *bgaH*, einer halophilen  $\beta$ -Galactosidase aus *Haloferax alcantearii* (Holmes & Dyall-Smith 2000) und eine zum Chromosom homologe 700bp lange Integrationsstelle (Oe3349). Für die Vermehrung in *E. coli* dient neben einer Ampicillinresistenzkassette (*bla*) der *colE1* Replikationsursprung (nicht eingezeichnet). Bei Transformation in den Akzeptororganismus *Halobacterium salinarum* integriert der Vektor über Homologe Rekombination via single cross-over ins Genom. Zu untersuchende Promotoren werden mit dem Reporter gen fusioniert und steuern somit die *bgaH*-Expression. Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in *H. salinarum* Zellysaten wird über den Abbau von ONPG, einem Analogon des natürlichen Substrates Galactose, zu dem farbigen Reaktionsprodukt o-Nitrophenol colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden.

Es besitzt eine verbesserte multiple Klonierungsstelle mit den Schnittstellen NdeI, PstI, ClaI, SmaI, BamHI und KpnI sowie einen Transkriptionsterminator in beide Leserichtungen, 5' des Reportergens *bgaH*. Der Vektor integriert nach Transformation via single cross-over Rekombination ins halobakterielle Genom wobei als Ziellokus der Bereich stromaufwärts des Sensorhodopsin- (*sop*) Gens (OE3349), dient. Eine detaillierte Darstellung ist dem Abbildungstext 4.6.1 zu entnehmen. Da mit Promotorelementen aus *Halobacterium salinarum* neben einer gewünschten Integrationsstelle auch zusätzliche für Rekombination in Frage kommende, homologe Sequenz angeboten werden (im besonderen bei Promotorfragmenten mit einer Länge größer 500bp), wurden alle in dieser Arbeit gemessenen Reportermutanten über PCR auf richtige Integration überprüft. Der Einbau eines Transkriptionsterminators in den Reportervektor „pReport“ verhindert nach erfolgter Integration ins halobakterielle Genom eine Beeinflussung der zu untersuchenden Promotor-abhängigen Genexpression durch Transkriptions-aktive Elemente aus dem Vektorrückgrat. Dazu wurde der 110 bp lange Doppelterminator zwischen den entgegengesetzt abgelesenen Genen *sod2* und *Oe2905* ausgewählt. Wie Abbildung 4.6.2 zu entnehmen besitzt dieser zwei Hairpin Strukturen an welchen die Transkription terminiert wird. Mit dem leeren Reportervektor transformierten Zellen zeigten in  $\beta$ -Galactosidasemessungen, wie gewünscht, keine detektierbare Hintergrundaktivität.

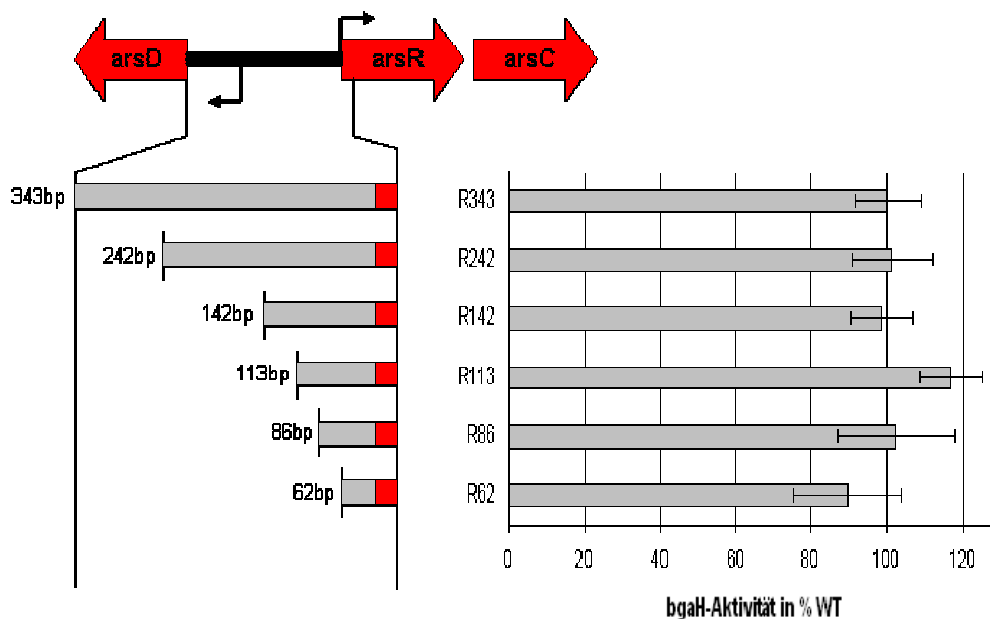


**Abbildung 4.6.2** Sekundärstruktur innerhalb der 110bp Terminationsregion der Gene *sod2* und *Oe2905* aus *Halobacterium salinarum* R1. Die beiden Haarnadelschleifen bei Positionen 0-43 an den 3'-Enden beider Leserahmen.

## 4.7 Reporteranalysen der *ars*-Promotoren

### 4.7.1 Verkürzung des *arsR*-Promotors am 5'-Ende

Wie bereits in Kapitel 4.4.3.1 gezeigt, werden die Gene *arsD*, *arsA*, *Oe5442* aber auch *arsR* auf Ebene der Transkription unter Arsenstress induziert. Auf der Suche nach regulatorisch aktiven Sequenzelementen, Aktivator- beziehungsweise Repressorbindestellen wurde nun der *arsR*-Promotor von 343 bp (Gesamtlänge zwischen *arsR* und *arsD*) stufenweise (242 bp, 142 bp, 113 bp, 86 bp, 62 bp) verkürzt und über Reportergen-analyse untersucht.



**Diagramm 4.7.1.1** Schrittweise Verkürzung des *arsR*-Promotor-5'-Bereiches. Promotorfragmente wurden als Translationsfusionen der ersten beiden Aminosäuren von ArsR (rot) mit dem Reporter gen *bgaH* konstruiert. Gemessen wurde die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität in Zellextrakten von Promotor-Reporter mutanten (im Stamm R1). Die spezifische Enzymaktivität wurde normiert gegen die optische Dichte bei 600nm dargestellt.

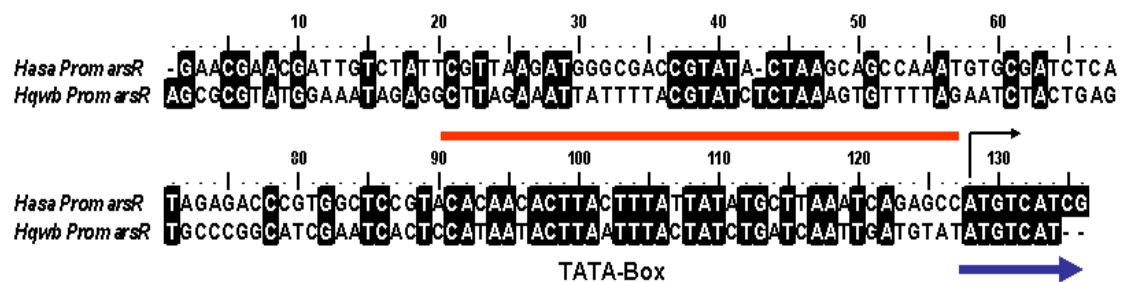
Eine kontinuierliche Verkürzung des *arsR*-Promotors von 343 bp (entsprechend dem gesamten intergenischen Bereich zwischen *arsR* und *arsD*) zum minimalen 62 bp-Fragment zeigte keine signifikante Veränderung der  $\beta$ -Galactosidase-Expression. Elemente, welche für die Regulation von *arsR*, beziehungsweise seine Induktion in Anwesenheit von Arsenit oder Antimonit verantwortlich sind, müssen im Bereich des 62 bp langen minimalen Kernpromotors lokalisiert sein. Eine Erhöhung der



gemessenen Reporteraktivität des 113 bp langen Promotors im Vergleich zu den restlichen könnte möglicherweise auf eine zweite Bindungsstelle mit niedrigerer Affinität hindeuten, ist aber hinsichtlich ihrer Intensität nicht mit der  $As^{III}$ -vermittelten Induktion vergleichbar.

#### 4.7.2 Mutationsanalyse des *arsR*-Promotors

Unter Miteinbeziehung der Resultate aus den Experimenten zur kontinuierlichen Promotorverkürzung (Kapitel 4.7.1) wurden *arsR*-Upstreamsequenzen aus *H. salinarum* mit jenen aus *H. walsbyi* verglichen um konservierte Elemente innerhalb des minimalen Kernpromotors ausfindig zu machen. Wie in Abbildung 4.7.2.1 dargestellt, findet man im Bereich zwischen Transkriptionsstart und -40 bp vor *arsR* einen hohen Grad an Konservierung der Nukleinsäuresequenz. Dieser Bereich beinhaltet ein potentielles TATA-Box-Motiv, ca. -29(-24) bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts, welches sehr gut mit dem von Soppa (1999) veröffentlichten Konsensus für halophile Archaea (-29 TTTWWW -24) übereinstimmt.



**Abbildung 4.7.2.1** Multipler Sequenzvergleich der Promotoren *arsR* aus *Halobacterium salinarum* (Hasa) und *arsR* aus *Haloquadratum walsbyi* (Hqwb). Konservierte Bereiche wurden durch Schattierung dargestellt. Transkriptionsstart und der beginnende Leserahmen des *arsR*-Gens wurden mit Pfeilen in schwarz beziehungsweise blau gekennzeichnet. Potentielle Repressorbindestelle mit einem roten Balken über der Sequenz hervorgehoben.

Der 62 bp lange *arsR*-Kernpromotor wurde nun mittels zufälliger Nukleotidsubstitution an ausgewählten, jeweils 4 bp langen, und in Abb. 4.7.2.1 dargestellten Positionen mutiert und über Reporteranalyse vermessen. Augenmerk wurde hierbei auf den Bereich unmittelbar stromaufwärts des Translationsstarts gelegt, da Mutationen im Bereich der TATA-Box oder des stromaufwärts gelegenen BRE-Elementes mit der basalen Transkription interferieren würden und damit im Kontext nur schwer interpretierbar wären.

**WT-ArsR-Promotor**

WT cgtacacaacacttactttattatgcttaaatcagagccatg

**B**
**A**
**T**  
-18-(-21)
-9-(-12)
-1-(-4)

**Mutagenesis -1-(-4)**

T01 cgtacacaacacttacttttagtcaatgcttaaatacagacatgatg

T02 cgtacacaacacttacttttagtcaatgcttaaatacagcccatg

T03 cgtacacaacacttacttttagtcaatgcttaaatacagagttatg

**Mutagenesis pos. -9-(-12)**

A01 cgtacacaacacttactttatttatatgctccctcagagccatg

A03 cgtacacaacacttactttatttatatgcttcattcagagccatg

A05 cgtacacaacacttactttatttatatgctcaaatcagagccatg

A09 cgtacacaacacttactttatttatatgctcctctcagagccatg

A12 cgtacacaacacttactttatttatatgctaactcagagccatg

**Mutagenesis -18-(-21)**

B01 cgtacacaacacttacttttaacaatgcttaaatacagagccatg

B04 cgtacacaacacttacttttaaccaatgcttaaatacagagccatg

B05 cgtacacaacacttacttttaccccatgcttaaatacagagccatg

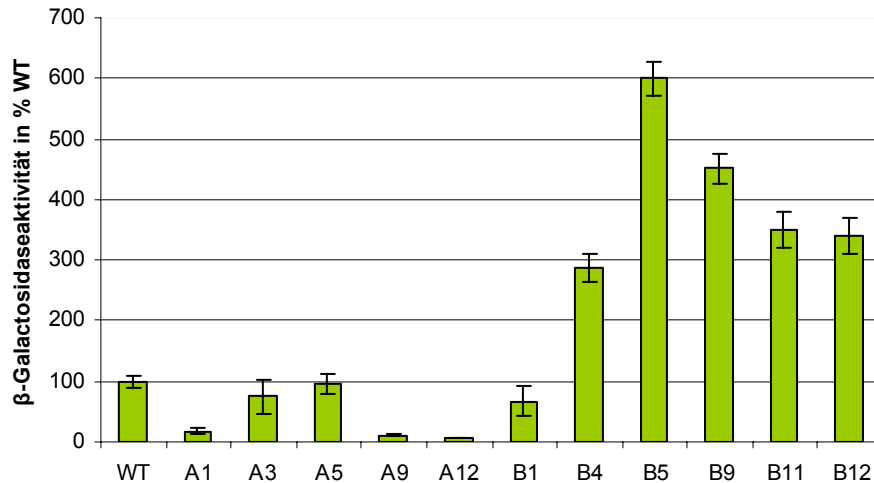
B09 cgtacacaacacttacttttacttcacatgcttaaatacagagccatg

B11 cgtacacaacacttactttattccatgcttaaatacagagccatg

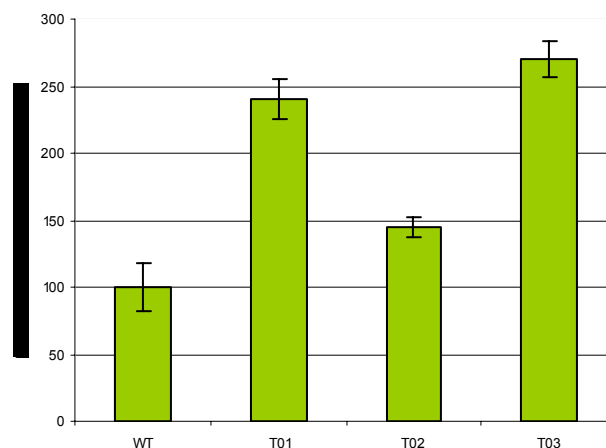
B12 cgtacacaacacttacttttagtcaatgcttaaatacagagccatg

**Abbildung 4.7.2.2** Mutagenese einer vermeintlichen Repressorbindestelle im *arsR*-Promotor. Zwei spezifische Regionen des *arsR*-Promotors A: (-9)-(-12) und B: (-18)-(-21), welche eine auffällige Inverted Repeat Struktur aufweisen, und zwei Bereiche des basalen Promotors (BRE-, INR-Element) wurden durch Mutagenese nach der Megaprimermethode verändert. Dargestellt sind die Sequenzen von Wildtyp (WT) und einiger ausgewählter Klone. Substituierte Nukleotide sind durch gelbe Markierung angezeigt.

Bei Mutation im Bereich A des *arsR*-Promotors konnte eine deutliche Reduktion der Reporteraktivität gemessen werden. Wurde hingegen der Bereich B des *arsR*-Promotors mutiert, konnte eine bis zu 6-fach erhöhte Reporteraktivität gemessen werden. Mutationen in Bereich T, also unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionstart, führten, wie im Falle der B-Mutationen zu erhöhten Reporteraktivitäten. Diagramm 4.7.2.1 zeigt die Reporteraktivitäten von ausgewählten Promotormutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die korrekte Integration der Promotor-Reporterkonstrukte am gewünschten chromosomalen Lokus wie auch die das Vorhandensein eines intakten WT-Promotors wurden mittels PCR überprüft.



**Diagramm 4.7.2.1** Mutagenese einer potentiellen Repressorbindestelle im *arsR*-Promotor. Gemessen wurde die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität in Promotor-Reportermutanten A und B im Stamm R1. Die Reporteraktivität wurde in Prozent der spezifischen Aktivität des Wildtyps angegeben und gegen die optische Dichte bei 600nm normiert.

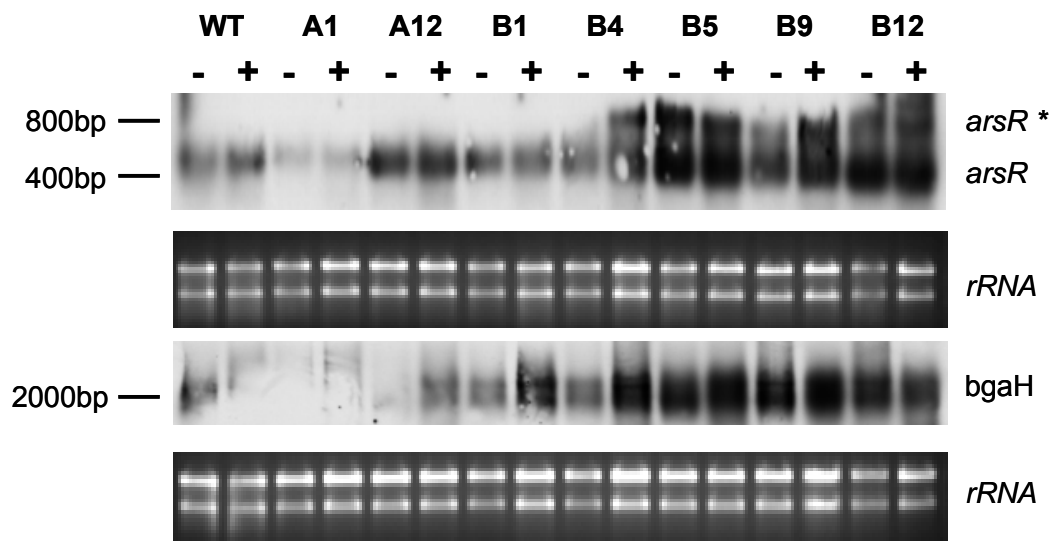


**Diagramm 4.7.2.2** Mutagenese einer potentiellen Repressorbindestelle im *arsR*-Promotor. Gemessen wurde die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität in Promotor-Reportermutanten T im Stamm R1. Die Reporteraktivität wurde in Prozent der spezifischen Aktivität des Wildtyps angegeben und gegen die optische Dichte bei 600nm normiert.

Der beobachtete Anstieg der BgaH-Aktivität liegt deutlich höher als der bei Induktion mit Arsenit gemessene Wert. Unter der Hypothese einer Repressorinteraktion deutet dies auf Interferenz durch einen zweiten Regulator, möglicherweise *ArsD*, in Analogie zum *E. coli ars*-Operon (Wu & Rosen 1993), hin. Neben einer Derepression durch Zerstörung einer Repressor/Operator Wechselwirkung könnten Mutationen in Sequenzabschnitten des *arsR*-Promotors zwischen Transkriptionsstart und TATA-Box

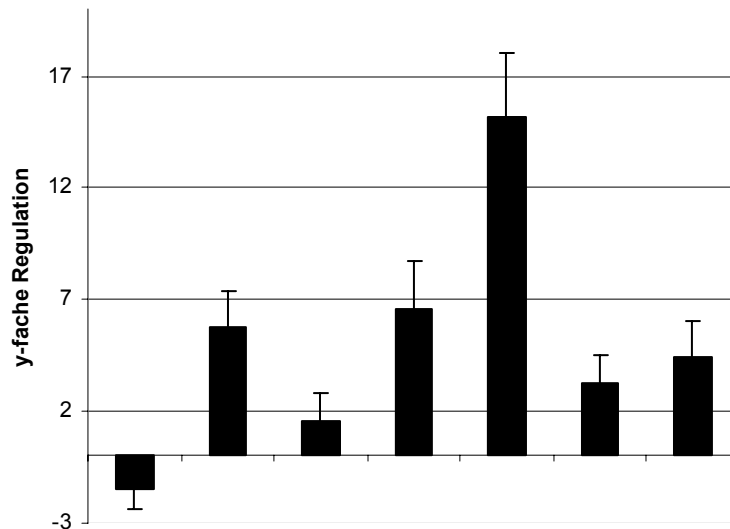
A) die basale Transkription oder B) die Translation beeinflussen. Der Bereich -18(-21) stellt auch das stromabwärts der TATA-Box liegende Kontaktelement für den basalen Transkriptionsfaktor TFB dar.

Um herauszufinden ob die gemessene Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in *arsR*-Promotormutanten auf Ebene der Transkription oder der Translation stattfindet, wurde die mRNA-Abundanz des Reportergens *bgaH* mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR und Northern Blotting analysiert. Sowohl quantitative RT-PCR als auch Northern Blot bestätigten die Ergebnisse aus den Reporteranalysen. Mutanten der Region B zeigten verglichen zum Wildtyp deutlich höhere Transkriptabundanz für *arsR* aber auch für das Reportergen *bgaH*. Auffallend ist, dass ausschließlich in den B-Mutanten neben dem Signal für *arsR* bei 400bp auch eine Bande bei ca. 800bp erkennbar ist, welche möglicherweise das dicistronischen Transkript *arsRC* darstellt.

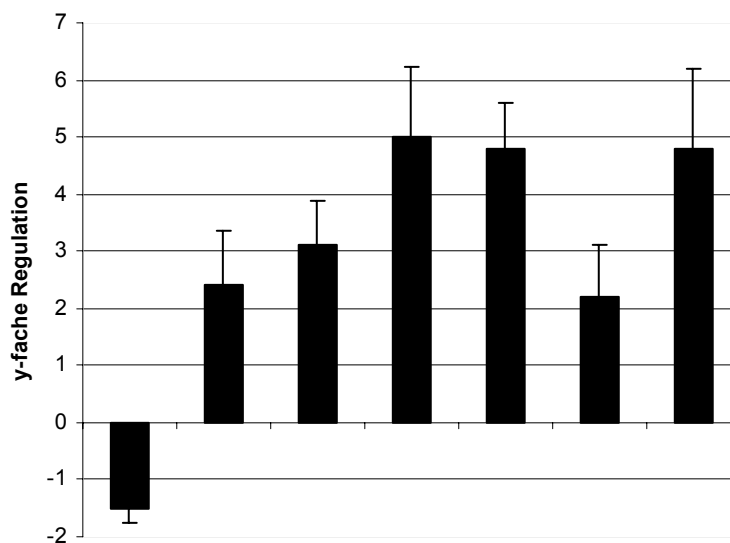


**Abbildung 4.7.2.4** Transkriptabundanz von *arsR* und *bgaH* ( $\beta$ -Galactosidase) in Reporteremutanten mit mutiertem *arsR*-Promotor [A1,A12: (-9)-(-12) und B1-B12: (-18)-(-21) zum Translationsstart] im Vergleich zum *arsR*-Wildtyp-Promotor. Northern Blot Hybridisierung mit Sonden gegen *arsR* und *bgaH*. RNA-Proben wurden aus nicht induzierten (-) und mit 25  $\mu$ M SbIII für 40min induzierten (+) *Halobacterium*-Kulturen in der frühlogarithmischen Wachstumsphase gewonnen. Als Ladekontrolle wurden *16S*- und *32S* *rRNA* (EtBr-gefärbt) dargestellt.

Das Auftreten einer Induktion von *arsR* beziehungsweise *arsR*\* deutet darauf hin, dass durch die Anwesenheit des Reporterkonstruktes mit mutiertem *arsR*-Promotor auch der Wildtyppromotor beeinflusst wird. Da dies sowohl im induzierten als auch im nicht induzierten Zustand sichtbar wird, liegt nahe, dass der WT-Promotor über homologe Rekombination ersetzt wurde und *arsR* ebenfalls dereprimiert wird.



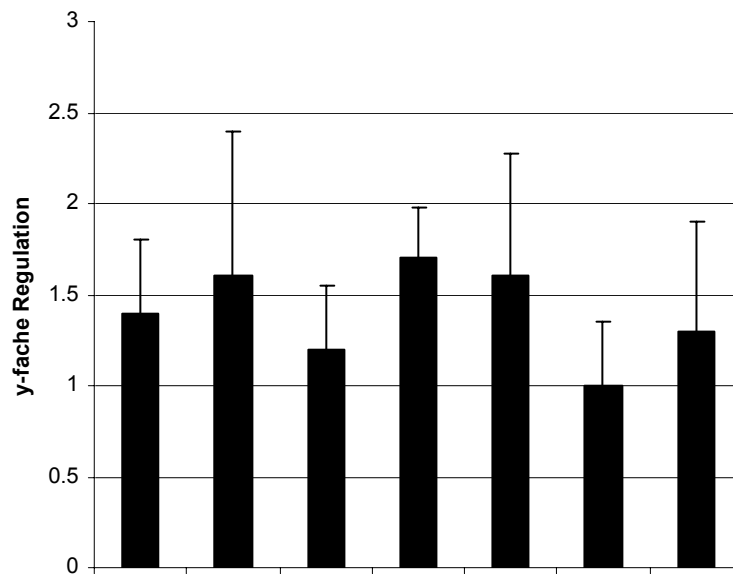
**Diagramm 4.7.2.3** Quantitative Echtzeit-RT-PCR Analyse der  $\beta$ -Galactosidasetranskription in den Reporterstämmen mit mutiertem *arsR*-Promotor A1, A12, B1, B4 B5, B9 und B12 (von links nach rechts). Aufgetragen ist der Regulationsfaktor der *bgaH*-Expression in den jeweiligen Promotormutanten im Vergleich zum Wildtyp. Als interner Standard wurde die *16S rRNA* verwendet.



**Diagramm 4.7.2.5** Quantitative Echtzeit-RT-PCR Analyse der *arsR*-Transkription in den Reporterstämmen mit mutiertem *arsR*-Promotor A1, A12, B1, B4 B5, B9 und B12 (von links nach rechts). Aufgetragen ist der Regulationsfaktor der *arsR*-Expression in den jeweiligen Promotormutanten im Vergleich zum Wildtyp. Als interner Standard wurde die *16S rRNA* verwendet.

Im Bereich A führten Mutationen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während die Mutation A1 im Vergleich zum Wildtyp verringerte *bgaH*-Transkription zeigt und somit wieder die Ergebnisse aus den Reporteranalysen bestätigt, zeigte die

Mutante A12 eine positive Änderungen des mRNA-Niveau, aber reduzierte  $\beta$ -Galactosidaseaktivität. Mutationen im Bereich -8(-12) scheinen also definitiv auch mit der Translation zu interferieren. Zusätzliche wurden RT-PCR Experimente zur Quantifizierung der Expression von *arsR*- und *arsC*- Transkripten durchgeführt. Diese zeigten dass die Transkription von *arsR* (Abb. 4.7.3.5) in den Promotormutanten mit Ausnahme von A1 zwischen 2- und 5-fach angehoben wird und mit dem Anstieg der *bgaH*-Expression (Abb. 4.7.3.2) parallel läuft. Wie aus Abb. 4.7.3.6 ersichtlich, wird die Expression von *arsC* nicht durch die *arsR*-Promotormutationen beeinflusst. Die im Northern Blot detektierte Bande *arsR*\* kann demnach nicht auf ein polycistronisches Transkript *arsRC* zurückgeführt werden.

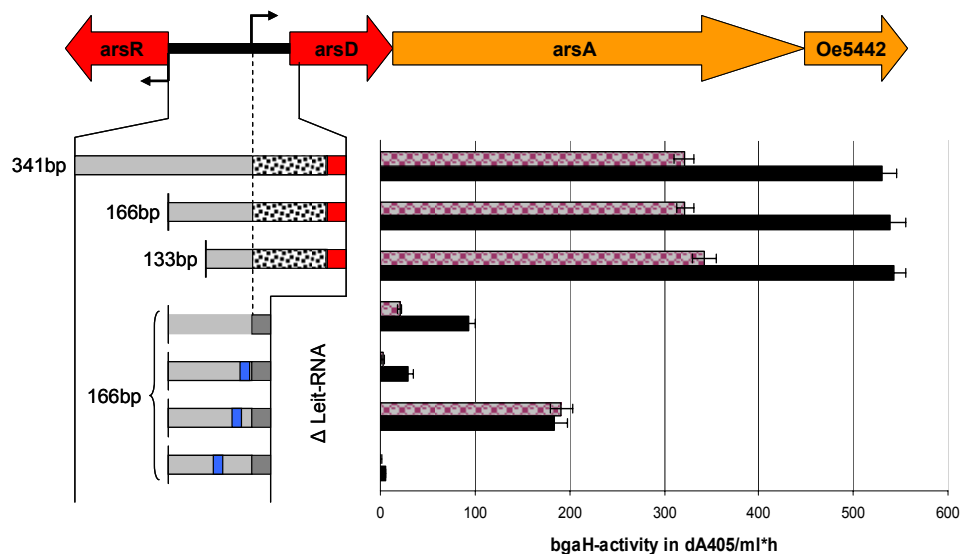


**Diagramm 4.7.2.6** Quantitative Echtzeit-RT-PCR Analyse der *arsC*-Transkription in den Reporterstämmen mit mutiertem *arsR*-Promotor A1, A12, B1, B4 B5, B9 und B12 (von links nach rechts). Aufgetragen ist der Regulationsfaktor der *arsC*-Expression in den jeweiligen Promotormutanten im Vergleich zum Wildtyp. Als interner Standard wurde die *16S rRNA* verwendet.

### 4.7.3 5'-Deletion und Mutation des *arsD*-Promotors

Wie bereits am Beispiel des *arsR*-Promotors exerziert, wurde hier der *arsD*-Promotor vom 5-Ende her in Schritten verkürzt und wieder mittels Reporterexpression gemessen. Aufgrund des Induktionsverhaltens des Wildtyp-Promotors (1,6-fach bei Induktion mit 50  $\mu$ M AsIII) würde man unter der Annahme einer Repressorinteraktion davon ausgehen, dass eine Deletion der Operatorstelle zu erhöhter *bgaH*-Expression im nicht induzierten Zustand und zur vollständigen Auslöschung der Metalloid-

Induktion führt. Wie in Abb. 4.7.3.1 dargestellt konnte in den Reportermutanten mit verkürztem Promotor (166 bp, 133 bp), verglichen am Vollängenpromotor (341 bp) keine Veränderung sowohl des Expressionsniveaus im nicht-induzierten Zustand als auch im Induktionsverhalten gemessen werden. Um nun den verbliebenen Kernpromotor auf regulatorische Elemente zu untersuchen wurde ein 166 bp-Fragment an vier ausgewählten Stellen rund um den Transkriptionsstart durch Substitution von jeweils 2 bp mutiert.

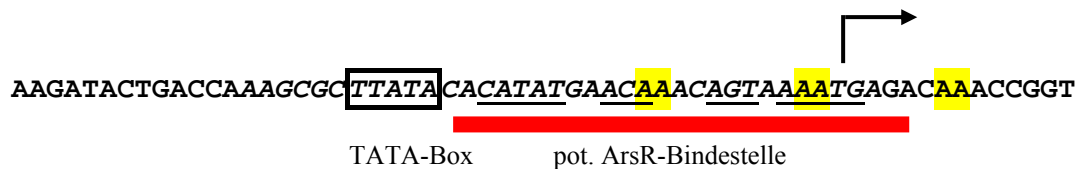


**Diagramm 4.7.3.1** Schrittweise Verkürzung des *arsD*-Promotor 5'-Bereichs und Mutationanalyse um den *arsD*-Transkriptionsstart. Promotorfragmente wurden als Translationsfusionen der ersten beiden Aminosäuren von ArsR (rot) mit dem Reporter gen *bgaH* konstruiert. Transkriptionsstarts sind durch Pfeile angezeigt und für *arsD* zusätzlich mit einer strichlierten Linie versehen. Für die Mutationsanalyse wurde ein 166 bp-Promotorfragment verwendet, bei dem die native Leit-RNA gegen einen 14 bp langen translationsaktiven Bereich aus dem *H. salinarum dpsA*-Promotor ersetzt wurde. Mutierte Bereiche sind durch blaue Balken angedeutet. Gemessen wurde die Reporter genexpression in a) nicht induzierten (graue Balken) und mit 50  $\mu$ M AsIII induzierten Kulturen (schwarze Balken).

Die native Leit-RNA wurde in diesen Mutationsstudien deletiert um mögliche Interferenzen durch diese zu vermeiden. Um dennoch für die Translation von mRNA entscheidende RNA-Sekundärstrukturen beziehungsweise eine effiziente ribosomale Bindestelle zu gewährleisten wurde in allen *arsD*-Reporterkonstrukten zur Mutationsanalyse die native Leit-RNA durch ein 14 bp Fragment des *dpsA* (Ferritin)-Promotors aus *Halobacterium salinarum* (AACGTGTAATCGTTATG) ersetzt. DpsA ist eines der am stärksten exprimierten Proteine in *Halobacterium salinarum*. Der

Austausch der Leit-RNA gegen den *dpsA*-upstream Bereich führte, wie erwartet zu einer Veränderung der *bgaH*-Expression. Die Grundaktivität des Reporterenzym sank allerdings dabei signifikant. Auffällig war hierbei, dass sich auch die  $As^{III}$ -induzierte Induktion von 1,6 auf bis zu 16-fach erhöhte. Mutationen an den Positionen +6-(+7) und -10(-11) zum Transkriptionsstart führten in beiden Fällen zur Reduktion des *bgaH*-Expressionsniveaus, nicht aber zur Aufhebung der  $As^{III}$ -Induktion.

Eine Mutation an Position -1(-2) allerdings, also unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstarts, führte zur Derepression der Reportergenexpression und zum vollständigen Verlust der  $As^{III}$ -abhängigen Induktion. Die gemessene  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in dieser Mutante ist gegenüber dem Wildtyp ca. 2-fach erhöht.



**Abbildung 4.7.3.1** Darstellung des *arsD*-Kernpromotorbereiches in *H. salinarum* R1. Der Transkriptionsstart wurde durch einen Pfeil, eine potentielle ArsR-Bindestelle durch einen roten Balken gekennzeichnet. Die gelb gefärbten Nukleotide innerhalb eines Sequenzabschnittes, welcher imperfekte inverted repeat-Strukturen enthält, wurden wie in Diagramm 4.7.3.1 dargestellt durch Nukleotidsubstitution (AA → CC) mutiert.

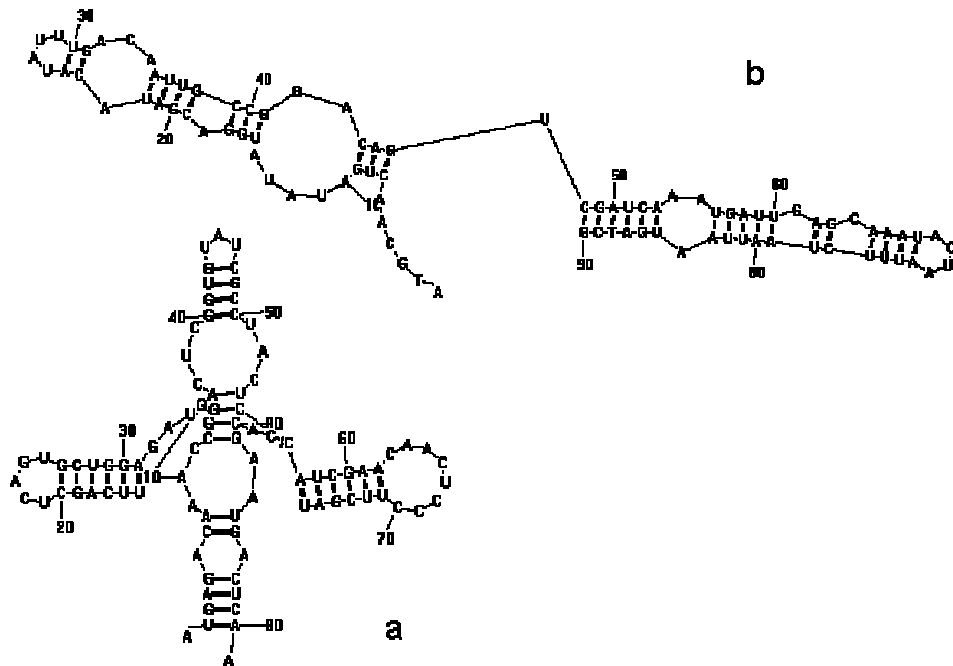
#### 4.7.4 Mutation der *arsD*-Leit-RNA

Das 5'-Ende der *arsD*-mRNA trägt eine untranslatierte Leitsequenz. Bekanntermaßen können RNA-Leitstrukturen in unterschiedlicher Weise, z. B. in Form von RNA-Sensoren (Tucker & Breaker 2005, Sashital & Butcher 2006, Vitrschak et al 2004), durch Antisense-RNA- bzw. Protein-vermittelte posttranskriptionelle Regulation oder Attenuation (Gollnick & Babitzke 2002) in die Regulation der Genexpression eingreifen. Um eine mögliche Funktion der *arsD*-Leit-RNA herauszufinden wurde diese mittels Scanningmutagenese untersucht. Hierzu wurden das mRNA-5'-Ende im Bereich von -1 bis -60 bp vom Translationsstart im Abstand von 3 bp durch zufällige Substitution von jeweils vier Nukleotiden mutiert. Abbildung 4.7.4.2 zeigt einen Sequenzabschnitt der ersten 60 bp der Wildtyp (WT)-*arsD*-Promotor LeitRNA sowie der mutierten und gemessenen Klone.

Wie in Abbildung 4.7.4.1 dargestellt, wurde bereits im Vorfeld versucht anhand von mRNA-Sekundärstrukturberechnung für die Leit-RNA's aus *Halobacterium*



*salinarum* und *Haloquadratum walsbyi* und deren Vergleich miteinander Aussagen über konservierte strukturelle Elemente zu finden. Darüber könnte man bereits Hinweise über eine mögliche Funktion der 5'-LeitRNA erhalten. Wenngleich man erkennen kann, dass die 80 bp langen *arsD*-LeitRNA's in beiden Organismen zur Ausbildung starker Sekundärstrukturen führen, so konnte dennoch anhand der Strukturvorhersage keine zusätzliche Aussage getroffen werden.

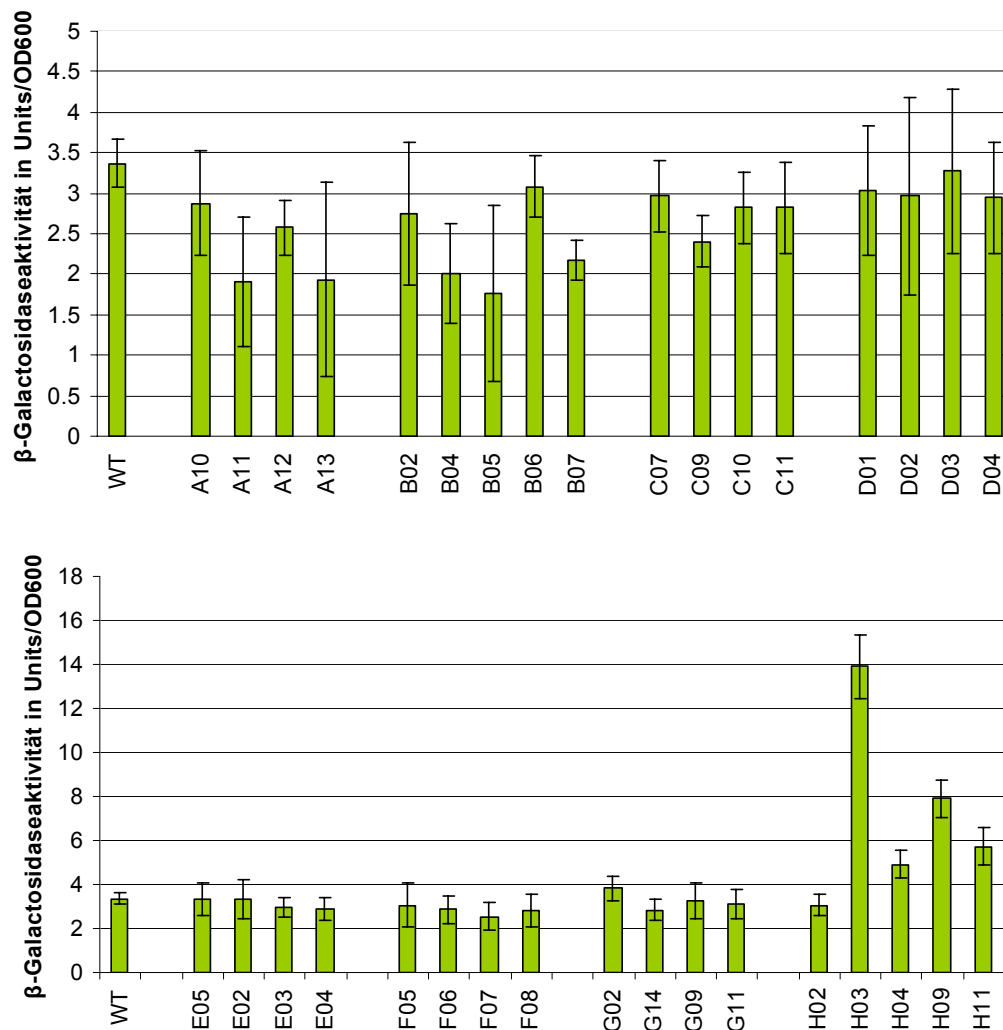


**Abbildung 4.7.4.1** RNA-Sekundärstrukturen von Leit-RNAs der *arsD*-Transkripte in *Halobacterium salinarum* (a) und *Haloquadratum walsbyii* (b). Die Sekundärstrukturberechnung und Darstellung wurde mit dem Programm RNA Structure Version 4.11 durchgeführt.

Die Reporteraktivität der Klone des Vollängen *arsD*-Promotorkonstruktes mit Mutationen an den in Abbildung 4.7.4.2 dargestellten Positionen wurde bei einer Zelldichte von OD600 = 1.0 ohne Arsenit/Antimonit-Induktion bestimmt und in Diagrammen 4.7.4.1 mit dem Wildtyppromotor verglichen. Um die relativ geringe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität sinnvoll messen zu koennen, wurden die Kulturen hierzu circa 10-fach aufkonzentriert. Gemessen wurde nach Induktion mit 10  $\mu$ M Arsenit und einem Inkubationszeitraum von 8 Stunden.

WT CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 A01 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCC**CCTA**AAATG  
 A02 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCC**ATCA**ATG  
 A03 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATC**ACAC**AAATG  
 A04 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCC**CCGA**ATG  
 B10 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCT**ACA**ATCCACGAATG  
 B11 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCT**TGA**ATCCACGAATG  
 B12 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCC**CCCT**ATCCACGAATG  
 B13 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCC**GGCA**ATCCACGAATG  
 C02 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAAC**TGG**CCCTTCGATCCACGAATG  
 C04 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAAC**CCAA**CCCTTCGATCCACGAATG  
 C05 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAAC**ACT**CCCTTCGATCCACGAATG  
 C06 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAAC**TAC**CCCTTCGATCCACGAATG  
 C07 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAAC**TT**CTCCCTTCGATCCACGAATG  
 D07 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCA**CAAA**AACAACCTCCCTTCGATCCACGAATG  
 D09 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCA**AGAC**AACAACCTCCCTTCGATCCACGAATG  
 D10 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCA**TTTT**AACAACCTCCCTTCGATCCACGAATG  
 D11 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCA**TCGT**AACAACCTCCCTTCGATCCACGAATG  
 E01 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCG**CGGA**CTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 E02 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCG**CGAA**ATCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 E03 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCG**GGTT**TCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 E04 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCG**TCAT**TCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 E05 CAGTGCTGGAGATGACTCGGTGTATCG**CTTT**TCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F05 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**CCAT**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F06 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**CCCG**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F07 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**TAA**TTCGCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F08 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**TATG**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F09 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**TTTC**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F10 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**ATTG**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F11 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**CACG**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 F12 CAGTGCTGGAGATGACTCGGT**TATC**CGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 G02 CAGTGCTGGAGATGAG**T**CGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 G03 CAGTGCTGGAGATGA**ATA**GGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 G04 CAGTGCTGGAGATGAG**CT**GGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 G09 CAGTGCTGGAGATG**CAA**CGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 G11 CAGTGCTGGAGATG**ATT**CGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 H07 CAGTG**CTGT**GATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 H08 CAGTG**CGC**GATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 H04 CAGTG**CGT**CGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 H06 CAGTG**CCG**GATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 H04 CAGTG**CGT**CGATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG  
 H06 CAGTG**CCG**GATGACTCGGTGTATCGCCTACTCAATCGAACAACTCCCTTCGATCCACGAATG

**Abbildung 4.7.4.2** Mutation der *arsD*-Leit-RNA. Sequenzausschnitt aus dem *arsD*-Promotor (mRNA-Leitsequenz, -1(-60) bp vom Translationsstart) der gemessenen Reporterklone. Substituierte Nucleotide sind in gelber Farbe hervorgehoben, der Translationsstart in fetter Schrift gekennzeichnet.



**Diagramm 4.7.4.1** Mutagenese der nicht translatierten RNA-Leitsequenz innerhalb des *arsD*-Promotors. Ein Vollängen-Promotorfragment wurde als Translationsfusionen der ersten beiden Aminosäuren von ArsR (rot) mit dem Reporter gen *bgalH* konstruiert. Gemessen wurde die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in Promotor-Reporter mutanten im Stamm R1. Die Reporter genaktivität wurde als spezifischen Aktivität in Miller Units angegeben und gegen die optische Dichte bei 600 nm normiert

Wie aus den Diagrammen 4.7.4.1 ersichtlich konnten nur für die Reporterklone mit Mutationen im Bereich H der *arsD*-LeitRNA signifikante Veränderungen gemessen werden. In vier von fünf gemessenen Promotormutanten stieg die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität auf maximal rund 3,5-fach. Möglicherweise überlappt die im *arsD*-Promotor gefundene Repressorbindestelle mit dem 5'-Ende der *arsD*-LeitRNA. Zusammenfassend kann mithilfe der  $\beta$ -Galactosidase-Messungen klar gezeigt werden, dass sich im Bereich zwischen Transkriptionsstart und überlappend mit den basalen

Transkriptionselementen in den Promotoren von *arsR* und *arsD* Repressorbindestellen befinden. Für die Transkription von *arsD* konnte ebenfalls eine  $As^{III}$ -Abhängigkeit dieses Effektes gemessen werden, womit es sich bei diesem Kontrollelement um eine DNA-Bindestelle für einen der beiden ArsR-Regulatoren handelt. Im Falle des *arsR*-Promotors ist nicht klar, ob es sich hier ebenso um einen regulatorischen Effekt eines Arsenit-abhängigen Repressors handelt. Die Mutation der vermeintlichen Operatorsequenz innerhalb des *arsR*-Promotors führte zwar, wie für eine Repressorbindestelle erwartet, zu einer Induktion, allerdings konnte keine  $As^{III}$ -Abhängigkeit oder deren Verlust festgestellt werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der konstitutiv exprimierte Regulator ArsR seine Genexpression autoregulatorisch und Arsenit-unabhängig steuert.

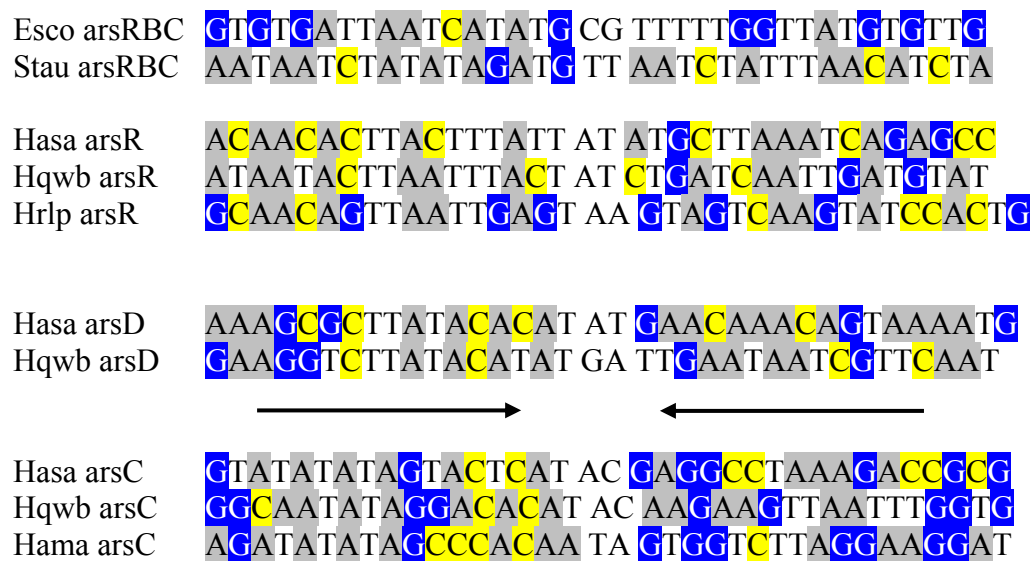
#### 4.8 Vergleichende Sequenzanalyse der potentiellen Repressorbindestelle

Mittels *in vivo* Reporteranalysen konnten regulatorische Elemente innerhalb von Promotoren der Gene *arsR* und *arsD* ausgemacht werden, welche für die Arsenit-beziehungsweise Antimonit-abhängige Regulation verantwortlich sind. Nun wurde innerhalb dieser experimentell bestätigten Sequenzabschnitte nach bekannten DNA-Bindestellen gesucht. Abbildung 4.8.1 zeigt DNA-Bindestellen mehrerer unterschiedlicher Repressorproteine aus der ArsR/SmtB-Familie sowie deren DNA-Konsensusmotive (Kernmotive) in einer erweiterten Darstellung nach Busenlehner et al. (2003).

smtS2/S1	gctaAACACATGAACA	GT	TATTCAGATATT	caaa
smtS4/S3	ccacCATACCTGAATC	AA	GATTCAGATGTT	taggc
ziaA	ctttAATATCTGAGCA	TA	TCTTCAGGTGTT	tcaa
cZRAB	aattAATATATGAACA	AA	TATTCATATGAA	agga
czcD	xxTTTATATATGAACA	CA	TGCTCATATATA	AAAxx
aseR	xxCGTGTATATAACGA	TT	TGCTTATATATT	Gaxx
nmtA	aataAATAAATGAACA	TA	TGATCATATATT	ctga
<b>Kernmotiv</b>	<b>aAtAxxTGAaca</b>	<b>xx</b>	<b>tatTCAxatxtt</b>	
cadCA	ataaTACACTCAAATA	AA	TATTTGAATGAA	gatg
arsRBC	tgtgATTAATCATATG	CG	TTTTTGTTATG	tgtt
<b>Kernmotiv</b>	<b>TxAxTCAAAta</b>	<b>xx</b>	<b>taTTTGaxTxTA</b>	

**Abbildung 4.8.1** Multipler Sequenzvergleich von DNA-Bindestellen und daraus abgeleitete Konsensussequenzen bereits beschriebener metallabhängiger Transkriptionsfaktoren der ArsR/SmtB-Familie. Erweiterte Darstellung nach Busenlehner et al. (2003).

Basierend auf der bereits bekannten Repressorbindestelle der *E. coli* und *Staphylococcus aureus* *ars*-Operons (Wu & Rosen 1993, Guangyong & Silver 1992) und der in dieser Arbeit experimentell oder durch Homologien innerhalb halophiler Archaea ermittelten cis-aktiven Promotorbereiche der Gene *arsR*, *arsD* und *arsC* wurde ein multipler Sequenzvergleich erstellt.



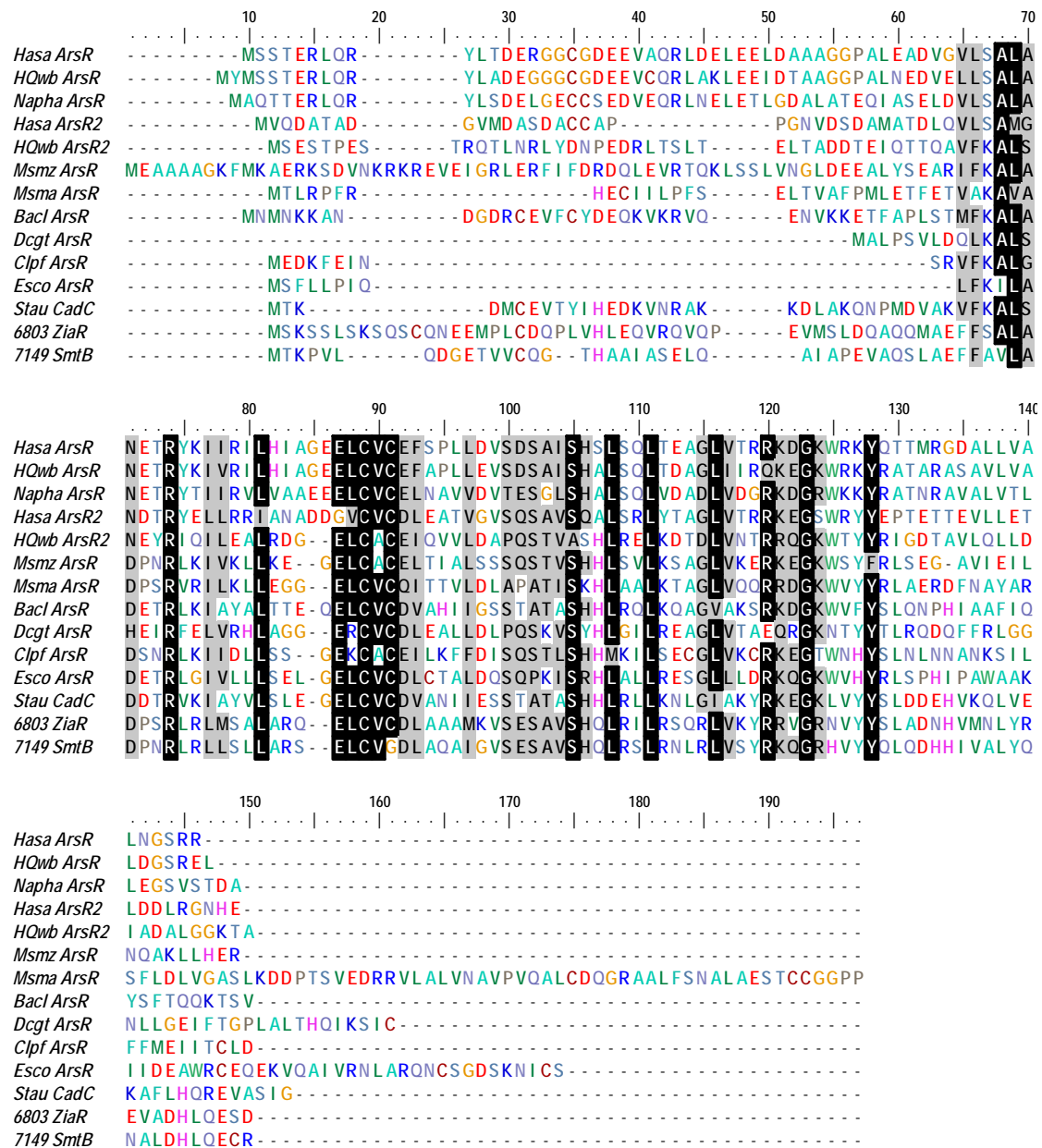
**Abbildung 4.8.2** Multipler Sequenzvergleich von vermeintlichen Operatorstellen der Promotoren *arsR* und *arsD* aus *Halobacterium salinarum* (Hasa) sowie *Haloquadratum walsbyii* (Hqwb) und *Halorubrum lacusprofundi* (Hrlp) unter Miteinbeziehung der ArsR-Bindestellen in *E. coli* (*Esco*) und *Staphylococcus aureus* (*Stau*) *arsRBC*-Promotoren.

Wie anhand der in Abbildung 4.8.2 verglichenen potentiellen Operatorsequenzen ersichtlich zeigt sich das von Busenlehner et al. (2003) beschriebene ArsR/SmtB-DNA-Konsensus- oder Kernmotiv (4.8.1) als sehr schwach konserviert. Dennoch ist ein schwach konserviertes 14-2-14 inverted repeat Motiv erkennbar.

## 4.9 *H. salinarum* ArsR und ArsR2, zwei Vertreter der ArsR/SmtB-Familie

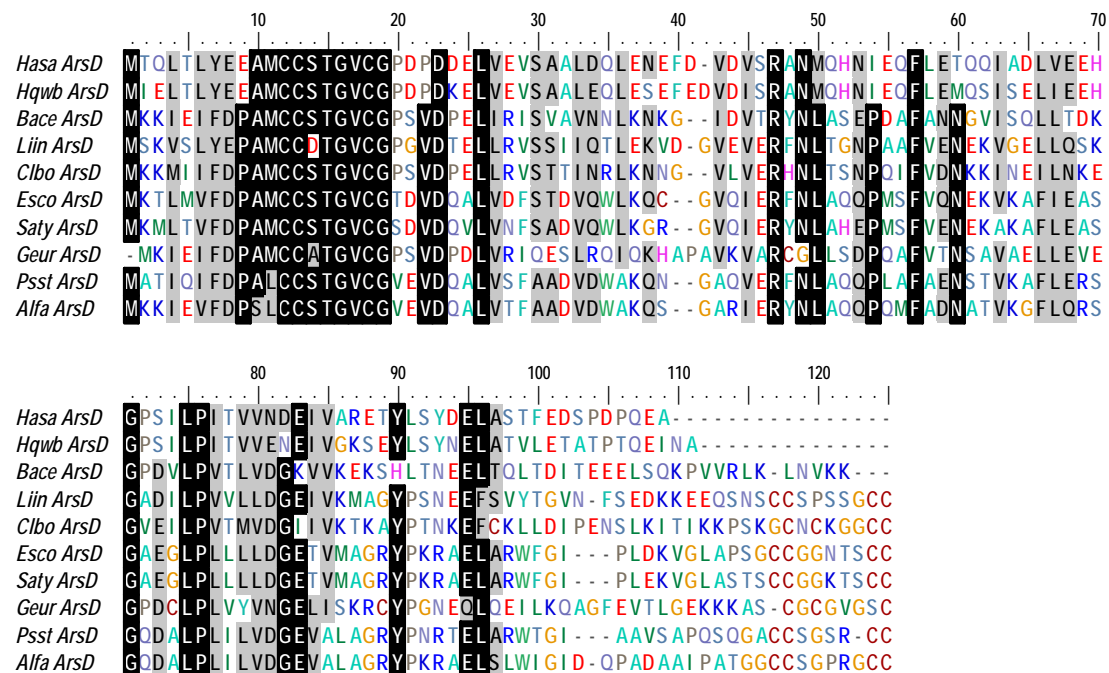
Das Arsenresistenzoperon in *Halobacterium salinarum* kodiert für zwei Transkriptions-faktoren mit starken Homologien zu Repressorproteinen der ArsR / SmtB-Familie. Im folgenden wurden Primärsequenzen dieser beiden, ArsR und ArsR2 aus *H. salinarum*, mit weiteren, zum Teil bereits charakterisierten, Vertretern

dieser Proteinfamilie aus *Haloquadratum walsbyi* sowie *Natronomonas pharaonis* verglichen.



**Abbildung 4.9.1** Multipler Sequenzvergleich der Proteinprimärstrukturen von ArsR-Homologa aus *Halobacterium salinarum* (Hasa), *Haloquadratum walsbyi* (Hqwb), *Natronomonas pharaonis* (Napha), *Bacillus clausii* KSM-K16 (BacI), *Methanosarcina mazei* Gö1 (Msmz), *Magnetospirillum magnetotacticum* AMB1 (Msma), *Clostridium perfringens* (Clpf) und *ArsR* aus *Escherichia coli* (*Esco*) sowie den bereits charakterisierten (Wong et al. 2002, Morby et al. 1993) Cd(II)-, Pb(II)- und Bi(III)- beziehungsweise Zn(II)-abhängigen Repressorproteinen CadC aus *Staphylococcus aureus* p1258 (Stau), ZiaR aus *Synechocytis PCC6803* (6803) und SmtB aus *Synechococcus PCC7149*. Konservierte Reste wurden durch Umrahmung (schwarz; grau) hervorgehoben. Homologie-Schattierung wurde mit einem treshold von 75% durchgeführt.

Der multiple Sequenzvergleich in Abb. 4.9.1 zeigt, dass vor allem das Metallbindungszentrum der  $\alpha$ 3N-Domäne ELCVC(D/E) in den Vertretern ArsR aus *H. salinarum*, ArsR und ArsR2 aus *Haloquadratum walsbyi* sowie ArsR aus *Natronomonas pharaonis* nicht aber in ArsR2 aus *H. salinarum* vollständig konserviert blieb. Ein auffälliges Kriterium der halophilen ArsR-Proteine ist das Auftreten eines Cysteins an Positionen 18 bzw. 20 in ArsR aus *H. salinarum* und *H. walsbyi* sowie des Cysteinpaars Cys19-Cys20 und Cys17-Cys18 (bei Position 35 im Alignment) in ArsR aus *Natronomonas pharaonis* und ArsR2 aus *H. salinarum*.



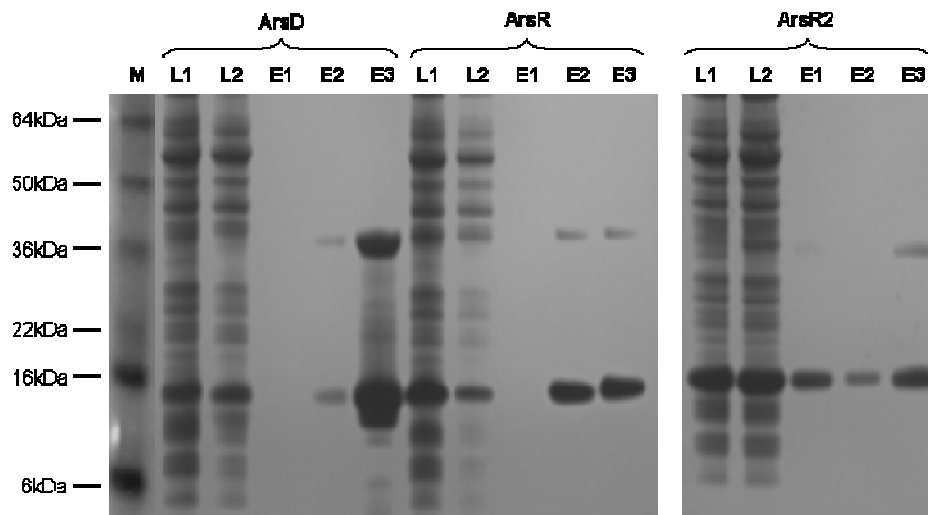
**Abbildung 4.9.2** Multipler Sequenzvergleich von ArsD-Aminosäuresequenzen aus *Halobacterium salinarum* (Hasa), *Haloquadratum walsbyi* (Hqwb), *Bacillus cereus* (Bace), *Listeria innocua* Clip11262 (Liin), *Clostridium botulinum* ATCC3502 (Clbo), *Escherichia coli* (Esco), *Salmonella typhimurium* IncN Plasmid R46 (Saty), *Geobacter uraniumreducens* Rf4 (Geur), *Pseudomonas stutzeri* A1501 (Psst) und *Alcaligenes faecalis* (Alfa). Konservierte Reste wurden durch Umrahmung (schwarz; grau) hervorgehoben. Homologie-Schattierung wurde mit einem threshold von 75% durchgeführt.

Beide halophilen Vertreter sowie ArsD aus *Bacillus cereus* besitzen einen verkürzten C-Terminus, welchem sowohl die Cysteine Cys112 und Cys113 (Positionen 117, 118 im Alignment) aber auch Cysteine Cys119 und Cys120 (Positionen 124, 125 im Alignment) fehlen. Wie am Beispiel des Plasmid R773-kodierten ArsD aus *E. coli* bereits eingehend untersucht, sind für die Metalloid-Erkennung und DNA-Bindung die beiden Cysteinpaare Cys12-Cys13 und Cys 118-Cys119 verantwortlich (Li & Rosen 2001, Li et al. 2002). Die Cysteine Cys12, Cys13 und Cys18 sind in allen

vergleichenen Proteinen vorhanden. Diese konservierten Cysteine sind auch für die Interaktion mit und Aktivierung der ATPase-Komponente ArsA verantwortlich, welche in *E. coli* die Effluxpumpe ArsAB antreibt (Lin et al 2007).

#### 4.10 Heterologe Expression der Transkriptionsfaktoren ArsR, ArsD und ArsR2

Für eine weitere funktionelle Charakterisierung von Metallbindung und DNA-Protein Wechselwirkung wurden die drei Transkriptionsfaktoren ArsR, ArsD und ArsR2 rekombinant in *E.coli* BL21 (DE3) hergestellt. Die Identität der 6 x HIS - Fusionsproteine (C-terminaler HIS-tag ) wurde mittels MALDI-TOF MS Peptide Mass Fingerprinting überprüft.



**Abbildung 4.10.1** Überexpression in BL21 (DE3) und Aufreinigung der 6xHIS-Fusionsproteine ArsR, ArsD sowie ArsR2 mittel NiNTA-Metallchelataffinitätschromatographie. Dargestellt ist eine Coomassie R-gefärbte SDS-PAGE. M: Protein-Molekulargewichtsstandard (SeeBlue2) L1: Zellysat nach Aufbruch mittels french press (1000psi) und L2: Überstand nach Zentrifugation bei 80 000g. E1: erste Elutionsfraktion E2: zweite Elutionsfraktion E3: dritte Elutionsfraktion

Wie mittels SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 4.10.1) gezeigt und ueber MALDI-TOF peptide mass fingerprinting bestaetigt bilden sowohl ArsR und ArsR2, aber auch ArsD stabile Dimere aus. Die Abweichung des Molekulargewichtes der Multimere im Gel vom theoretisch erwarteten ist sehr wahrscheinlich auf eine unvollstaendige Denaturierung der Proben zurueckzufuehren. Das Verhaeltnis von Dimer zu Monomer lieB sich durch Hitzedenaturierung minimieren.

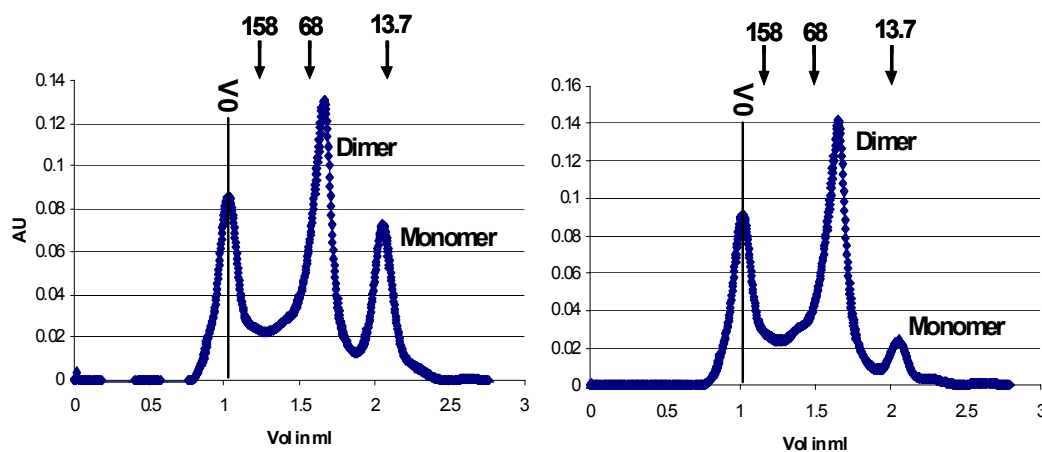


**Tabelle 4.10.1** Auflistung von Molekulargewichten, Extinktionskoeffizienten für die Proteine ArsR, ArsD und ArsR2 sowie deren rekombinante 6 x HIS-Fusionsproteine.

Protein	Halolex -Code	Lokus	Länge	Theor. Masse (Da)	pI	Fusion (Da)	Extinktions koeffizient
ArsR	Oe5437	PHS3	129 AS	14147 / 15216	4,8	15216	10095
ArsD	Oe5438	PHS3	108 AS	12021 / 13090	3,6	13090	4594
ArsR2	Oe5443	PHS3	119 AS	12822 / 13885	4,3	13885	11710

## 4.11 Analytische Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung

Um neben der in 4.12 erläuterten CD-spektroskopischen Charakterisierung der Proteinsekundärstrukturen zusätzliche Hinweise über die korrekte Faltung und Funktionalität der Proteine ArsR und ArsR2 zu erhalten, wurde deren Multimerisierung mittels analytischer Gelfiltrationschromatographie überprüft. Wie bereits in SDS-Polyacrylamidgelen aus Abbildung 4.10.1 ersichtlich, bilden beide Proteine Dimere, unter bestimmten Bedingungen (nicht dargestellt) auch Tetramere.

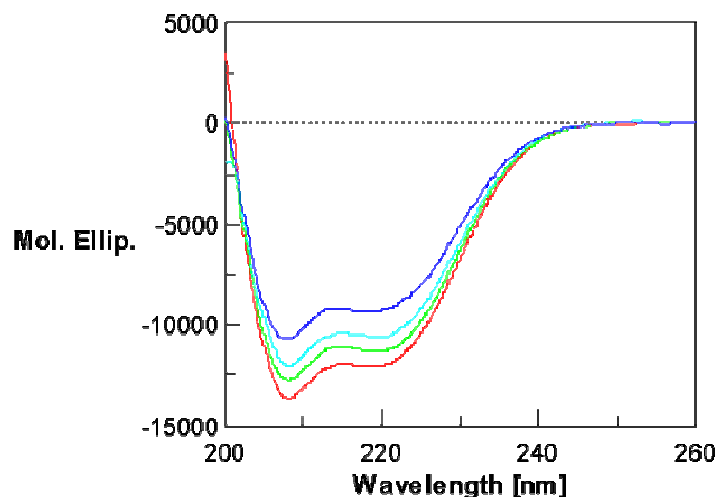


**Diagramm 4.11.1** Analytische Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung. ArsR (oben), ArsR2 (unten). Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Laufpuffer: CFE, Fraktionen in Peak III enthielten kein Protein sondern extern zugesetzte *arsR-D* DNA. Als Eichstandards wurden folgende Proteine verwendet: RibonukleaseA (13,7 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Bovine Serum Albumin (68 kDa), Aldolase (158 kDa) und mittels Pfeilen gekennzeichnet.

## 4.12 ArsR und ArsR2: Faltung und Stabilität

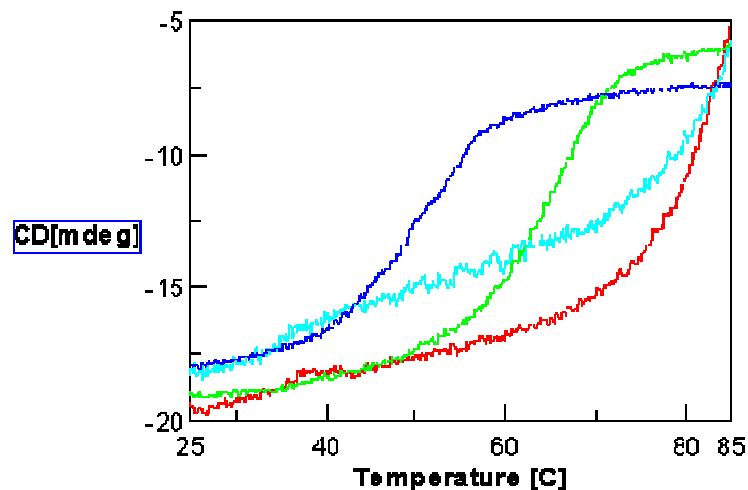
Nach erfolgreicher denaturierender Aufreinigung der rekombinant hergestellten 6 x HIS- Transkriptionsfaktoren ArsR, ArsD und ArsR2 wurden diese durch eine mehrstufige Dialyse gegen Hochsalzpuffer (siehe Material und Methoden) renaturiert. Um eine korrekte Rückfaltung zu überprüfen wurden die Proteine dann mittels CD-Spektroskopie näher untersucht. Die CD-Spektroskopie liefert im Fern-UV-Bereich (170-250 nm), in welchem vorwiegend die Peptidbindung absorbiert, Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen.

Wie Abbildung 4.12.1 zeigt ist der Faltungszustand von ArsR2 stark von der umgebenden Salzkonzentration (NaCl) abhängig, wobei der Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturelementen mit ansteigender Salzkonzentration zunimmt. Um dieses Ergebnis zu bekräftigen beziehungsweise um Informationen zur Stabilität von ArsR2 zu erhalten, wurden CD-Schmelzkurven in einem Temperaturbereich von 25°C-90°C aufgenommen. Hierzu wurden die gereinigten Fusionsproteine in Puffern unterschiedlicher Natriumchlorid-Konzentration verdünnt und bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 0,5°C / min thermisch denaturiert. Dabei zeigte sich ArsR2 als sehr thermostabil unter hohen Salzkonzentrationen. Diese Stabilität verringerte sich drastisch bei niedrigeren NaCl-Konzentrationen. In 0,625 M beziehungsweise 1,25 M NaCl betrug die  $T_{m(1/2)}$  50°C und 65°C.



**Diagramm 4.12.1** Fern-UV-CD (Circular Dichroism)-Spektrern des Transkriptionsfaktors ArsR2 (Oe5443) in Pufferumgebungen mit vier unterschiedlichen Natriumchloridkonzentration. ArsR2 in einer Konzentration von 180  $\mu$ M in Puffer B (40 mM MgSO<sub>4</sub>, 13,5 mM KCl, 10 mM Na<sub>3</sub>Citrat 1 mM HEPES; pH 7,0) plus 3,75 M (rot), 2,5 M (grün), 1,25 M (türkis) und 0,625 M (blau).

In Puffern mit 2,5 M und 3,75 M NaCl lag die  $T_{m(1/2)}$  deutlich über 80°C. Diese freie Schmelztemperaturen konnten nicht bestimmt werden, da beide ausserhalb des Messbereiches der verwendeten Apparatur liegen. Wurden die hitzedenaturierten Proteine mit der selben Geschwindigkeit wieder auf 25°C abgekühlt, erfolgte in Hochsalzpuffer eine spontane Rückfaltung von annähernd 100% des eingesetzten Proteins.



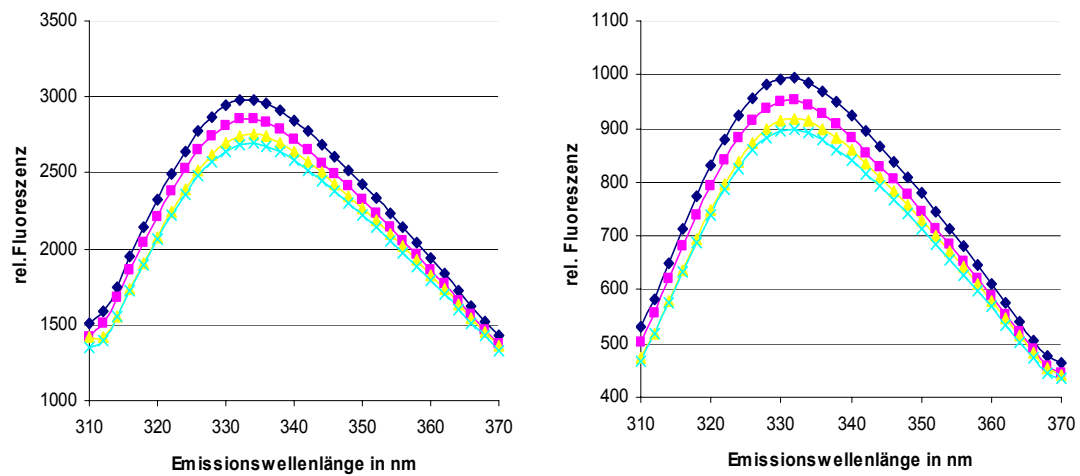
**Diagramm 4.12.2** Thermische Denaturierung von ArsR2 in Abhängigkeit der Salzkonzentration des gewählten Puffers. Gemessen wurde mittels Circular Dichroism Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 220 nm. ArsR2 (Oe5443) in einer Konzentration von 180  $\mu$ M in Puffer B (40 mM MgSO<sub>4</sub>, 13,5 mM KCl, 10 mM Na<sub>3</sub>Citrat 1 mM HEPES; pH 7,0) plus 3,75 M (rot), 2,5 M (türkis), 1,25 M (grün) und 0,625 M (blau) Natriumchlorid wurde hierzu in einem Temperaturgradienten (0,5°C/min) von 25°C bis 85°C denaturiert.

## 4.13 Interaktion von ArsR und ArsR2 mit den Metalloiden

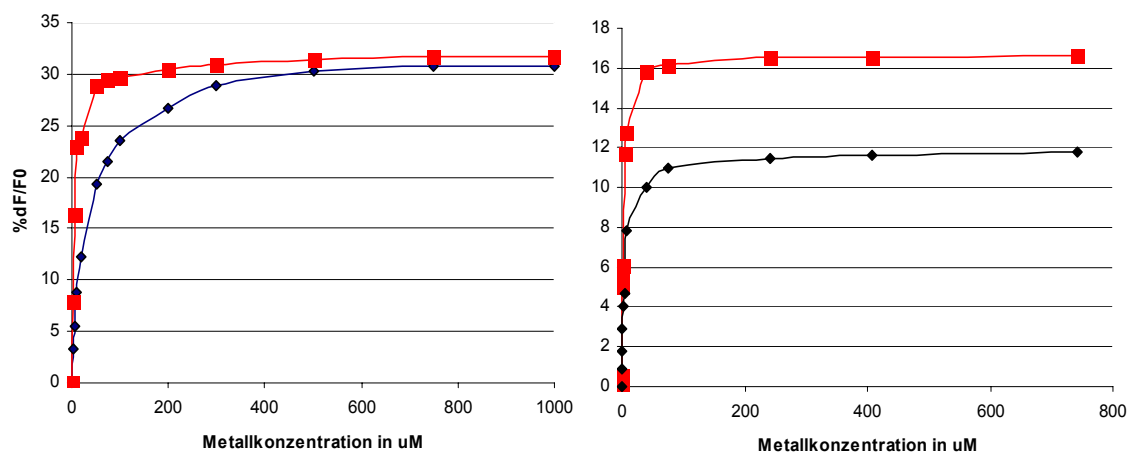
Zur Untersuchung von direkten Interaktionen der Induktormetalloide mit den Transkriptionsfaktoren ArsR und ArsR2 wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz herangezogen. Beide Proteine enthalten in ihrer Primärstruktur ein oder mehrere Tryptophane. Aromatische Aminosäuren absorbieren Licht im Wellenlängenbereich um 280 nm. Dabei werden delokalisierte  $\pi$ -Elektronen des aromatischen Rings in einen angeregten Zustand gehoben und geben bei Rückkehr in den Grundzustand Energie in Form von Fluoreszenz ab. Diese Fluoreszenz ist stark von der Umgebung der einzelnen aromatischen Aminosäure abhängig. Das Tryptophansignal, welches unter den aromatischen Aminosäure am stärksten zur Fluoreszenzemission beiträgt (siehe Tabelle 4.13.1) kann bei der gewählten

Anregungswellenlänge von 295 nm zusätzlich über Fluoreszenzresonanztransfer von anderen Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalanin-resten eines Polypeptides beeinflusst beziehungsweise verstärkt werden. Somit können sich Konformationsänderungen eines Proteins unmittelbar im emittierten Fluoreszenzsignal widerspiegeln. Gemessen wurde in dieser Arbeit die konzentrationsabhängige Bindung der Metalloide Arsenite und Antimonit an ArsR und ArsD.

**Diagramm 4.13.1** Tryptophanfluoreszenz-Emissionsspektren der Proteine ArsR2 (links) und



ArsR (rechts) in  $\frac{1}{2}$  x Basalsalzpuffer, aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge von 295nm (25°C). Interaktion mit Arsenit 0 (schwarz), 1 (rosa), 5 (gelb), 10 μM Arsenit (türkis).



**Diagramm 4.13.2** Interaktion der Transkriptionsfaktoren ArsR2 (links) und ArsR (rechts) mit den Metalloiden Arsenit (Kreise) und Antimonit (Quadrate) gemessen als Quenching der intrinsischen Tryptophanmessungen bei Emissionswellenlängen von 331nm (ArsR2) und 333nm (ArsR) und dargestellt als  $\%F-F_0/F_0$ .

Wie aus Diagramm 4.13.2 ersichtlich, zeigten beide Transkriptionsfaktoren eine Metalloid-abhängige Fluoreszenzlöschung („Quenching“), wobei beide Proteine mit höherer Affinität Antimonit binden. Die beobachteten Messungen zeigten im Falle von ArsR unterschiedliche und vom jeweiligen Metalloid abhängige Maxima der Tryptophan-Fluoreszenzlöschung. ArsR2 wurde in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  gemessen und zeigte halb-maximale Bindung bei 35  $\mu\text{M}$  für Arsenit und 5  $\mu\text{M}$  für Antimonit. ArsR, ebenfalls in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  erreichte halb-maximale Bindung bei 6  $\mu\text{M}$  für Arsenit und 2.5  $\mu\text{M}$  für Antimonit. Beide Transkriptionsfaktoren scheinen somit bevorzugt Antimonit aber auch Arsenit zu erkennen. Versuche Zink (II) als mögliches Effektormolekül zu verwenden zeigten erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen Fluoreszenzlöschung.

	<i>Zeit in nsec</i>	<i>Absorption</i>		<i>Fluoreszenz</i>	
		Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Quantum
Tryptophan	2.6	280 nm	5,600	348 nm	0.20
Tyrosine	3.6	274 nm	1,400	303 nm	0.14
Phenylalanine	6.4	257 nm	200	282 nm.	0.04

**Tabelle 4.13.1** Charakteristische Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin.

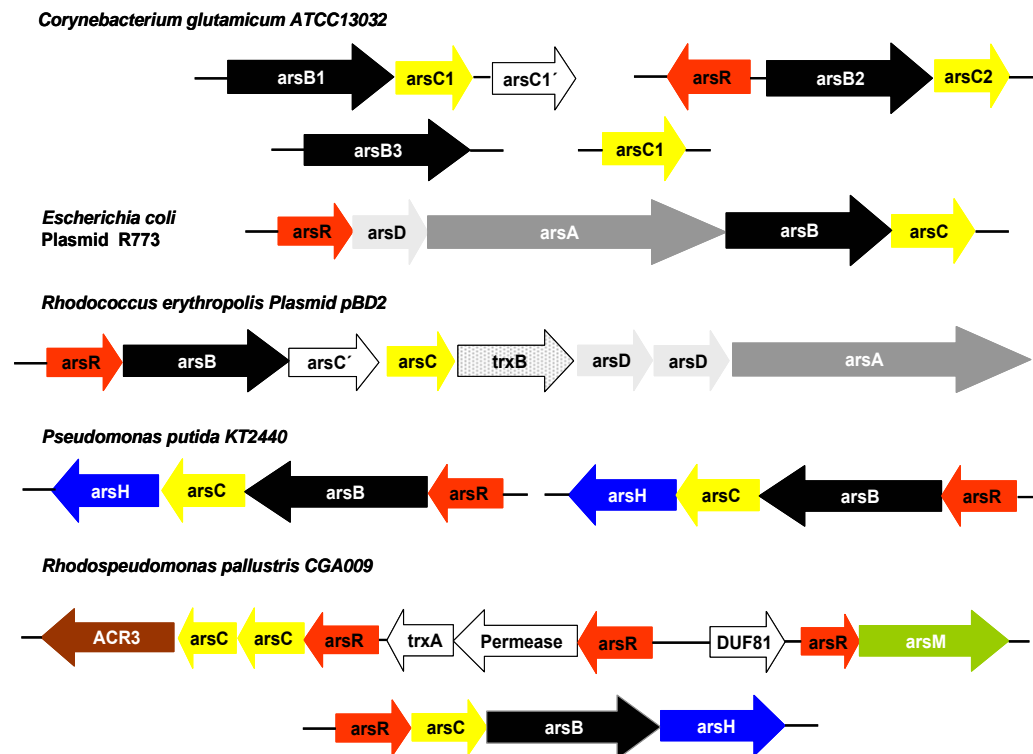
## 5 Diskussion

### 5.1 Diversität von Metalloidresistenzgenen

Mikroorganismen haben im Laufe der Evolution unterschiedliche Mechanismen der Resistenz gegenüber Metalloiden entwickelt und tolerieren unterschiedlich hohe Konzentrationen an Arsenverbindungen. *Corynebacterium glutamicum ATCC13032* beispielsweise wächst bei Konzentrationen von bis zu 12 mM  $\text{As}^{\text{III}}$  bzw.  $> 500 \text{ mM As}^{\text{V}}$  (Mateos et al 2006). Generell basiert der Mechanismus der Resistenz in der Arsenatreduktase-vermittelten Reduktion von  $\text{As}^{\text{V}}$  zu  $\text{As}^{\text{III}}$ , welches entweder durch passiven oder aktiven Transport aus der Zelle entfernt wird. Für den Export von Arsenit sind im Laufe der Evolution unterschiedliche Transportsysteme konvergent entstanden. So findet man in Bakterien vorwiegend ArsB oder die aktive Pumpe ArsAB, während in höheren Eukaryoten meist Multidrugexporter mit Glutathion komplexiertes  $\text{As}^{\text{III}}$  ausschleusen (Rosen 2002). Ganz anders verwenden viele Archaea oder Bakterien eine S-Adenosylmethionin-abhängige Arsenitmethyltransferase. Diese methyliert  $\text{As}^{\text{III}}$  zu Mono-, Di- und Trimethylarsin. Letzteres ist flüchtig und kann in Gasform aus der Zelle entweichen (Michalke et al. 2007).

Während die Arsenreduktion in vielen Bakterien (Messens & Silver 2006) aber auch in *Saccharomyces cerevisiae* (Mukhopadhyay et al. 2000) Glutathion/Glutaredoxin-abhängig ist, so bezieht sie beispielsweise in *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Li et al. 2007) oder *Streptomyces sp.* Stamm *FR-008* (Wang et al. 2006) ihre Reduktionsäquivalente über Thioredoxin und Thioredoxinreduktase. Diese Proteine werden von Genen kodiert, welche entweder mit den Arsenresistenzgenen in einem Operon lokalisiert sind, oder mit diesem gemeinsam als Regulon transkribiert werden. Neben den reinen Resistenzmechanismen findet man viele Mikroorganismen, welche Metalloide zur Energiegewinnung nutzen können. Eine wahrscheinlich sehr ursprüngliche Form der Adaptation an Arsen-reiche Habitate stellen Arsenit-oxidierende Bakterien dar. *Alcaligenes faecalis*, *Thermus thermophilus*, das grüne Schwefelbakterium *Chlorobium limicola* oder *Chloroflexus aurantiacus*, sind in der Lage chemolithotroph mit  $\text{As}^{\text{III}}$  als Elektronendonator bzw.  $\text{As}^{\text{V}}$  als Elektronenakzeptor zu wachsen (Stolz et al. 2006, Inskeep et al 2007). Andere Bakterien, wie *Chrysiogenes arsenatis* (Kraft & Marcy 1998), *Shewanella sp.* Stamm *ANA-3*

(Malarsan et al. 2007) oder *Bacillus selenitireducens* (Afkar et al. 2003) nutzen Arsenat als alternativen, terminalen Elektronenakzeptor der anoxygenen Atmung (Silver & Pung 2005). Erst kürzlich konnte für mikrobielle Matten aus dem kalifornischen „Monolake“, hauptsächlich bestehend aus *Ectothiorhodospira* und *Oscillatoria* Spezies, anoxigen phototrophes Wachstum mit Arsenit als Elektronendonator gezeigt werden (Kulp et al. 2008).



**Abbildung 5.1.1** Schematische Darstellung des Vorkommens von Arsenresistenzgenen und ihrer Operon-Organisation in mehreren bakteriellen Genomen. Offene Leserahmen sind als Pfeile dargestellt und nach Funktion beziehungsweise Homologie mit dem folgenden Farbcode markiert: Gene kodierend für Arsenatreduktase ArsC (gelb), Metalloidmethyltransferase ArsM (grün), Effluxtransporter ArsB (schwarz) bzw. ACR3 (braun), ATPase ArsA (grau), Thioredoxin TrxA2 sowie Thioredoxinreduktase TrxB/ArsT (weiß mit Punkten) und Transkriptionsfaktoren ArsR (rot) sowie ArsD (hellgrau). Bislang in ihrer Funktion nicht näher charakterisierte Komponenten aus Arsenresistenzoperons, mit Ausnahme der NADH:FMN-abhängigen Oxidoreduktase ArsH (blau) wurden in weiß dargestellt.

Wie aus Abbildung 5.1.1 ersichtlich findet man in einigen Organismen auch multiple Resistenzmechanismen oder aber mehrere Operons, welche Resistenzen kodieren. Einige zusätzliche Gene in diesen Operons bzw. deren Funktionen sind bislang nur ungenuegend charakterisiert. Wengleich bereits zwei Kristallstrukturen von ArsH aus *Sinorhizobium meliloti* (Ye et al. 2007) und *Shigella flexnerii* (Vorontsov II et al.

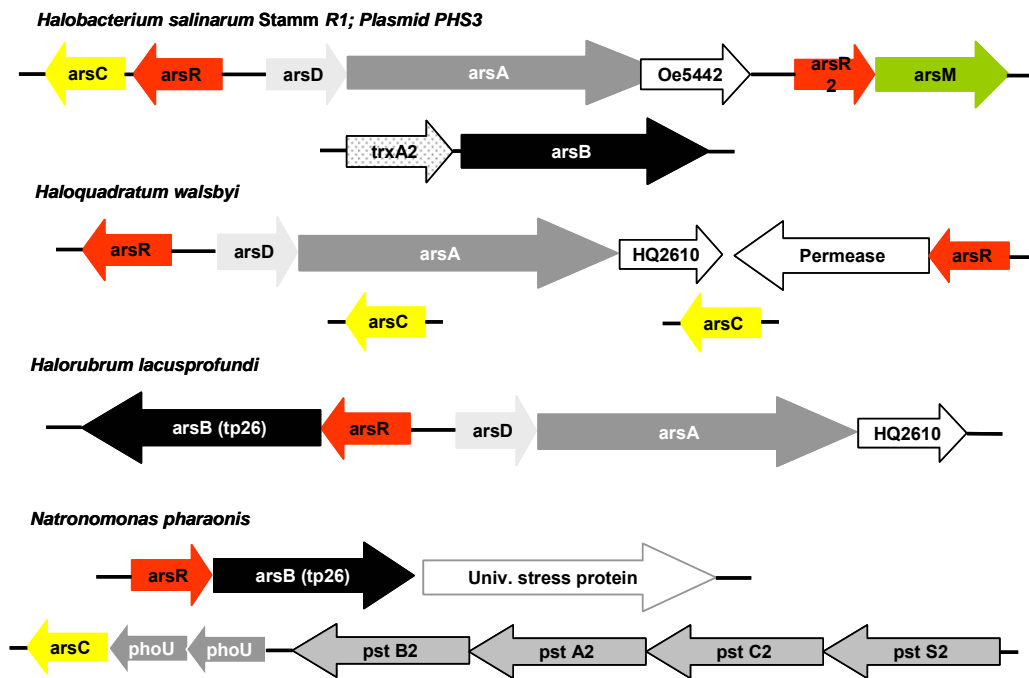
2007) veröffentlicht wurden, so ist die genaue Rolle dieses Proteins im Arsenresistenzverhalten noch ungeklärt. Mutationsstudien in mehreren Bakterien führten ebenfalls zu einem widersprüchlichen Ergebnis. So konnte beispielsweise für *Serratia marcescens* (Neyt et al. 1995) und *Sinorhizobium meliloti* (Yang et al. 2005) gezeigt werden, dass eine Deletion von *arsH* zum Verlust der Arsenresistenz führte, während dies für *Synechocystis PCC6803* (Lopez-Maury et al. 2003) und *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher et al. 2000) nicht zutraf.

## 5.2 Metalloidresistenzmechanismen in halophilen Archaea

Bei Betrachtung des Arsenresistenzgeninventars in vier sequenzierten Genomen halophiler Archaea zeigt sich erneut eine sehr hohe Variabilität an unterschiedlichen Resistenzmechanismen. In *Haloquadratum wasbyi* (Bolhuis et al. 2004, Bolhuis et al. 2006) und *Halorubrum lacusprofundi* (Gibson et al. 2005) findet man, in Analogie zur bakteriellen Arsen- und Antimon-Detoxifikation, Transporter, welche entweder aktiv, getrieben durch die ATPase ArsA, oder passiv dem Metalloidefflux dienen. Wie aus Abb. 5.1.2 ersichtlich besitzt *Halobacterium salinarum* anstatt eines Metalloid-spezifischen Transporters die SAM-abhängige Metalloid-Methyltransferase ArsM. Die ArsM-katalysierte Methylierungsreaktion konnte erstmals für das entsprechende Homolog aus *Rhodopseudomonas pallustris* (Qin et al. 2006) nachgewiesen werden. Für die *Halobacterium salinarum* Stämme *NRC-1* sowie *R1* konnte bislang lediglich ein indirekter Nachweis mittels Deletionsanalyse erbracht werden (Wang 1994, Schwarz unveröffentlicht).

Die Anordnung des *Natronomonas pharaonis arsC* in einem Gencluster mit den Phosphattransportgenen *pstB2*, *A2*, *C2*, *S2* und der für die Regulation der Phosphathomeostase bedeutsamen regulatorischen *phoU*-Gene. Die Tatsache, dass *phoU3* in *Halobacterium salinarum* bei  $\text{As}^{\text{III}}$ - bzw.  $\text{Sb}^{\text{III}}$ -Induktion immer signifikant negativ reguliert wird, könnte eine mögliche Vernetzung von Phosphat- und Arsenat-abhängigen Signaltransduktionswegen andeuten. Eine mittels der Computerprogramme PIGED und RSAT durchgeführte Genom-weite Suche nach weiteren ArsR-Konsensusbindestellen in Promotoren von *Halobacterium salinarum* erzielte keine signifikanten Treffer.





**Abbildung 5.1.2** Schematische Darstellung des Vorkommens von Arsenresistenzgenen und ihrer Operon-Organisation in vier halophilen Euryarchaea. Offene Leserahmen sind als Pfeile dargestellt und nach Funktion beziehungsweise Homologie farblich gestaltet. Gene kodierend für Arsenatreduktase ArsC (gelb), Metalloidmethyltransferase ArsM (grün), Effluxtransporter ArsB (schwarz) bzw. ACR3 (braun), ATPase ArsA (grau), Thioredoxin TrxA2 sowie Thioredoxinreduktase TrxB/ArsT (weiß mit Punkten) und Transkriptionsfaktoren ArsR (rot) sowie ArsD (hellgrau). Bislang in ihrer Funktion nicht näher charakterisierte Komponenten aus Arsenresistenzoperons, wie der NADH:FMN-abhängigen Oxidoreduktase ArsH (blau), einer vermeintliche Flavin-abhängigen Monooxygenase ArsO (rosa) und anderen wurden in weiß dargestellt.

## 5.3 Veränderungen der Genexpression bei Sb<sup>III</sup>-Stress

### 5.3.1 Spezifische Metalloid-induzierte Genexpression

In Archaea wurde die globale Auswirkung von Arsenstress bislang lediglich in einer Studie untersucht. Baker-Austin *et al.* (2006) beschrieben die As<sup>III</sup>-Stressantwort des Arsen-hypertoleranten, acidophilen Archaeons *Ferroplasma acidarmanus* *Fer1* mittels Proteom-analysen. Das zu 97% fertiggestellte Genom des Stammes *Fer1* enthält ein minimales Set an Arsenresistenzgenen: *arsR* und *arsB* (Giehring *et al.* 2003). Die Transkription von Arsenresistenzgenen wurde allerdings bereits in mehreren Prokaryoten (Rosenstein 1992, Cai DuBow 1996, Sato & Kobayashi 1998, Bucher & Rawlings 2002, Lopez-Maury 2003) und Eukaryoten untersucht und wird in allen beschriebenen Organismen spezifisch durch Arsenit und Antimonit induziert. In *Halobacterium salinarum* wird die Expression der Arsenresistenzgene *arsDA*-

*Oe5442* sowie *arsR2* und *arsM* spezifisch von Metalloiden der V Hauptgruppe (Arsen, Antimon und Bismuth) induziert. Die Genexpression der Arsenresistenzdeterminanten wird sehr schnell induziert und ist auf Transkriptionsebene bereits nach 5 min deutlich sichtbar. Der Regulator ArsR sowie die Arsenatreduktase ArsC werden konstitutiv exprimiert. Die Regulation eines Genproduktes kann einerseits auf Ebene der Transkription, andererseits auch posttranskriptionell, wie am Beispiel der Attenuation der Tryptophanbiosynthesegene in Bakterien (Babitzke 1997) bzw. diverser Antisense-RNA Mechanismen bekannt (Brantl 1997), oder während der Translation eingreifen (siehe RNA-Bindeproteine in der Regulation ribosomaler Proteine Piendl et al 2007). Mutationen der *arsD*-LeitRNA in *H. salinarum* zeigten keinen Effekt auf die Expression des Reporterproteins BgaH, was eine entscheidende Regulation auf Ebene der Translation ausschließt. Da die in Reporteranalysen gemessenen Expressionsmuster auch mittels Northern Blotting sowie quantitativer PCR bestätigt werden konnten, stellt die beobachtete Regulation sehr klar eine Transkriptionsregulation dar.

### 5.3.2 Allgemeine Antwort auf (oxidativen) Stress

Setzt man Halobakterien hohen Arsenit- bzw. Antimonitkonzentrationen über einen längeren Zeitraum aus oder streßt man Zellen unter Wachstums-limitierenden Bedingungen, so zeigt sich im Genom-weiten Transkriptionsprofil neben der spezifischen Regulation der As/Sb-Resistenzgene eine Induktion vieler Gene, welche gemeinsam als zelluläre Antwort auf oxidativen Stress betrachtet werden können. Anhand des Fehlens dieses Effekts in den ersten 60 min nach Expositionsbeginn kann geschlossen werden, dass diese Gene keiner direkten  $Sb^{III}$ ,  $As^{III}$  -abhängigen Kontrolle/Regulation unterliegen. Im folgenden soll auf die Bedeutung einiger stark regulierter Gene eingegangen werden. Lichtexposition, Radioaktivität, Schwermetalle und Redox-reaktive Agenzien (z.B. Paraquat) führen zu unvollständiger Reduktion von Sauerstoff während der oxygenen Respiration und können somit zur Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxidanion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $\cdot OH$ ) führen.

**Glutathion -Glutaredoxin –Thioredoxin:** Das Tripeptid Glutathion (GSH),  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin, ist das abundanteste Thiol in vielen Organismen. GSH liegt in der bakteriellen Zelle in Konzentrationen von 0,1 – 10 mM (Fahey &

Sundquist 1991), vor allem in seiner reduzierten Form GSH vor. Glutathion fungiert als Puffer des zellulären Redoxzustandes und schützt die Zelle somit. In Archaea oder beispielsweise den Actinomyceten konnte man bislang kein Glutathion nachweisen. *Halobacterium* produziert hingegen  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -Glu-Cys) und Thiosulfat (Newton & Javor 1985), während man in Actinomyceten und Mycobacterium das Cysteinderivat Mycothiol (1-D-Myoinosityl-2-(N-acetyl-cysteinyl)amido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid), kurz MSH, findet (Rawat & Av-Gay 2007). Die beobachtete sehr starke Induktion von Glutaredoxin, aber auch die positive Regulation eines Homologs der Glutathion-S-Transferase sowie von Thioredoxin, zeigen deutlich, dass unter Metalloidstress Glutaredoxin oder Thioredoxin als Elektronendonoren für Metallreduktasen und zur Pufferung des zellulären Redoxzustandes von Nöten sind. Im Gegensatz zu Thioredoxinen, welche NAD(P)H-abhängig von einer Thioredoxinreduktase reduziert werden, erfolgt die Regeneration von Glutaredoxin über Glutathion, welches wiederum von der Glutathionreduktase NAD(P)H-abhängig reduziert wird. Thioredoxin und Glutaredoxin besitzen darüberhinaus Chaperonfunktion und vermitteln eine redoxunabhängige Faltung beziehungsweise Rückfaltung von Proteinen (Berndt et al. 2008)

In keinem der durchgeführten Microarrayexperimente zum Metalloidstress konnte eine veränderte Expression der Superoxiddismutase oder der Katalase beobachtet werden. *H. salinarum* besitzt mehrere Wege auf oxidativen Stress zu reagieren. Beispielsweise weiß man, dass die Fe-Speicherfunktionen des Ferritin DpsA die Ausbildung toxischer Hydroxylradikale im Zuge der Fenton Reaktion vermindert (Yamamoto et al. 2002).

**NADH-Oxidase (yqjM, noxC):** Das fakultativ anaerobe Essigsäurebakterium *Streptococcus mutans* ist nicht zur HEME-Biosynthese befähigt und besitzt weder Cytochromoxidasen noch Katalase, aber auch kein Glutathion (Higuchi et al. 2000). Es verwendet stattdessen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bildende NADH-Oxidase nox-1 und die H<sub>2</sub>O-bildende NADH-Oxidase nox-2. Letztere katalysiert gemeinsam mit AphC die NADH-abhängige Reduktion von organischen Hydroperoxiden oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu den entsprechenden Alkoholen und/oder Wasser (Higuchi et al 1999). Die NADH-Oxidase schützt die Zelle somit vor oxidativem Stress, indem sie Sauerstoff zu Wasser reduziert. Neben der klassischen NADH-Oxidase- (EC1.6.99.3) katalysieren andere Vertreter der NADH-Oxidasefamilie eine NADH-Peroxidase- (EC 1.11.1.1) oder

Disulfidreduktaseaktivität (EC 1.8.1.14). Eine Metalloidinduktion der Expression einer NADH:FMN Oxidoreduktase wurde nicht nur in dieser Arbeit in *H. salinarum* sondern auch in *Ferroplasma acidarmanus Fer1* beobachtet (Baker-Austin et al. 2007). Trotz fehlender Homologie auf Ebene der Primärstruktur koennte das aus mindestens zwei Untereinheiten bestehende NADH-Oxidase Homolog in *H. salinarum* auf eine analoge Funktion zum bakteriellen ArsH hinweisen.

**Hsp31** ist ein Vertreter der DJ-1/PfpI (ThiJ/PfpI)-Familie, zu der auch die Cysteinprotease PfpI aus *Pyrococcus horikoshii* sowie YhbO, ThiJ (Mizote et al. 1999), SCR27a und YedU aus *E. coli* zählen. Während ThiJ als Kinase in der Thiaminbiosynthese fungiert, besitzt das *E. coli yedU*-Genprodukt (Sastry et al. 2002) Chaperon- und Aminopeptidaseaktivität und vermittelt als Homodimer eine Schutzfunktion in Stress- und Überdauerungsphasen (Mujacic & Baneyx 2006). Hsp31 in Hefe wird bei oxidativem Stress induziert (Skoneczna et al. 2007). Vom humanen hsp31-Homolog DJ-1 vermutet man ebenfalls eine durch oxidativen Stress aktivierte Chaperonfunktion. Mutationen in diesem Protein führen zum Parkinson Erkrankungsbild, einer  $\alpha$ -Synuclein Fibrillenbildung (Shendelman et al. 2004, Tairo et al. 2004, Moore et al. 2005). Eine konkrete Funktion in *H. salinarum* wurde bislang nicht beschrieben.

**Thermosome:** Das Thermosom, ein exklusiv archaeeles Chaperonin, welches strukturell dem bakteriellen GroEL homolog ist, wurde erstmals im hyperthermophilen *Pyrodictium ocellum* entdeckt. TriC (TCP-1 ring complex) oder CCT (chaperonin containing TCP-1) sind essentiell fuer die Faltung von Proteinen, vorwiegend des Cytoskeletts wie beispielsweise des Tubulin oder des Actin. Während das Thermosom in *Sulfolobus acidocaldarius*, *Pyrodictium ocellum*, *Thermococcus sp.* sowie *Haloferax volcanii* und *Halobacterium salinarum* in Analogie zum eukaryotischen TriC Komplex als Heterooligomer bestehend aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, findet man in *Pyrococcus sp.*, *Methanococcus janaschii*, *Methanopyrus kandlerii* und *Archaeoglobulus fulgidus* lediglich eine Untereinheit.

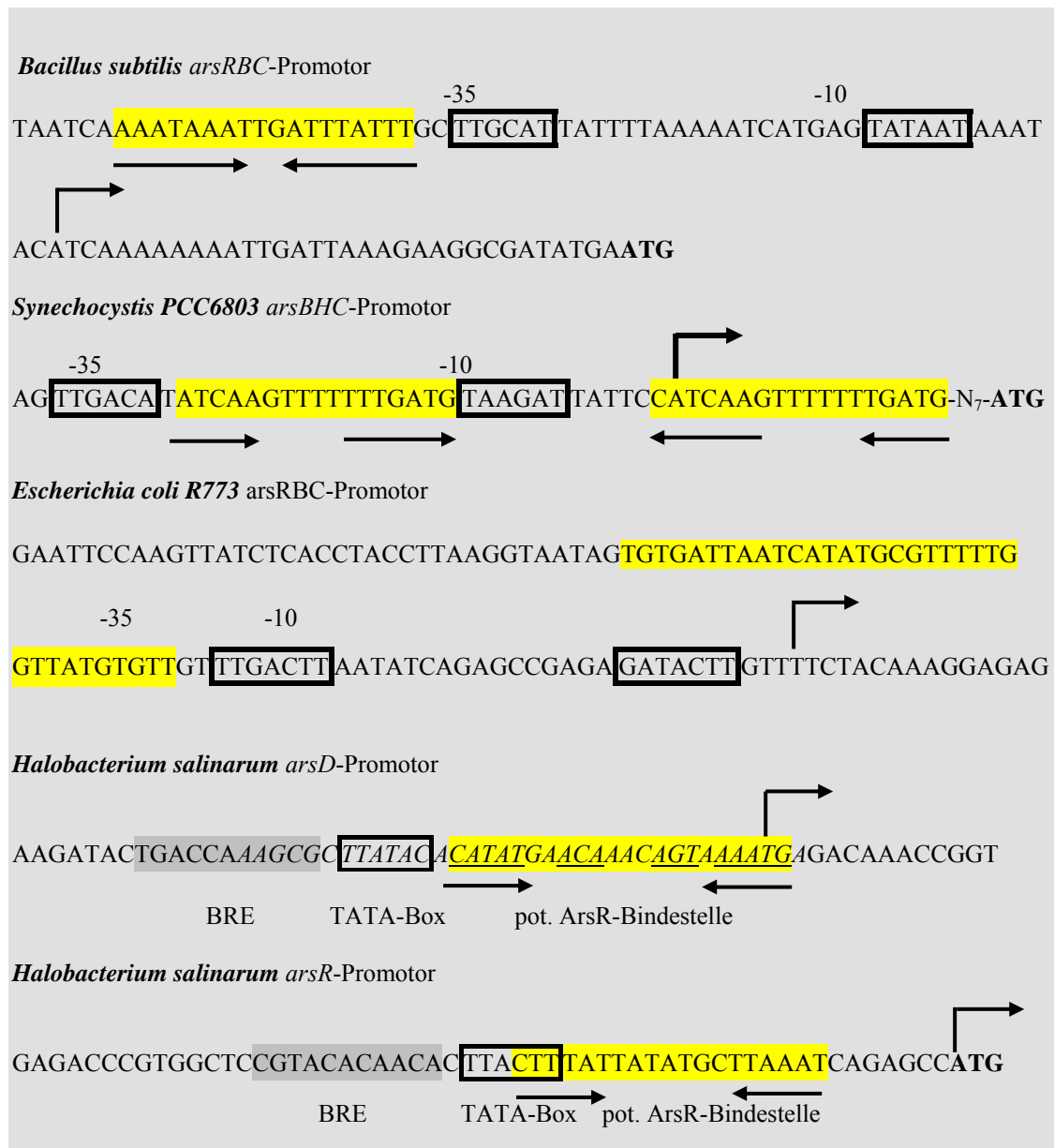
**Nicht-spezifische Induktion von Metallresistenzgenen:** Neben dem ars-Operon wurden in den durchgeführten Microarray Experimenten auch andere Gene mit Homologie zu Metallresistenzen durch  $As^{III}/Sb^{III}$  induziert. So zum Beispiel CadA, eine vermutete Cadmium/Zink ATPase, YvgX, eine dem Kupfertransport zugeschriebenen ATPase, sowie MerA, ein Homolog der Quecksilber Reduktase.

## 5.4 Transkriptionsinitiation und Charakterisierung der ArsR-Operatorelemente

Die Promotororganisation der Archaea unterscheidet sich deutlich von jener der Bakterien. Die Transkription in Archaea bedient sich einer RNA-Polymerase vom Typ der eukaryotischen Polymerase II. Mutationsanalysen in mehreren Archaea (Reiter et al. 1990, Hain et al. 1992, Palmers Daniels 1995, Danner and Soppa 1996) führten zur Identifizierung von drei essentiellen Promotorbereichen: der TATA-Box (-27 +/- 2), die DNA-Bindestelle fuer das TATA-Bindeprotein TBP, eine stromaufwaerts davon lokalisierte TFB-Bindestelle, das sogenannte BRE (TfIIB Recognition Element) sowie ein Initiatorelement um den Transkriptionsstart. Für halophile Archaea konnte ein TATA-Box Konsensusmotiv mit der Nukleinsäuresequenz 29- TTTWWW -24 erstellt werden (Soppa 1999).

Über die in dieser Arbeit ermittelten Transkriptionsstarts sowie der daraus ablesbaren Promotorkernelemente verdeutlicht sich eine sehr hohe Sequenzvariabilität sowohl der TATA-Boxen als auch des BRE-Elements. Dennoch findet man bei Vergleich von Promotorsequenzen bestimmter Gene in unterschiedlichen halophilen Archaea, wie am Beispiel der Arsenresistenzgene in Abbildung 4.5.2.2 veranschaulicht, eine sehr gute Konservierung beider Elemente. Dies läßt sich darin begründen, dass Halophile mehrere Kopien sowohl des TBP als auch des TFB besitzen.

Die in Abbildung 5.4.1 dargestellten Promotoren aus Arsenresistenzoperons in Bakterien zeigen, dass die ArsR-Operatorstelle in Bakterien, wie auch in Archaea immer in unmittelbarer Nähe zu den jeweiligen Elementen der basalen Transkription lokalisiert sind. Die Repression der Genexpression läßt sich somit über eine Behinderung der Anlagerung von basalen Transkriptionsfaktoren (TBP und TFB in Archaea, Sigma Faktoren in Bakterien) oder der RNA-Polymerase erklären. Alle ermittelten Transkriptionsstarts, mit Ausnahme der *arsD*, *tfbB* und *hsp5* Transkripte besitzen entweder keine oder sehr kurze (< 10 nt) Leit-RNAs. Eine klassische Regulation dieser Gene auf Translationsebene wird damit sehr unwahrscheinlich.

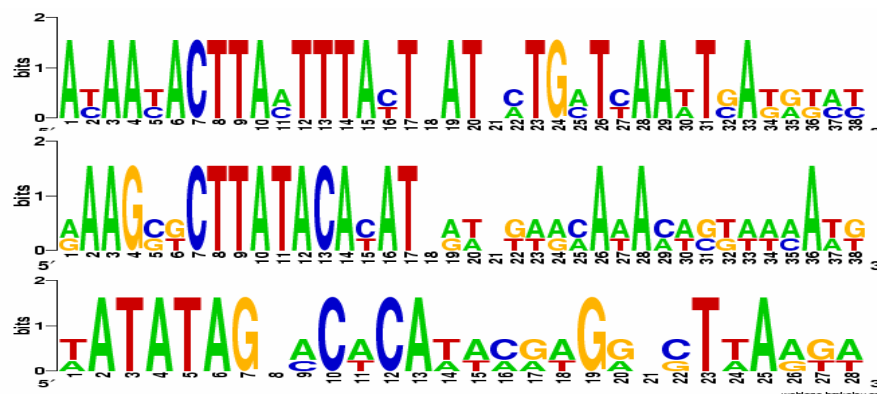


**Abbildung 5.4.1** Vergleich bakterieller *ars*-Promotoren sowie ArsR-DNA-Bindestellen mit den in dieser Arbeit gefundenen. Fett umramte Kästen zeigen -10 und -35 Promotorkernelemente, bzw die archaeale TATA-Box, grau markierte Bereiche die vermutete TFB-Bindestelle (BRE). Die ArsR-Bindestellen (gelb markiert; inverted repeats durch duenne Pfeile dargestellt) in *H. salinarum* wurden mittels Mutationsanalyse und *in vivo* Reporter-messungen ermittelt. Transkriptionsstarts werden durch dicke Pfeilen angezeigt Startnukleotid und Translationsstart sind in fetten Lettern dargestellt.

Welche Bedeutung hat dies aber für die Translation dieser mRNAs? In Bakterien erfolgt die Initiation der Translation durch die Wechselwirkung von 16 S rRNA mit einer komplementären Purin-reichen Sequenz im 5'-Bereich der mRNA (Kozak et al. 1989). Dieser Bereich, die ribosomale Bindestelle (RBS) ist auch als Shine Dalgarno

Sequenz (SD) bekannt, welche in *E. coli* zwischen 5 und 13 Basen stromaufwärts des Startcodons liegt (Shine Dalgarno et al. 1974). Viele archaeale Transkripte besitzen keine oder sehr kurze nicht translatierte Leit-RNA's (Torarinsson et al. 2005). Die Translation von mRNA's ohne 5'-Leitstrukturen benutzt einen anderen, bislang noch wenig charakterisierten Initiationsmechanismus (Tolstrup et al. 2000, Benelli et al. 2003). Für Leit-RNA-lose Transkripte in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass diese von einem Komplex aus 70S Ribosom, IF2 und Initiator-tRNA gebunden werden. Die Erkennung der mRNA scheint hier von einer Codon-Anticodon Wechselwirkung abhängig zu sein (Benelli 2003). Wenngleich die 5'-Enden archaealer mRNA's keine Cap-Strukturen (7-Methyl-G) besitzen, so könnte das Vorkommen mehrerer, zu eukaryotischen Translationselongationsfaktoren homologen Proteinen (eIF 1A, 2, 2B, 4A 5) auf einen bereits aus Eukaryoten bekannten Scanningmechanismus hinweisen (Dennis 1997, Bell & Jackson 1998).

Mit Ausnahme von *gvpA* und *gvpO* besitzen alle Transkripte der Gasvesikelgene *p-gvpDEFGHIJKLM* und *p-gvpACNO* aus *Halobacterium salinarum* PHH1 ein zum 3'-Ende der 16S rRNA komplementäres, vermeintliches Shine Dalgarno Motiv (Satorius-Neef & Pfeifer 2004). In diesen Arbeiten konnte mittels in-vivo Promotor/Reporteranalysen konnte gezeigt werden, dass eine Variation der Position des SD-Elementes zwischen -4, -7 und -10 Nukleotiden stromaufwärts des Translationsstarts nicht zu signifikanten Veränderungen der Reporterogenaktivität führte. Während Mutationen innerhalb des vermeintlichen SD-Motivs eine 5-50 %ige Reduktion bewirkten, so resultierte die vollständige Entfernung der 5'-mRNA-Leitstruktur in einer signifikant erhöhten Translationseffizienz.



**Abbildung 5.4.2** Konsensussequenzen für ArsR-Bindestellen der Promotoren *arsR* (oben) und *arsD* (mitte) aus *Halobacterium salinarum*, *Haloquadratum walsbyi* bzw. *arsRBC* aus *E. coli*

und *Staphylococcus aureus* (unten). Die Darstellungen der Sequenzmotive wurden mit dem Programm WebLogo erstellt.

Im Gegensatz zu *Sulfolobus solfataricus* (Condo et al. 1999) fanden Ring et al (2007) in *in vitro* Translationsexperimenten mittels Extrakten aus *Haloferax volcanii* eine vergleichbar effiziente Translation von mRNA's mit stark und schwach konservierten SD-Motiven oder vollkommen Leit-RNA-losen Transkripten und schlossen daraus, daß in halophilen Archaea zwei Mechanismen der Initiation mit ähnlicher Effizienz arbeiten.

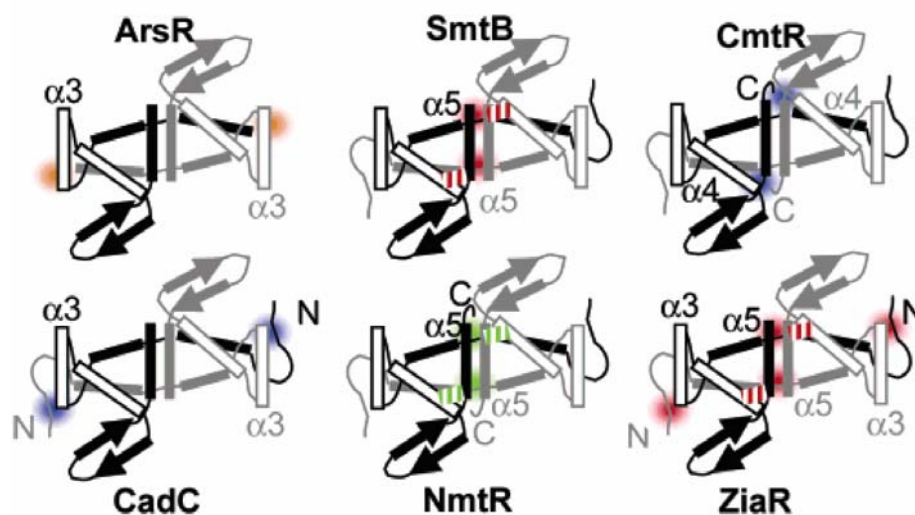
In dieser Arbeit konnte mittels *in vivo*- Analyse von Promotor/Reporterstämmen zwei *in cis* aktive Promotorelemente innerhalb der 5'-Regionen vor *arsR* bzw. *arsD* bestimmt werden, welche im Falle letzterer mit der Metalloid-abhängigen Induktion in Verbindung gebracht werden konnten. In Anbetracht der Expressionsmuster der beiden Transkripte *arsR* und *arsR2* kann geschlossen werden, dass der Regulator ArsR in erster Linie die basale Expression des Resistenzoperons steuert. Im nicht induzierten Zustand konnten Transkripte von *arsR*, nicht aber *arsR2* detektiert werden. Die ArsR-Bindestellen in den untersuchten Promotoren besitzen zwar immer inverted repeats, sind aber genauso, wie für bakterielle Vertreter der ArsR/SmtB beschrieben, in ihrer Sequenz, verglichen an Operatorsequenzen anderer Transkriptionsfaktoren, nur wenig konserviert. Abbildung 5.4.2 zeigt den Versuch, Konsensussequenzen für die Promotoren *arsR* und *arsD* aus zwei Haloarchaea zu generieren, und stellt dies einer ArsR-Konsensus-DNA-Bindestelle für *E.coli* und *Staphylococcus aureus* gegenüber.

## **5.5 *H. salinarum* ArsR und ArsR2, zwei Vertreter der ArsR/SmtB-Familie**

Metallabhängige Genregulation in Prokaryoten findet vorwiegend auf Ebene der Transkription statt. Man kennt bislang sieben sich in Struktur wie auch dem Wirkungsmechanismus unterscheidende Familien von Metall-abhängigen Transkriptionsregulatorproteinen, MerR, und ArsR/SmtB-, Fur/Zur, DtxR, CsoR, CopY und NikR. Für sechs dieser Proteinfamilien sind bereits eine oder mehrere Röntgenkristallstrukturen verfügbar (Arunkumar & Giedroc 2007). MerR-Transkriptionsfaktoren fungieren in Abwesenheit spezifischer Metallionen als Repressoren, in Anwesenheit des Effektormoleküls aber als Aktivatoren (Brown et al.



2003, Giederoc & Arunkumar 2007). Solche sind beispielsweise MerR (Shewchuk et al. 1989), ZntR (Outten et al. 1999) und CoaR (Rutherford et al. 1999) aus *E. coli* sowie *Synechocystis PCC6803*, CadR aus *Pseudomonas aeruginosa* (Brocklehurst et al. 2003) CueR (Outten et al. 2000), PbrR (Borremans et al. 2002), GolS (Checa et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde für Regulatoren der ArsR/SmtB-Familie: CsoR und CobY bislang ausschließlich Repressorfunktion beschrieben. Während in diesen Systemen die Metallbindung zur Derepression und somit zu einer Induktion der Zielgenexpression führt, wirken Fur, DtxR und NikR als Corepressoren, indem sie bei Bindung ihres Effektormoleküls die Transkription ihrer Zielgene reprimieren. Proteine der ArsR-Familie zeichnen sich generell durch eine  $\alpha\alpha\beta\beta$ -Sekundärstruktur aus, in welcher die  $\alpha 2$ -turn- $\alpha 3$ -Helix-Turn-Helix (HTH)-DNA-bindende Domäne für den Sequenz-spezifischen Kontakt mit der großen Furche des DNA-Operators verantwortlich ist.



**Abbildung 5.5.1** Sekundärstrukturmodelle für einige bekannte Vertreter der ArsR/SmtB-Familie und deren Metallkoordinationszentren (als rote bzw. blaue Kreise dargestellt).

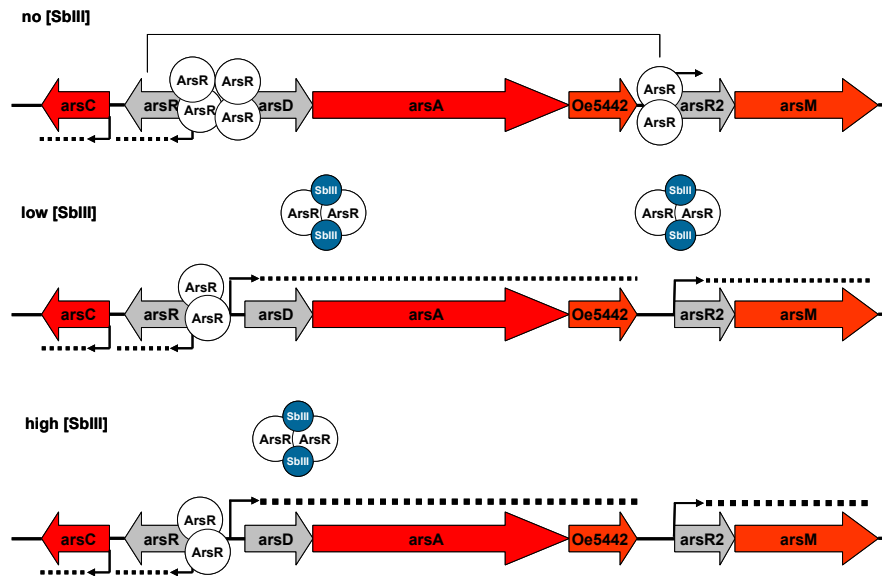
ArsR/SmtB-Transkriptionsfaktoren stellen betreffend ihres Effektorspektrums eine sehr heterogene Rezeptorgruppe dar, welche zusammengefaßt die Kontrolle der zellulären Antwort auf ein breites Spektrum an Metallionen abdeckt. Diese Heterogenität an Induktormetallen begründet sich im Vorkommen von drei strukturell voneinander getrennten Metallrezeptorstellen. Diese wurden entsprechend ihrer metallo-sensorischen Sekundärstrukturelemente als  $\alpha 3N/\alpha 3$  (Metallbindestelle 1 in *S. aureus pI258* CadC),  $\alpha 4C$  und  $\alpha 5$  (Metallbindestelle 2 in *S. aureus pI258* CadC) benannt (Giederoc & Arunkumar 2007).

Im Falle der halophilen Vertreter der ArsR/SmtB-Gruppe von Transkriptionsfaktoren fällt sofort auf, dass diese am N-Terminus zwei zusätzliche Cysteinreste tragen (siehe 4.9), welche nicht dem typischerweise in Bakterien oder Archaea vorkommenden ArsR entsprechen. Aus einem Homolog in *Corynebacterium glutamicum*, welches ebenfalls zwei benachbarte Cysteine in der N-terminalen  $\alpha$ 0 Helix trägt, weiß man, dass dieses As<sup>III</sup> in trigonaler Koordination von drei Cysteinen bindet.. ArsR2 aus *H. salinarum* besitzt darüberhinaus Aminosäure-substitutionen (Glu<sub>57</sub> > Gly, Leu<sub>58</sub> > Val) im ansonsten sehr hoch konservierten Metallbindungsmotif ELCVC(D/E) der  $\alpha$ 3N-Domaene. Eindeutige Aussagen zum Metalloid-Bindungsmechanismus der beiden ArsR-Transkriptionsfaktoren können allerdings ohne weitere Mutationsanalyse nicht gemacht werden.

## 5.6 Modell zur Metalloid-abhängigen Regulation

Konträr zu den von Wang *et al.* (1994) veröffentlichten Ergebnissen zur Transkriptionsinduktion des Arsenresistenzoperons in *Halobacterium NRC-1* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *Halobacterium salinarum R1* *arsR* nur geringfügig reguliert wird, während *arsR2* As<sup>III</sup> / Sb<sup>III</sup>-abhängig induziert wird. ArsR übernimmt somit die Kontrolle der basalen Transkription des Operons und initiiert die Expression von *arsDA-Oe5442* und *arsR2-M*. Den As<sup>III</sup>/Sb<sup>III</sup>-Induktionsmustern im Zeitexperiment zu Folge ist anzunehmen, daß ArsR2 keinen Einfluss auf die Genexpression von *arsR* oder *arsDA-Oe5442* besitzt. Eine direkte Korrelation des *arsR2*-Induktionsverlaufes besteht nur mit *arsM*.

Obwohl mittels RT-PCR ein dicistronisches Transkript für *arsR2M* detektiert wurde, konnte mittels Sonden gegen *arsR2* bzw. *arsM* im Northernblot nur die monocistronische Form nachgewiesen werden. Die gemessene Länge der *arsM* mRNA zeigte eine signifikante Abweichung von der theoretisch (laut Annotation) erwarteten und könnte auf einen internen Transkriptionsstart stromaufwärts von *arsM*, also innerhalb des *arsR2*-Leserahmens hindeuten. Wenngleich eine spezifische DNA-Bindung der Regulatoren hier nicht gezeigt werden konnte, so können anhand der Transkriptionsprofile sowie mithilfe der Promotormutationsanalysen beide Transkriptionsfaktoren als Repressorproteine deklariert werden. ArsR, als einziger, im nicht induzierten Zustand exprimierter Regulator, interagiert mit dem *arsD*- und wahrscheinlich auch mit dem *arsR*-, sowie dem *arsR2*- Promotor.



**Abbildung 5.6.1** Hypothetisches Modell zur Regulation des Arsenresistenzoperons in *Halobacterium salinarum* Stamm R1. Transkriptionsstarts sind durch Pfeile markiert, Transkripte und deren Abundanzen sind in Form von strichlierten Linien unterschiedlicher Dicke, entsprechend der jeweiligen Transkriptionsstärke, eingezeichnet.

ArsR übernimmt in erster Linie die Metalloid-abhängige Kontrolle der basalen Transkription. Eine von Chen & Rosen (2001) für ArsD in *E.coli* gezeigte Arsenit-abhängige DNA-Bindung konnte in dieser Arbeit für *H. salinarum* nicht gezeigt werden. Die mittels Echtzeit-RT-PCR ermittelten Expressionsmuster für *arsA-5442* im Zeitexperiment lassen aber eine Corepressorfunktion, oder, in Anlehnung an die Regulation der Quecksilberresistenz in *Ralstonia metallidurans* (Champier et al. 2004), eine mit dem Repressor ArsR auf Proteinebene interagierende Modulatorfunktion von ArsD vermuten (MerR-MerD im Falle des Beispiels aus *R. metallidurans*). ArsR2 zeigt, wie auch ArsR, AsIII- und SbIII-Bindung und ermöglicht somit eine Feineinstellung der Expression von *arsM*. Auch in anderen Organismen zeigt sich, daß, bei Vorkommen von multiplen Resistenzoperons, Gene für Arseniteffluxmembranproteine (*arsB*, *acr*) aber auch anderer Resistenz-determinanten selten ohne assoziiertes *arsR* zu finden sind.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Deutsche Version

*Halobacterium salinarum* zeigt sehr hohe Toleranz gegenüber Metalloiden. Die Gene, welche fuer dieses Resistenzverhalten gegenüber Arsen, Antimon und Bismut verantwortlich sind wurden erstmals von Wang et al. (2004) im Stamm NRC1 charakterisiert. Der Stamm R1 besitzt ebenfalls ein Plasmid (PHS3)-kodiertes Arsenresistenzgencluster (*arsRC*, *arsDA-Oe5442*, *arsR2M*). In Abwesenheit von Metalloiden unterliegen die *ars*-Strukturgene einer sehr strikten Kontrolle und werden nur in Anwesenheit von Metalloiden, nicht aber in deren Abwesenheit exprimiert. Unter Metalloidstressbedingungen werden die Transkripte fuer *arsDA-Oe5442* und *arsR<sub>2</sub>M* konzentrationsabhaengig induziert. Die Stärke der Transkriptionsinduktion steigt in folgender Reihenfolge:  $\text{Bi}^{\text{III}} > \text{As}^{\text{III}} > \text{Sb}^{\text{III}}$ .

Um einen vollständigen Ueberblick der an der Arsenresistenz beteiligten Gene sowie der globalen Auswirkungen auf *Halobacterium* zu erhalten wurden Transkriptomanalysen mittels selbst hergestellter DNA-Microarrays (Twellmeyer et al. 2007) hergedurchgefuehrt. Unter  $\text{As}^{\text{III}}/\text{Sb}^{\text{III}}$ -Stress zeigte sich einerseits eine schnelle Induktion von Arsenresistenzgenen, andererseits ein Ansteigen der Expression von Genen der (oxidativen) Stressantwort.

Um einen näheren Einblick in die Promotororganisation und Regulation zu gewinnen, wurden in einem ersten Schritt die 5-Enden der Transkripte *arsR* und *arsD* in *Halobacterium salinarum* und *Haloquadratum wasbyi* sowie von *arsC* und *arsR2* in *H. salinarum* bestimmt. Die Transkripte der Arsenresistenzgene zeigten fast ausschließlich keine oder sehr kurze (wenige Nucleotide lange) nichttranslatierte Leit-RNA-Strukturen. Im Gegensatz dazu besitzt *arsD* sowohl in *H. salinarum* wie auch in *H. walsbyi* eine ca. 80 bp lange nichttranslatierte Leit-RNA. Scanning Mutagenese dieser Regionen zeigten allerdings eindeutig, dass diese Leit-RNA nicht für die Transkriptionsregulation verantwortlich ist. Weitere Charakterisierung der Promotoren *arsD* und *arsR* mittels sequentieller Deletion und Mutagenese führten zur Identifizierung von Repressorbindestellen im Bereich zwischen Transkriptionsstart und TATA-Box (teilweise ueberlappend mit diesen). Eine in Reporter-messungen von Mutanten des *arsR*-Promotors beobachtete Derepression der Arsenit-abhaengigen

Induktion zeigt eindeutig, dass es sich bei dieser Operatorstelle um eine ArsR-Bindestelle handelt. Für den *arsR*-Promotor konnte zwar eine Derepression, nicht aber ein Unterschied im Induktionsverhalten nachgewiesen werden. Zusammen mit den Transkriptionsmessungen deutet dies auf eine mögliche Autoregulation von ArsR hin.

Um die beiden Regulatorproteine ArsR und ArsR2 auch *in vitro* charakterisieren zu können, wurden diese heterolog in *E.coli* exprimiert, mittels denaturierender Affinitätschromatographie gereinigt und rückgefalten. Dabei zeigten sich sowohl Faltung als auch Aktivität beider Proteine als salzabhängig. In SDS-PAGE- als auch in Gelfiltrationsläufen konnten sowohl Mono- als auch Dimere nachgewiesen werden. Mittels Tryptophanfluoreszenz konnte für beide Proteine As<sup>III</sup>/Sb<sup>III</sup>-Bindung (mit Präferenz für Antimon) gezeigt werden.

## 6.2 Summary

*Halobacterium salinarum* shows significant tolerance to metalloids. The mechanism conferring this tolerance to Arsenic, Antimony and Bismut relies on plasmid encoded resistance determinants, which have been characterized by Wang et al. (2004). *H. salinarum* strain *RI* arsenic resistance operon structural genes were shown to be tightly repressed in the absence of metalloids, but were specifically activated in their presence. Upon metalloid- exposure *arsDA-Oe5442* as well as *arsR<sub>2M</sub>* transcripts were induced in a concentration-dependent manner. The strength of induction decreased in the given order Sb<sup>III</sup> > As<sup>III</sup> > Bi<sup>III</sup>. Global expression profiling using whole genome DNA-microarrays found a fast responding induction of arsenic resistance genes and slowly rising oxidative- as well as general stress response genes. Expression of the latter could only be observed after long term exposure or when very high concentrations were applied.

To gain closer insight into the promoter organization and generate prerequisites for the analysis of regulatory sites, we have mapped the transcriptional start sites (tsp's) of the genes *arsR* and *arsD* from *Halobacterium salinarum* and *Haloquadratum wasbyi* as well as *arsC* and *arsR2* among others in *H. salinarum*. Transcripts of arsenic resistance genes proved to be almost exclusively leaderless, mostly consisting of mRNAs which start a few nucleotides upstream of the translational initiation site or directly overlap with the latter. Only the *arsD*-transcripts in *Halobacterium salinarum*

as well as *Haloquadratum walsbyi* were found to have nontranslated mRNA-leader sequences of around 80 nucleotides in length. Nevertheless these leader sequences are not involved in the transcriptional regulation as could be observed by scanning mutagenesis of this specific region. On the other hand mutational and deletion analysis revealed potential repressor-DNA-binding sites in the promoters of *arsR* as well as *arsD* as demonstrated by  $\beta$ -galactosidase reporter studies. Stepwise deletion of the *arsR* and *arsD* promoter 5'-ends was used to delimit the essential promoter core elements within a region of approximately 60 bp upstream the *tsp*. Subsequent mutational analysis of selected regions inside the *arsD* promoter led to the discovery of a repressor DNA-binding site. The metalloid induced upregulation, which was observed in *arsD(WT)*-, was absent or significantly reduced in mutant promoters, which clearly indicates a repressor action of ArsR in the absence of inducer. Although significant derepression (max. 8-fold) could also be observed for selected mutations in the *arsR* core promoter region, no metalloid dependence was detected. Considering these results in conjunction with a weak and temporary or non significant stimulation of *arsR* transcription, we propose that ArsR might act as an autoregulator of its own transcription. For further in vitro characterization of ArsR and ArsR2 we used recombinantly expressed and refolded His-tagged proteins. Folding and activity proved to be dependent on high salt conditions as could be shown via circular dichroism spectroscopy. Both ArsR/SmtB-type transcriptional regulators present in *H. salinarum* formed monomers and dimers in SDS-PAGE as well as gel filtration runs. Using tryptophane fluorescence quenching As<sup>III</sup>/Sb<sup>III</sup>- binding (with a preference for Sb<sup>III</sup>) could be demonstrated for both proteins.

## 7 Danksagung

Voran möchte ich Herrn Prof. Dieter Oesterhelt für die Ermöglichung einer Doktorarbeit in seiner Gruppe und deren Betreuung danken. Besonderer Dank gilt ebenfalls Jens Twellmeyer und Andy Wende dafür, die wesentlichen Vorarbeiten bei der Entwicklung und Etablierung der *Halobacterium*-Microarrays geleistet zu haben, Mattias Koch für sein ROT-BLAU-Screening, Dr. Frank Siedler, Beatrix Scheffer und Sigrid Bauer für die Durchführung von MS- und Kiki Weihrauch, Karin Rodewald, Peter Palm und Snezan Marinkovic für DNA-Sequenzanalysen. Prof. Luis Moroder möchte ich für das Angebot danken, CD-Spektroskopie und Fluoreszenz in seinen Laboratorien messen zu dürfen, Elisabeth Weyher-Stingl für kompetente Einweisung in diese sowie ihre permanente Hilfestellung.

Dank gilt auch Andreas Brachmann (Institut fuer Genetik, LMU Muenchen) für die Fragmentlängenbestimmung und die kostenlose Ausleihe der dazu erforderlichen Software, Friedhelm Pfeiffer, dem „Papa“ der Datenbank „Halolex“ (<http://www.halolex.mpg.de/>) sowie seiner Bioinformatikgefolgschaft für die Benutzung dieser, Rita Schwaiger für die mir so unliebsame Auswertung von Microarraydaten sowie Birgitte Kessler und Bettina Brustmann fuer viele kleine Tipps und Kniffe sowie die Aufrechterhaltung eines guten Laborstandards. Kosta Konstantinidis, Andy Wende und Rita Schwaiger sowie den Praktikanten Verena Loleit, Christian Duevelmeyer und Roy Evenstein danke ich fuer eine sehr nette Zusammenarbeit. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Martin Grininger für die Korrektur dieser Doktorarbeit bedanken.

Abschliessend verneige ich mich ehrfürchtig vor der Schöpfung, welche unser (liebes) Haustier im purpurnen Mantel geschaffen und mit solch außergewöhnlichen, in der Laborpraxis des öfteren äußerst unliebsamen, aber dennoch spannenden Eigenschaften ausgestattet hat.

## 8 Literaturverzeichnis

Afkar E, Lisak J, Saltikov C, Basu P, Oremland RS, Stolz JF (2003) "The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10" *FEMS Microb. Lett.* Vol 226; S. 107-112

Ahn, T, Yim S-J, Sung-Kun Yim, Choi H-I and Chul-Ho Yun (2001) Polyacrylamide Gel Electrophoresis without a Stacking Gel: Use of Amino Acids as Electrolytes" Vol. 291, S.300-303

Aiyar A, Xiang Y, Leis J (1996) "Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR" *Methods Mol.Biol.* Vol. 57: S. 177-191

Andersson AF, Lundgren M, Eriksson S, Rosenlund M, Bernander R, Nilsson P (2006) "Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*" *Genom Biol.* Vol. 7; R99

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Stuhl K (2001) *Current protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York

Babitzke P (1997) „Regulation of tryptophan biosynthesis: Trp-ing the TRAP or how *Bacillus subtilis* reinvented the wheel" *Mol. Microb.* Vol. 26; S. 1-9

Baker-Austin C, Dopson M, Wexler M, Sawers RG, Stemmler A, Rosen BP, Bond PL (2006) "Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* *FerI*" *Extremophiles*

Baliga NS, Dassarma S.(2000) "Saturation mutagenesis of the haloarchaeal bop gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity." *Mol. Microb.* Vol. 36; S. 1175-1183

Baliga NS, Kennedy SP, Ng WV, Hood L, DasSarma S. (2001) "Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon." *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* Vol. 98; S. 2521-2525

Baliga NS, Pan M, Goo YA, Yi EC, Goodlett DR, Dimitrov K, Shannon P, Aebersold R, Ng WV, Hood L (2002) „Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium sp.* analyzed by a global systems approach." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* Vol. 99; S. 14913-14918

Bartlett MS (2005) „Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase." *Curr.Opin.Microb.* Vol. 8; S. 677-684

Bell SD, Cairns SS, Robson RL, Jackson SP (1999) "Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro." *Mol.Cell* Vol. 4; S. 971-982

Bell SD, Jackson SP. (2000) "Mechanism of Autoregulation by an Archaeal Transcriptional Repressor" *J. Biol. Chem.* Vol. 275, S. 31624-31629

Benelli D, Maoni E, Londei P (2003) „Two different mechanisms form RNA/ribosome interaction in archaeal translation initiation" *Mol. Microb.* Vol. 50; S. 635-643

Bennett MS, Guan Z, Laurberg M, Su X-D (2001) „*Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases." *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* Vol. 98; S. 13577-13582

Bentley R, Chasteen TG (1992) "Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony, and Bismuth" *Microb.Mol.Biol.Reviews* Vol. 66; S. 250-272

Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, Lin-Chao S, Cohen SN (2002) "Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays" *Proc.Natl.Acad.Sci* Vol. 99; S. 9697-9702



- Bisle B, Schmidt A, Scheibe B, Klein C, Tebbe A, Kellermann J, Siedler F, Pfeiffer F, Lottspeich F, Oesterhelt D (2006) „Quantitative profiling of the membrane proteome in a halophilic archaeon” *Mol. Cell Proteomics* Vol. 5; S. 1543-1558
- Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, Goffeau A, Ulaszewski S. (1997) „Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Yeast* Vol. 13; 819-828
- Bolhuis H, Poole EM, Rodriguez-Valera F (2004) “Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon” *Environ. Microbiol.* Vol. 6, S. 1287-1291
- Bolhuis H, Palm P, Wende A, Falb M, Rampp M, Rodriguez-Valera F, Pfeiffer F, Oesterhelt D (2006) “The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi* : life at the limits of water activity” *BMC Genomics* Vol. 4; S. 169
- Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL, van Der Lelie D (2001) „Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34” *J Bacteriol.* Vol. 183; S. 5651-5658
- Brinkman AB, Bell SD, Lebbink RJ, de Vos WM, van der Oost J (2002)“ The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability.” *J.Biol.Chem.* Vol 277; S. 29537-29549
- Brocklehurst KR, Megit SJ, Morby AP (2003) “ Characterisation of CadR from *Pseudomonas aeruginosa*: a Cd(II)-responsive MerR homologue” *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 308; S. 234-239
- Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL (2003) „The MerR family of transcriptional regulators” *FEMS Microb. Reviews* Vol. 27; S. 145-163
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005) „Quantitative real-time RT-PCR-a perspective“ *J. Mol. Endocrinol.* Vol. 34, S. 597-601
- Cai J, DuBow MS (1996) “Expression of the *Escherichia coli* chromosomal ars operon” *Canadian J. Microbiol.* Vol. 42; S. 662-671
- Callen BP (2004) „Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter“ *Mol. Cell* Vol. 14; S. 647-656
- Champier L, Duarte V, Michaud-Soret I, Coves J (2004) “Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: A possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon” *Mol. Microb.* Vol. 52; S. 1475-1485
- Che D, Jensen S, Cai L, Liu JS (2005) „BEST: binding-site estimation suite of tools” *Bioinformatics* Vol. 21; S. 2909-2911
- Chen Y, Rosen BP (1997) „Metalloregulatory properties of the ArsD repressor.” *J.Biol. Chem.* Vol. 272 ; S. 14257-14262
- Chen Y, Rosen BP (2001) “Role of vicinal cysteine pairs in metalloid sensing by the ArsD As(III)-responsive repressor.” *Mol.Microb.* Vol.41; S. 687-696
- Cohen-Kupiec R, Blank C, Leigh JA (1997) „Transcriptional regulation in Archaea: in vivo demonstration of a repressor binding site in a methanogen.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* Vol.94, S. 1316-1320
- Coker JA, Dassarma S (2007) „Genetic and transcriptomic analysis of transcription factor genes in the model halophilic Archaeon: coordinate action of TbpD and TfbA” *BMC Genetics* Vo. 8; in Druck

- Cook WJ, Kar SR, Taylor KB, Hall LM (1998) „Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins” J. Mol. Biol. Vol. 275; S. 337-342
- Creelius EA (1977) “Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man” Environ.Health Perspect. Vol.19; S. 147-150
- Danner S, Soppa J (1996) “Characterization of the distal promoter element of halobacteria in vivo using saturation mutagenesis” Mol. Microbiol. Vol. 19: S. 1265-1276
- Dennis PP (1997) “Ancient ciphers: Translation in Archaea” Cell Vol. 89; S.1007-1010
- Dinger ME, Baillie GJ, Musgrave DM (2000) “Growth phase-dependent expression and degradation of histones in the thermophilic archaeon *Thermococcus zilligii*” Mol Microbiol Vol. 36; S. 876–885.
- Ettema TJ, Brinkman AB, Lamers PP, Kornet NG, de Vos WM, van der Oost J. (2006) „Molecular characterization of a conserved archaeal copper resistance (cop) gene cluster and its copper-responsive regulator in *Sulfolobus solfataricus* P2.” Microbiology Vol. 152; S. 1969-1979
- Facciotti MT, Reiss DJ, Pan M, Kaur A, Vuthoori M, Bonneau R, Shannon P, Srivastava A, Donohoe SM, Hood LE, Baliga NS (2007) “General transcription factor specified global gene regulation in archaea” Proc.Natl.Acad.Sci Vol. 104; S. 4630-4635
- Fahey RC, Sundquist AR (1991) „Evolution of glutathione metabolism“ Adv.Enzymol. Relat. Areas Mol.Biol. Vol. 64; 1-53
- Fahey RC (2001) “NOVEL THIOLS OF PROKARYOTES” Annual Review Microb. Vol. 55; S. 333-356
- Falb M, Aivaliotis M, Garcia-Rizo C, Bisle B, Tebbe A, Klein C, Konstantinidis K, Siedler F, Pfeiffer F, Oesterhelt D (2006) “Archaeal N-terminal protein maturation commonly involves N-terminal acetylation: a large-scale proteomics survey” J.Mol.Biol. Vol 262; S. 915-924
- Fernandes AP, Holmgren A (2004) „Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system” Antioxid Redox Signal Vol. 6; S.63-74
- Forbes AJ, Patrie SM, Taylor GK, Kim YB, Jiang L, Kelleher NL (2004) “Targeted analysis and discovery of posttranslational modifications in proteins from methanogenic archaea by top-down MS” Proc Natl Acad Sci USA Vol. 101; S. 2678–2683
- French SL, Santangelo TJ, Beyer AL, Reeve JN (2007) “Transcription and translation are coupled in Archaea” Mol. Biol. Evolut. Vol. 24; S. 893-895
- Geiser M, Cebe R, Drewello D, Schmitz R (2001) ”Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA Ligase” Biotechniques Vol. 31; S. 88-92
- Gelfand MS, Koonin EV, Mironov AA (2000) “Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach.” Nucleic Acids Res. Vol. 28; S. 695-705
- Ghosh M, Shen J, Rosen BP (1999) “Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*” Proc.Natl.Acad.Sci. USA Vol. 96; S. 5001-5006
- Gibson JA, Miller MR, Davies NW, Neill GP, Nichols DS, Volkman JK (2005) “Unsaturated diether lipids in the psychrotrophic archaeon *Halorubrum lacusprofundi*” Sys. Applied Microbiol. Vol. 28; S. 19-26
- Giedroc DP, Arunkumar AI (2007) „Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches” Dalton Trans. Vol. 7; S. 3107-3120

- Gmelin L. (1839) "Warnung vor gewissen grünen Tapeten und Anstrichen" *Karlsruher Z.* Nov. 24; suppl.326
- Gosio B (1892) „Action of microphytes on solid compounds of arsenic: a recapitulation“ *Science* Vol. 19; S. 104-106
- Hain J, Reiter W-D, Hüdepohl U, Zillig W (1992) "Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis" *Nucleic Acids Res.* Vol. 20; S. 5423-5428
- Hall, T.A. (1999) "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" *Nucl. Acids. Symp. Ser.* Vol. 41; S. 95-98.
- Hansen JM, Zhang H, Jones DP (2006) "Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions" *Free Radical Biol. Med.* Vol. 40; S. 138- 145
- Hambraeus G, von Wachenfeldt C, Hederstedt L (2003) „Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs" *Mol.Genet.Genomics* Vo. 269; S. 706-714
- Heinicke I, Muller J, Pittelkow M, Klein A (2004) „Mutational analysis of genes encoding chromatin proteins in the archaeon *Methanococcus voltae* indicates their involvement in the regulation of gene expression" *Molec.Genet.Genomics* Vol. 272, S. 76-87
- Higuchi M, Yamamoto Y, Poole LB, Shimada M, Sato Y, Takahashi N, Kamio Y (1999) "Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*" *J. Bact.* Vol. 181; S. 5940-5947
- Higuchi M, Yamamoto Y, Kamio Y (2000) "Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress" *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 90; S. 484-493
- Hochgräfe F, Mostertz J, Pöther DC, Becher D, Helmann JD, Hecker M (2007) „S-cysteinylation is a general mechanism for thiol protection of *Bacillus subtilis* proteins after oxidative stress" *J. Biol. Chem.* Vol. 282; S. 25981-25985
- Hochheimer A, Hedderich R, Thauer RK (1998) "The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme." *Arch. Microb.* Vol. 170; S. 389-393
- Hochheimer A, Hedderich R, Thauer RK (1999) „The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation." *Molec. Microb.* Vol. 31; S. 641-650
- Hofacker A, Schmitz KM, Cichonczyk A, Sartorius-Neef S, Pfeifer F (2004) "GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*" *Microbiology* Vol. 150; S. 1829-1835
- Hofmeister F (1894) „Ueber Methylierung im Thierkörper“ *Arch.Exp.Pathol.* Vol. 33; S. 198-215
- Hundt S, Zaigler A, Lange C, Soppa J, Klug G (1997) „Global analysis of mRNA decay in *Halobacterium salinarum* NRC-1 at single-gene resolution using DNA microarrays" *J.Bact.* Vol.
- Jaeger T, Flohé L (2006) "The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs" *Biofactors* Vol. 27; S. 109-120
- Jager A, Samorski R, Pfeifer F, Klug G (2002) „Individual gvp transcript segments in *Haloferax mediterranei* exhibit varying half-lives, which are differentially affected by salt concentration and growth phase." *Nucleic Acids Res.* Vol. 30; S.5436-5443

- Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, Warelow TP, Ward SA, Santini JM (2007) "Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes" *Environm. Microb.* Vol. 9; S. 934-943
- Ken R, Hackett NR (1991) „*Halobacterium halobium* strains lysogenic for phage phi H contain a protein resembling coliphage repressors." *J.Bact.* Vol. 173; S. 955-960
- Klein C, Garcia-Rizo C, Bisle B, Scheffer B, Zischka H, Pfeiffer F, Siedler F, Oesterheld D (2005) „The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*" *Proteomics* Vol. 5; S. 180-197
- Klein C, Aivaliotis M, Olsen JV, Falb M, Besir H, Scheffer B, Bisle B, Tebbe A, Konstantinidis K, Siedler F, Pfeiffer F, Mann M, Oesterheld D (2007) "The Low Molecular Weight Proteome of *Halobacterium salinarum*" *J.Proteom Res.* Vol. 6; S. 1510-1518
- Kozak M (2005) "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes" *Gene* Vol. 361; S. 13-37
- Krafft T, Macy JM (1998) "Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*" *Europ. J. Bioch.* Vol. 255; S. 647-653
- Kuo YP, Thompson DK, St Jean A, Charlebois RL, Daniels CJ. (1997) "Characterization of two heat shock genes from *Haloferax volcanii*: a model system for transcription regulation in the Archaea. *J.Bact.* Vol. 179; S. 6318-6321
- Lee SJ, Engelmann A, Horlacher R, Qu Q, Vierke G, Hebbeln C, Thomm M, Boos W (1993) "TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*." *J.Biol.Chem.* Vol. 278; S. 983-990
- Lee SJ, Moulakakis C, Koning SM, Hausner W, Thomm M, Boos W (2005) "TrmB, a sugar sensing regulator of ABC transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promoter specificity and is controlled by different inducers." *Mol. Microbiol.* Vol. 57; S. 1797-1807
- Lehnherr H, Velleman M, Guidolin A, Arber W (1992) „Bacteriophage P1 gene 10 is expressed from a promoter-operator sequence controlled by C1 and Bof proteins." *J.Bact.* Vol. 174; S. 6138-6144
- Li K, Hein S, Zou W, Klug G (2004) "The glutathione-glutaredoxin system in *Rhodobacter capsulatus*: part of a complex regulatory network controlling defense against oxidative stress" *J.Bact.* Vol. 186; S. 6800-6808
- Li S, Rosen BP, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR (2002) "Evidence for cooperativity between the four binding sites of dimeric ArsD, an As(III)-responsive transcriptional regulator." *J.Biol.Chem.* Vol. 277; S. 25992-26002
- Li Y, Hu Y, Zhang X, Xu H, Lescop E, Xia B, Jin C (2007) "Conformational fluctuations coupled to the thiol-disulfide transfer between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*." *J.Biol.Chem.* Vol. 282; S. 11078-11083
- Lin S, Shi Q, Nix FB, Styblo M, Beck MA, Herbin-Davis KM, Hall LL, Simeonsson JB, Thomas DJ (2002) "A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol" *J.Biol.Chem.* Vol. 277; S. 10795-10803
- Lie TJ, Leigh JA (2002) „Regulatory response of *Methanococcus maripaludis* to alanine, an intermediate nitrogen source" *Molecular Microbiol.* Vol. 184; S.5301-5306
- Lie TJ, Leigh JA (2003) "A novel repressor of *nif* and *glnA* expression in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*" *Molecular Microbiology* Vol. 47; S.235-246
- Lie TJ, Wood GE, Leigh JA (2005) „Regulation of *nif* expression in *Methanococcus maripaludis*: roles of the euryarchaeal repressor NrpR, 2-oxoglutarate, and two operators" *J.Biol. Chem.* Vol.280, S. 5236-5241

- Lin YF, Yang J, Rosen BP (2007) „ArsD residues Cys12, Cys13, and Cys18 form an As(III)-binding site required for arsenic metallochaperone activity” *J. Biol.Chem.* Vol. 282; S. 16783-16791
- Lutfalla G, Uze G (2006) “Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments” *Methods in Enzymol.* Vol. 410; S.386-400
- MacFerrin KD, Terranova MP, Schreiber SL, Verdine GL (1990) „Overproduction and dissection of proteins by the expression-cassette polymerase chain reaction.” *Proc.Natl.Acad.Sci.* Vol. 87; S. 1937-1941
- Malasarn D, Keeffe JR, Newman DK (2007) “Characterization of the Arsenate Respiratory Reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3” *J. Bact.*
- Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O (2006) “A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change” *Biophys.Journal* Vol. 90; S. 1790-1796
- Marc F, Sandman K, Lurz R, Reeve JN (2002) “Archaeal histone tetramerization determines DNA affinity and the direction of DNA supercoiling” *J. Biol.Chem.* Vol. 277; S. 30879–30886
- Martin P, DeMel S, Shi J, Gladysheva T, Gatti DL, Rosen BP, Edwards BF (2001) “Insights into the structure, salivation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme” *Structure* Vol. 9; S. 1071-1081
- Mateos LM, Ordóñez E, Letek M, Gil JA (2006) „*Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic” *Int. Microbiol.* Vol. 9; S-207-215
- Maruyama K, Sugano S (1994) „Oligo-Capping: A simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNA's with oligoribonucleotides” *Gene* Vol. 138; S. 171-174
- Matews DH (2006) “RNA secondary structure analysis using RNAstructure” In *Current Protocols in Bioinformatics* (Baxevanis, A. D., Davidson, D. B., Page, R. D. M., Petsko, G. A., Stein, L. D., & Stormo, G. D., eds.) S. 12.6.1-12.6.14. John Wiley & Sons, Inc.
- Messens J, Silver S (2006) „Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution” *J. Mol.Biol.* Vol. 362
- Michalke K, Meyer J, Hensel R. (2007) “Methylation of metal(loid)s by Methanoarchaea: production of volatile derivatives with high ecotoxicological impact and health concern” In: *Archaea, Evolution, Physiology and Molecular Biology* Edit. R.G. Garrett and H.P.Klenk; Blackwell
- Mizote T, Tsuda M, Smith DD, Nakayama H, Nakazawa T (1999) „Cloning and characterization of the thiD/J gene of *Escherichia coli* encoding a thiamin-synthesizing bifunctional enzyme, hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethyl-pyrimidine kinase” *Microbiology* Vol. 145; S. 495-501
- Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL (2005) “Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress” *Human Mol. Genet.* Vol. 14; 71-84
- Mujacic M, Baneyx F (2006) „Regulation of *Escherichia coli* hchA, a stress-inducible gene encoding molecular chaperone Hsp31,” *Mol Moicrob.* Vol. 60; S. 1576-1589
- Müller S. and Klein A (2001) “Coordinate positive regulation of genes encoding [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*” *Mol.Genetics.Genomics* Vol. 265; S. 1069-1075
- Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP (2000) “Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase” *J. Biol.Chem.* Vol. 275; S. 21149-21157

- Newton GL, Javor B (1985) „gamma-Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria” J. Bact. Vol. 161; S. 438-441
- Neyt C, Iriarte M, Thi VH, Cornelis GR. (1997) “Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*” J Bacteriol. Vol. 179; S. 612-619.
- Noll I, Müller S, Klein A (1999) “Transcriptional Regulation of Genes Encoding the Selenium-Free [NiFe]-Hydrogenases in the Archaeon *Methanococcus voltae* Involves Positive and Negative Control Elements” Genetics Vol.152; S. 1335-1341
- Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA, Mateos LM (2005) “Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032” Ann. Review in Microbiolog
- Outten CE, Outten FW, O'Halloran TV (1999) “DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*” J Biol Chem. Vol. 274; S. 37517-37524
- Owolabi JB, Rosen BP (1990) „Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon.“ J.Bact. Vol. 172; S. 2367-2371
- Palmer JR, Daniels CJ (1995) “In vivo definition of an archaeal promoter” J. Bact. Vol. 177: S. 1844-1849
- Pfaffl MW (2001) “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR” Nucl. Acids Res. Vol. 29, S. 2002-2007
- Pfeifer F, Zotzel J, Kurenbach B, Roder R, Zimmermann P (2001) „A p-loop motif and two basic regions in the regulatory protein GvpD are important for the repression of gas vesicle formation in the archaeon *Haloferax mediterranei*.” Microbiology Vol. 147; S. 63-73
- Plößer P, Pfeifer F (2002) “A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*.” Mol.Microbiol. Vol. 45; S. 511-520
- Qin J, Fu HL, Ye J, Bencze KZ, Stemmler TL, Rawlings DE, Rosen BP (2007) “Convergent evolution of a new arsenic binding site in the ArsR/SmtB family of metalloregulators” J. Biol. Chem (online)
- Rawat M, Av-Gay Y (2007) „Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes” FEMS Microb.Reviews Vol. 31; S. 278-292
- Reiter WD, Hüdepohl U, Zillig W (1990) Mutational analysis of an archaeal promoter: essential role of the TATA box for transcription efficiency and start site selection in vivo” Proc. Natl. Sci. USA Vol. 87: S. 9509-9513
- Ring G, Londei P, Eichler J (1997) “Protein biogenesis in Archaea: addressing translation initiation using an in vitro protein synthesis system for *Haloferax volcanii*” FEMS Microbiol Lett. Vol. 270; S. 34-41
- Rohlin L, Trent JD, Salmon K, Kim U, Gunsalus RP, Liao JC. (2005) “Heat shock response of *Archaeoglobus fulgidus*.” J.Bact. Vol. 187; S. 6046-6057
- Rosen BP (1999) „Families of Arsenic transporters“ Trends in Mircob. Vol. 7; S.207-212
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Reztantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J (2003) “TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis” Biotechniques Vol. 34; S. 374-378.
- Sambrook & Russel (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Third Edition, Cold Spring Harbor, New York

- Sanders OI, Rensing C, Kuroda M, Mitra B, Rosen BP (1997) „Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*.” J.Bact. Vol. 179; S. 3365-3367
- Sandman K., Reeve JN (1995) “Archaeal chromatin proteins: different structures but common function?” Curr. Opinion Microb. Vol. 8; S. 656-661
- Sastry MS, Korotkov K, Brodsky Y, Baneyx F (2002) „Hsp31, the *Escherichia coli* yedU gene product, is a molecular chaperone whose activity is inhibited by ATP at high temperatures” J. Biol. Chem. Vol. 48; S. 46026-46034
- Sato T, Kobayashi Y (1998) „The ars operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite.” J.Bact. Vol. 180; 1655-1661
- Satorius-Neef S, Pfeifer F (2004) “In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*” Mol. Microb. Vol. 51; S. 579-588
- Schagger H, von Jagow G (1987) “Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.” Anal.Biochemistry Vol. 166, S. 368-379
- Schlx PJ, Worhunsky DJ (2003) “Translational repression mechanisms in prokaryotes” Mol.Microb. Vol.48; S. 1157-1169
- Shandale P, Verma J, Naorem A (2007) “Basal transcription machinery: role in regulation of stress response in eukaryotes” J Biosci. Vol. 32; S. 569-78
- Shearwin KE, Callen BP, Egan JB (2005) “Transcriptional interference – a crash course” Trends in Genetics Vol. 21; S. 339-345
- Schnabel H (1984) “An immune strain of *Halobacterium halobium* carries the invertible L segment of phage PhiH as a plasmid.” Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol. 81; S. 1017-1020
- Shand RF, Betlach MC. (1991) “Expression of the bop gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light.” J.Bact. Vol. 173; S. 4692-4699
- Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A (2004) “DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation” PLOS Biol. Vol. 2; S. e362
- Shi W, Dong J, Scott RA, Ksenzenko MY, Rosen BP (1996) “The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the ars operon.” J.Biol.Chem. Vol. 271; S. 9291-9297
- Shi W, Wu J, Rosen BP (1994) „Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins.” J.Biol.Chem. Vol. 269; S. 19826-19829
- Silver S, Pung LT (2005) “Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic” Appl.Environ.Microb. Vol. 71, S.599-608
- Skoneczna A, Miciałkiewicz A, Skoneczny M (2007) “*Saccharomyces cerevisiae* Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species” Free Radical Biol. Med Vol. 42; S. 1409-1420
- Soppa J (1999) “Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects” Mol. Microbiol. Vol. 95; S. 1295-1305
- Stolt P, Zillig W (1993a) “Antisense RNA mediates transcriptional processing in an archaebacterium, indicating a novel kind of RNase activity.” Mol.Microbiol. Vol. 7; 875-882
- Stolt P, Zillig W (1993b) “Structure specific ds/ss-RNase activity in the extreme halophile *Halobacterium salinarum*.” Nucleic Acids Res. Vol. 21; S. 5595-5599
- Stolt P, Zillig W (1993c) “In vivo and in vitro analysis of transcription of the L region from the *Halobacterium salinarum* phage phi H: definition of a repressor-enhancing gene.” Virology Vol. 195; S. 649-658

- Stolt P, Zillig W (1994) "Transcription of the halophage phi H repressor gene is abolished by transcription from an inversely oriented lytic promoter." FEBS Lett. Vol. 344; 125-128
- Stolz JF, Basu P, Santini JM, Oremland RS (2006) "Arsenic and selenium in microbial metabolism" Ann. Review Microb. Vol. 60; S. 107-130
- Stolz JF, Oremland RS (1999) "Bacterial respiration of arsenic and selenium" FEMS Microbiol. Reviews Vol. 23; S. 625-627
- Sun J, Klein A. (1994) „A lysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*" Mol.Microb. Vol. 52; S. 563-571
- Swearingen JW Jr, Fuentes DE, Araya MA, Plishker MF, Saavedra CP, Chasteen TG, Vásquez CC (2006) „Expression of the ubiE gene of *Geobacillus stearothermophilus* V in *Escherichia coli* K-12 mediates the evolution of selenium compounds into the headspace of selenite- and selenate-amended cultures" Appl. Environm.Microbiol.Vol. 72; S. 963-967
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K, Arigo H (2004) „DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death" EMBO Rep. Vol. 5; 213-218
- Tarasov V, Besir H, Schwaiger R, Klee K, Furtwängler K, Pfeiffer F, Oesterhelt D (2008) "A small protein from the bop-brp intergenic region *Halobacterium salinarum* contains a zinc finger motif and regulates bop and crtB1 transcription" Mol. Microb. Vol 67; S. 772-780
- Tebbe A, Klein C, Bisle B, Siedler F, Scheffer B, Garcia-Rizo C, Wolfertz J, Hickmann V, Pfeiffer F, Oesterhelt D (2005) „Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation" Proteomics Vol. 5; S. 168-179
- Theil EC (2007) "Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: The ferritin story" Biometals Vol. 20; S. 513-521
- Thompson DK, Daniels CJ. (1998) „Heat shock inducibility of an archaeal TATA-like promoter is controlled by adjacent sequence elements." Mol.Microb. Vol. 27; 541-551
- Thompson DK, Palmer JR, Daniels CJ (1999) „Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*." Mol.Microb. Vol. 33; S1081-1093
- Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F (2007) The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis" FEBS Lett. Vol. 581; S.3598-3607
- Tolstrup N, Sensen CW, Garrett RA, Clausen IG (2000) "Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*" Extremophiles Vol. 4; S. 175-179
- Torarinsson E, Klenk HP, Garrett RA (2005) „Divergent transcriptional and translational signals in Archaea" Environmental Microb. Vol. 7; S. 47-54
- Totter S, Harvie DR, Robinson NJ. (2005) "Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones" Acc. Chem. Res. Vol. 38; S. 775-783
- Twilmeyer J, Wende A, Wolfertz J, Pfeiffer F, Panhuysen M, Zaigler A, Soppa J, Welzl G, Oesterhelt D. (2007) "Microarray analysis in the archaeon *Halobacterium salinarum* R1" Plos One Vol. 2; e1064
- Vacic V, Iakoucheva LM, Radivojac P (2006) "Two Sample Logo: A Graphical Representation of the Differences between Two Sets of Sequence Alignments" Bioinformatics Vol. 22; S. 1536-1537
- Van den Hoven RN, Santini JM (2004) „Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor" Bioch.Biophys.Acta - Bioenergetics Vol. 1656; S. 148-155



- Velleman M, Heirich M, Gunther A, Schuster H (1990) „A bacteriophage P1-encoded modulator protein affects the P1 cI repression system.” *J.Biol.Chem.* Vol. 265; S. 18511-18517
- Vierke G, Engelmann A, Hebbeln C, Thomm M (2003) „A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response.” *J.Biol.Chem.* Vol. 278; S. 18-26
- Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2004) „Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression?” *Trends Genet.* Vol. 20; S. 44-50
- Vorontsov II, Minasov G, Brunzelle JS, Shuvalova L, Kiryukhina O, Collart FR, Anderson WF (2007) “Crystal structure of an apo form of *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity” *Protein Sci.* Vol. 16; S. 2483-2490
- Wang L, Chen S, Xiao X, Huang X, You D, Zhou X, Deng Z (2006) “arsRBOCT arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008” *Appl. Environ. Microb.* Vol. 72; S. 3738-3742
- Wang W, Malcolm BA (1999) „Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis.” *Biotechniques* Vol. 26 (4); S. 680-682
- Wang Y, Liu CL, Storey JD, Tibshirani RJ, Herschlag D, Brown PO (2002) “Precision and functional specificity in mRNA decay” *Proc.Natl.Acad.Sci* Vol. 99; S. 5860-5865
- Willsky GR, Malamy MH (1980) „Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*” *J.Bact.* Vol. 144; S. 366-374
- Wu J, Rosen BP (1991) “The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein.” *Mol.Microb.* Vol. 5; S. 1331-1336
- Wu J, Rosen BP (1993a) “Metalloregulated expression of the ars operon.” *J.Biol.Chem.* Vol. 268; S. 52-58
- Wu J, Rosen BP (1993b) „The arsD gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon.” *Mol.Microb.* Vol. 8; S. 615-623
- Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S (1997) “The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport.” *J.Biol.Chem.* Vol. 272; S. 30061-30066
- Wysocki R, Chery CC, Wawrzycka D, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamas MJ. (2001) “The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Mol.Microb.* Vol. 40; S.1391-1402
- Xie Y, Reeve JN (2005) „ Regulation of tryptophan operon expression in the archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus*” *J.Bact.* Vol.187; S. 6419-6429
- Xu C, Shi W, Rosen BP (1996) „The chromosomal arsR gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein.” *J.Biol.Chem.* Vol. 271; S. 2427-2432
- Xu C, Rosen BP (1997) „Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of *Escherichia coli*.” *J.Biol.Chem.* Vol. 272; S. 34-38
- Yang HC, Cheng J, Finan TM, Rosen BP, Bhattacharjee H. (2005) “Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*” *J Bacteriol.* 2005 Oct;187(20):6991-7.
- Ye J, Kandededara A, Martin P, Rosen BP (2005) “Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pI258 CadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor” *J. Bact.* Vol. 187; S. 2414-2421
- Ye J, Yang HC, Rosen BP, Bhattacharjee H. (2007) “Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*” *FEBS Lett.* Vol. 581; S. 3996-4000

Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996) "A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*" Gene Vol. 171; S. 41-47

Zakharyan RA, Aposhian HV (1999) "Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase" Chem. Res.Toxicol Vol. 12; S. 1278-1283

Zakharyan RA, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DM, Aposhian HV (1999) "Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes" Toxicol.Appl.Pharmacol. Vol. 158; S. 9-15

Zimmermann P, Pfeifer F (2003) „Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. " Mol.Microb. Vol. 49; S. 783-794

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(n)
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz; $\beta$ -Lactamase
APS	Ammoniumpersulphat
Bp	Nukleinsäurebasenpaare
BRE	Transcription Factor IIB Recognition Element
BSA	Bovine Serum Albumine
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxyribonukleotide
DTNB	5'-Dithiobis [2-Nitrobenzoic Acid]
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintertaacetat
ESI	Electrospray Ionization (MS)
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
HTH	Helix-Turn-Helix Motiv
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Km <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz, (Aminoglycosidphosphotransferase)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	Methanol
Mev <sup>R</sup>	Mevinolinresistenz; HMG-CoA-Reduktase
mRNA	messenger (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
Nov <sup>R</sup>	Novobiocinresistenz; Topoisomerase II

OD600	Optische Dichte bei 600 nm
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactosid
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelectrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RACE	Random Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
Rpm	Rotations per Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOF	Time of Flight (MS)
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tsp	Transcriptional start point
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D -Galactopyranosid

# *Curriculum vitae*

---

**Surname :** Schwarz  
**First name :** Christoph  
**Date of birth :** 20.09.1974  
**Nationality :** Austria  
**Residence :** Heustrasse 52, 4320 Perg, Austria

---

## **Scientific education**

- 2/2008 - 2/2010**      **Postdoctoral Research at the School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, USA**  
« Hydrogenases and their application in bio-H<sub>2</sub> production »  
« Improvement of molecular tools in cyanobacterial genetics »  
« Characterization and crystallization of SynCRP1 »
- 5/2002 - 12/2007**      **PhD thesis in the group of D. Oesterhelt at the Max Planck Institute for Biochemistry; Martinsried, Germany**  
« Transcription and regulation of Arsenic resistance genes in *Halobacterium salinarum* » and related topics
- 2002**                      **Diploma in Microbiology**
- 10/2001-2/2002**      **Research period at the Institute for Autotrophic Microorganisms; Czech Academy of Science**
- 1/2001 – 9/2001**      **Military Service**
- 1/1999 – 12/2000**      **Diploma thesis at the Botanical Institute ; Christian Albrechts-University, Kiel, Germany**  
« Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* PCC6803 »
- 10/1994 -12/2000**      **Study of Microbiology at the Leopold Franzens-University of Innsbruck**
- 9/1989 – 7/1994**      **Grammar school (BORG) with main emphasis on natural sciences**
- 9/1981 – 7/1989**      **Basic (Elementary) school**

## Scientific Publications

- 1) Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, Appel J (2005) „LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803* as a transcription activator“ Mol.Microb. Vol. 58; p. 810-823
- 2) Reichelt P, Schwarz C, Donzeau M (2006) „Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents“ Prot.Expr.Purif. Vol. 46; p. 483-488
- 3) Schwaiger R, Schwarz C, Furtwaengler K, Tarasov V, Wende A, Oesterhelt D (2010) „The Transcriptional control by two leucine responsive regulatory proteins in *Halobacterium salinarum* R1“ submitted to BMC Genomics, accepted
- 4) Furtwaengler K, Tarasov V, Wende A, Schwarz C, Oesterhelt D (2010) “Regulation of phosphate uptake via Pst transporters in *Halobacterium salinarum* R1” Mol. Microb. in press
- 5) Schwarz C, Poss Z, Hoffmann D, Appel J (2010) „Hydrogenases and Hydrogen Metabolism in Photosynthetic Prokaryotes“ In Recent advances in Phototrophic Prokaryotes Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 675 in press
- 6) Konstantinidis K, Schwarz C, Schwaiger R, Siedler F, Oesterhelt D (2010) „Quantitative analysis of heat shock response in *Halobacterium salinarum*“ in preparation
- 7) Schwarz C, Schwaiger R, Konstantinidis K, Wende A, Twellmeier J, Oesterhelt D (2010) „As<sup>III</sup>/Sb<sup>III</sup> stress and transcriptional regulation of arsenic resistance operon genes in *Halobacterium salinarum* strain R1“ in preparation

## Teaching experience

- 2009** Lecturing at the School of Life Sciences, Arizona State University  
lecture MMB245 (fall semester) « Molecular Biology of the Cell »
- 2008** Lecturing at the School of Life Sciences, Arizona State University  
Selected lectures about “Recombineering” as a contribution to  
« Genetics » held by Prof. R. Gaxiola
- 2003 – 2007** Supervision of several biochemical practicals
- 2001** Special teaching post in « ABC defence » during the military service
-