

# **Regulation der Organohalid-Respiration durch MarR-Regulatoren in *Dehalococcoides mccartyi***

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

**Frau Lydia Krasper, geb. Segler**

geboren am 09.06.1987 in Neindorf-Beckendorf

eingereicht am: 27.04.2017

Gutachter: 1. PD Dr. Ute Lechner  
2. Prof. Dr. Gary Sawers  
3. Prof. Dr. Thomas Brüser

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.04.2018

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis .....	i
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Halogenierte Verbindungen in der Umwelt .....	1
1.2 Die Organohalid-Respiration .....	2
1.3 <i>Dehalococcoides mccartyi</i> .....	4
1.3.1 <i>Dehalococcoides mccartyi</i> Stamm CBDB1 .....	5
1.4 Regulation der Organohalid-Respiration.....	6
1.5 MarR ähnliche Regulatoren und ihre Funktion .....	9
1.6 MarR-Regulatoren in <i>Dehalococcoides mccartyi</i> .....	11
1.7 Zielstellung .....	13
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Chemikalien und Gase .....	14
2.2 Verwendete Organismen, Plasmide und Phagen.....	14
2.2.1 Bakterienstämme .....	14
2.2.2 Plasmide .....	15
2.2.3 Phagen .....	16
2.3 Mikrobiologische Methoden .....	17
2.3.1 Kultivierung von <i>D. mccartyi</i> .....	17
2.3.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> Stämmen.....	19
2.4 Molekularbiologische Methoden .....	21
2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus CBDB1.....	21
2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. mccartyi</i> und <i>E. coli</i> .....	21
2.4.3 Reverse Transkription.....	22
2.4.4 5`RACE .....	22
2.4.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	23
2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	23
2.4.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	25
2.4.8 Herstellung rekombinanter <i>E. coli</i> Stämme.....	27
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.5.1 Zellanzucht, -ernte, -aufschluss und -fraktionierung für proteinbiochemische Analysen .....	30
2.5.2 Reinigung von Proteinen mit <i>StrepTag</i> -Fusion mittels Affinitätschromatografie.....	31
2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
2.5.4 Konzentrierung und Pufferwechsel von Proteinlösungen .....	32

2.5.5	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.5.6	Protein-Färbungen .....	33
2.5.7	Western-Blot Analyse.....	34
2.5.8	FAR-Western-Analyse.....	35
2.5.9	Protein-Protein-Interaktion und Immunoblotting .....	36
2.5.10	Gel-Retentionsanalyse (EMSA).....	36
2.5.11	Auswertung der Gel-Retentionsanalysen.....	38
2.5.12	DNase I-Footprinting .....	40
2.6	Analytische Methoden .....	40
2.6.1	Analyse der Dechlorierung von Trichlorbenzolen in CBDB1 .....	40
2.6.2	β-Galaktosidase-Analyse .....	42
2.6.3	Analytische Ultrazentrifugation.....	43
2.6.4	Massenspektrometrie .....	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Transkriptionelle Regulation des <i>cbdb_A1623-1625</i> Genclusters im Stamm CBDB1 .....	47
3.1.1	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Regulatorfunktion von <i>RdhR1625</i> .....	47
3.1.2	Ermittlung der Transkriptionsstarts von <i>rdhA1624</i> und <i>rdhR1625</i> .....	54
3.2	Transkriptionelle Regulation des <i>cbdb_A1452-56</i> Genclusters .....	55
3.2.1	Transkription des <i>rdhAB1452-55</i> Operons in CBDB1 .....	55
3.2.2	Induktion der Transkription durch 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol.....	56
3.2.3	Bestimmung der Promotorbereiche von <i>rdhA1453</i> , <i>rdhA1455</i> und <i>rdhR1456</i> .....	58
3.3	Regulatorfunktion von <i>RdhR1456</i> .....	59
3.3.1	Etablierung eines heterologen <i>in vivo</i> Systems zur Untersuchung der Regulation des <i>rdhAB1452-55</i> Operons .....	59
3.3.2	<i>In vivo</i> Repression der Promoteraktivitäten von <i>rdhA1453</i> und <i>rdhA1455</i> durch <i>RdhR1456</i> .....	60
3.3.3	<i>In vitro</i> Interaktion eines C- sowie N-terminalen <i>Streptag</i> -Derivats von <i>RdhR1456</i> mit den Promotorregionen von <i>rdhA1453</i> und <i>rdhA1455</i> .....	65
3.3.4	Ermittlung der oligomeren Form von <i>RdhR1456<sub>StrepC</sub></i> im <i>in vitro</i> System.....	68
3.3.5	Bestimmung der Bindeaffinität von <i>RdhR1456</i> an verschiedene DNA-Bereiche.....	70
3.3.6	Ermittlung der essentiellen Basen für die Interaktion mit <i>RdhR1456</i> innerhalb des <i>direct repeats</i> .....	71
3.3.7	Identifizierung potentieller Liganden von <i>RdhR1456</i> .....	73
3.4	Transkriptionelle Regulation des <i>cbdb_A1595-1599</i> Genclusters .....	78
3.4.1	<i>In vivo</i> -Repression des Promoters von <i>rdhA1598</i> durch <i>RdhR1456</i> und <i>RdhR1596</i> .....	78
3.4.2	Bindung von <i>RdhR1456<sub>StrepC</sub></i> und <i>RdhR1596<sub>StrepC</sub></i> an die Promoterregion von <i>rdhA1598</i> <i>in vitro</i> .....	80

---

3.5	Komplexität des Regulationssystems der MarR-Regulatoren in <i>Dehalococcoides mccartyi</i>	83
4	Diskussion	85
4.1	RdhR1625, RdhA1456 und RdhA1596 - Beispiele für MarR-Regulatoren in <i>D. mccartyi</i>	85
4.1.1	Phylogenetische Entwicklung von <i>rdhR</i> - und <i>marR</i> -Genen in <i>D. mccartyi</i>	85
4.1.2	Vergleich der Wirkungsweise der MarR-Regulatoren RdhR1456, RdhR1625 und RdhR1596	87
4.2	Der Regulator RdhR1456	90
4.2.1	Regulation der Transkription des Genclusters <i>cbdb_A1452-55</i>	90
4.2.2	Bindung von RdhR1456 an die DNA	92
4.2.3	Die ungeklärte Rolle von Liganden für die Funktion des RdhR1456-Regulators	95
4.3	Crosstalk der MarRs in CBDB1	96
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101
7	Anhang	110

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

Å	Angström
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosinphosphat
ATP	Adosintriphosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
CbrA	Chlorbenzoldehalogenase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ( <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> )
Cm	Chloramphenicol
D	Proteindimer
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DCB	Dichlorbenzol
DCP	Dichlorpenol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DR	<i>direct repeat</i>
ds	doppelsträngig
<i>Dsb.</i>	<i>Desulfitobacterium</i>
DTH	Dithionit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Elektromobilitätsshiftassay

F	Fluoreszenzintensität
6-FAM	5`-6-Carboxyfluorescein
FID	Flammenionisationsdetektor
fw	<i>forward</i>
GC	Gaschromatographie/Gaschromatograph
h	Stunde
HABA	2-(4`-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IR	intergene Region
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
K <sub>d</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
M	Molar
MarR	<i>multiple antibiotic resistance regulator</i>
Mb	Megabasenpaar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n. a.	nicht analysiert; nicht angegeben
n. d.	nicht detektiert
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactosid
<i>ori</i>	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PceA	Tetrachlorethendehalogenase
PCR	Polymerasenkettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDVF	Polyvinylidendifluorid
PIPES	Piperazine-N,N`-bis(2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(dI/dC)	Poly-Desoxyinosin-Desoxycytidin
qPCR	quantitative <i>real time PCR</i>
5` RACE	5` <i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
<i>rdh</i>	reduktive Dehalogenase-homolog ( <i>reductive dehalogenase homologous</i> )

rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotation per minute</i> )
RR	<i>twin arginine</i> -Signalsequenz
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i> )
sp.	Art
spp.	Arten
T	Thymin; Proteintetramer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAT	<i>twin arginine tranlocation</i>
TCB	Trichlorbenzol
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TGYEP	phosphatgepuffertes Medium mit Trypton, Hefe und Glucose ( <i>trypton glucose yeast phosphate</i> )
TrBB	Tribrombenzol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
v	Geschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen (Konzentrationsangabe)
w/v	Masse/Volumen (Konzentrationsangabe)
wHTH	<i>winged helix turn helix motif</i>

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1. Modell der Organohalid-Respiration .....	4
Abbildung 2. Modell zur Regulation der Organohalid-Respiration in <i>D. mccartyi</i> . ....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genorganisation von <i>rdhA1453</i> und <i>rdhA1624</i> mit den assoziierten <i>marR</i> -Genen <i>rdhR1456</i> und <i>rdhR1625</i> im <i>D. mccartyi</i> Stamm CBDB1. ....	8
Abbildung 4. RdhR1456 und dessen homologe MarR-Proteine. ....	10
Abbildung 5. Stammbaum der MarR-Regulatoren in <i>D. mccartyi</i> Stämmen. ....	12
Abbildung 6. $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der <i>E. coli</i> Stämme LS4 (Kontrollstamm), LS13 (P <sub>1624</sub> ), LS5 (P <sub>1625-14</sub> ), LS15 (P <sub>1625</sub> ) in Units und als Rot-Färbung auf McConkey-Agar. ....	48
Abbildung 7. Einfluss von pBAD1625 auf die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS15 in Abhängigkeit von einem intakten <i>rdhR1625</i> -Gen im pBAD Vektor. ....	50
Abbildung 8. Einfluss der Kultivierungsbedingungen und des Cysteinrests von RdhR1625 auf seine autoregulatorische Funktion. ....	51
Abbildung 9. Einfluss von pASKIBA3_1625 und pASKIBA3_1456B auf die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von MC4100 pACYCIR1624::lacZ. ....	53
Abbildung 10. Promoterbereiche und Transkriptionsstarts der Gene <i>rdhA1624</i> und <i>rdhR1625</i> . ....	54
Abbildung 11. Organisation des <i>rdhAB1452-1455</i> Operons im <i>D. mccartyi</i> Stamm CBDB1 und Ergebnisse der RT-PCR. ....	56
Abbildung 12. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB (a) und 1,2,4-TCB (b). ....	57
Abbildung 13. Quantitative Transkriptionsanalyse der <i>rdhA</i> -Gene <i>rdhA1453</i> ( $\blacktriangle$ ) und <i>rdhA1455</i> ( $\blacksquare$ ), sowie des <i>rdhR</i> -Gens <i>rdhR1456</i> ( $\bullet$ ) während der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TCB (a) und 1,2,4-TCB (b) im Vergleich zur Kontrolle (c). ....	58
Abbildung 14. Promoterbereiche und Transkriptionsstarts der Gene <i>rdhA1453</i> , <i>rdhA1455</i> , <i>rdhR1456</i> und <i>rdhA1598</i> . ....	59
Abbildung 15. $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der <i>E. coli</i> Stämme LS4 (Kontrolle), LS9 (P <sub>1453::lacZ</sub> ), LS20 (P <sub>1455::lacZ</sub> ) und LS21 (P <sub>1456::lacZ</sub> ). ....	60
Abbildung 16. Untersuchung der Stämme LS20 (P <sub>1455::lacZ</sub> ), LS21 (P <sub>1456::lacZ</sub> ) mit pBAD1456A bzw. pBAD1456B auf Synthese von RdhR1456. ....	61
Abbildung 17. Einfluss von verschiedenen pBAD1456-Varianten auf die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS20 (P <sub>1455::lacZ</sub> ). ....	62
Abbildung 18. Regulatorische Wirkung von RdhR1456 auf die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der <i>E. coli</i> Stämme LS9 (P <sub>1453::lacZ</sub> ), LS20 (P <sub>1455::lacZ</sub> ), LS21 (P <sub>1456::lacZ</sub> ). ....	64
Abbildung 19. Vergleich gereinigtes RdhR1456 <sub>StrepC</sub> und RdhRA1456 <sub>StrepN</sub> . ....	65
Abbildung 20. Eingrenzung der DNA-Binderegion von RdhR1456 mittels EMSA. ....	66
Abbildung 21. Identifizierung der DNA-Bindestelle von RdhR1456 in der IR1453 (A) und in der IR1455 (B) mittels DNase I Footprinting. ....	67
Abbildung 22. Rolle der <i>direct repeat</i> -Region für die Interaktion von RdhR1456 <sub>StrepC</sub> mit der DNA. ....	67
Abbildung 23. Sedimentationsprofil von RdhR1456 <sub>StrepC</sub> mittels Sedimentationsgleichgewichtsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge. ....	68
Abbildung 24. Sedimentationsgleichgewichtsläufe von 5'-6-FAM-IR1455-DNA (25 nM) einzeln und im Komplex mit RdhR1456 <sub>StrepC</sub> (1,66 $\mu$ M). ....	69
Abbildung 25. Vergleich der Bindeaffinität von RdhR1456 <sub>StrepC</sub> an die dsDNA-Oligonucleotide von <i>rdhA1453</i> [IR1453 (302-328 bp)] und <i>rdhA1455</i> [IR1455 (105-136 bp)], [IR1455(137-168 bp)] (A) und Berechnung der K <sub>d</sub> -Werte (B). ....	70

Abbildung 26. Alignment der putativen Erkennungssequenzen von RdhR1456 mit anderen IRs in Orientierung zu den <i>rdhA</i> -Genen im Genom vom <i>D. mccartyi</i> Stamm CBDB1. ....	72
Abbildung 27. Vergleich der Bindeaffinität von RdhR1456 <sub>StrepC</sub> an die zwei Halbseiten der <i>direct repeat</i> -Region. ....	72
Abbildung 28. Vergleich der Bindung RdhR1456 <sub>StrepC</sub> an DNA-Fragment 5 (f5) aus IR1455-56 im Vergleich zu DNA mit Mutationen (f5Δdr, f5Δdr-Q1, f5Δdr-Q2). ....	73
Abbildung 29. Kein Aufhebungseffekt von TCBs und DCBs auf die Bindung von RdhR1456 an IR1455	74
Abbildung 30. Effekt von CBDB1-Extrakten auf die Bindung von RdhR1456 an IR1455 (f5). ....	76
Abbildung 31. Interaktionsstudie von RdhR1456 <sub>StrepC</sub> mit CBDB1-Extrakten. ....	77
Abbildung 32. Schematische Darstellung der Genregion um das <i>rdhA</i> -Gen <i>rdhA1598</i> . ....	79
Abbildung 33. Transkriptionelle Regulation der Promoteraktivität von LS22 (P <sub>1598::lacZ</sub> ) durch verschiedene MarR-Regulatoren. ....	80
Abbildung 34. Bindeaffinität von RdhR1456 <sub>StrepC</sub> an ein DNA-Fragment von <i>rdhA1598</i> [IR1598 (123-152 bp)]. ....	81
Abbildung 35. Aufreinigung von RdhR1596 <sub>StrepC</sub> (A), <i>in vitro</i> Interaktion von RdhR1596 <sub>StrepC</sub> mit IR1598 und IRtrpE (B) und anderen intergenen Bereichen (C). ....	82
Abbildung 36. Vergleich der regulatorische Wirkung aller <i>rdhA</i> assoziierter MarR-Regulatoren aus CBDB1 auf die Promoter P <sub>1453</sub> , P <sub>1455</sub> , P <sub>1456</sub> , P <sub>1598</sub> , P <sub>1625</sub> <i>in vivo</i> . ....	83
Abbildung 37. Modelle zur Regulation der Transkription von <i>rdhA</i> - und <i>rdhR</i> -Genen durch RdhR1456 (A), RdhR1625 (B) und RdhR1596 (C) nach Transkriptionsanalysen von Wagner (2009) und Ergebnissen dieser Arbeit. ....	88
Abbildung 38. Strukturelles Alignment des AbsC-Tetramers aus <i>Streptomyces coelicolor</i> (grau) mit einem RdhR1456-Monomer (blau). ....	94
Abbildung I. Reinigung von in <i>E. coli</i> Rosetta heterolog synthetisiertem RdhR1456 als C-terminales (A) und N-terminales (B) StrepTag-Fusionsprotein. ....	118
Abbildung II. Einfluss von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB auf die β-Galaktosidase-Aktivität von LS5 (P <sub>1625::lacZ</sub> ). ....	119
Abbildung III. Quantitative Transkriptionsanalyse der <i>rdhA</i> -Gene <i>rdhA1453</i> (▲) und <i>rdhA1455</i> (■), sowie des <i>marR</i> -Gens <i>rdhR1456</i> (●) nach der Induktion mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB in An- bzw. Abwesenheit von 20 μM H <sub>2</sub> . ....	120
Abbildung IV. Quantitative Transkriptionsanalyse der <i>rdhA</i> -Gene <i>rdhA1453</i> (▲) und <i>rdhA1455</i> (■), sowie des <i>marR</i> -Gens <i>rdhR1456</i> (●) nach der Induktion mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB in An- bzw. Abwesenheit von 10 μM H <sub>2</sub> . ....	120
Abbildung V. Regulatorische Wirkung von RdhR1456 und RdhR1625 auf die β-Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme LS9, LS20 und LS21. ....	121
Abbildung VI. Stammbaum der reduktiven Dehalogenasene der isolierten <i>D. mccartyi</i> Stämme CBDB1, DCMB5, VS, BAV1, GT und DET195. ....	124
Abbildung VII. Vergleich der Promotersequenzen P <sub>1453</sub> , P <sub>1455</sub> und P <sub>1598</sub> und der für die EMSAs und die Ultrazentrifugation genutzten dsDNA-Oligonukleotide. ....	124

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme.....	14
Tabelle 2. Verwendete Plasmide.....	15
Tabelle 3. Verwendete Phagen .....	16
Tabelle 4. Zusammensetzung CBDB1-Minimalmedium .....	17
Tabelle 5. Zusammenfassung von PCR-Reaktionsansätzen mit verschiedenen DNA-Polymerasen .....	23
Tabelle 6. Temperatur-Programme für die PCR mit verschiedenen DNA-Polymerasen.....	24
Tabelle 7. Zusammensetzung und Temperaturprogramm einer QuikChange-Mutagenese-Reaktion. ....	25
Tabelle 8. Temperaturprogramm für eine Ligation.....	26
Tabelle 9. Molekularmasse und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine .....	32
Tabelle 10. Zusammensetzung von SDS-Gelen .....	33
Tabelle 11. Zusammensetzung eines Nativ-Gels für einen EMSA.....	38
Tabelle 12. Ofenprogramm des GC-2010 für Chlorbenzole und Retentionszeiten .....	42
Tabelle 13. Zusammensetzung von Puffer Z .....	43
Tabelle 14. Übersicht potentieller Liganden und Bindestellen für RdhR1456 auf Grundlage anderer Transkriptionsfaktoren.....	75
Tabelle 15. Übersicht der detektierten Peptide in den analysierten Gelbanden (a, b) der FAR-Western-Analyse. ....	78
Tabelle 16. Konservierung des DR-Motivs von RdhR1456 aus CBDB1 in verschiedenen <i>D. mccartyi</i> Stämmen .....	86
Tabelle 17. Zusammenfassung des beobachteten Einflusses von RdhR-Regulatoren auf die Promoteraktivität von <i>rdhA</i> - und <i>rdhR</i> -Genen aus CBDB1 anhand von heterologen <i>in vivo</i> -Untersuchungen.....	97
Tabelle I. Beispiele von Regulatoren in <i>D. mccartyi</i> neben TCS und MarR. ....	111
Tabelle II. Vergleich der Eigenschaften einiger MarR-Regulatoren. ....	112
Tabelle III. Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide. ....	114
Tabelle IV. Einfluss des Vektorsystems für <i>rdhR1625</i> auf die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS5 ( $P_{1625-14::lacZ}$ ). ....	118
Tabelle V: $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von LS13 ( $P_{1624::lacZ}$ ) unter Einfluss von $\sigma$ ECF und RdhR1625. ....	119
Tabelle VI. Keine Inhibition der Komplexbildung von DNA-Fragmenten mit RdhR1456 <sub>StrepC/N</sub> in Gelretentionsstudien in Anwesenheit der hier aufgeführten getesteten potentiellen Liganden. ....	121
Tabelle VII. Übersicht zu orthologen <i>rdhA</i> - und <i>rdhR</i> -Genen zu CBDB1 in den <i>D. mccartyi</i> Stämmen VS, GT, DCMB5, BTF08, BAV-1 und DET 195. ....	122



# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 HALOGENIERTE VERBINDUNGEN IN DER UMWELT

Halogenierte Verbindungen sind in der Umwelt weit verbreitet. Dabei stammen sie sowohl aus natürlichen Prozessen als auch aus anthropogenen Quellen. So z. B. wird eine Vielzahl von bromierten Verbindungen durch marine Organismen produziert und ist Teil des biogeochemischen Bromidkreislaufes in marinen Sedimenten (Leri et al., 2010). Chlorierte Verbindungen hingegen wurden bis Ende des 20. Jahrhunderts durch die chemische Industrie in die Umwelt entlassen. Viele dieser Verbindungen fanden vor dem Bewusstwerden ihrer schädlichen Wirkung auf die Gesundheit, ihrer persistenten Bioakkumulation und ihrer Wirkung als Treibhausgase Anwendung in zahlreichen Bereichen. Das Anwendungsspektrum reichte von Chlorbenzolen als Lösungsmitteln bis zu Chlorphenolen als Fungizide und Herbizide, Pentachlorphenol als Konservierungsmittel für Leder bis hin zu polychlorierten Biphenylen (PCBs), die z. B. als Weichmacher Verwendung fanden (Reinecke und Schlömann, 2007). Viele halogenierte Verbindungen zählen zu den gefährlichsten Umweltschadstoffen der Erde [*Persistent Organic Pollutants* (POPs)] und wurden durch die Stockholmer Übereinkunft 2004 weltweit verboten. Seit dem wurde die Liste von POPs immer weiter ergänzt. Zu den momentan gelisteten 30 POPs zählen Pflanzenschutzmittel, DDT, Dioxine, Furane, PCBs, Penta- und Hexachlorbenzol (PeCB, HCB), sowie Pentachlorphenol (PeCP)<sup>1</sup>.

Da es sich bei den meisten Chloraromaten um persistente bioakkumulierende Substanzen handelt, war das Verbot zur Freisetzung von POPs nur ein erster Schritt zur Problemlösung der bereits bestehenden kontaminierten Standorte. Hexachlorbenzol (HCB) z. B. hat sich nahezu in der gesamten Umwelt angereichert. Es konnte sowohl in der Luft, im Wasser, im Boden und in Gewässersedimenten, als auch in biologischem Material wie z. B. Fischen, Eiern, im Fettgewebe von Säugetieren und auch im Menschen und somit in der Nahrungskette nachgewiesen werden (Barber et al., 2005). Die Eliminierung von POPs in der Umwelt wurde zu einem brisanten Thema. Durch die festgelegte reduzierte Emission von HCB durch das Stockholmer Übereinkommen verringerte sich das HCB-Level in der Umwelt signifikant. Eine Ausnahme bildete China, da dort weiterhin HCB produziert wurde. Außerdem konnte in Meerestieren kein deutlicher Trend beobachtet werden (Barber et al., 2005). Deshalb sollte nicht nur durch Eingrenzung der Emission eine Verminderung von halogenierten Verbindungen in der Umwelt erzielt werden, sondern auch durch deren gezielten Abbau.

---

<sup>1</sup> <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx> (Informationen am 19.05.2016 bezogen)

Es wurde nach Möglichkeiten der Dehalogenierung von halogenierten Verbindungen gesucht. So war bereits bekannt, dass neben einem cometabolischem Abbau durch lignolytische Pilze, wie *Phanerochaete chrysosporium*, und den Abbau durch aerobe Bakterien (z. B. *Burkholderia* und *Pseudomonas*) auch ein metabolischer Abbau in anaeroben Bereichen durch Bakterien mit Hilfe einer anaeroben Atmung, der sogenannten Organohalid-Respiration (OHR), möglich ist (Reinecke und Schlömann, 2007). Maymó-Gatell et al. isolierten 1997 das erste Bakterium, was unter anaeroben Bedingungen polychloriertes Ethen (PCE) zu Ethen mit Hilfe einer reduktiven Dechlorierung vollständig abbaute (Maymó-Gatell et al., 1997). Dies war einer der ersten Meilensteine für die Erforschung der OHR von vielen verschiedenen chlorierten Verbindungen.

## 1.2 DIE ORGANOHALID-RESPIRATION

Die Organohalid-Respiration ist eine unter strikt anaeroben Bedingungen ablaufende Respiration, welche halogenierte Kohlenwasserstoffverbindungen als Elektronenakzeptor zur Energiekonservierung nutzt. Als Elektronendonatoren dienen in den verschiedenen Organohalid-respirierenden Bakterien (OHRBs) Wasserstoff, Formiat oder andere organische Substanzen. Die OHR ist besonders interessant für die Dekontaminierung von Umweltverschmutzungen anthropogener Natur. Die OHRBs können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die obligaten und die nicht obligaten OHRBs (Maphosa et al., 2010). Die meisten darunter zählenden Bakterien besitzen eine Vielzahl von reduktiven Dehalogenase-homologen (*rdh*) Genen für die OHR. Neben der Bedeutung in der Bioremediation spielen OHRBs eine wichtige Rolle im globalen Halogen-Kreislauf (Krzmarzick et al., 2012).

Die OHRBs sind in den Phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Chloroflexi* zu finden, wobei Vertreter der Phyla *Proteobacteria* und *Firmicutes* zumeist zu den nicht-obligaten OHRBs zählen (*Geobacter*, *Desulfuromonas*, *Anaeromyxobacter*, *Sulfurospirillum*, *Desulfitobacterium spp.*) (Hug et al., 2013). Im Gegensatz zu den Vertretern der *Firmicutes* und *Proteobacteria*, sind alle bisher bekannten Organohalid-respirierenden Vertreter der Chloroflexi obligate OHRBs, weshalb sie im besonderen Fokus für die Erforschung der OHR stehen, da sie wahre Spezialisten für diesen Metabolismus sind.

Die verschiedenen Abbauwege von umweltrelevanten halogenierten Verbindungen durch die OHR in *Dehalococcoides mccartyi*, aber auch in *Sulfospirillum*, *Desulfitobacterium* und *Dehalobacter* Stämmen sind mittlerweile gut erforscht. Der *D. mccartyi* Stamm CBDB1 wird seinem Namen als „Chlorbenzoldechlorierendes Bakterium 1“ (Adrian et al., 2000) gerecht, indem er in der Lage ist, viele verschiedene Chlorbenzole, daneben aber auch verschiedene chlorierte Dioxine, Biphenyle und Phenole, zu dechlorieren. So wird beispielsweise HCB von CBDB1 schrittweise über 1,2,4,5-

Tetrachlorbenzol (TeCB) zu 1,2,4-Trichlorbenzol (TCB) bis zum 1,3-Dichlorbenzol (DCB) und 1,4-DCB dechloriert, während das über 1,2,3,5-TeCB ebenfalls gebildete 1,3,5-TCB nicht weiter umgewandelt wird (Jayachandran et al., 2003). Der *D. mccartyi* Stamm DCMB5 dechloriert ebenfalls HCB, allerdings zu den Endprodukten 1,2,4-TCB, 1,3,5-TCB und einer nur geringen Menge 1,4-DCB (Pöritz et al., 2015). An diesem Beispiel wird deutlich, dass die verschiedenen *D. mccartyi* Stämme jeweils ein großes Dechlorierungspotential besitzen, sich jedoch in Bezug auf ihr Substratspektrum und ihre Dechlorierungswege unterscheiden. Eine tabellarische Zusammenfassung der verschiedenen *D. mccartyi* Stämmen mit ihren Substratspektren ist nachzulesen bei Zinder (2016).

Obwohl viele reduktive Dechlorierungswege beschrieben sind und eine Vielzahl von reduktiven Dehalogenasegenen in den Genomen der OHRBs identifiziert wurden, wurden bislang nur wenige funktional charakterisiert. Hierzu zählen PceA, TceA, VcrA, CbrA, BvcA, MbrA, CfrA, DcrA, CprA (Tang und Edwards, 2013). Den Ablauf der Organohalid-Respiration stellt man sich auf Grundlage von Wachstumsuntersuchungen, vergleichenden Genomanalysen (Seshadri et al., 2005, Kube et al., 2005) und der funktionalen und strukturellen Charakterisierung einiger Dehalogenasen (Bommer et al., 2014), Hydrogenasen (Mansfeldt et al., 2014; Nijenhuis und Zinder, 2005) und eines jüngst identifizierten Megakomplexes aus CBDB1 (Kublik et al., 2016) folgendermaßen vor: *D. mccartyi* nutzt im Gegensatz zu den fakultativen OHRBs ausschließlich Wasserstoff als Elektronendonator. Dieser wird durch eine der fünf Hydrogenasen, wahrscheinlich der membranständigen Hup-Hydrogenase, zu zwei Elektronen und zwei Protonen oxidiert. Durch einen noch nicht geklärten Elektronentransport gelangen die Elektronen zur membranverankerten reduktiven Dehalogenase (RdhA). Als Membrananker fungiert vermutlich die sogenannte RdhB-Untereinheit der reduktiven Dehalogenase. Reduktive Dehalogenasen besitzen im aktiven Zentrum einen Cobalamin-Kofaktor und 2 Fe-S-Cluster, mit deren Hilfe sie vermutlich die Elektronen zum Elektronenakzeptor auf der periplasmatischen Seite der Membran weiterleiten. Die RdhA reduziert so mit Hilfe der Elektronen halogenierte Verbindungen, wie beispielsweise 1,2,3-Trichlorbenzol. Durch die Reduktion wird ein Chlorsubstituent durch ein Wasserstoffatom ausgetauscht. Das zweite Proton aus der Oxidation wird in Verbindung mit dem Chlor-Ion zur Salzsäure. Im Gegensatz zu anderen nicht-obligaten OHRBs, wie *Sulfurospirillum multivorans* besitzen *D. mccartyi* Stämme weder Gene für Chinone, Cytochrome noch für eine Chinol-Dehydrogenase (Goris et al., 2014; Kube et al., 2005). Es war deshalb lange unklar, wie die Elektronen von der Hydrogenase zur reduktiven Dehalogenase transportiert werden. Aktuelle Studien schlagen hierfür eine direkte Assoziation der Hydrogenase mit der Dehalogenase in einem Art Superkomplex vor (siehe Abbildung 1), bei dem die Elektronen aus der Oxidation des Wasserstoffs direkt zur RdhA weitergeleitet werden. Belege für diese Theorie lieferten Studien von Kublik et al. (2016). Isolierte

Superkomplexe aus den Rohextrakten von *D. mccartyi* Stamm CBDB1 enthielten sowohl die Hup-Hydrogenase, als auch eine RdhAB, sowie ein Eisen-Schwefel-Molybdoenzym (CISM-Komplex).

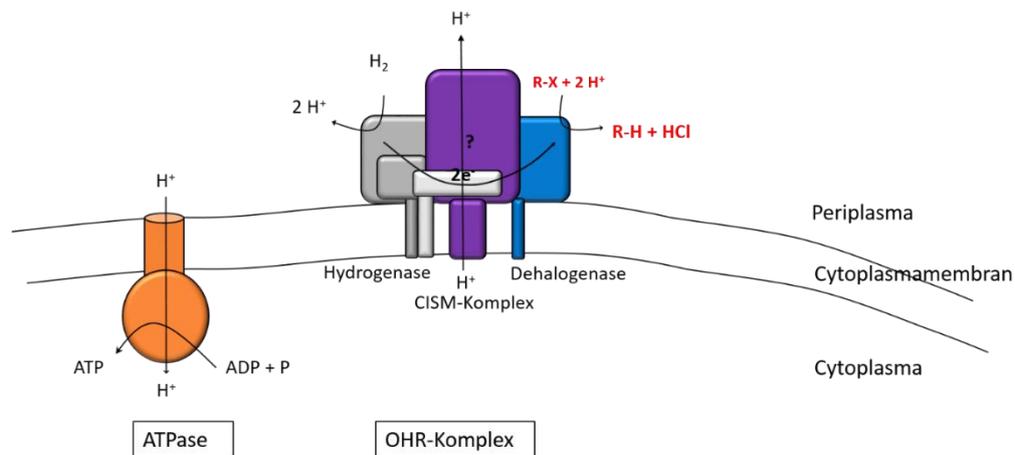


Abbildung 1. Modell der Organohalid-Respiration (modifiziert nach Seshadri et al., 2005; Kublik et al., 2016)

In *S. multivorans* hingegen wird vermutet, dass die RdhABs als Homodimere die Reduktion der Elektronenakzeptoren durchführen (Bommer et al., 2014), die Elektronen hierfür werden vermutlich über eine Chinol-Dehydrogenase vom Chinonpool zur RdhA geleitet (Goris et al., 2014). Im Zuge der Organohalid-Respiration kommt es vermutlich zur Erzeugung eines Protonengradienten, welche zur ATP-Synthese durch die ATPase genutzt wird (Abbildung 1). Dabei wird vermutlich aus einem oxidierten  $H_2$   $0,625 \pm 0,1$  ATP synthetisiert, denn das Verhältnis von freigesetzten Protonen je Elektronen wurde von Schumacher und Holliger (1996) in *Dehalobacter restrictus* auf  $1,25 \pm 0,2$  hochgerechnet und 1 ATP wird in Bakterien gewöhnlich durch den Transport von ca. 4 Protonen durch eine membranständige ATPase konserviert (Steigmiller et al., 2008). Die so konservierte Energie wird nun wahrscheinlich genutzt, um aus Acetat und  $CO_2$  als einzige Kohlenstoffquellen Biomasse zu produzieren. Die geringe Ausbeute an ATP pro reduziertem Elektronenakzeptor erklärt die langsame Bildung von Biomasse und somit das langsame Wachstum der OHRBs.

### 1.3 DEHALOCOCCOIDES MCCARTYI

Die OHRBs der Chloroflexi gehören zur Klasse der *Dehalococcoidia*. Sie enthält sowohl alle bislang bekannten und isolierten *Dehalococcoides mccartyi* Stämme, als auch *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* und *Dehalobium* (Löffler et al., 2013). Löffler et al. (2013) fassten die Eigenschaften aller bis dato bekannten Vertreter der Art *Dehalococcoides mccartyi* (*D. mccartyi* 195, CBDB1, BAV1, MB, DCMB5, BTF08, GT, FL2) innerhalb der Klasse *Dehalococcoidia* wie folgt zusammen. Alle Vertreter sind obligate OHRBs, die ausschließlich  $H_2$  als Elektronendonator, halogenierte Verbindungen als Elektronenakzeptor und  $CO_2$  und Acetat als C-Quelle nutzen. Die Genome sind

ringförmig organisiert und zählen mit 1,34-1,47 Mb zu den kleinsten Genomen freilebender Mikroorganismen. Die Zellen besitzen eine diskusförmige Struktur mit einem Durchmesser von 0,3–1 mm und einer Dicke von 0,1–0,2 mm. Die Zellwand enthält kein Peptidoglykan jedoch ein Protein mit Eigenschaften einer S-Layer-Komponente, wie bei den Archaeen. Sie wird deshalb als S-Layer-ähnlich bezeichnet (Morris et al., 2006). Mit einer Verdopplungszeit von 2-3 Tagen weisen sie ein sehr langsames Wachstum auf, sind unbeweglich und strikt anaerob.

*D. mccartyi* besitzt eine zentrale Bedeutung für die Bioremediation. Das wird am Beispiel von Tetrachlorethen (PCE) deutlich. *Desulfitobacterium*, *Desulfuromonas*, *Dehalobacter*, *Dehalospirillum* sind zwar in der Lage PCE zum Dichlorethen (DCE) abzubauen, aber die weitere Dechlorierung zum ungefährlichen Ethen kann nur durch einige *D. mccartyi* Stämme wie 195, FL2 und BAV1 katalysiert werden (He et al., 2003; Löffler et al., 2013). Das breite Dechlorierungspotential von *Dehalococcoides mccartyi* wird seit 2002 bereits kommerziell zur gezielten Bioaugmentation verwendet. Dafür wurde eine Mischkultur von *Dehalococcoides spp.* und methanogenen und acetogenen Bakterien entwickelt, die als KB-1 bezeichnet wurde (Löffler und Edwards, 2006).

### 1.3.1 *Dehalococcoides mccartyi* Stamm CBDB1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf den *D. mccartyi* Stamm CBDB1 gelegt. Dieser Stamm zeichnet sich unter den *D. mccartyi* Stämmen durch sein besonders breites Substratspektrum aus. CBDB1 kann vielschrittige Dechlorierungen von polychlorierten Verbindungen zu niedrigchlorierten leisten. Es ist wahrscheinlich, dass hierbei mehrere RdhA-Enzyme koordiniert zum Einsatz kommen. Ein Beispiel dafür ist die bereits erwähnte Dechlorierung von HCB, aber auch die Dechlorierung von Pentachlorphenol (Adrian et al., 2007a) oder 1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin (Bunge und Lechner, 2009). Die Verbindungen werden über eine schrittweise Dechlorierung zu niedriger chlorierten Verbindungen umgewandelt. Die 32 *rdhAB*-Gene in CBDB1 müssen vermutlich einer gut koordinierten Regulation unterliegen. Ein Blick in das 1,4 MB umfassende Genom von CBDB1 zeigt, dass die meisten *rdhAB*-Gene in CBDB1, aber auch in anderen *D. mccartyi* Stämmen, in enger Assoziation mit Genen vorliegen, die MarR-Typ-Regulatoren oder Zweikomponentensystem (TCS)-Regulatoren kodieren. Die meisten *rdhAB*-Gene befinden sich in zwei Genregionen mit einer hohen Variabilität, den sogenannten *high plasticity regions* (HPR), während der Rest des Genoms eine hohe Syntenie zu anderen *Dehalococcoides* Stämmen wie 195 aufweist (Kube et al., 2005). Alle *rdhAB*-Gene sind in der Nähe des Replikationsursprungs (*ori*) lokalisiert, wobei 28 der 32 *rdhs* auf dem DNA-Leitstrang kodiert sind. Die Gene für Transkriptionsregulatoren sind dagegen vorrangig auf dem DNA-Folgestrang vorzufinden. Phylogenetisch verwandte *rdhABs* sind im Genom von CBDB1 nicht zwangsläufig in unmittelbarer Nähe lokalisiert, was auf Rekombinationsereignisse distaler Regionen

im Verlauf der Evolution schließen lässt. CBDB1 besitzt im Genom einige Gene für mobile Elemente, die das ermöglichen könnten. Dazu zählen Gene für Transposasen, Rekombinasen, Integrasen aber auch phagenähnliche Gene und ein Prophage. Des Weiteren wurde eine Region mit repetitiven Elementen, sogenannten CRISPR (*clustered regulatory interspaced short repeats*) gemeinsam mit assoziierten Genen identifiziert, welche in Bakterien bekannt ist als Abwehrsystem gegen Fremd-DNA, aber auch verantwortlich sein kann für Genmodifikationen (Sander und Joung, 2014).

## 1.4 REGULATION DER ORGANOHALID-RESPIRATION

So wie der Stamm CBDB1 besitzen alle bislang beschriebenen *D. mccartyi* Stämme eine Vielzahl paraloger *rdhAB*-Gene, die zumeist mit regulatorischen Genen assoziiert vorliegen. Beispielsweise besitzt der Stamm DCMB5 23 (Pöritz et al., 2013) und der Stamm 195 17 *rdhAB*-Gene (Seshadri et al., 2005). Die Tatsache, dass alle bisher bekannten *Dehalococcoides* Stämme trotz ihres vergleichbar kleinen Genoms so viele verschiedene *rdhAB*-Gene besitzen, lässt darauf schließen, dass diese alle essentiell für den Metabolismus dieser Organismen sind und vermutlich unterschiedliche Elektronenakzeptoren verwenden. Die enge Assoziation der meisten *rdhAB*-Gene mit regulatorischen Genen, legt weiterhin nahe, dass die Expression der *rdhAB*-Gene einer spezifischen Regulation unterliegt. So werden vermutlich in Abhängigkeit der Umweltbedingungen unterschiedliche RdhABs exprimiert. Konkrete Studien zur Regulation der OHR sind bislang nur sehr dürftig, dabei würde die Aufklärung der Regulation doch zentrale Fragen der OHR, wie zum Beispiel wann und warum welche RdhABs exprimiert werden, mit beantworten können.

Betrachtet man die Gesamtheit der OHRBs in Bezug auf deren transkriptionelle Regulation, so ist bislang lediglich in *Desulfitobacterium (Dsb.) dehalogenans* und *Desulfitobacterium hafniense* die Regulation der Chlorphenolreduktase CprA durch die Regulatoren CprK bzw. CprK1 gut erforscht. Diese Transkriptionsfaktoren, die zur Fnr/Crp-Superfamilie gehören und 91 % Sequenzidentität zueinander aufweisen, wirken als redoxensitive Aktivatoren für das *cprTKZEBACD-Gencluster* (Mazon et al., 2007; Pop, 2006; Smidt und Vos, 2004). Als Liganden fungieren chlorierte Phenole (Mazon et al., 2007; Smidt et al., 2000). Ein heterolog gereinigtes CprK-Protein lag vorrangig als Homodimer im reduzierten Zustand vor. Somit bindet CprK im reduzierten Zustand wahrscheinlich als Homodimer an die DNA (Pop et al., 2004). *In vitro* führte Sauerstoff zur Inaktivierung von CprK durch die Ausbildung einer Disulfid-Brücke. Ob die Disulfid-Brücken physiologisch in der Zelle eine Rolle für die Inaktivierung von CprK spielen, wird jedoch bezweifelt und könnte auch ein Artefakt des gereinigten Proteins bzw. der Kristallisation sein (Pop et al., 2004; Gábor et al., 2006).

Neben CprK wurden in *Dsb. dehalogenans* auch Zweikomponentensysteme (TCS) in Verbindung mit der Regulation der OHR gebracht. In Mutanten mit einem inserierten Transposon im *upstream*-Bereich einer Histidinkinase (HK) wurde ein *Dsb. dehalogenans* mit einem Dehalorespirations-Defizit erzeugt. Die Bedeutung von TCS für die Regulation der OHR konnte somit beispielhaft gezeigt werden (Smidt et al., 1999).

Konzentriert man sich nun auf die Regulation der OHR in *D. mccartyi*, so ist darüber bislang wenig bekannt. Über Genomannotationen isolierter *D. mccartyi* Stämme weiß man, wie bereits erwähnt, dass *rdhA*-Gene zumeist im Genom in enger Assoziation mit Genen für putative Transkriptions-Regulatoren lokalisiert sind. Es handelt sich in den meisten Fällen um Gene für Zweikomponentensysteme (TCS) bestehend aus einem Response-Regulator (RR) und einer Histidinkinase (HK), sowie Gene für MarR-ähnliche Regulatoren. Ein Modell wie die OHR möglicherweise mit Hilfe dieser Regulatoren gesteuert wird, ist in Abbildung 2 dargestellt.

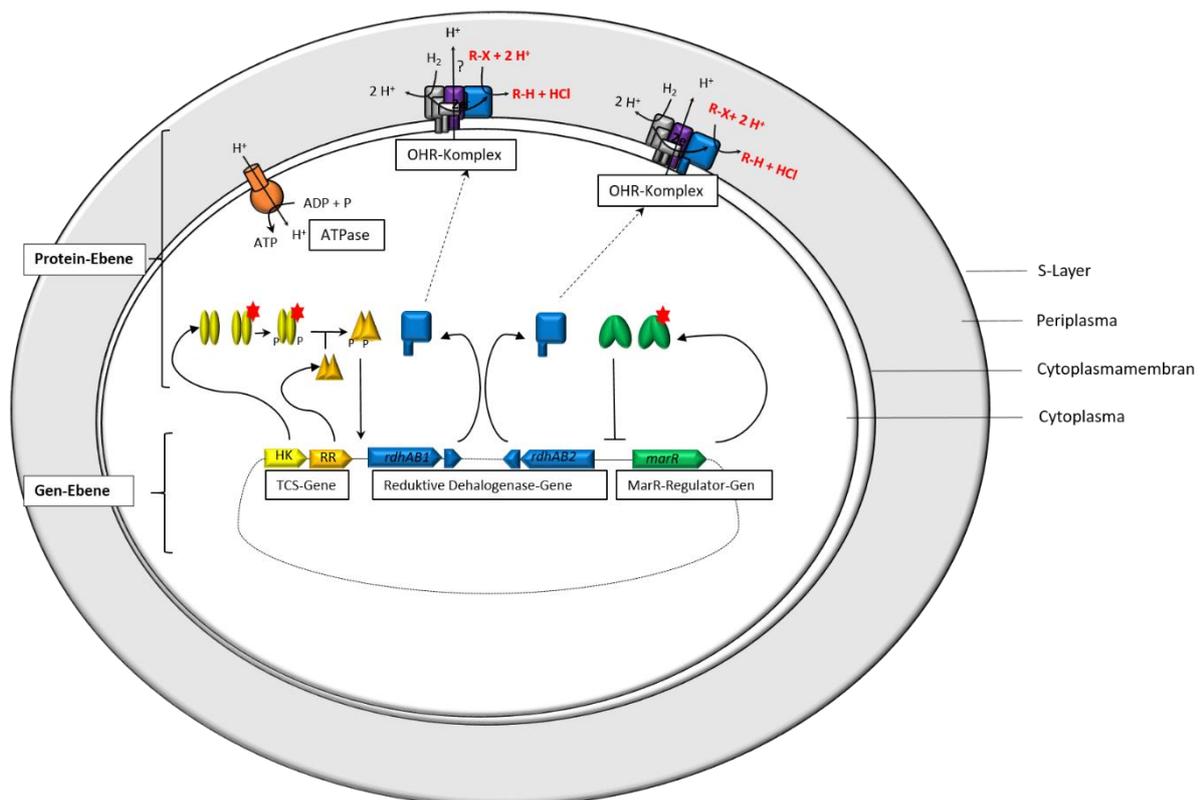


Abbildung 2. Modell zur Regulation der Organohalid-Respiration in *D. mccartyi*. Dargestellt ist ein Schema einer *D. mccartyi*-Zelle mit den *rdhAB*-Genen (blau), den Regulatorgenen (gelb und orange für HK und RR des TCS, grün für *MarR*), sowie den exprimierten Regulator- und *RdhAB*-Proteinen. Ein putativer Ligand für *MarR* oder HK wurde mit einem Stern dargestellt. Zwei OHR-Komplexe in der Cytoplasmamembran bestehend aus den *RdhABs*, einer Hup-Hydrogenase (grau), HupX (hellgrau) und dem CISM-Komplex (violett). In braun ist die ATP-Synthetase dargestellt. Die Proteinsynthese ist jeweils als gebogener Pfeil vom Gen zum Protein angedeutet, gestrichelte Pfeile deuten den Transport der *RdhAB*-Proteine und die Assemblierung zu den OHR-Komplexen an, chemische Reaktionen wurden durch gebogene Pfeile dargestellt und gerade Pfeile wurden zur Darstellung von Phosphorylierungsreaktionen und Proteininteraktionen mit der DNA verwendet. Dabei stellt ein umgedrehtes T die Hemmung der Transkription durch den Regulator dar.

Neben diesen Regulatoren wurden in den verschiedenen *Dehalococcoides* Stämmen aber auch andere Regulatoren wie beispielsweise Regulatoren vom LuxR-, Crp/Fnr- oder TetR-Typ identifiziert (Tabelle I im Anhang). In CBDB1 jedoch sind von den 32 *rdhA*-Genen 15 mit Genen eines TCS assoziiert und 14 mit *marR*-Genen (Kube et al., 2005; Schiffmann et al., 2013). Es war somit naheliegend, dass die transkriptionelle Regulation der OHR in CBDB1 vorrangig unter der Kontrolle von TCS und MarR-Regulatoren steht.

In der Vergangenheit sollten Transkriptionsanalysen und Proteomanalysen von *D. mccartyi* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen Aufschluss über die Regulation der OHR liefern. Wagner et al. (2009) zeigten, dass in Anwesenheit der Elektronenakzeptoren 1,2,3-TCB oder 1,2,4-TCB, die von CBDB1 zu 1,3-DCB bzw. 1,3-DCB und 1,4-DCB dechloriert werden, eine vermehrte Transkription von 29 der 32 *rdhA*-Genen stattfand. Neben der bereits bekannten Chlorbenzol-reduktiven Dehalogenase CbrA (Adrian et al., 2007b) wurden auch viele andere *rdhAs* transkribiert. Dabei wurde lediglich bei drei *rdhAs* eine differenzielle Transkription zwischen der Anzucht mit 1,2,3-TCB im Vergleich zu 1,2,4-TCB festgestellt. Die Gene *cbdbA1453* und *cbdbA187* wiesen eine höhere Induktion mit 1,2,3-TCB auf, während die Transkription von *cbdbA1624* mit 1,2,4-TCB stärker war, als mit 1,2,3-TCB. Diese Beobachtung ist interessant, da *cbdbA1453* und *cbdbA1624* sich auf Sequenzebene sehr stark ähneln (Sequenzidentität von 92 %), aber augenscheinlich unterschiedlich reguliert werden.

Für eine einheitliche Bezeichnung von *rdhAB*-Genen und deren assoziierten Genen in *D. mccartyi* wurde kürzlich eine Nomenklatur vorgeschlagen. *RdhA*-Gene und -Proteine sollen zukünftig als *rdhA* bzw. RdhA bezeichnet werden (Kruse et al., 2016). So wurden die ehemals als *cbdbA1624* und *cbdbA1453* nach ihren *locus tags* bezeichneten *rdhA*-Gene in dieser Arbeit als *rdhA1624* bzw. *rdhA1453* bezeichnet. Des Weiteren sollten auch die *marR*-Gene und Proteine zukünftig nicht mit dem *locus tag* ihrer Gene bezeichnet werden sondern als *rdhR* bzw. RdhR mit der nachgestellten *locus tag*-Nummer.

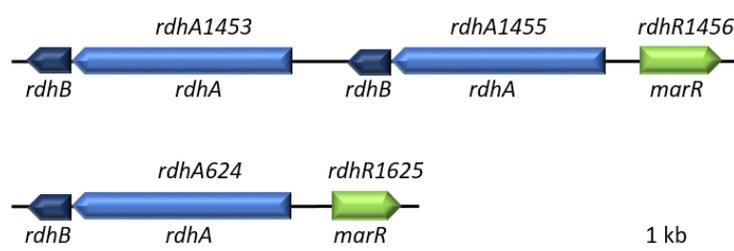


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genorganisation von *rdhA1453* und *rdhA1624* mit den assoziierten *marR*-Genen *rdhR1456* und *rdhR1625* im *D. mccartyi* Stamm CBDB1. *rdhAB*-Gene sind blau, *marR*-Gene grün.

Die *rdhA*-Gene *rdhA1453* (ehemals als *cbdbA1453* bezeichnet) und *rdhA1624* (ehemals als *cbdbA1624* bezeichnet) sind mit *marR*-Genen assoziiert. Abbildung 3 zeigt dies schematisch. Während *rdhA1624* direkt benachbart zum *marR*-Gen *rdhR1625* liegt, ist das *marR*-Gen *rdhR1456* mit den zwei *rdhAB*-Operons *rdhAB1452-53* und *rdhAB1454-55* assoziiert.

Da in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die MarR-Regulatoren gelegt wurde, soll im Folgenden ein Überblick über diese Gruppe von Regulatoren gegeben werden.

## 1.5 MARR ÄHNLICHE REGULATOREN UND IHRE FUNKTION

Die MarR-Transkriptionsregulator-Familie ist nach dem MarR (*multiple antibiotic resistance regulator*) aus *Escherichia coli* benannt und umfasst mehr als 12.000 Regulatoren (Wilkinson und Grove, 2006). Von annähernd 100 MarR-Regulatoren ist bislang die physiologische Rolle untersucht worden (Perera und Grove, 2010). MarR-Regulatoren sind weit in Bakterien und Archaeen verbreitet und regulieren viele verschiedene zelluläre Prozesse. MosR und OhrR z. B. regulieren die Antwort auf oxidativen Stress (Brugarolas et al., 2012; Oh et al., 2007). Die Expression von Virulenz-Determinanten wird beispielsweise von SlyA, PecS/PecT und RovA reguliert (Dolan et al., 2011; Nasser et al., 2005; Quade et al., 2012). Viele MarRs regulieren auch *multidrug* Resistenzen (Birukou et al., 2014; Evans et al., 2001; Xiong et al., 2000). Selbst der Transport von Übergangsmetallen wie Zn(II) durch die Membran kann durch Regulatoren vom MarR-Typ gesteuert werden (Guerra et al., 2011). Weiterhin sind Vertreter der MarR-Familie für die Regulation des Katabolismus von aromatischen Verbindungen zuständig (Davis und Sello, 2010; Otani et al., 2016; Providenti und Wyndham, 2001).

Allen MarR-Regulatoren gemeinsam ist ihr triangulärer Aufbau mit einem konserviertem *winged helix turn helix* Motiv (wHTH). Sie binden typischerweise als Homodimere an palindromische Bereiche der DNA *upstream* der Zielgene. Zu meist handelt es sich hierbei um eine *inverted repeat*-Region. Eine spezielle Konsensus-Sequenz für MarR-Regulatoren gibt es jedoch nicht. Jeder der bislang charakterisierten MarR-Regulatoren bindet an eine für ihn spezifische Bindebox, dabei kann es sowohl Unterschiede in der Länge der *repeat*-Seiten geben, als auch im Abstand zwischen beiden *repeats*. Außerdem können die Halbseiten auf dem gleichen DNA-Strang liegen oder auf dem Gegenstrang (Wilkinson und Grove, 2006). Eine beispielhafte Übersicht einiger MarR-Regulatoren ist in Tabelle II im Anhang dargestellt.

Anhand der Kristallstrukturen einiger MarRs wurde der wahrscheinliche Regulationsmechanismus der MarR-Regulatoren abgeleitet. Allen bislang bekannten MarRs gemeinsam ist die Tatsache, dass sie mit jeweils einem Protomer des Homodimers an eine Halbseite des *inverted repeats* der DNA binden. Dafür

nutzen sie ihr wHTH-Motiv. Die  $\alpha_4$  Helix fungiert als DNA-Erkennungs-Domäne und ragt in die *major groove* der DNA und stellt teilweise direkte Verbindungen zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz her, während der  $\beta$ -*hairpin*, bestehend aus den zueinander antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) mit einem dazwischen liegendem *wing*, in die *minor groove* der DNA ragt und dort eher unspezifische Interaktionen eingeht. Sequenz-Alignments haben gezeigt, dass besonders das wHTH-Motiv sehr konserviert ist, weshalb der Mechanismus der DNA-Bindung vermutlich bei den meisten MarR-Regulatoren wie beschrieben abläuft (Birukou et al., 2014; Perera und Grove, 2010; Wilkinson und Grove, 2006). In Abbildung 4 sind die Kristallstrukturen einiger MarR-Regulatoren im Vergleich zur theoretischen Struktur von RdhR1456 aus *D. mccartyi* Stamm CBDB1 dargestellt.

(A)

Sequenz-Identität (%)	Strukturähnlichkeit (%)	Ähnliches Protein	Gennummer	Organismus	Literatur
16	80	CouR (5CYV)	RHA1_ro05125	<i>Rhodococcus rostrii</i> RHA1	Otani et al, 2016
13	79	PcaV (4FHT)	SCO6704	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Davis et al., 2013
17	79	HucR-Mutante (5DD8A)	DR_1159	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Deochand et al., 2016
19	77	CD1569 (3NQOB)	CD630_15690	<i>Clostridium difficile</i>	JCSG, 2010
13	76	SAR2349 (4EM2)	SAR2349	<i>Staphylococcus aureus</i>	Chang et al., 2013

(B)

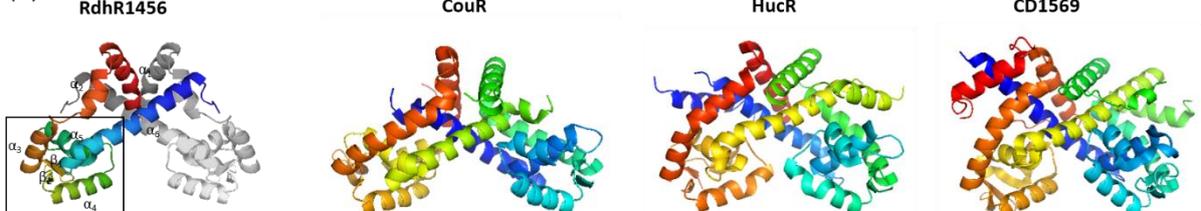


Abbildung 4. RdhR1456 und dessen homologe MarR-Proteine. Dargestellt ist in (A) eine tabellarische Übersicht zu RdhR1456 homologen MarR-Proteinen und deren Dimer-Kristallstrukturen im Vergleich zur theoretischen Kristallstruktur von RdhR1456 (B). Rot entspricht dem N-Terminus der Proteine, blau dem C-Terminus. Die sechs  $\alpha$ -Helices sind am Beispiel von RdhR1456 nummeriert ( $\alpha_{1-6}$ ). Die zwei  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_{1-2}$ ) bilden zusammen mit der  $\alpha_3$  und  $\alpha_4$  das wHTH-Motiv als die theoretische DNA-Bindedomäne (umrahmt). Die 3D-Struktur von RdhR1456 wurde mit Hilfe von Phyre<sup>2</sup> und dem Template-Protein AbsC aus *Streptomyces coelicolor* erstellt.

MarR-Regulatoren fungieren meist als Repressoren, wobei aber auch Beispiele für Aktivatoren und sogar für Regulatoren mit einer kombinierten Funktion bekannt sind. So z. B. fungiert OhrR je nach Oxidationszustand als Aktivator oder Repressor für seine Zielgene (Oh et al., 2007). SlyA und PenR/PenT hingegen sind ausschließlich Aktivatoren für ihre Zielgene und rekrutieren die RNA-Polymerase (Stapleton et al., 2002; Zhu et al., 2013). Als Repressoren blockieren MarR-Regulatoren durch ihre Bindung an eine *inverted repeat-Region* im Promoterbereich, die Rekrutierung der RNA-Polymerase und verhindern die Elongation (Wilkinson und Grove, 2004; Galan et al., 2003; Perera und Grove, 2010). Mehr als die Hälfte der MarR-Regulatoren sind autoreguliert (Wilkinson und Grove, 2006), was zumeist damit zusammenhängt, dass sie oft divergent zum *Target-Gen* auf dem DNA-Folgestrang kodiert sind und ihre Promoterregion mit der der Zielgene überlappt. Eine Lokalisierung innerhalb des regulierten Operons ist allerdings auch möglich (MarR) (Martin und Rosner, 1995).

Darüber hinaus sind auch Beispiele von MarRs bekannt, die nicht in direkter Nachbarschaft zu ihren Zielgenen kodiert sind und eher global regulieren (SarZ aus *Staphylococcus aureus* (Poor et al., 2009)).

Die Bindung eines Liganden bewirkt die Dissoziation des MarRs von der DNA. Dies geht bei den meisten MarR-Regulatoren mit einer Konformationsänderung einher. Bei SlyA und PcaV z. B. findet nach der Ligandenbindung eine Rotation des wHTH-Motivs zur Dimerisierungsdomäne statt, dadurch kann das DNA-Bindemotiv nicht mehr mit der DNA-Bindedomäne interagieren und SlyA bzw. RovA lösen sich von der DNA (Davis et al., 2013; Dolan et al., 2011). Eine Ausnahme bildet der erst kürzlich charakterisierte Regulator CouR aus *Rhodococcus jostii* RHA1. Durch die Bindung von p-Coumaroyl-CoA kommt es ebenfalls zur Dissoziation von der DNA, dies erfolgt aber nicht durch eine Konformationsänderung von CouR, sondern durch eine Ladungsabstoßung von der DNA, welche durch den in die DNA-Bindedomäne ragenden CoA-Rest des Liganden erzeugt wird (Otani et al., 2016). Die Art des Liganden steht meist im direkten Zusammenhang mit der Funktion der Gene, die der betreffende MarR reguliert. Bei der Regulation des Katabolismus fungieren oft Stoffwechselprodukte oder Zwischenstufen als Liganden (PcaV, PenR, HucR siehe Tabelle II im Anhang). Für MarRs hingegen, die Virulenzgene regulieren oder Resistenz gegenüber oxidativem Stress besitzen, handelt es sich bei den Liganden oft um Antibiotika oder Umwelteinflüsse wie ROS oder Temperatur (EmrR, TcaR, MarR, RovA, MexR siehe Tabelle II im Anhang).

## 1.6 MARR-REGULATOREN IN *DEHALOCOCCOIDES MCCARTYI*

Zu MarR-Regulatoren in *D. mccartyi* gibt es bisher kaum Studien. Lediglich ihre enge Assoziation zu den *rdhAB*-Genen und die Expression von *marR*-Genen in *D. mccartyi* CBDB1 und DCMB5 unter Wachstumsbedingungen mit HCB und 1,2,3-TCB (Marlen Pöritz et al., 2015; Schiffmann et al., 2013) lassen vorsichtige Vermutungen zu. MarR-Regulatoren in *D. mccartyi* werden somit unter gleichen Bedingungen wie RdhABs exprimiert. Wagner (2009) wies *in vitro* die Bindung des MarR-Regulators RdhR1625 (ehemals CbdbA1625) aus *D. mccartyi* CBDB1 an die intergene Region zwischen dem *rdhA*-Gen *rdhA1624* und dem *marR*-Gen *rdhR1625* mit Hilfe von Gelretentionsanalysen mit einem gereinigtem RdhR1625 Protein als *Streptag*-Fusionsprotein nach.

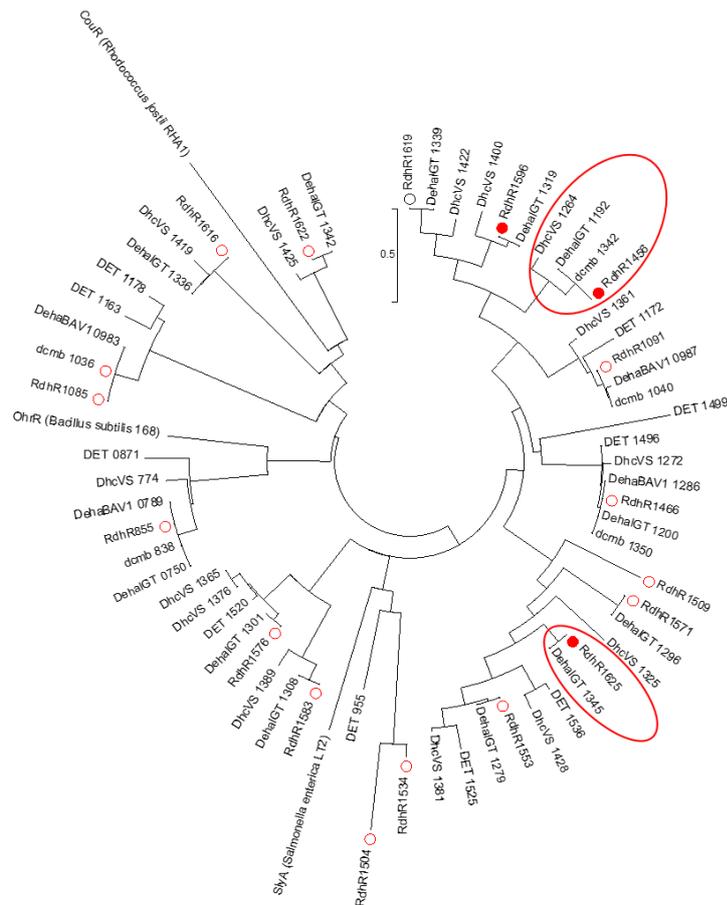


Abbildung 5. Stammbaum der MarR-Regulatoren in *D. mccartyi* Stämmen. DNA-Sequenz-Alignment wurde mit CLUSTALW durchgeführt. Der Stammbaum wurde in MEGA6 mit Hilfe der neighbour-joining Methode erstellt. Die Skala entspricht einer Sequenzidentität von 50 %. MarR-Regulatoren aus CBDB1 sind mit roten Punkten markiert. RdhR1625 und rdhR1456 mit ihren orthologen marR-Genen in anderen *D. mccartyi* Stämmen sind rot hervorgehoben.

Vergleicht man die MarR-Regulatoren verschiedener *D. mccartyi* Stämme miteinander, so wird deutlich, dass sie z. T. eine ähnliche Orthologie aufweisen, wie die jeweils assoziierten RdhAs (Abbildung VI im Anhang). Beispielsweise besitzt der MarR RdhR1456 (CbdbA1456) die orthologen MarRs Dcemb\_1342 und DhcVS\_1264 in DCMB5 und VS (Abbildung 5). Die dazugehörige RdhA RdhA1455 (CbdbA1455) hat die orthologen RdhAs in Dcemb\_1341 in DCMB5 und DhcVS\_1263 in VS (Abbildung VI im Anhang). Ähnlich verhält es sich auch mit anderen MarRs und RdhAs. Jedoch gibt es auch Ausnahmen. So sind die bereits erwähnten *rdhA*-Gene *rdhA1624* und *rdhA1453* Paraloge in CBDB1. Degegen liegen die genomisch assoziierten MarR-Gene *rdhR1456* und *rdhR1625* in unterschiedlichen phylogenetischen Clustern (Abbildung 5). Trotz der genannten Ausnahmen scheint es evolutionär eine gekoppelte Entwicklung der meisten *rdhA*-Gene mit ihren dazugehörigen Regulatorgenen gegeben zu haben, wie es auch für die meisten *rdhA* und *rdhB*-Gene beobachtet wurde (Kube et al., 2005). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Erhaltung der Assoziation essentiell für das Überleben der Spezies ist. McMurdie et al. (2009) beschreiben die Entstehung orthologer *rdhA*-Gene durch vertikale Vererbung von einem gemeinsamen Vorfahr und durch horizontalen

Gentransfer, wobei ganze Gencluster zwischen verschiedenen Stämmen ausgetauscht wurden. Paraloge Gene wie *rdhA1453* und *rdhA1624* entstanden vermutlich durch Rekombinationsereignisse innerhalb eines Stammes. Dabei erfolgte scheinbar auch die Loslösung der Assoziation mit dem MarR-Regulator. Eine Untersuchung des Operons bestehend aus *rdhA1453* und *rdhA1455* mit dem assoziierten *rdhR1456* im Zusammenhang mit *rdhA1624* und dem assoziierten Regulator *rdhR1625* würde Aufschluss über die Regulation in *D. mccartyi* durch MarR-Regulatoren liefern. Zum einen würde man erfahren, wie spezifisch die MarRs für ihre Zielgene sind, ob sie mehrere Zielgene besitzen und ob ähnliche *rdhAs* von gleichen MarRs reguliert werden. Zum anderen würde man eventuell erfahren, welche Rolle die Substrate von CBDB1 bei der Regulation durch MarRs spielen.

## 1.7 ZIELSTELLUNG

Um das Verständnis für die molekularen Mechanismen der OHR zu erweitern, wurde im Rahmen dieser Dissertation die Regulation der OHR durch MarR-Regulatoren untersucht. Da sich in vorherigen Arbeiten die Gene *rdhA1624* und *rdhA1453* aufgrund ihrer differentiellen Transkription auf TCBs als interessant herausstellten, steht ihre Regulation durch die in Nachbarschaft kodierten MarR-Regulatoren RdhR1625 und RdhR1456 im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ein weiterer, zu RdhR1456 orthologer MarR-Regulator, RdhR1596, wurde zusätzlich in die Untersuchungen einbezogen. Für eine physiologische und biochemische Charakterisierung sollte die Regulation sowohl *in vivo* im heterologen *E. coli* als auch mittels *in vitro* Studien analysiert werden. Die MarR-Regulatoren aus CBDB1 sollten hinsichtlich ihrer DNA-Bindung und Ligandenspezifität charakterisiert werden. Um Hinweise auf eine gemeinsame Transkription zu gewinnen, war ein weiterer Aspekt die Identifizierung der Promoterbereiche der *rdhA*- und *marR*-Gene und die Transkriptionsanalyse der Gene im Verlauf der Dechlorierung. Des Weiteren sollte eine erste Analyse der Wechselwirkung weiterer MarR-Regulatoren aus *D. mccartyi* mit den untersuchten Promoterbereichen erfolgen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 CHEMIKALIEN UND GASE

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Konzernen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), VWR (Darmstadt) sowie Biozym (Oldendorf) in den Reinheitsgraden *purum* oder höher bezogen. Die genutzten Gase wurden in den Reinheitsgraden 4.0 und 5.0 von Westfalen (Münster) geliefert.

### 2.2 VERWENDETE ORGANISMEN, PLASMIDE UND PHAGEN

#### 2.2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit genutzten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1	Wildtyp	Adrian <i>et al.</i> (2000)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1 supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F' proAB, lacIqZΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> MC4100ara <sup>R</sup> <sub>a</sub>	F [araD139] <sub>B/r</sub> $\Delta(argF-lac)$ 169* & lambda- e14- <i>flhD5301</i> $\Delta(fruK-yeiR)$ 725 ( <i>fruA25</i> ) <sup>†</sup> <i>relA1</i> <i>rpsL150</i> (str <sup>R</sup> ) <i>rbsR22</i> $\Delta(fimB-fimE)$ 632(::IS1) <i>deoC1</i>	Casadaban und Cohen (1979); Berthelmann und Brüser (2004)
<i>Escherichia coli</i> MC1061	F $\Delta(ara-leu)$ 7697 [araD139] <sub>B/r</sub> $\Delta(codB-lacI)$ 3 <i>galk16 galE15</i> $\lambda^-$ e14- <i>mcrA0 relA1 rpsL150</i> (strR) <i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r <sup>m+</sup> )	Casadaban <i>et al.</i> (1980)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	F <i>ompT hsdSB</i> (RB- mB-) <i>gal dcm</i> $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) <i>pLysSRARE</i> (CmR)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> LS4	MC4100ara $\lambda$ RS_ <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS5	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1625-14	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS9	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1453	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS13	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1624	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS15	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1625	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS20	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1455	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS21	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1456	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS22	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1598	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> LS23	MC4100ara $\lambda$ RS_ P1455-23	Diese Arbeit

a Arabinosetoleranz

## 2.2.2 Plasmide

In Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide aufgelistet. Die *marR*-Regulatorgene wurden mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme gerichtet in das pBAD30 Plasmid kloniert. Die jeweiligen verwendeten Restriktionsstellen sind mit aufgeführt. Die Klonierung der intergenen Regionen (IR) in pRS551 erfolgte ausschließlich in die BamHI Restriktionsstelle. Dadurch wurde eine Promoter-*lacZ*-Fusion erzeugt. Die Klonierungen in die pASKIBA-Vektoren fanden über die BsaI Restriktionsstelle statt. Für die gerichtete Insertion von Sequenzen in den pACYC184 Vektor wurde die Restriktionsstelle Sall verwendet, während eine Insertion in pJET1.2 ungerichtet über *blunt-ends* in die *multiple cloning site* (MCS) stattfand.

Tabelle 2. Verwendete Plasmide

Plasmidbezeichnung	Resistenz	Insert (ggf. Sequenzposition im Genom von Stamm CBDB1)	Referenz
pBAD30	Amp <sup>R</sup>	Kein Insert	Guzman et al. (1995)
pBAD1091	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1091 (885119-885580 bp) kloniert in die EcoRI/Sall Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1456A	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1456A (1149998-1150588 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1456AStopA	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1456A (Punktmutation T→A, 1149999 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1456B	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1456B (1150076-1150588 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1456BStopB	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1456B (Punktmutation AT→TA, 1150076/7 bp ) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1504 <sup>a</sup>	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1504 (1191289-1191783 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1509	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1509 (1195021-1195560 bp) kloniert in die HindIII/Sall Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1534	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1534 (1221553-1222041 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1553	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1553 (1241686-1242198 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1571	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1571 (1259380-1259886 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1576	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1576 (1265283-1265759 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1583	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1583 (1272454-1271979 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1596	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1596 (1285081-1285596 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1619	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1619 (1311430-1311954 bp) kloniert in die EcoRI/Sall Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD1625	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1625 (1318637-1319125 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	Wagner et al. (2013)
pBAD1625sala	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1625 (1318637-1319125 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktion Stelle von pBAD30; Punktmutation an Position 1318785/6 bp TG→GC	diese Arbeit
pBAD1625_SD	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1625 ( 1318627-1319125 bp) mit vorgeschaltetem AGG kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD30	diese Arbeit
pBAD24_1625	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1625 (1318637-1319125 bp) kloniert in die EcoRI/HindIII Restriktionsstelle von pBAD24	diese Arbeit
pRS551	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Kein Insert	Simons et al. (1987)

<b>pP1453-lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	IR von cbdbA1454-53(1148221-1147516 bp) kloniert in pRS551, P <sub>1453</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1455-lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	IR von cbdbA1456-55 (1150075-1149746 bp) kloniert in pRS551, P <sub>1455</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1456-lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	IR von cbdbA1455-56 (1149746-1150075 bp) kloniert in pRS551, P <sub>1456</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1598-lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	IR von cbdbA1599-98 (1287902-1287451 bp) kloniert in pRS551, P <sub>1598</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1624-lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	IR von cbdbA1625-24 (1318636-1318391 bp) kloniert in pRS551, P <sub>1624</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1625-lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	IR von cbdbA1624-25 (1318391-1318636) kloniert in pRS551, P <sub>1625</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1455 Δdr -lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Intergene Region von cbdbA1456-55Δdr (1150075-1149746 bp, Deletion von 1149855-1149877 bp) kloniert in die BamIII Restriktionsstelle, P <sub>1455</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1455 ΔdrQ -lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Intergene Region von cbdbA1456-55Δdr (1150075-1149746 bp, Deletion von 1149855-1149877 bp, Insertion von GTA) kloniert in die BamIII Restriktionsstelle, P <sub>1455</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pP1455 ΔdrQ2 -lacZ</b>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Intergene Region von cbdbA1456-55Δdr (1150075-1149746 bp, Deletion von 1149855-1149877 bp, Insertion von GTATAC) kloniert in die BamIII Restriktionsstelle, P <sub>1455</sub> ::lacZ Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>pCBDBA1453</b>	Amp <sup>R</sup>	Partialsequenz von cbdbA1453 (1146531-1146698 bp) kloniert in pGEM	Wagner et al. (2009)
<b>pCBDBA1455</b>	Amp <sup>R</sup>	Partialsequenz von cbdbA1455 (1150527-1148978 bp) kloniert in pJet1.2	diese Arbeit
<b>pCBDBA1456</b>	Amp <sup>R</sup>	Partialsequenz von cbdbA1456 (1150251-1150405 bp), kloniert in pJET1.2	diese Arbeit
<b>pASKIBA3_1456</b>	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1456 (1150076-1150588 bp) kloniert in die BsaI Restriktionsstelle von pASKIBA-3	diese Arbeit
<b>pASKIBA7_1456</b>	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1456 (1150076-1150588 bp) kloniert in die BsaI Restriktionsstelle von pASKIBA-7	diese Arbeit
<b>pASKIBA3_1596</b>	Amp <sup>R</sup>	cbdbA1596 (1285082-1285594 bp) kloniert in die BsaI Restriktionsstelle von pASKIBA-3	diese Arbeit
<b>pACYC_LS13</b>	Cm <sup>R</sup>	P1624::lacZ Promoter-Fusion aus pRS551 umklontiert in die Sall Restriktionsstelle von pACYC184 downstream vom tet-Promoter	diese Arbeit

<sup>a</sup> nach Reannotation von Schiffmann et al. (2013) ORF zwischen cbdbA1503 und cbdbA1505

### 2.2.3 Phagen

In Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Phagen aufgeführt.

Tabelle 3. Verwendete Phagen

Phage	Genotyp	Referenz
<b>λ RS_lacZ</b>	RS45 ( <i>lacZ</i> )	Wagner et al. (2013)
<b>λ RS_P1453</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1453</sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1453- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>λ RS_P1455</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1455</sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1455- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>λ RS_P1456</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1456</sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1456- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>λ RS_P1455Δr</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1455-<i>r</i></sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1455Δr- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>λ RS_P1598</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1598</sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1598- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	diese Arbeit
<b>λ RS_P1624</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1624</sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1624- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	Wagner et al. (2013)
<b>λ RS_P1625</b>	RS45 ( <i>P</i> <sub>1625</sub> :: <i>lacZ</i> ), cbdbA1625- <i>lacZ</i> Promoter Fusion	diese Arbeit

## 2.3 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.3.1 Kultivierung von *D. mccartyi*

Die strikt anaerobe Anzucht von *D. mccartyi* fand im CBDB1-Minimalmedium statt. Die Verfolgung der Zellzunahme wurde mikroskopisch vorgenommen. Die Dechlorierungs-Aktivität der Kulturen wurde mittels Chloridfreisetzung (2.6.1.1) für Langzeitkultivierungen und mittels gaschromatographischen Untersuchungen (2.6.1.2) für Kurzzeitexperimente überprüft.

#### 2.3.1.1 CBDB1-Minimalmedium

Das CBDB1-Minimalmedium für die anaerobe Kultivierung von *D. mccartyi* Stämmen setzte sich aus den in Tabelle 4 aufgeführten Komponenten zusammen.

Tabelle 4. Zusammensetzung CBDB1-Minimalmedium

Komponente	Endkonzentration
Natriumacetat	5 mM
Mineralsalzlösung	20 ml/l
Spurenelementelösung SL 9	10 ml/l
Resazurinlösung 0,1 %	0,05 ‰
Na <sub>2</sub> S (100 mM)	0,1 mM
Vitaminlösung (sterilfiltriert)	1 ml/l
NaHCO <sub>3</sub> (1 M)	10 ...13 mM
Ti-(III)-citrat (sterilfiltriert) (100 mM)	1,3...2 mM

Für die Herstellung von 1 l CBDB1-Minimalmedium wurde 1 l doppelt ionisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) in dreifacher Wiederholung auf 100 °C erhitzt. Während dessen erfolgte eine zehninütige Begasung einer leeren 1 l Serumflasche mit Stickstoff (4.0). Nach Zugabe des Natriumacetats als Feststoff wurden 900 ml des heißen Wassers unter Begasung eingefüllt. Das Medium wurde mit der Mineralsalzlösung und der Spurenelementelösung SL9 ergänzt, auf 1 l mit restlichem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und unter weiterer Begasung auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Zugabe von 200 µl Resazurin (1 % (v/v)) wurde die Flasche verschlossen und einer weiteren zehninütigen Schornsteinbegasung des Mediums, gefolgt von einer zehninütigen Schornsteinbegasung des Gasraumes, unterzogen. Abschließend wurde 1 ml einer 100 mM frisch hergestellten anaeroben Natriumsulfid-Lösung mittels Spritze hinzugegeben. Eine Sterilisation bei 121 °C für 20 min schloss sich an. Für Kultivierungen ab einer Größe von 150 ml erfolgte vor der Sterilisation eine anaerobe Umfüllung des Mediums in vorgesehene Kultivierungsgefäße. Nach der Sterilisation sollte das Medium auf Grund der Reduktionswirkung von Na<sub>2</sub>S farblos sein. Das

abgekühlte sterile Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,0 mittels anaerober steriler Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 M) eingestellt und mit steriler Vitaminlösung komplettiert. Für Kultivierungen ab 150 ml Kulturvolumina wurde das sterile Medium unter Stickstoffbegasung in die vorgesehenen sterilen Kulturgefäße portioniert abgefüllt und der Gasraum einer 20 minütigen Stickstoffbegasung unterzogen. Zur Gewährleistung eines Redoxpotentials unter -302 mV (Jones und Pickard, 1980) erfolgte vor Inokulation mit CBDB1 Zellen, die Zugabe von anaerobem sterilem Titan(III)-citrat in einer Endkonzentration von 1,3-2 mM.

#### 2.3.1.2 **Langzeitkultivierung von CBDB1 (Zweiflüssigphasenkulturen)**

Der *D. mccartyi* Stamm CBDB1 wurde für eine Langzeitkultivierung als Zweiflüssigphasenkulturen im CBDB1-Minimalmedium angezogen. Das Zweiflüssigphasenmedium setzte sich dabei aus CBDB1-Minimalmedium und 2,5 % (v/v) einer darüber geschichteten Hexadekanphase zusammen. Die Hexadekanphase beinhaltete den Elektronenakzeptor 1,2,3-TCB oder 1,2,4-TCB, so dass eine nominale Endkonzentration von 10 mM im Medium erreicht wurde. Die Zweiflüssigphasenkulturen wurden 1 % (v/v) aus einer Vorkultur mit einer Zellzahl von ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml inokuliert. Die Inokulation erfolgte anaerob mittels Spritzen. Aus den Spritzen wurde der Sauerstoff vorher weitgehend durch Spülen mit einer anoxischen Titan(III)-citrat-Lösung (10 mM) entfernt. Durch den Verbleib eines Titan(III)-citrat-Rests in der Kanüle der Spritze wurde ein Transfer der CBDB1-Vorkultur in das neue Medium unter reduzierten Bedingungen gewährleistet. Um neben Acetat auch  $\text{CO}_2$  als Kohlenstoffquelle für CBDB1 zur Verfügung zu stellen, schloss sich eine 10 minütige Schornsteinbegasung mit Protadur (80 %  $\text{N}_2$ , 20 %  $\text{CO}_2$ ) an. Bevor die Kultivierung bei 30°C, abgedunkelt und stehend für mindestens zwei Wochen erfolgte, wurde der Elektronendonator  $\text{H}_2$  ergänzend im Überschuss (0,3 bar Überdruck) hinzugegeben.

#### 2.3.1.3 **Kurzzeitkultivierung von CBDB1**

Für Kurzzeitexperimente wurde das CBDB1-Minimalmedium 10 %ig (v/v) aus einer Zweiflüssigphasenkultur ( $1 \times 10^8$  Zellen/ml) inokuliert und ohne weitere Zugabe eines Elektronenakzeptors und -donors 72 h einer Hungerphase unterzogen. Zum Starten des Experiments wurde der zu untersuchende Elektronenakzeptor in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  aus einer 0,5 M Acetonstammlösung hinzugefügt und mit  $\text{H}_2$  als Elektronendonator im Überschuss ergänzt. Für einige Transkriptionsanalysen erfolgte alternativ eine zweistufige Hungerphase bestehend aus einer 72-stündigen Phase ohne Zugabe eines Elektronendonators und Akzeptors. Im nächsten Schritt erfolgte eine einstündige Schornsteinbegasung mit Protadur (20 % (v/v)  $\text{CO}_2$ , 80 % (v/v)  $\text{N}_2$ ) um den restlichen

Wasserstoff zu entfernen. Danach schloss sich die 2. Hungerphase (24 h) an. Zum Starten des Experiments wurde der zu untersuchende Elektronenakzeptor wie oben beschrieben hinzugefügt. H<sub>2</sub> als Elektronendonator wurde hingegen in verschiedenen Konzentrationen (0 µM, 10 µM, 20 µM oder im Überschuss) ergänzt.

#### 2.3.1.4 Mikroskopische Zellzahlbestimmung von *D. mccartyi*

Zur Überprüfung des Wachstums von CBDB1 erfolgte eine mikroskopische Zellzahlbestimmung. Eine Probe (20 µl) der Zellkultur wurde mit 20 µl einer DAPI-Lösung (4,6-Diamidin-2-phenylindol; 5 µg/ml) gemischt und 2 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellzahlbestimmung fand mit 20 µl dieses Gemisches am Fluoreszenzmikroskop Axioskop (Zeiss, Jena) bei einer 1.000 fachen Vergrößerung statt. Um die Zellen zu fixieren, wurden sie vor der Mikroskopie auf Objektträger, die mit 2 % (w/v) Agarose beschichtet waren, gebracht. Da DAPI in die chromosomale DNA interkaliert, erscheinen die Zellen im Fluoreszenzlicht (Filter 4879-01) blau. Zur Überprüfung auf Reinheit der Kulturen, erfolgte neben der Fluoreszenzmikroskopie parallel immer auch eine Mikroskopie im Hellfeld. Anhand von jeweils fünf definierten Ausschnitten je Probe wurde auf die Zellzahl in 1 ml Kultur geschlossen. Die Berechnung ist im Folgenden dargestellt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = n \times \left( \frac{\text{Fläche des Deckglases}}{\text{Auszählfläche}} \times \text{Verdünnungsfaktor} (10 \mu\text{l mikroskopierte Probe}) \right)$$

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{400\text{mm}^2}{0,00603\text{mm}^2} \times 100 = n \times 6633500$$

$$n = \text{Zellzahl}/\text{Ausschnitt}$$

#### 2.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli* Stämmen

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden in den im Folgenden erläuterten Medien kultiviert. Die Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, vor Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Temperatursensitive Zusätze, wie Antibiotika, wurden im Anschluss steril hinzugefügt. Folgende Antibiotika kamen in den entsprechenden Endkonzentrationen zur Anwendung.

Ampicillin (Amp)	125 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	25 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	12,5 µg/ml

### 2.3.2.1 *LB-Medium/Agar*

Zur Kultivierung von *E. coli* Stämmen dienten vorrangig das LB-Medium und der LB-Agar nach Sambrook et al. (1989), welche sich wie folgt zusammensetzen.

Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Natriumchlorid	1 % (w/v)
[z. T. Glukose	0,4 % (w/v)]
[Agar Agar	1,5 % (w/v)]
[z. T. Natriumpyrophosphat	2,5 mM]

Natriumpyrophosphat wurde dem LB-Agar nach einer Lambda-Phagentransduktion (2.4.8.2) zur Stabilisierung der Zellen hinzugefügt.

### 2.3.2.2 *McConkey-Agar*

Zur Herstellung von McConkey-Agarplatten kam McConkey Agar von Difco (Franklin Lake, USA) zur Anwendung. Die Fertigung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.3.2.3 *TGYEP-Medium*

Zur Herstellung des TGYEP-Mediums kamen folgende Chemikalien zum Einsatz.

Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Kaliumphosphatpuffer (pH7)	100 mM
Glucose (sterilfiltriert)	0,4 % (w/v)

Der Kaliumphosphatpuffer und die Glukose wurden separat sterilisiert und dem sterilen Medium vor der Kultivierung hinzugefügt.

#### 2.3.2.4 *SOC-Medium*

Das SOC-Medium nach Hanahan (1983) wurde ohne Zugabe von Magnesium-Ionen und Glukose hergestellt und autoklaviert. Die Magnesium-Ionen und die Glukose wurden im Anschluss aus separat sterilisierten Stammlösungen vor Verwendung hinzugegeben. Die Lagerung des SOC-Mediums fand bis zur Verwendung bei 4 °C statt.

Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Natriumchlorid	0,06 % (w/v) (10 mM)
Kaliumchlorid	0,02 % (w/v) (2,5 mM)
Magnesiumchlorid	0,095 % (w/v) (w/v) (10 mM)
Magnesiumsulfat	0,12 % (w/v) (10 mM)
Glucose	0,36 % (w/v) (20 mM)

## 2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus CBDB1

Zur Gewinnung der genomischen DNA aus CBDB1 wurde mindestens 1 ml Zellkultur pelletiert (20 min,  $10.136 \times g$ , RT). Aus dem Zellpellet wurde anschließend mittels DNA Extraktions-Kit NucleoSpin<sup>®</sup>Tissue (MACHEREY-NAGEL, Düren) nach Herstellerangaben die DNA extrahiert. Die erhaltene genomische DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer eluiert und fungierte als *template* für die Ermittlung der Genkopienzahl in den Transkriptionsexperimenten bzw. als *template* für Klonierungen.

### 2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. mccartyi* und *E. coli*

Für die Transkriptionsexperimente wurden jeweils 45 ml bzw. nach einer Optimierung 2 ml der Versuchskulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit den Elektronenakzeptoren 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB geerntet. Bei Verwendung der RNA für Transkriptionsstartuntersuchungen wurden 150 ml CBDB1-Zellkultur und 10 ml einer *E. coli*-Zellkultur ( $OD_{600} = 0,2$ ) pelletiert. Die Zellen wurden in sterilen 50 ml Greiner-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) bei 4 °C pelletiert (45 min,  $3.500 \times g$ ). Der

Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen. Die verbleibende aufkonzentrierte Zellsuspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut bei 4 °C pelletiert (30 min,  $8.377 \times g$ ). Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus der aufkonzentrierten Zellsuspension erfolgte mittels *Total RNA-Purification Kit* (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia, Polen) nach Herstellerangaben. Die extrahierte RNA wurde in 100 µl mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem Wasser eluiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde vor der weiteren Verwendung von restlicher DNA befreit. Dies erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit der RNase freien DNase I (NEB, Ipswich, USA) bei 37 °C. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist im Folgenden aufgeführt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 2,5 mM EDTA bei 70 °C für 10 min abgestoppt.

Gesamt-RNA (CBDB1 oder <i>E. coli</i> )	25 µl
DNase I (2U/µl)	2 µl
10x DNase I Puffer	3 µl
EDTA (25 mM)	3 µl

Der Erfolg des DNase-Verdau wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion mit der sensitiven *HotStartTaqPlus* DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) und den entsprechenden spezifischen Primern für das zu untersuchenden Transkript überprüft. Als *template* diente dabei eine 1:4 Verdünnung der DNase I verdauten RNA und als Positivkontrolle fungierte genomische DNA von CBDB1 bzw. *E. coli*.

### 2.4.3 Reverse Transkription

Die gereinigte und von DNA-Rückständen befreite RNA wurde mit Hilfe des „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Scientific, Darmstadt) in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR erfolgte dabei nach Herstellerangaben unter Verwendung von Random-Hexamer-Primer. Die erhaltene cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert und in einer 1:2 Verdünnung für die Transkriptionsexperimente mittels RT-PCR und RTqPCR als *template* eingesetzt.

### 2.4.4 5`RACE

RNA, die für Transkriptionsstartbestimmungen mittels 5`RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) bestimmt war, wurde im Anschluss an einen DNase I Verdau mit dem dafür vorgesehenen 5`RACE Kit (Roche, Mannheim) bearbeitet. Die Bearbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA (von CBDB1 jeweils 100 µg, von *E. coli* jeweils 1 µg) wurde zunächst mittels genspezifischem SP1-Primer (siehe

Tabelle III im Anhang) in cDNA umgeschrieben. An diese so gewonnene genspezifische cDNA wurde ein PolydT-*tail* am 5'-Ende synthetisiert. Die cDNA wurde gereinigt und mittels *nested*-PCR mit PolydT-Primer und genspezifischem SP2-Primer unter Verwendung der hoch sensitiven *HotStartTaqPlus*-DNA-Polymerase vervielfältigt. Eine weitere *nested*-PCR mit Hilfe von genspezifischen SP3 Primer und einem *Oligo-dT-Anchorprimer* gewährleistete die Vervielfältigung der cDNA in ausreichender Menge um die erhaltene DNA in den Vektor pJET1.2 zu klonieren oder direkt zu sequenzieren. Anhand der Abbruchstelle der Sequenzierung vor einem Poly-A Ende wurde der basengenaue Transkriptionsstartpunkt der jeweiligen Gene ermittelt.

#### 2.4.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um aus *E. coli* Zellen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das Zellpellet von 5-15 ml einer im LB Medium kultivierten Übernachtskultur verwendet. Die Plasmid-Isolation fand mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Darmstadt) nach Herstellerangaben statt. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die meisten molekularbiologischen Untersuchungen war eine Vervielfältigung der DNA der zu untersuchenden Genregionen erforderlich. Dafür wurde sich die bewährte Methode der PCR (*polymerase chain reaction*; Mullis *et al.*, 1992) zu Nutze gemacht. Die Amplifikation der *Template*-DNA fand in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in Thermocyclern (Primus 25 oder Primus 96 advanced®, Peqlab, Erlangen) statt.

Tabelle 5. Zusammenfassung von PCR-Reaktionsansätzen mit verschiedenen DNA-Polymerasen

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	Velocity™-DNA-Polymerase	„HausTaq-DNA-Polymerase“	DreamTaq DNA-Polymerase	HotStartTaq-Plus-DNA-Polymerase
eingesetztes Volumen in µl						
Reaktionspuffer	10× 5×(Hi-Fi)	1× 1 x	/ 10	2 /	5 /	2 /
dNTPs	2,5 mM	200 µM	4	1,6	4	1,6
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5...3mM	/	/	/	0...1,2
Primer <i>forward</i>	5 µM	0,210 µM	2,1	0,8	2,1	0,8
Primer <i>reverse</i>	5 µM	0,210 µM	2,1	0,8	2,1	0,8
<i>template</i>			1	1	1	1
Polymerase	2 U/µl 5 U/µl	1 U/50 µl 1,25 U/50 µl	0,5 /	0,2 /	/ 0,25	/ 0,1
ddH <sub>2</sub> O			ad 50	ad 20	ad 50	ad 20

In den Tabellen 5 und 6 sind die verschiedenen genutzten PCR-Reaktionsansätze, Polymerasen und Programme zusammengefasst. Die verwendeten Oligonukleotide als genspezifische Primer wurden von Metabion (Martinsried) bezogen und sind in Tabelle III im Anhang zusammengefasst.

Tabelle 6. Temperatur-Programme für die PCR mit verschiedenen DNA-Polymerasen

Programmschritt	Verwendete Polymerasen			
	<i>Velocity</i> -PCR	<i>HausTaq</i> -PCR	<i>DreamTaq</i> -PCR	<i>HotStartTaqPlus</i> -PCR
<b>Initiale Denaturierung</b>	98 °C	94 °C	95 °C	95 °C
	2 min	3 min	3 min	5 min
<b>Denaturierung</b>	96 °C	94 °C	94 °C	94 °C
	30 sek	30 sek	30 sek	30 sek
<b>Annealing</b>	46-62 °C	46-62 °C	52 °C	46-58 °C
	30 sek	30 sek	30 sek	30 sek
<b>Extension</b>	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C
	15 sek/kb	60 °sek/kb	60 sek/kb	30 sek/kb
<b>Finale Extension</b>	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C
	4 min	10 min	10 min	10 min
<b>Zyklen</b>	35	35	35	35-45

#### 2.4.6.1 *qRT-PCR*

Die Transkription von CBDB1 wurde mittels qRT-PCR untersucht. Dabei fungierte in cDNA umgeschriebene RNA als *template*. Die qR-TPCR wurde mit Hilfe der hochsensitiven HotStartTaqPlus-DNA-Polymerase durchgeführt und diente als qualitativer Nachweis für die Transkription verschiedener Genregionen in CBDB1 und als Kontrollreaktion für die cDNA-Synthese.

#### 2.4.6.2 *QuikChange Mutagenese*

Auch für die Punktmutation von Regulatorgenen wurde die Methodik der PCR angewendet. Dabei wurden 50 ng eines Plasmids mit der entsprechenden *marR*-Gensequenz als *template* genutzt. Spezielle zueinander reverskomplementäre Mutationsprimer mit einer eingefügten Punktmutation (siehe Tabelle III im Anhang) wurden für die Synthese des neuen mutagenisierten Plasmids eingesetzt. Die Primer binden an der zu mutagenisierenden Zielregion im Plasmid und werden anschließend durch eine *Extension*-Reaktion mittels *Velocity*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) nach dem *RollingCircle*-Prinzip verlängert, bis das gesamte Plasmid vervielfältigt ist. In einer anschließenden 1,5 stündigen Restriktion mit 10 U DpnI bei 37 °C wird das jeweilige Ausgangs-Plasmid (pRS551, pJET1.2 bzw. pBAD30), welches als einziges nicht mutagenisiert ist, aufgrund seines Methylierungsgrades verdaut. Die übriggebliebenen mutagenisierten Kopien des Plasmids werden in den Zielstamm transformiert

und die Mutation mittels Sequenzierung überprüft. Die Zusammensetzung und das Temperaturprogramm einer Mutagenesereaktion sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7. Zusammensetzung und Temperaturprogramm einer QuikChange-Mutagenese-Reaktion

PCR-Ansatz				Temperaturprogramm	
Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	( $\mu$ l)	Ablauf	Temperatur/ Dauer
Reaktionspuffer	5x(Hi-Fi)	1x	10	Initiale	95 °C
dNTPs	2,5 mM	200 $\mu$ M	4	Denaturierung	30 sek
Primer <i>forward</i>	8,6-9 $\mu$ M	125 ng	1	Denaturierung	95 °C
Primer <i>reverse</i>	8,6-9 $\mu$ M	125 ng	1		30 sek
<i>template</i>			1	Annealing	55-60 °C
Polymerase	2 U/ $\mu$ l	1 U	0,5		60 sek
ddH <sub>2</sub> O			ad 50	Extension	72 °C
					30 sek/kb
				Zyklen	16

#### 2.4.6.3 Agarosegelelektrophorese

Zu Analyse Zwecken von PCR-Amplifikaten, Plasmidpräparationen, Restriktions- und Ligationsansätzen wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Es wurden 0,6 bis 2 %ige (w/v) Gele verwendet. Die Herstellung erfolgte mit Agarose (Biozym Scientific, Oldendorf) und 1 x TAE (40 mM Tris-Acetat, pH 8, 1 mM EDTA), welcher auch als Laufpuffer Verwendung fand. Nach Versetzen der Proben mit 1 x DNA Ladepuffer (0,09 % (w/v) Bromphenolblau, 0,09 % (w/v) Xylenecyanol FF, 5 % (v/v) Glycerin) wurde die DNA bei 80 bis 100 V aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend in einem Ethidiumbromid-Bad (0,0001 % (v/v)) gefärbt und die DNA im UV-Licht (INTAS, Göttingen) sichtbar gemacht. Als Größenstandards fungierten je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente verschiedene DNA-Marker (1 kb-DNA Ladder, O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix ready to use, Mass Ruler Low Range DNA Ladder von Thermo Scientific oder NEB).

#### 2.4.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Um Genregionen aus *D. mccartyi* untersuchen zu können, wurden die amplifizierten DNA-Bereiche von Interesse mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und einer T4-Ligase in die verschiedensten Plasmide integriert und im Anschluss für weitere Untersuchungen in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert oder mit Hilfe von Phagen transduziert.

#### 2.4.7.1 **Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Gereinigte Amplifikate und isolierte Plasmid-DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben (Thermo Scientific, Darmstadt; NEB, Frankfurt am Main) bei 30 °C bzw. 37 °C im kleinstmöglichen Volumen (30-50 µl) geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde anschließend sofort über eine Agarosegelelektrophorese (2.4.6.3) aufgetrennt und das geschnittene DNA-Fragment mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Gel gereinigt.

Restriktionen von Plasmiden mit nur einem Enzym wurden vor der Auftrennung im Agarosegel einer Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase (CIAP) (Promega, Mannheim) unterzogen. Die Restriktion wurde dafür bei 65-80 °C für 20 min abgestoppt, anschließend mit 1 µl CIAP (1 U/µl) versetzt und bei 37 °C 1 h inkubiert.

#### 2.4.7.2 **Ligation von DNA Fragmenten**

Geschnittene und über das Agarosegel gereinigte PCR-Produkte und Vektoren wurden miteinander ligiert. Dafür wurden geschnittene, gereinigte PCR-Produkte (Inserts) und Vektoren (50 oder 100 ng) in einem individuell optimierten Verhältnis (z. B. 10:1 oder 3:1) gemischt und in 10 µl eines Ligationsansatzes eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 0,5 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) und 1 µl Ligasepuffer (10×, 10 mM ATP (Thermo Scientific, Darmstadt)) ergänzt. Die Ligation erfolgte für Klonierungen in pJET1.2 bei Raumtemperatur für 30 min. Für alle anderen Klonierungen in die Vektoren pRS551, pBAD30, pACYC184 und pASKIBA3 und pASKIBA7 wurde das nachstehende Ligationsprogramm (Tabelle 8) verwendet und im Thermocycler Primus 25 oder Primus 96 advanced® durchgeführt.

Tabelle 8. Temperaturprogramm für eine Ligation

Temperatur	Zeit
24 °C	30 min
20 °C	30 min
16 °C	30 min
12 °C	30 min
8 °C	3 min
65 °C	10 min

Die Ligationsansätze wurden im Anschluss durch eine 30-minütige Mikrodialyse entsalzt und in *E. coli* XL1 Blue transformiert.

### 2.4.8 Herstellung rekombinanter *E. coli* Stämme

Für die Herstellung rekombinanter *E. coli* Stämme kamen zum einen die Transformation von Plasmiden und zum anderen die Transduktion von DNA mittels Phagen in das Chromosom von *E. coli* MC4100ara<sup>R</sup> zum Einsatz.

#### 2.4.8.1 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation wurde entweder die Elektroporation in elektrokompetente Zellen oder die chemische Transformation in ultrakompetente Zellen verwendet. Des Weiteren wurden aus *E. coli* XL1 Blue gereinigte Plasmide über eine TSS-Transformation in andere *E. coli* Stämme transformiert.

##### Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die geeigneten *E. coli* Stämme wurden als Übernachtskultur (LB Medium, 37 °C, schüttelnd) mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Eine Hauptkultur wurde damit 1 %ig (v/v) inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 37 °C schüttelnd in LB Medium mit entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Die Kultur wurde in Zentrifugenröhrchen (jeweils 50 ml) aufgeteilt und nach einer 30-minütigen Kühlung bei 4 °C auf Eis pelletiert (10 min, 4 °C, 3.661 × g). Das Zellpellet wurde in jeweils 50 ml sterilem eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut pelletiert (10 min, 4 °C, 3.661 × g). Dieser Schritt wurde wiederholt. Danach wurde das gewaschene Pellet in jeweils 10 ml eiskaltem 10 %igen (v/v) Glycerin resuspendiert und aus allen Röhrchen vereinigt. Das Zell-Glycerin-Gemisch wurde weitere 10 min zentrifugiert (4 °C, 3.661 × g) und das Pellet in 600 µl einer 10 %igen (v/v) Glycerinlösung aufgenommen. Die elektrokompetenten Zellen wurden anschließend zu 40 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

##### Transformation in elektrokompetente Zellen (Elektroporation)

Zur Elektroporation wurden 1-4 µl Ligationsansatz oder gereinigte Plasmid-DNA mit 40 µl frisch aufgetauten, eisgekühlten elektrokompetenten Zellen in einer ebenfalls vorgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Anschließend erfolgte die Elektroporation im *Gene Pulser™* (Biorad, München) bei 25 µF, 1,7-2,5 kV und 200 Ω. Die Zellen wurden sofort in 800 µl SOC-Medium (2.3.2.4) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zur Selektion positiver Klone wurden verschiedene Volumina der Zellen auf selektiven Medien (2.3.2.1, 2.3.2.2) ausplattiert und für mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Transformanden wurden anschließend mittels Kolonie-PCR überprüft. Bevor mit den rekombinanten Zellen Experimente durchgeführt wurden, erfolgte eine Plasmidisolierung (2.4.5) aus positiven Klonen und die Plasmide wurden auf Richtigkeit der DNA-Sequenz mittels Sequenzierung (Microsynth, Lindau) überprüft.

#### Herstellung von ultrakompetenten Zellen (Inoue et al. 1990)

Für die Herstellung ultrakompetenter Zellen wurde 50 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur 1 %ig (v/v) inokuliert und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Nach einer Zentrifugation (4 °C, 15 min, 3.661 x g) wurde das Zellpellet in 16 ml sterilem, eiskaltem Transformationspuffer (55 mM  $MgCl_2$ , 15 mM  $CaCl_2$ , 250 mM KCl, 10 mM PIPES, pH 6,7) resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 °C, 15 min, 3.661 x g). Das gewaschene Zellpellet wurde in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer erneut resuspendiert, mit 0,3 ml DMSO versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die ultrakompetenten Zellen wurden in 100 µl oder 200 µl Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### Transformation in ultrakompetente Zellen (Hanahan, 1983)

Die Ligationsansätze oder die Plasmid-DNA (1-10 µl) wurden zu frisch aufgetauten eiskaltem kompetenten Zellen (100 µl) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C und einer einminütigen Abkühlung auf Eis unterzogen, mit 800 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C für 45 min schüttelnd inkubiert. Abschließend erfolgte die Selektion auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum. Nach einer mindestens 12-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden gewachsene Kolonien auf positive Klone mittels Kolonie-PCR und Plasmid-Sequenzierung getestet.

#### TSS-Transformation (Chung et al. 1989)

Für eine schnelle Transformation von Plasmiden in verschiedene Zielstämme kam die Methode der TSS-Transformation zum Einsatz. Das LB-Medium (5 ml) wurde 2 %ig (v/v) aus einer Übernachtskultur inokuliert und mit entsprechendem Antibiotikum bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 schüttelnd kultiviert. Jeweils 1 ml der Zellkultur wurde anschließend pelletiert (2 min, 14.157 x g), in 100 µl eiskaltem TSS-Puffer (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 10 % (w/v) PEG, 5 % (v/w) DMSO, 30 mM  $MgCl_3$ ; pH 6,5) resuspendiert und mit 50-100 ng Plasmid gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis, folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine weitere Inkubation auf Eis (10 min). Danach wurde die Zellsuspension mit 800 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte analog zu den bereits erwähnten Transformationsmethoden (2.4.8.1).

#### **2.4.8.2 *Lambda* Phagentransduktion**

Zur Herstellung von chromosomalen Promoter-*lacZ*-Fusionen fand die *Lambda*-Phagentransduktion Anwendung. Zunächst wurden die zu untersuchenden Promotoren von CBDB1 in den Vektor pRS551 vor das promoterlose *lacZ*-Gen kloniert. Anschließend wurde mit Hilfe der verschiedenen erzeugten

pRS551-Plasmide (2.2.2) und des Lambda-Phagen RS45 eine Phagentransduktion in einen L-Arabinose toleranten MC4100ara<sup>R</sup> *E. coli* Stamm durchgeführt. Eine Ausnahme bildete die intergene Region von cdbA1456-55Δr. Diese wurde von Centic Biotec (Heidelberg, Germany) synthetisiert.

#### Herstellung eines heterogenen Lambda-Phagenlysats

Zunächst wurde ein rekombinantes pRS551-Plasmid in den Lambda-Phagen sensitiven *E. coli*-Stamm MC1061 transformiert. Anschließend wurden die resultierenden verschiedenen MC1061-Stämme in Lambda-Broth (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl, 0,01 % (w/v) Hefeextrakt, 0,2 % (w/v) Maltose) unter Zugabe von Kanamycin (50 µg/ml) über Nacht schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Jeweils 1 ml Kultur wurde pelletiert (14 157 × g, 5 min, RT) und in 100 µl einer 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 0,05-50 µl Phagenlysats λRS45 (2012 hergestellte Charge) infiziert. Die infizierten Zellen wurden für 20 min bei 37 °C zur Adsorption der Phagen an die Zielzellen nicht schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Zellen mit auf 45 °C erwärmten Top-Agar (1 % (w/v) Trypton, 0,25 % (w/v) NaCl, 0,7 % (w/v) Agar-Agar) vermischt und auf λ-Agar-Platten (1 % (w/v) Trypton, 0,25 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Agar-Agar) gegossen. Die Platten wurden anschließend für 5 bis 9 h bei 37 °C mit dem Deckel nach oben bis zu einer Plauebildung inkubiert. Das heterogene Phagenlysats von Platten mit einer nahezu konfluenten Zelllyse diente der späteren Transduktion. Mit Hilfe von 4 ml kaltem SM-Puffer (0,1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 M Tris/HCl, 0,01 % (w/v) Gelatine) wurde der gesamte Top-Agar nach mehrstündiger Inkubation bei 4 °C (schwenkend) mit den enthaltenen Plaques abgeschwemmt und mit 1 ml Chloroform versetzt. Eine 30-minütige Inkubation (37 °C, schüttelnd) sollte restliche noch lebende Zellen durch das Chloroform abtöten. Das Lysat-Top-Agar-Gemisch wurde bei 3 661 × g und 4 °C in 10 min pelletiert. Der Überstand, der das heterogene Phagenlysats darstellte, wurde zu je 1 ml aliquotiert und nach dem Versetzen mit 200 µl Chloroform bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### Vervielfältigung eines Lambda-Phagenlysats (λRS45)

Bei langer Lagerung verlieren Phagenlysate ihre Effektivität. Deshalb war es nötig, das λ-Phagenlysats zu vervielfältigen. Dafür wurde der λ-sensitive *E. coli*-Stamm LE392 verwendet. Nach einer Anzucht in 3 ml λ-Broth über Nacht wurden die Zellen pelletiert (2 min, 14.157 x g, RT) und in 50 % (v/v) des Ausgangsvolumens in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Methode der Herstellung eines heterogenen Phagenlysats (2.4.8.2).

#### Phagentransduktion mit heterogenem Lambda-Phagenlysats

Für die Transduktion des Zielstammes MC4100ara<sup>R</sup> mit den verschiedenen heterogenen λ-Phagen wurden die Zellen in einer Tageskultur in λ-Broth angezogen (OD<sub>600</sub> = 0,6) und jeweils 1 ml pelletiert (14 157 × g, 5 min, RT), in 100 µl LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und mit dem jeweiligen

heterogenen Phagenlysat infiziert. Dabei erfolgte eine Infektion aus einer vierstufigen Verdünnungsreihe ( $10^1$  bis  $10^{-2}$ ) heraus. 10  $\mu$ l bzw. 1  $\mu$ l dieser Verdünnungen wurden zur Infektion eingesetzt. Eine 20-minütige Inkubation der mit den Phagen infizierten Zellen (37 °C, ohne Schütteln) folgte. Das Zell-Lysat-Gemisch wurde anschließend zur Selektion auf Agarplatten mit 2,5 mM Natriumpyrophosphat und 50  $\mu$ g/ml Kan ausplattiert und bei 37 °C mindestens 12 h inkubiert. Daraufhin erhaltene Kolonien wurden erneut auf Kanamycin- und 2,5 mM Natriumpyrophosphat-haltigen Agarplatten vereinzelt. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts analysiert. Durch Überprüfung des Wachstums auf Ampicillin-haltigen Platten konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Zellen mit noch vorhandenem pRS551 Plasmid handelte.

## 2.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### 2.5.1 Zellanzucht, -ernte, -aufschluss und -fraktionierung für proteinbiochemische Analysen

Für die proteinbiochemischen Untersuchungen von Proteinen mit *StrepTag*-Fusion wurden die *E. coli* Stämme in TGYEP-Medium anaerob in 1 l Serumflaschen bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,6 angezogen. Die Proteinexpression wurde anschließend durch Zugabe von 0,2  $\mu$ g/ml Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Nach einer weiteren dreistündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen pelletiert [4 °C, 30 min, 2.990 x g (SORVALL Zentrifuge, Rotor F10S, Thermo Scientific)]. Das erhaltene Zellpellet wurde resuspendiert, in Zentrifugenröhrchen (50 ml) vereinigt und erneut pelletiert [4 °C, 15 min, 3.661 x g (Hettich Zentrifuge, Rotor 1424A)]. Vor der weiteren Verwendung der Zellpellets fand die Lagerung für mindestens 1 h bei -20 °C statt, was den Aufschluss der Zellen durch den Gefrier- und Auftauprozess begünstigen sollte. Das Zellpellet wurde in 10 ml Puffer A (500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und mit 6 U/ml DNaseB und 2  $\mu$ l/ml Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, 10 mM) versetzt. Eine Ultraschallbehandlung mit der Sonotrode KE76 [Sonoplus Ultraschall-Homogenisator (Bandelin, Berlin)] bei 2 x 30 W für 3 min auf Eis schloss sich an und bewirkte die Zelllyse. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (50.000 x g, 30 min, 4 °C, SORVALL Zentrifuge, Rotor SS34) vom Rohextrakt separiert. Anschließend erfolgte die Fraktionierung des Rohextraktes in die lösliche Fraktion und die Membranfraktion durch eine Ultrazentrifugation [1 h, 130.000 x g, 4 °C (Beckmann LM-60M Ultrazentrifuge, Krefeld)].

### 2.5.2 Reinigung von Proteinen mit *StrepTag*-Fusion mittels Affinitätschromatografie

Die lösliche Fraktion wurde nach einer 30-minütigen Inkubation mit 2,4 µl/ml Avidin (2 mg/ml) bei 4 °C für die Reinigung durch Streptactin-Sepharose Säulen verwendet. Die Proteinanreicherung erfolgte nach Herstellerangaben (IBA, Göttingen). Die Streptactin-Sepharose Säulen wurden zu Beginn mit Puffer W (500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Beladung der Säulen mit maximal 10 ml löslicher Fraktion pro 1 ml Säulenmaterial. Nach vollständigem Durchfluss der löslichen Fraktion, wurde mit 10 x 1 ml Puffer W gewaschen und anschließend das *StrepTag*-Fusionsprotein mittels 10 x 0,5 ml Puffer E (Puffer W + 2,5 mM α-Desthiobiotin) eluiert. Die Regeneration mit 3 x 3 ml Puffer R [Puffer A + 1 mM 2-(4-hydroxybenzenazol)benzoesäure (HABA)] und die anschließende Lagerung in 10 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gewährleistete eine mehrfache Verwendbarkeit des Säulenmaterials.

### 2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Proteinlösungen (z. B. lösliche Fraktionen) wurde mittels Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt. Dafür kamen 100 µl einer mit ddH<sub>2</sub>O verdünnten Proteinlösung zum Einsatz. Die Proteinlösung wurde mit 1 ml Lösung C in einer 1,5 ml Küvette versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung D und eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln bei RT. Die Extinktion wurde anschließend am Uvikon (Uvikon 900, Kontron Instruments, Rossdorf) bei 750 nm bestimmt und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Eichgeraden mit BSA berechnet. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist im Folgenden aufgelistet.

Lösung A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % (w/v), Natriumtartrat 0,5 % (w/v), NaOH 1 N

Lösung B: CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O 0,1 % (w/v)

Lösung C: Lösung A (v/v) : Lösung B (v/v) 9:1

Lösung D: Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz 50 % (v/v) (Fluka, Steinheim)

Die Proteinkonzentration von gereinigten Proteinen wurde mittels Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen) mit 1 µl Protein unter Berücksichtigung des Molekulargewichts und des theoretischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt. Um Ungenauigkeiten auf Grund des geringen Probenvolumens zu umgehen wurde für Gel-Retentionsanalysen (2.5.10) und für die analytische Ultrazentrifugation (2.6.3) ein Absorptionsspektrum von 1 ml des gereinigten Proteins im Bereich von 230-330 nm am Uvikon (Uvikon 900, Kontron Instruments, Rossdorf) aufgenommen und mit Hilfe der Extinktion bei 279-281 nm unter Berücksichtigung des Molekulargewichts und des theoretischen

Extinktionskoeffizienten die Proteinkonzentration berechnet. Die Extinktionskoeffizienten wurden anhand des Molekulargewichts der Proteine theoretisch bestimmt und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Molekularmasse und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

Protein	Molekularmasse in g/mol	Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{280}$ ) in Units/M*cm
RdhR1456 <sub>StrepC</sub>	21.105,2	18.450
RdhR1456 <sub>StrepN</sub>	21.560,7	18.450
RdhR1596 <sub>StrepC</sub>	20.873,9	15.470

#### 2.5.4 Konzentrierung und Pufferwechsel von Proteinlösungen

Um gereinigte *StrepTag*-Fusionsproteine von  $\alpha$ -Desthiobiotin zu befreien und in einen für weitere Studien geeigneten Puffer umzupuffern, wurden jeweils 2,5 ml Proteinlösung aus den Elutionsfraktionen der *StrepTag*-Reinigungen über eine Gelfiltration gereinigt und in 3,5 ml neuem Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Proteinlösung mittels körnigem PEG 10000 über einen Mikrodialyseschlauch innerhalb von 0,5-2 h aufkonzentriert. Im Anschluss wurde die Proteinlösung durch eine Mikrodialyse in 1,5 l EMSA-Puffer (50 mM Tris (pH 7,5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) Glycerin) bei 4 °C über Nacht umgepuffert. Die so gewonnene Proteinlösung wurde nach 30-minütiger Zentrifugation (13.680 x g, 4 °C) zur Abtrennung von unlöslichen Aggregaten bei -196 °C in Flüssig-Stickstoff als Proteinkügelchen (jeweils ca. 20  $\mu$ l) bis zur Verwendung gelagert oder direkt für die Studien eingesetzt.

#### 2.5.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe kam die denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli (1970) zum Einsatz. Proteinlösungen wurden mit 1/5 Vol. 5 x SDS-Probenpuffer (315 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) verlieh den Proteinen eine konstante negative Ladung, während das enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol eventuell vorhandene Disulfidbrücken reduzierte, so dass die Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung und nur anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden. Nach der Denaturierung schloss sich eine Abkühlung auf Eis an und die Proben (8-15  $\mu$ l) wurden mit Hilfe von 7,5-15 %igen SDS-Gelen in vertikalen Minigel Apparaturen (Biorad, München) mit 0,75-1 mm *Spacer*-Platten aufgetrennt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10. Zusammensetzung von SDS-Gelen

	Sammelgel		Trenngel		
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	1,21 ml	3,28 ml	2,9 ml	2,53 ml	2,15 ml
<b>0,5 M Tris/HCl; pH 6,8</b>	0,5 ml	/	/	/	/
<b>1,5 M Tris/HCl; pH 8,0</b>	/	1,5	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<b>40 % Acrylamid</b>	0,25 ml	1,13 ml	1,5 ml	1,88 ml	2,25 ml
<b>10 % SDS</b>	20 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
<b>N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)</b>	2,5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<b>10 % (v/v) Ammoniumpersulfat (APS)</b>	25 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Probenpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 12,5 mA bis zum Erreichen des Trenngels und anschließend bei 25 mA pro Gel für ca. 2 h.

### 2.5.6 Protein-Färbungen

Zum Sichtbarmachen der aufgetrennten Proteine wurden die SDS-Gele nach erfolgreicher SDS-PAGE mit unterschiedlichen Färbetechniken behandelt.

#### 2.5.6.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie Färbung mittels Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Serva Blau R250; 0,05 % (w/v) Serva Blau G250; 5 % (v/v) Methanol; 42,5 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) wurde als Standardmethode für die meisten Gele verwendet. Das Gel wurde über Nacht in der Färbelösung schwenkend inkubiert, anschließend kurz in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und bis zum gewünschten Ergebnis mit Hilfe der Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure; 45 % (v/v) Ethanol) entfärbt und in ddH<sub>2</sub>O bis zur Dokumentation gelagert.

#### 2.5.6.2 Silberfärbung

Für die Detektion geringer Proteinkonzentrationen, wie es bei CBDB1-Proteinlösungen der Fall war, kam die hoch sensitive Silberfärbung zum Einsatz. Mit dieser Färbung ist es möglich Proteinbanden bis in den Nanogramm-Bereich sichtbar zu machen.

Die Proteine im SDS-Gel wurden zunächst für 5 min mit einer Fixierlösung (1,5 % (w/v) Trichloressigsäure, 0,0185 % (v/v) Formaldehyd, 50 % (v/v) Aceton) fixiert und das SDS entfernt. Nach

fünfminütigem Waschen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O, wurde das Gel mit 50 % (v/v) Aceton für 5 min vorbehandelt, in eine Natriumthiosulfatlösung (0,02 % (w/v)) für 1 min überführt und 3 x 5 s mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte der Färbeschritt mit einer Silbernitratlösung (0,32 % (w/v) Silbernitrat, 0,44 % (v/v) Formaldehyd) für 8 min. Die positiv geladenen Silber-Ionen lagern sich bei diesem Schritt an die negativ geladenen Seitengruppen der Proteine an. Überschüssiges Silbernitrat wurde durch kurzes Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt. Zum Schluss wurden die Banden mit Hilfe der Entwicklerlösung (2,4 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,018 % (v/v) Formaldehyd, 0,005 % (w/v) Natriumthiosulfat) sichtbar gemacht. Mit 3 %iger (v/v) Essigsäure wurde die Reaktion abgestoppt.

### 2.5.7 Western-Blot Analyse

Zur Analyse der *StrepTag*-Fusionsproteine fand die Western-Blot Analyse nach Towbin et al. (1979) Anwendung. Bei dieser Methode werden die Proteine nach erfolgter SDS-PAGE aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mittels Antikörper gegen den *StrepTag* sichtbar gemacht.

Für die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden sechs Lagen Whatmanpapier und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und gemeinsam mit dem Gel für 10 min in Towbinpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Der Western-Blot wurde nach dem *Semi-Dry* Verfahren folgendermaßen in der *Fastblot*-Apparatur (Biometra, Göttingen) aufgebaut: Anode - 3 x Whatman-Papier - Nitrocellulose-Membran - SDS-Gel - 3 x Whatman-Papier - Kathode. Nach dem luftblasenfreien Übereinanderschichten wurden die Proteine innerhalb von 90 min bei 1,2 mA/cm<sup>2</sup> auf die Membran transferiert.

#### 2.5.7.1 Proteindetektion mittels ECL-Reaktion

Die Nitrocellulosemembran mit den darauf transferierten Proteinen wurde über Nacht bei 4 °C schwenkend in einer Blockierungs-Lösung, bestehend aus 3 % (w/v) BSA in PBS-Tween (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 115 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Tween), inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 min in PBS-Tween gewaschen und einer 30-minütigen Behandlung mit einer Avidin-Lösung (20 µg Avidin gelöst in 10 ml PBS-Tween) zur Blockierung der biotinylierten Proteine unterzogen. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS-Tween folgte die einstündige Inkubation mit dem *Streptactin-HRP*-Konjugat aus einer 1:100.000 Verdünnung in PBS-Tween. Das Konjugat bindet an den *StrepTag* von Proteinen, während die fusionierte Meerrettich-Peroxidase (HRP) die chemilumineszente Reaktion bewerkstelligt. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS-Tween-Puffer und zweimaligen Waschen mit PBS-Puffer (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 115 mM NaCl; pH 7,2) wurden Lösung A

[100 mM Tris/HCl (pH 8); 90 mM *p*-Cumarinsäure; 250 mM Luminol (in DMSO)) und Lösung B (100 mM Tris/HCl (pH 8), 30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) im Dunkeln gemischt und zur Membran hinzugefügt. Das Luminol wird bei Vorhandensein eines Katalysators (Meerrettich-Peroxidase) durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Dabei entsteht ein lichtemittierendes Produkt an den Stellen des Gels wo das HRP-Konjugat gebunden hat. Diese Stellen werden auf einem auf der Membran aufgelegten Röntgenfilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) belichtet und mit Hilfe einer Entwickler- und Fixierlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) als Schwärzung sichtbar gemacht.

## 2.5.8 FAR-Western-Analyse

### 2.5.8.1 Zellanzucht, -ernte, -aufschluss und -fraktionierung für die FAR-Western-Analyse

Um Protein-Protein-Interaktionsstudien des MarR-Regulators RdhR1456 mit potenziellen Bindepartnern aus CBDB1 durchzuführen wurde die Methode der FAR-Western-Analyse angewendet. Hierfür wurde der Bakterienstamm *D. mccartyi* CBDB1 anaerob in 150 ml bis 1 l CBDB1-Minimalmedium (2.3.1.1) für 72 h mit 50 µM 1,2,3-TCB oder 1,2,4-TCB als Elektronenakzeptor kultiviert. Im Anschluss fand die Zellernte unter anoxischen Bedingungen durch eine mehrstufige Zentrifugation statt. Hierfür wurde zunächst die Zellkultur in Erntebechern pelletiert (2.990 x g, 45 min, 4 °C, SORVALL-Zentrifuge, Rotor F10S). Danach wurde der Überstand bis auf 50 ml abgenommen und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Eine Zentrifugation bei 3.661 x g für 45 min bei 4 °C (Hettich-Zentrifuge, Rotor 1424A) schloss sich an. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 500 µl Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTH, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit 6 U/ml DNaseB und 2 µl/ml PMSF (10 mM) versetzt. Der Zellen wurden mittels Ultraschallbehandlung (2 X 30 s 30 Watt) mit der Sonotrode KE73 (Sonoplus Ultraschall-Homogenisator Bandelin, Berlin) aufgeschlossen. Die anschließende Zugabe von 1,5 % Digitonin (75 µl) und eine Inkubation für 45 min bei RT schwenkend sollte den kompletten Zellaufschluss gewährleisten. Die so gewonnenen Zellextrakte wurden nun mit Hilfe einer zweistufigen Zentrifugation bei 21.380 x g und 130.000 x g in die Fraktionen Zelltrümmer, Membranfraktion und lösliche Fraktion separiert und die einzelnen Fraktionen für die Protein-Protein-Interaktionsstudien genutzt.

### 2.5.8.2 SDS-Gelelektrophorese, Western-Blotting und Renaturierung für die FAR-Western-Analyse

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen (2.5.3), wurden 10-100 µg Protein mit SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 7,5 %iges SDS-Gel über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

Im Anschluss wurde das Gel auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran mittels eines *Semi-dry* Western-Blot-Verfahrens wie zuvor beschrieben transferiert (2.5.7). Das Gel wurde anschließend mit Silber gefärbt (2.5.6.2), während die Proteine auf der Membran durch eine Guanidin-Hydrochlorid-Lösung zunächst denaturiert (6 M) und anschließend schrittweise renaturiert (3, 1, 0,1 und 0 M) wurden. Der Denaturierungs- und Renaturierungsprozess erfolgte nach Wu et al. (2007) mit AC-Puffer [10 % (v/v) Glycerin, 0,1 M NaCl, 20 mM Tris (pH 7,5), 10 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Tween20, 2 % (w/v) Milchpulver, 1 mM DTT, 0-6 M Guanidin-HCl].

### 2.5.9 Protein-Protein-Interaktion und Immunoblotting

Nach der vollständigen Renaturierung der Proteine auf der PVDF-Membran, fand die eigentliche FAR-Western-Analyse statt. Die Membran wurde mit 3 % (w/v) BSA blockiert (4 °C, schwenkend, 3 h) und mit 10 ml einer Avidin-haltigen PBST-Lösung [2 µg/ml (w/v) Avidin, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20] zur Abdeckung unspezifischer Proteine behandelt (schwenkend, 30 min, RT). Das heterolog synthetisierte und gereinigte RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Fusionsprotein (40 µg) wurde in 20 ml Bindepuffer [100 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,6), 0,5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (v/v) Tween20, 2 % (w/v) Milchpulver, 1 mM DTT] überführt. Die PVDF-Membran wurde in dieser Proteinsuspension über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Dabei sollte das heterolog synthetisierte RdhR1456<sub>StrepC</sub> an seinen möglichen Interaktionspartner auf der PVDF-Membran binden. Die Membran wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBST-Puffer von nicht gebundenem RdhR1456<sub>StrepC</sub> befreit. Danach erfolgte die *StrepTag*-Erkennung mittels *Streptactin*-HRP-Konjugat (1:10.000) für 1 h bei RT. Nicht gebundenes HRP-Konjugat wurde durch zweimaliges Waschen mit PBST-Puffer und zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt und das *StrepTag*-Fusionsprotein (RdhR1456<sub>StrepC</sub>) auf der Membran abschließend wie bereits in 2.5.7.1 beschrieben mittels ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

### 2.5.10 Gel-Retentionsanalyse (EMSA)

Die Interaktion von Proteinen mit DNA wurde mit Hilfe von Gel-Retentionsanalysen, auch *electromobility shift assay* (EMSA) genannten Analysen, studiert. Um die DNA-Binderegion von RdhR1456 in CBDB1 zu lokalisieren, wurden verschiedene DNA-Fragmente der kompletten intergenen Bereiche (IR) zwischen *rdhA1453* und *rdhB1454* (IR1453), *rdhA1455* und *rdhR1456* (IR1455), *rdhA1624* und *rdhR1625* (IR1624) und *rdhA1598* und *cbdbA1599* (IR1598) für die EMSAs amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte mittels *Velocity* DNA-Polymerase wie in 2.4.6 bereits beschrieben. Als *templates*

fungierten genomische DNA von CBDB1 oder pJET-Plasmide mit den entsprechenden DNA-Bereichen von CBDB1.

#### 2.5.10.1 **Herstellung von doppelsträngigen(ds)DNA-Oligonukleotiden**

Zur Untersuchung der Bindespezifität von RdhR1456 wurden aus dem putativen spezifischen DNA-Bindebereich (IR1453, 1455, 1598) des Proteins im Genom von CBDB1 28-33 bp lange, zueinander reverskomplementäre DNA-Oligonukleotide abgeleitet und von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Oligonukleotide aus putativen nicht spezifischen Bereichen (IR83, IR1624) dienten als Kontrolle. Jeweils 80 pmol der zueinander reverskomplementären einzelsträngigen DNA-Oligomere wurden anschließend in einem Reaktionspuffer (1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl; pH 7,5) mit Hilfe eines Temperaturprogrammes (90 °C 2 min, 70 °C 10 min, 60 °C 20 min, 50 °C 20 min, 40 °C 20 min, 30 °C 20 min, 20 °C 20 min, 4 °C 10 min) im Thermocycler (*Primus 25 advanced*, Peqlab, Erlangen) *annealed*. Die dsDNA-Oligonukleotide wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.5.10.2 **EMSA-Reaktion**

Jeweils 25 nM eines ds-Oligonukleotids wurde mit 24 bis 1882 nM RdhR1456<sub>StrepC</sub> (Dimer) zusammen mit 0,3 µg Poly-Desoxyinosin-Desoxycytidin (Poly dI/dC) in 20 µl eines EMSA-Puffers [50 mM Tris pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) Glycerin] mit 1 mM EDTA und 3 mM DTT gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Das Poly dI/dC sollte dabei eine unspezifische Bindung des Proteins minimieren. Sollte die Bindung eines putativen Liganden geprüft werden, wurde das Protein zunächst zusammen mit dem putativen Liganden (0,25 µM-5 mM) für 30 min bei 4 °C im EMSA-Puffer inkubiert, bevor die DNA hinzugefügt wurde.

#### 2.5.10.3 **Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)**

Das Protein-DNA-Gemisch wurde anschließend mit Hilfe eines 10 %igen, nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gels (80 mM Tris/HCl; pH 8,5) bei 4 °C für 30 min bei 9 mA pro Gel in 1 x Nativ-Laufpuffer (0,1 M Glycin, 0,1 M Tris) aufgetrennt. Die Gele wurden im Anschluss mit *GelRed™ Nucleic Acid Stain* (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln) nach Herstellerangaben gefärbt und die DNA Fragmente mit UV-Licht visualisiert. Die Zusammensetzung eines Nativ-Gels ist in Tabelle 11 dargestellt.

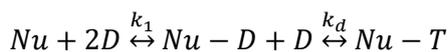
Tabelle 11. Zusammensetzung eines Nativ-Gels für einen EMSA

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
ddH <sub>2</sub> O	1,53 ml	4,26 ml
Bis-Acrylamid (40 %)	0,25 ml	1,5 ml
Puffer (Tris/HCl 2,5 M, pH 8,5)	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	2,5 µl	5 µl
APS (10 %)	20 µl	40 µl

### 2.5.11 Auswertung der Gel-Retentionsanalysen

Die Affinität von RdhR1456 an verschiedene Promotersequenzen wurde anhand des gebildeten DNA-Proteinkomplexes im Bezug zur freien DNA bestimmt. Die sogenannte Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) bezeichnet die molare Proteinkonzentration, bei der eine halbmaximale Bindung erreicht wird (Ryder et al., 2008). Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität der im Nativ-Gel *geshifteten* Bande des Komplexes auf die gesamte Fluoreszenzintensität bezogen. Diese prozentuale Fluoreszenz (S) wurde gegen die eingesetzte Dimer-Proteinkonzentration (D) aufgetragen und für die daraus resultierende Kurve eine Gleichung zur  $K_d$ -Wert-Berechnung abgeleitet. Die Ableitung und Berechnung des  $K_d$  Wertes von RdhR1456 anhand der Gel-Retentionsanalysen wurde freundlicherweise von Dr. Ralph Golbik zur Verfügung gestellt.

Die DNA wurde durch ein Protein-Tetramer gebunden, deshalb galt Folgendes als Grundlage zur  $K_d$ -Wert-Berechnung:



Die Gleichungen zur Berechnung der Konzentration an Tetrameren aus einer bekannten initialen Dimerkonzentration (Ausgangskonzentration) werden wie folgt abgeleitet:

$$M_0 = 2D + 4T \quad \text{Ein Tetramer setzt sich aus vier Monomeren zusammen.}$$

$$D_0 = D + 2T \quad \text{Ein Tetramer setzt sich aus zwei Dimeren zusammen.}$$

$$K_d = \frac{(D_0 - 2T)^2}{T}$$

$$T^2 - T\left(D_0 + \frac{K_d}{4}\right) + \frac{D_0^2}{4} = 0$$

$$T_{1,2} = \frac{D_0 + \frac{K_d}{4}}{2} \pm \sqrt{\frac{\left(D_0 + \frac{K_d}{4}\right)^2}{4} - \frac{D_0^2}{4}}$$

$$T_{1,2} = \frac{4 \cdot D_0 + K_d}{8} \pm \sqrt{\frac{K_d^2 + 8 \cdot D_0 \cdot K_d}{64}}$$

$$T = \frac{4 \cdot D_0 + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8 \cdot D_0 \cdot K_d}}{8}$$

$M_0, D_0$  = initiale Konzentrationen von Monomeren und Dimeren

$T$  = Konzentration des Tetramers bei einer definierten Konzentration der Nukleinsäure

$Nu$  = Nukleinsäure

Im EMSA-Gel wird nicht die genaue Konzentration des Tetramers bei definierter Nukleinsäurekonzentration gemessen, sondern eine Signalamplitude ( $S$ ) der Fluoreszenz der gebundenen Nukleinsäure. Die Signalwerte der Komplexe im Gel sind aber direkt proportional zur wahren Konzentration des Tetramers. Deshalb gilt:

$$S \sim T$$

$$S_{max} \sim T_{max}$$

$$\frac{S}{S_{max}} = \frac{T}{T_{max}}$$

$$S = \frac{T \times S_{max}}{T_{max}}$$

Die maximal mögliche Konzentration des Tetramers ist gleich der Hälfte der initialen Konzentration des Dimers, da sich das Tetramer aus zwei Dimeren zusammensetzt.

$$T_{max} = \frac{D_0}{2}$$

$$S = \frac{T \times S_{max}}{\frac{D_0}{2}}$$

Wenn das maximale Signal auf 100 % normiert wurde, wird die relative Signalamplitude ( $S$ ) bei einer bestimmten Konzentration der Nukleinsäure wie nachfolgend definiert:

$$S = \frac{T \times 100}{\frac{D_0}{2}}$$

$$S = \frac{T \times 2 \times 100}{D_0}$$

$$S = \frac{100 \times 2 \times \left( 4 \times D_0 + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8 \times D_0 \times K_d} \right)}{8 \times D_0}$$

$$S = \frac{100 \times \left( 4 \times D_0 + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8 \times D_0 \times K_d} \right)}{4 \times D_0}$$

Die dieser Gleichung entsprechende Formel in Kaleidagraph™ lautet nach zweckmäßiger Umstellung der Faktoren:

$$(m1/(4 \times m0)) \times (4 \times m0 + m2 - (m2^2 + 8 \times m0 \times m2)^{0,5}); m1=100; m2=50$$

m1 = maximale Signalamplitude (hier 100 %)

m2 = gesuchter  $K_d$ -Wert

### 2.5.12 DNase I-Footprinting

Die DNase I-Footprinting-Analyse erfolgte mit Hilfe einer auf 5'-6-Carboxyfluorescein (6-FAM) basierenden Methode (Wilson et al., 2001). Dabei wurden 6-FAM markierte DNA-Fragmente durch PCR-Amplifikation mit jeweils einem 6-FAM-markierten *forward*-Primer und einem nicht markierten *reverse*-Primer generiert (siehe Anhang Tabelle III). Jeweils 25 nM dieser DNA-Fragmente wurden mit 0 bis 6  $\mu$ M gereinigtem RdhR1456<sub>StrepC</sub> (für IR1453) oder RdhR1456<sub>StrepN</sub> (für IR1455) gemischt und wie für die Gel-Retentionsanalysen (2.5.10) 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein DNase I-Verdau für 60 sek durch Zugabe von 30  $\mu$ l DNase I (0,01 U) in einem DNase-Puffer (10 mM Tris/HCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl, pH 7,6). Die Reaktion wurde mit 150  $\mu$ l Chloroform abgestoppt und die DNA für die *GenScan*-Analyse bei SeqLab (Göttingen) gereinigt und gefällt. Aus den Fluoreszenzprofilen der verdauten Proben wurden anhand der Fluoreszenzintensitäten die geschützten DNA-Bereiche identifiziert.

## 2.6 ANALYTISCHE METHODEN

### 2.6.1 Analyse der Dechlorierung von Trichlorbenzolen in CBDB1

Die Dechlorierungsaktivität von *D. mccartyi* Stämmen wurde indirekt durch eine Chloridkonzentrationsmessung im Überstand von Zweiflüssigphasen-Kulturen ermittelt oder bei Kurzzeitkultivierungen die Konzentration der Dechlorierungsprodukte und -edukte direkt mittels Gaschromatographie bestimmt.

### 2.6.1.1 **Quantifizierung der Chloridfreisetzung mittels Chlor-o-counter-Messung**

Zur indirekten Bestimmung der Dechlorierungsaktivität von *D. mccartyi* Zweiflüssigphasen-Kulturen wurde die Chloridfreisetzung im Verlauf der Kultivierung gemessen. Dies erfolgte mit Hilfe des Chlor-o-counter Messgeräts (FLOHR Instruments, Nieuwegein, Niederlande). Von einer Kultur wurde eine 1 ml Probe entnommen und pelletiert (20 min, 12.063 x g, RT). Jeweils 2 x 400 µl des Überstandes kamen für die Messung zum Einsatz. Als Kontrolle diente eine 100 mM NaCl-Lösung, mit welcher zu Beginn jeder Messung die Genauigkeit des Geräts geprüft wurde. Die Messung der zu untersuchenden Proben fand in einem Gemisch aus 20 ml Basislösung [10 % (v/v) Essigsäure, 0,52 % (v/v) Salpetersäure] und 1 ml Gelatinelösung [0,6 % (w/v) Gelatine, 0,01 % (w/v) Thymol, 0,01 % (w/v) Thymolblau] statt. Während der Messung reagieren die in der Lösung vorhandenen Chlorid-Ionen mit dem in die Lösung ragenden Silberdraht zu Silberchlorid. Silberchlorid fällt als grauer Niederschlag aus und durch die fehlenden Chlorid-Ionen in der Lösung kommt es zur Depolarisierung der Elektrode und somit zum Ende der Messung.

### 2.6.1.2 **Quantifizierung der Chlorbenzole mittels Gaschromatographie**

#### Probenvorbereitung

Um die Konzentrationen der verschiedenen Chlorbenzole im Verlauf der Organohalid-Respiration von *D. mccartyi* Stämmen direkt zu analysieren wurden Proben der Kultivierungen zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des Gaschromatographen GC-2010 (Shimazu, Duisburg) nach Pöritz et al. (2015) analysiert. Hierfür wurde jeweils 0,5 ml einer *D. mccartyi* Kultur unter 0,5 ml n-Hexan in Glasgefäßen mit teflonbeschichteten Septen geschichtet. Anschließend erfolgte eine Extraktion der Chlorbenzole aus der wässrigen Phase in das n-Hexan mittels einer Ultraschallbehandlung im Sonotrex (Bandelin, Berlin) für 15 min. Es schloss sich eine Extraktion für eine Nacht an (155 rpm, RT, über Kopf). Nach der Extraktion wurden 100 µl der Hexanphase mit 25 µl eines internen Standards (2,5 mM 1,3,5-TrBB) versetzt und zur Analyse im Gaschromatographen verwendet. Hierfür kamen 1 ml Glasgefäße mit einem 150 µl Glaseinsatz zum Einsatz.

#### Gaschromatographische Messung

Die gaschromatographische Messung am GC-2010 fand mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (FID) statt. Der mit dem Gaschromatographen verbundene Autosampler und Injektor AOC-20its injizierte hierfür 2 µl Probe mit einem Splitverhältnis von 1:10 und einer Temperatur von 250 °C in den GC-2010. Über eine Rtx<sup>®</sup>35-Megapore-Kapillarsäule (Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0,32 mm, Filmdicke: 0,5 µm; Restek, Bad Homburg) wurden die Proben mit Hilfe von Helium 5.0 als Trägergas

(lineare Geschwindigkeit 0,3 m/s, Säulendruck 58,5 kPa), Stickstoff 5.0 als „Make up“-Gas, Druckluft und Wasserstoff 5.0 als Brennergase aufgetrennt. Der FID detektierte die aufgetrennten Extrakte bei 280 °C am Ende der Säule. Das Ofenprogramm der Säule und die Retentionszeiten der verwendeten Verbindungen sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12. Ofenprogramm des GC-2010 für Chlorbenzole und Retentionszeiten

Rate (°C/min)	Endtemperatur (°C)	Haltezeit (min)	Verbindungen	Retentionszeit (min)
	40	1,1	1,3-DCB	7,98
40	70	1,9	1,4-DCB	8,12
20	140	1,2	1,2,3-TCB	10,90
40	160	1,2	1,2,4-TCB	10,27
20	220	0,5	1,3,5-TrBB	13,10
40	280	5,0		

## 2.6.2 $\beta$ -Galaktosidase-Analyse

### 2.6.2.1 Zellanzucht und Messung (nach Griffith und Wolf, 2002)

Die verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämme mit chromosomalen Promoter-*lacZ*-Fusionen wurden zur Bestimmung ihrer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in LB-Medium (14 ml) anaerob in Hungaterörchen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 bei 37 °C kultiviert. Dabei wurde jeder Bakterienstamm parallel in LB-Medium und in LB-Medium mit 0,02 % (w/v) L-Arabinose angezogen. Das Wachstum in Anwesenheit von L-Arabinose sollte die Expression der Promoter-*lacZ*-Fusionen induzieren und wurde im Folgenden als Wachstum unter induzierenden Bedingungen bezeichnet. Jeweils 100  $\mu$ l einer Bakteriensuspension wurden in die Wells einer 96-Well-Platte überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20  $\mu$ l eines Aufschlusspuffers [89 % (v/v) Puffer Z, 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) SDS]. Nach einer dreiminütigen Inkubation wurden 40  $\mu$ l Chloroform zugesetzt. Durch den Aufschlusspuffer, aber auch durch die Zugabe von Chloroform, sollten die Bakterienzellen permeabilisiert werden. Nach einer weiteren Inkubation (3 min) wurden dem Ansatz jeweils 20  $\mu$ l einer ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid (ONPG)-Lösung (4 mg/ml in Puffer Z gelöst) hinzugefügt. Anschließend wurde sofort die  $\beta$ -Galaktosidase-Messung im Plattenreader Sunrise (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) mit dem Programm Microplate Manager 4 gestartet. Die Messung der Absorption erfolgte in 30 Einzelmessungen als Zeitverlauf bei einer Wellenlänge von 420 nm im Abstand von 20 sek. Anhand der Geschwindigkeit der Gelbfärbung ( $v_{420}$ ) wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität A in Units in Anlehnung an Miller et. al (1972) der jeweiligen Bakterienstämme unter Einbeziehung der OD<sub>600</sub> mit folgender Formel berechnet.

$$A = \frac{v_{420 \text{ nm}}}{(OD_{600} \times 0,1)}$$

Für jeden Stamm erfolgte eine biologische Dreifachbestimmung in jeweils dreifacher technischer Ausführung. Die Zusammensetzung von Puffer Z ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13. Zusammensetzung von Puffer Z

Reagenzien	Konzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 mM
KCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM

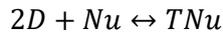
### 2.6.3 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Analyse der oligomeren Form von RdhR1456 und RdhR1456-DNA-Komplexen im EMSA-Puffersystem, aber auch zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von RdhR1456 wurde eine analytische Ultrazentrifugation eingesetzt. Eine Proteinprobe wurde hierbei in einer Konzentrationsreihe (40 - 500 µg/ml) in 300 µl EMSA-Puffer in der Beckman Optima XLI-Analytischen Ultrazentrifuge (Palo Alto, CA, USA) mit dem Rotor An-50Ti zentrifugiert. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde bei 40.000 rpm in 4 h bei 20 °C ermittelt. Um das Sedimentationsgleichgewicht zu bestimmen, wurde die Zentrifugation bei 12.000 rpm und bei 20 °C durchgeführt. Die Proteine bzw. Komplexe besitzen entsprechend ihres Molekulargewichts ein ganz bestimmtes Diffusionsverhalten innerhalb des Zentrifugenröhrchens. Anhand der Lokalisierung des Proteins im Zentrifugenröhrchen lässt sich das Molekulargewicht des Proteins, der DNA und der DNA-Protein-Komplexe genau ermitteln. Dies erfolgte durch eine Messung bei 230 nm (für DNA und DNA-Protein-Komplexe) oder bei 280 nm (für Protein-Komplexe) im Zentrifugenröhrchen während der Zentrifugation.

#### 2.6.3.1 Datenanalyse

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Sedfit (Schuck, 2000) analysiert. Zur Berechnung des Molekulargewichts des Komplexes wurden die folgenden spezifischen Teil-Volumina verwendet (Durchschlag, 1986):  $v(\text{Protein}) = 0,73 \text{ ml/g}$ ,  $v(\text{dsDNA}) = 0,56 \text{ ml/g}$ ,  $v(\text{Komplex}) = 0,696 \text{ ml/g}$  (berechnet für den Anteil an Protein (80 %) und dsDNA (20 %)). Die Dissoziationskonstante  $K_d$  des RdhR1456-dsDNA-Komplexes wurde wie folgt ermittelt. Die Fluoreszenzintensität der sedimentierten Spezies wurde gegen die eingesetzte Proteinkonzentration grafisch dargestellt und aus der sich ergebenden Kurve eine Gleichung zur Berechnung des  $K_d$ -Wertes abgeleitet. Dabei war zu berücksichtigen, dass die

Bindung von Nukleinsäure (Nu) an RdhR1456, welches in Lösung als Dimer (D) vorlag, zur Formation eines Tetramers (T) führte.



Das Gleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer spiegelt so die Gleichgewichtskonstante ( $K_d$ ) für die Nukleinsäure-Bindung wider.

$$D_0 = D + 2T$$

$$K_d = \frac{(D_0 - 2T)^2}{T}$$

$$T^2 - T \times \left( D_0 + \frac{K_d}{4} \right) + \frac{D_0^2}{4} = 0$$

$$T_{1,2} = \frac{D_0 + \frac{K_d}{4}}{2} \pm \sqrt{\frac{\left( D_0 + \frac{K_d}{4} \right)^2}{4} - \frac{D_0^2}{4}}$$

$$T_{1,2} = \frac{4 \times D_0 + K_d}{8} \pm \sqrt{\frac{K_d^2 + 8 \times D_0 \times K_d}{64}}$$

$$T = \frac{4 \times D_0 + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8 \times D_0 \times K_d}}{8}$$

Die gemessene Signalamplitude (S) der Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration des Tetramers zu einer definierten Nukleotidkonzentration (25 nM). Die maximale Signalamplitude ( $S_{max}$ ) entspricht der maximal möglichen Konzentration vom Tetramer ( $T_{max}$ , 25 nM).

$$S \sim T$$

$$S_{max} \sim T_{max}$$

$$\frac{S}{S_{max}} = \frac{T}{T_{max}} = \frac{T}{25 \text{ nM}}$$

$$S = \frac{T \times S_{max}}{T_{max}}$$

Die maximale Konzentration des Tetramers entspricht der halben Konzentration der initialen Dimerkonzentration.

$$T_{max} = \frac{D_0}{2}$$

$$S = \frac{T \times S_{max}}{\frac{D_0}{2}}$$

Wenn das maximale Signal normalisiert wird (100 %), kann die spezifische Nukleinsäure-Konzentration als relativer Wert dazu ermittelt werden.

$$S = \frac{T \times 1}{\frac{D_0}{2}}$$

$$S = \frac{T \times 2}{D_0}$$

Wenn die Signalamplitude ähnlich der maximalen Tetramerkonzentration (25 nM) ist, so kann die relative Signalamplitude ( $S_{rel}$ ) wie folgt definiert werden.

$$S_{rel} = \frac{S}{25 \text{ nM}}$$

$$S = 25 \text{ nM} \times S_{rel}$$

$$S = \frac{25 \text{ nM} \times 2 \times T}{D_0}$$

$$S = \frac{25 \text{ nM} \times 2 \times \left(4 \times D_0 + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8 \times D_0 \times K_d}\right)}{8 \cdot D_0}$$

$$S = \frac{25 \text{ nM} \times \left(4 \times D_0 + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8 \times D_0 \times K_d}\right)}{4 \times D_0}$$

Die Ableitung und Berechnung des  $K_d$  Wertes von RdhR1456 wurde freundlicherweise von Dr. Hauke Lilie zur Verfügung gestellt.

#### 2.6.4 Massenspektrometrie

Die löslichen Fraktionen des *D. mccartyi* Stammes CBDB1 und der *E. coli* Stämme, sowie gereinigte heterolog synthetisierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die mit Coomassie bzw. mit Silber gefärbten Banden von Interesse wurden ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Untersuchung eingesetzt. Die Proben wurden mit 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen, mit 10 mM DTT reduziert und mit 100 mM Iodoacetamid alkyliert. Anschließend fand ein in Gel-Verdau mit Trypsin statt (Kublik et al., 2016). Die verdauten Peptide wurden aus den Gelstücken mit 50 %

Acetonitril, 5 % Formiat extrahiert, aufkonzentriert und mittels C<sub>18</sub> beschichteten Pipettenspitzen (ZipTip®, Merck Millipore, Darmstadt) entsalzen. Eine Vakuum-Zentrifugation (RVC-2-25 CD plus, CHRIST, Osterode) bei 50 °C und 20 mbar gewährleistete die Trocknung der Peptide. Die Lagerung erfolgte bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20 °C. Zu Beginn der Analyse wurden die Peptide in 15 µl 0,1 %igem (v/v) Formiat resuspendiert und in einem nHPLC-Gerät (Dionex Ultimate 3000 RSLC nano system, Thermo Scientific) über die Acclam® PepMap 100 C<sub>18</sub> Säule (Thermo Scientific) separiert. Die eluierten Peptide wurden dann mit Hilfe einer Tandem-Massenspektrometrie (Orbitrap FusionMass Spectrometer, Thermo Scientific) analysiert (Marco-Urrea et al., 2012). Die massenspektrometrischen Analysen erfolgten in Kooperation mit Anja Kublik und Dominique Türkowsky.

## 3 ERGEBNISSE

---

### 3.1 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION DES CBDB\_A1623-1625 GENCLUSTERS IM STAMM CBDB1

(Daten teils publiziert in Wagner et al., 2013)

Die transkriptionelle Regulation des *rdhA*-Gens *rdhA1624* (bislang als Genlocus *cbdb\_A1624* bezeichnet) wurde in Studien von Wagner (2009) und Segler (2011), wie in der Einleitung bereits erwähnt, untersucht. Wagner zeigte die differenzielle Transkription von *rdhA1624* in Anwesenheit von 1,2,3-TCB im Vergleich zu 1,2,4-TCB. 1,2,3-TCB bewirkte eine stärkere transkriptionelle Induktion. Aber auch 2,3-Dichlordibenzo-*p*-dioxin (DCDD) führte unter anderem zu einer vermehrten Transkription von *rdhA1624* im Stamm CBDB1. Die direkte genetische Assoziation des *rdhA*-Gens mit dem *marR*-ähnlichen Gen *rdhR1625* (bislang als Genlocus *cbdb\_A1625* bezeichnet) legte die Vermutung nahe, dass der putative Transkriptionsfaktor RdhR1625 (bislang CbdbA1625) eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation des benachbarten *rdhA1624* Gens spielt. Wagner (2009) konnte zeigen, dass ein heterolog exprimiertes RdhR1625-Protein als *StrepTag*-Fusionsprotein an die intergene Region von *rdhA1624* bindet. Somit war ein erster Beweis geliefert, dass RdhR1625 an der transkriptionellen Regulation von *rdhA1624* beteiligt ist. Erste heterologe *in vivo* Untersuchungen mit verkürzten Promoter-*lacZ*-Fusionen von *rdhA1624* und *rdhR1625* ergaben ebenfalls Hinweise auf eine Bindung von RdhR1625 an diesen DNA-Bereich (Segler, 2011). Basierend auf den Ergebnissen der vorheriger Studien von Wagner (2009) und Segler (2011) wurden aufbauende Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *rdhA*-Gens *rdhA1624* sowie des assoziierten *rdhR*-Gens *rdhR1625* im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Ergebnisse der vorherigen Studien wurden überprüft und das heterologe *in vivo* System optimiert.

#### 3.1.1 *In vivo*-Untersuchungen zur Regulatorfunktion von RdhR1625

Die Regulatorfunktion von RdhR1625 wurde mit Hilfe eines optimierten *in vivo* Testsystems basierend auf Segler (2011) und auf den *in vitro* Studien von Wagner (2009) weiter erforscht. Hierfür wurden zunächst *E. coli* MC4100ara<sup>R</sup> Stämme mit chromosomal integrierten unverkürzten Promoter-*lacZ*-Fusionen der Promoterregionen von *rdhA1624* ( $P_{1624}$ ) und dem dazugehörigen Regulatorgen *rdhR1625* ( $P_{1625}$ ) erzeugt. Dafür wurden im Gegensatz zu den vorherigen Studien *E. coli* MC4100ara<sup>R</sup> Stämme mit einer Arabinoseresistenz verwendet (Berthelmann und Brüser, 2004; Englesberg et al., 1962). In Segler

(2011) fanden dagegen die Untersuchungen mit *E. coli* MC4100 Stämmen ohne Arabinoseresistenz statt. Segler (2011) verwendete zudem Promoter-*lacZ*-Fusionen von  $P_{1624}$  und  $P_{1625}$  mit einer am 5' Ende um 14 bp verkürzten Gensequenz des gesamten Intergenens Bereichs von *rdhA1624* und *rdhR1625* (IR1624). Der IR1624-DNA-Bereich wurde mittels sequenzspezifischen Primern amplifiziert und in den pRS551-Vektor mit Hilfe der BamHI Schnittstelle ungerichtet *upstream* vom promoterlosen *lacZ*-Gen kloniert und in den *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF<sup>-</sup> transformiert. Anschließend wurde die Orientierung mittels Sequenzierung überprüft und durch Phagentransduktion in das Chromosom von *E. coli* MC4100ara<sup>R</sup> gebracht. Der resultierende Stamm mit dem Promoter von *rdhA1624* ( $P_{1624}$ ) in Fusion mit *lacZ* wurde als LS13 ( $P_{1624}::lacZ$ ) definiert, während der Stamm mit dem Promoter von *rdhR1625* ( $P_{1625}$ ) in Fusion mit *lacZ* als LS15 ( $P_{1625}::lacZ$ ) definiert wurde. Als Kontrollstamm fungierte MC4100ara<sup>R</sup> mit einem chromosomal integrierten promoterlosen *lacZ*-Gen (LS4). Des Weiteren wurde die in früheren Studien (Segler, 2011) verwendete *lacZ*-Fusion mit der um 14 Basen verkürzten Variante der Promoter-*lacZ*-Fusion  $P_{1625-14}::lacZ$  ebenfalls in MC4100ara<sup>R</sup> transduziert und als LS5 ( $P_{1625-14}::lacZ$ ) bezeichnet. Zur Überprüfung der Funktionsweise der Promotoren im heterologen *E. coli* System wurden anschließend  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Assays mit den erzeugten Stämmen, wie in 2.6.2 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 6 sind die daraus resultierenden Basisaktivitäten von LS4, LS13, LS5 und LS15 dargestellt.

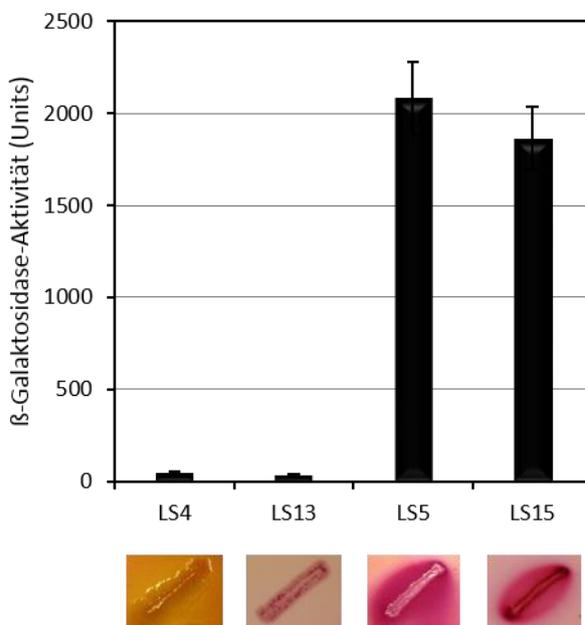


Abbildung 6.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *E. coli* Stämme LS4 (Kontrollstamm), LS13 ( $P_{1624}$ ), LS5 ( $P_{1625-14}$ ), LS15 ( $P_{1625}$ ) in Units und als Rot-Färbung auf McConkey-Agar. Die Zellanzucht erfolgte anaerob in LB-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,6, danach wurden 100  $\mu$ l der Zellkultur für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in Units von 3 Wiederholungen, die jeweils als biologisches Triplikat durchgeführt wurden. Unten dargestellt ist die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Stämme als Rotfärbung bei Wachstum auf McConkey Agar (12 h, 37 °C).

Wie zu erwarten, wies der Kontrollstamm LS4 eine vernachlässigbar geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von  $46 \pm 5$  Units auf. Der Stamm LS13 wies ebenfalls eine sehr geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im

Bereich des Kontrollstammes auf  $(36 \pm 5 \text{ Units})$ . Somit konnte dieses heterologe System für weitere Untersuchungen in Bezug auf die potenzielle Repression durch RdhR1625 nicht genutzt werden. Die Stämme LS5 und LS15 wiesen jedoch deutliche  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten im Bereich von  $2082 \pm 194 \text{ Units}$  für LS5 und  $1864 \pm 172 \text{ Units}$  für LS15 auf. Damit bot sich eine gute Basis für Interaktionsstudien mit dem Regulator RdhR1625. Es war nun möglich, die eventuell autoregulatorische Funktion von RdhR1625 zu analysieren. Neben dem quantitativen Assay, wurden die Stämme bezüglich ihrer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auch qualitativ mit Hilfe von Selektivmedium überprüft. Auf dem verwendeten McConkey-Agar färbten sich alle Stämme mit einer  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität rot. Die Kolonien von LS5 und LS15 färbten sich stark rot, während LS13-Kolonien lediglich schwach rot wurden und bei LS4 Kolonien keine Rotfärbung zu beobachten war (Abbildung 6).

#### 3.1.1.1 *In vivo Repression der Promoteraktivität von rdhR1625 durch RdhR1625*

Zur indirekten Untersuchung der regulatorischen Funktion von RdhR1625 auf die Expression von *rdhR1625* wurden die *E. coli* Stämme LS15 pBAD30, LS15 pBAD1625 und LS15 pBAD1625Stop verwendet. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme wurden nach anaerober Kultivierung in An- bzw. Abwesenheit von 0,02 % L-Arabinose in LB-Medium ermittelt und in Abbildung 7 dargestellt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten des Kontrollstamms LS15 pBAD30 wiesen keine signifikanten Unterschiede der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten zwischen den induzierten (grau) und den nicht induzierten Bedingungen (schwarz) auf, während der Stamm LS15 pBAD1625 in Anwesenheit von L-Arabinose eine deutlich geringere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von  $1.255,3 \pm 80,7 \text{ Units}$  aufwies als in Abwesenheit der L-Arabinose ( $2.104,4 \pm 123,2 \text{ Units}$ ).

Um zu überprüfen, ob die verringerte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf das Vorhandensein des intakten *rdhR1625*-Gens im pBAD30-Vektor zurückzuführen war und keinen Artefakt darstellte, wurde das *rdhR1625*-Gen zu einem funktionslosen Gen mutiert, indem das Startcodon von *rdhR1625* (ATG) in das Stopcodon TAG geändert wurde. Der Vektor wurde folglich als pBAD1625Stop bezeichnet und LS15 pBAD1625Stop als Kontrolle ebenfalls im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay eingesetzt. Dieser Stamm wies ähnlich wie der Kontrollstamm LS15 pBAD30 keinen signifikanten Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Bedingungen auf. Dies bestätigte die Funktion von RdhR1625 als Repressor von *rdhR1625 in vivo*.

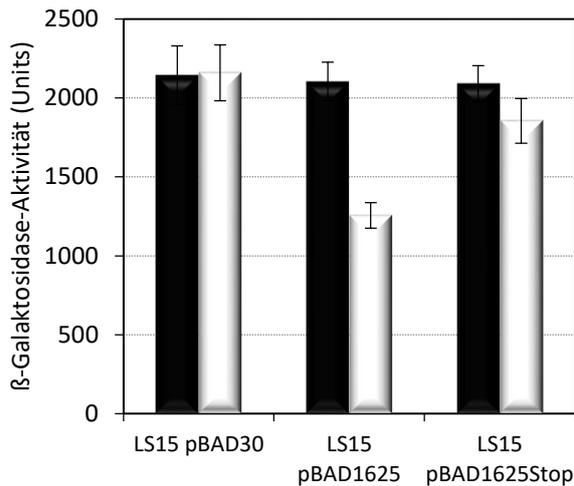


Abbildung 7. Einfluss von *pBAD1625* auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS15 in Abhängigkeit von einem intakten *rdhR1625*-Gen im *pBAD* Vektor. Dargestellt sind die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in Units eines Triplikats von *E. coli* LS15 *pBAD30*, *pBAD1625* und *pBAD1625Stop* nach anaerober Kultivierung in LB-Medium unter Zugabe von 0,02 % Arabinose als Induktor (hellgrau) im Vergleich zur Kultivierung ohne Induktor (schwarz).

Um die negative Regulation durch *RdhR1625* zu verstärken, wurden Versuche mittels verbesserter ShineDalgarno-Sequenz „AGGAGG“ nach Shine und Dalgarno (1974) vor dem *rdhR1625* Gen im *pBAD30* Vektor durchgeführt. Hierfür wurden für die Klonierung von *rdhR1625* in *pBAD30* 12 bp der *upstream*-Region von *rdhR1625* mit einer Mutation der natürlichen ShineDalgarno-Sequenz (CACAGG) zur perfekten ShineDalgarno Sequenz (AGGAGG) vor den Translationsstart von *rdhR1625* in *pBAD30* kloniert. Außerdem wurde alternativ *pBAD24* verwendet. Der Repressionseffekt konnte dadurch jedoch nicht verbessert werden (siehe Anhang Tabelle IV).

### 3.1.1.2 Die von *Cys50* des Regulators *RdhR1625* unabhängige Regulation der Promoter-Aktivität bei anaerober Anzucht

Da der *D. mccartyi* Stamm CBDB1 ein strikt anaerobes Bakterium ist, wurden auch die heterologen *in vivo* Studien nach anaerober Kultivierung der *E. coli* Stämme durchgeführt. Des Weiteren ist, wie in der Einleitung bereits erwähnt, von anderen MarR-Regulatoren bekannt, dass sie typischerweise als Dimer an die DNA binden. Von MexR aus *Pseudomonas aeruginosa* weiß man zudem, dass dieser MarR-Regulator über die Ausbildung von Disulfidbrücken abhängig vom Redoxpotential reguliert wird (Chen et al., 2008). Außerdem ist vom bisher einzigen Regulator mit bekannter Funktion innerhalb der dehalogenierenden Mikroorganismen (CprK aus *Dsb. hafniense*) bekannt, dass ebenfalls Cysteinreste eine entscheidende Rolle für die Aktivität des Regulators spielen. Unter oxidischen Bedingungen kommt es durch Disulfidbindung zu einer Stabilisierung einer Konformation des CprK-Homodimers, welche zwar noch den Effektor binden kann, jedoch keine DNA-Bindung mehr aufzeigt. (Pop et al., 2006). Um Aufschluss über den Regulationsmechanismus von *RdhR1625* zu erlangen wurden vergleichende  $\beta$ -

Galaktosidase-Assays mit dem Stamm LS5 nach aerober und anaerober Kultivierung durchgeführt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten des Kontrollstammes LS5 pBAD30 und des Stammes LS5 pBAD1625 sind in Abbildung 8 (A) dargestellt.

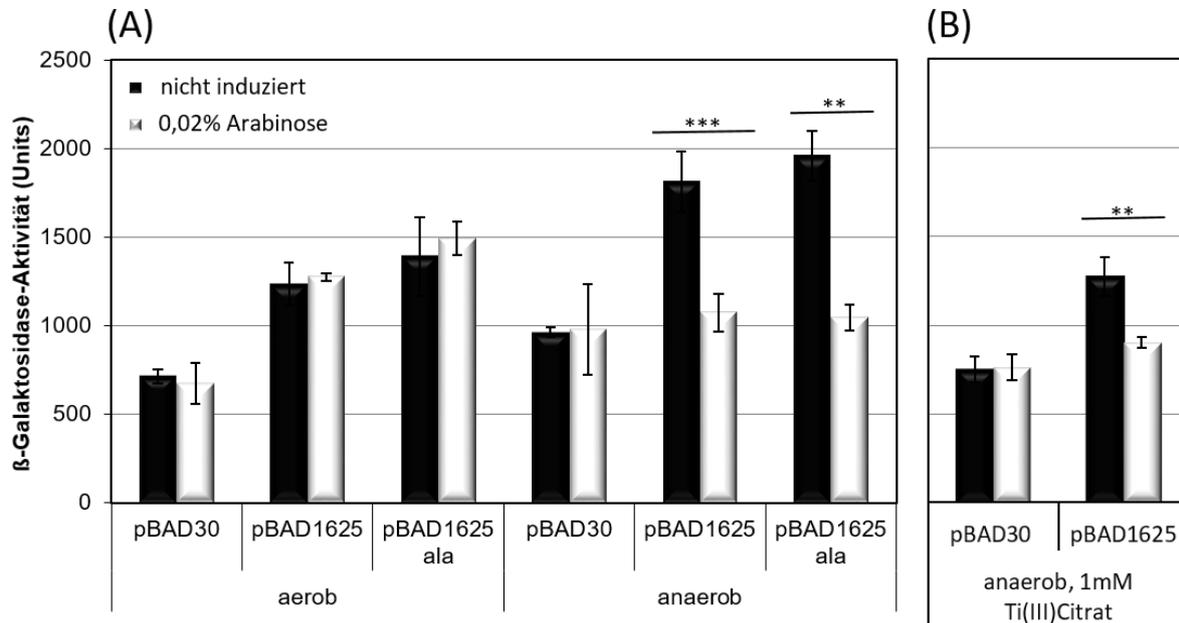


Abbildung 8. Einfluss der Kultivierungsbedingungen und des Cysteinrests von RdhR1625 auf seine autoregulatorische Funktion. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in Units eines Triplikats von *E. coli* LS5 pBAD30, pBAD1625 und pBAD1625ala nach aerober, anaerober (A) und anaerober Kultivierung mit 1 mM Ti(III)-citrat (B) in LB-Medium unter Zugabe von 0,02 % Arabinose als Induktor (hellgrau) im Vergleich zur Kultivierung ohne Induktor (schwarz). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des T-Tests bestimmt (\*\* entspricht  $0,01 \geq \alpha \geq 0,001$ ; \*\*\* entspricht  $\alpha \leq 0,001$ ;  $n = 3$ )

Auf der linken Seite der Abbildung 8 (A) sind die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten nach einer aeroben Kultivierung und rechts die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten nach einer anaeroben Kultivierung dargestellt. Vergleicht man die jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten unter induzierten (grau) und nicht induzierten (schwarz) Bedingungen, so wird ein deutlicher Unterschied zwischen der aeroben und anaeroben Anzucht sichtbar. Lediglich unter anaeroben Bedingungen sind die Aktivitäten von LS5 pBAD1625 nach einer Induktion signifikant niedriger als ohne eine Induktion. Beim Kontrollstamm LS5 pBAD30 waren dagegen keine signifikanten Unterschiede der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten zwischen induzierten und nicht induzierten Wachstumsbedingungen feststellbar. Die Tatsache, dass RdhR1625 scheinbar lediglich unter anaeroben Bedingungen als funktioneller Repressor gebildet wird, ließ vermuten, dass das einzige vorhandene Cystein an Position 50 unter aeroben Bedingungen oxidiert wird und zu einem inaktiven Protein führt. Um das zu analysieren, wurde das Cystein an Position 50 durch ein Alanin mittels *QuikChange*-Mutagenese (2.4.6.2) ausgetauscht. Der erhaltene Vektor pBAD1625ala wurde ebenfalls in LS5 transformiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten nach aerober und anaerober Zellanzucht ermittelt und ebenfalls in Abbildung 8 (A) dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass sich die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme LS5 pBAD1625 und pBAD1625ala

weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen signifikant voneinander unterscheiden. LS5 pBAD1625ala verhält sich genauso wie LS5 pBAD1625. Lediglich unter anaeroben Bedingungen ist eine Verminderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unter induzierten Bedingungen um ca. 56 % zu beobachten. Mit Hilfe von, mit 1 mM Ti-(III)-citrat versetztem, anaerobem Medium wurden Untersuchungen mit erniedrigtem Redoxpotential auf ca. -400 mV durchgeführt, um zu überprüfen ob das Redoxpotential einen Einfluss auf die Repression nimmt. Diese führten jedoch nicht zu einer stärkeren Repression durch RdhR1625 [Abbildung 8(B)].

#### 3.1.1.3 **Einfluss von potentiellen Liganden für RdhR1625 auf die *in vivo* Aktivität von Promoter $P_{1625}$**

Die Studien von Wagner (2009) lieferten *in vitro* Hinweise für eine mögliche Bindung von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB RdhR1625<sub>StrepC</sub>. Diese sollten mit Hilfe eines *in vivo* Systems überprüft werden. Dafür wurden die *E. coli* Stämme LS5 pBAD30 und LS5 pBAD1625 in Ab- bzw. Anwesenheit von L-Arabinose und 25 und 50  $\mu$ M 1,2,3-TCB bzw. 1,2,4-TCB kultiviert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme unter den verschiedenen Bedingungen bestimmt. Die herabgesetzte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch pBAD1625 wurde jedoch weder von 1,2,3-TCB noch von 1,2,4-TCB aufgehoben. Bemühungen zur verbesserten Lösung der TCBs im wässrigen Medium durch den Einsatz von  $\beta$ -Cyclodextrin als Lösungsvermittler führten ebenfalls nicht zur Aufhebung der Repression (siehe Abbildung II im Anhang).

#### 3.1.1.4 **Regulation von *rdhA1624* durch RdhR1625**

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, konnte das *in vivo* System mit dem Stamm LS13 nicht für die Untersuchung der Repression durch CbdbA1625 genutzt werden, da dieser Stamm zu niedrige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten aufwies. Daher sollte zunächst überprüft werden, ob der Promoter von *rdhA1624* eventuell durch RdhR1625 entgegen der üblichen Funktionsweise von MarR-Regulatoren als Repressoren, aktiviert wird. Hierfür wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Assay mit LS13 pBAD30 und LS13 pBAD1625 nach einer anaeroben Kultivierung durchgeführt. Es wurde aber auch hier keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS13 pBAD1625 unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen festgestellt. Auch die Einbringung des alternativen Sigmafaktors  $\sigma$ ECF aus CBDB1 in das System durch Transformation mit pACYC184 für eine verbesserte Erkennung des Promoters durch die *E. coli* RNA-Polymerase, sorgte nicht für eine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe Tabelle V im Anhang).

Aus diesem Grund wurde ein anderes heterologes System konstruiert, in dem der mit *lacZ* fusionierte intergene Bereich IR1624 konstitutiv transkribiert wurde. Die  $P_{1624::lacZ}$ -Fusion aus LS13 wurde in den

pACYC184 Vektor *downstream* des konstitutiven *tet*-Promoters kloniert. Anschließend wurde das resultierende Plasmid pACYCIR1624*lacZ* in den *E. coli* Stamm MC4100ara<sup>R</sup> transformiert. Die RdhR-kodierenden Gene *rdhR1625* und *rdhR1456B* wurden in den mit pACYC184 kompatiblen pASKIBA3 Vektor kloniert und  $\beta$ -Galaktosidase-Assays nach anaerober Kultivierung mit (schwarz) bzw. ohne 200 ng/ml AHT (grau) als Induktor für die Synthese der Regulatoren durchgeführt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme MC4100ara<sup>R</sup> pACYCIR1624*lacZ* pASKIBA3 (Kontrolle), MC4100ara<sup>R</sup> pACYCIR1624*lacZ* pASKIBA3\_1625 und MC4100ara<sup>R</sup> pACYCIR1624*lacZ* pASKIBA3\_1456B (Spezifitätskontrolle) sind in Abbildung 9 dargestellt.

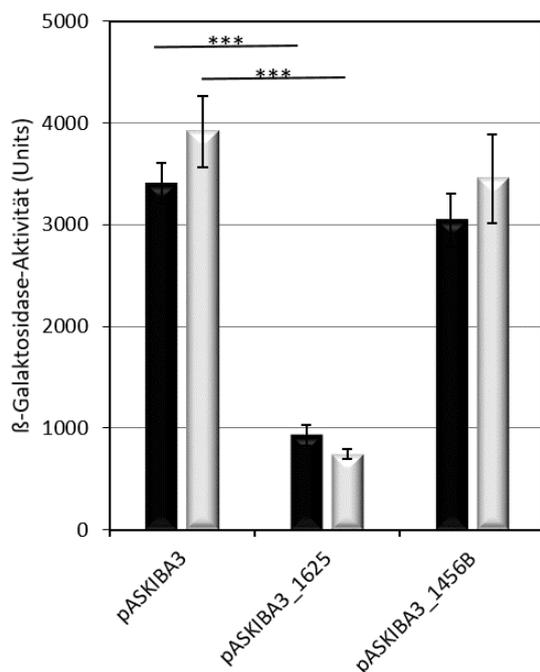


Abbildung 9. Einfluss von pASKIBA3\_1625 und pASKIBA3\_1456B auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von MC4100 pACYCIR1624::*lacZ*. Dargestellt sind die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von Triplikaten der *E. coli* Stämme MC4100ara<sup>R</sup> pACYCIR1624*lacZ* mit dem Leervektor pASKIBA3 als Negativkontrolle, pASKIBA3\_1456B, der den RdhR-Regulator RdhR1456B kodiert, und pASKIBA3\_1625 nach anaerober Kultivierung in LB-Medium unter Zugabe von 200 ng/ml AHT als Induktor zu Beginn der exponentiellen Phase ( $OD_{600} = 0,3$ ; hellgrau) im Vergleich zur Kultivierung ohne Induktor (schwarz). Die Signifikanz wurde mittels T-Test im Vergleich zur Negativkontrolle ermittelt. Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\* für  $\alpha \leq 0,001$  für  $n=3$  dargestellt.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der einzelnen Stämme unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen unterschieden sich nicht wesentlich, während jedoch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von MC4100ara<sup>R</sup> pACYCIR1624*lacZ* pASKIBA3\_1625 sowohl unter induzierten als auch unter nicht induzierten Bedingungen mit  $740 \pm 48$  bzw.  $930 \pm 102$  Units wesentlich niedriger war, als die der Kontrollen mit ca. 3.000-4.000 Units. Vom *tet*-Promoter/*tet*-Repressor-System ist bekannt, dass auch ohne die Induktion mit AHT eine basale Expression erfolgen kann. Jedoch ist diese mit einer mRNA je dritter Zelle unter nicht induzierenden Bedingungen relativ gering (Bertram und Hillen, 2008; Lutz und Bujard, 1997). Offensichtlich genügt aber bereits dieses basale Expressionsniveau des *tet*-Promoters im pASKIBA-Vektor für eine ausreichende Proteinsynthese von RdhR1625, um eine starke

Repressionswirkung auf die Transkription des  $P_{1624}$ -Promoters auszuüben. Lutz und Bujard (1997) ermittelten für den *Tet*-Promoter, der im pASKIBA-Vektor-System verwendet wird, im Vergleich zum hier verwendeten pBAD Promoter aus pBAD30 eine viermal schwächere Repression. Aus diesem Grund wurde der regulatorische Effekt von RdhR1625 anhand des Vergleiches zu den Kontrollstämmen festgemacht und nicht am Vergleich induzierter mit nicht induzierter Anzucht, wie für das pBAD30 System. Die Daten lieferten somit Hinweise darauf, dass die transkriptionelle Regulation von *rdh1624* unter der Kontrolle von RdhR1625 steht.

### 3.1.2 Ermittlung der Transkriptionsstarts von *rdhA1624* und *rdhR1625*

Die Ergebnisse zeigten, dass die Transkription von *rdhA1624* und *rdhR1625* durch RdhR1625 reprimiert wird. Wagner (2009) postulierte eine DNA-Binderegion im intergenen Bereich von *rdh1624-25* bestehend aus einem perfekten *inverted repeat*. MarR-Regulatoren steuern ihre Zielgene meist dadurch, dass innerhalb ihrer Binderegionen oder in unmittelbarer Nähe die Promotoren der Zielgene vorliegen. Dadurch wird, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die Rekrutierung und Bindung der RNA-Polymerase blockiert. Aus diesem Grund sollten die Promotoren von *rdhA1624* und *rdhR1625* ermittelt werden. Eine 5`RACE Analyse mit RNA aus CBDB1 und dem heterologen *E. coli* Stamm LS13 ergab für *rdhA1624* einen Transkriptionsstart von 110 nt und für *rdhR1625* von 148 nt (Abbildung 10). Die aus den bestimmten Transkriptionsstarts abgeleiteten -10 Regionen befinden sich innerhalb der DNA-Binderegion von RdhR1625 und die direkte Repression der Zielgene ist somit plausibel.

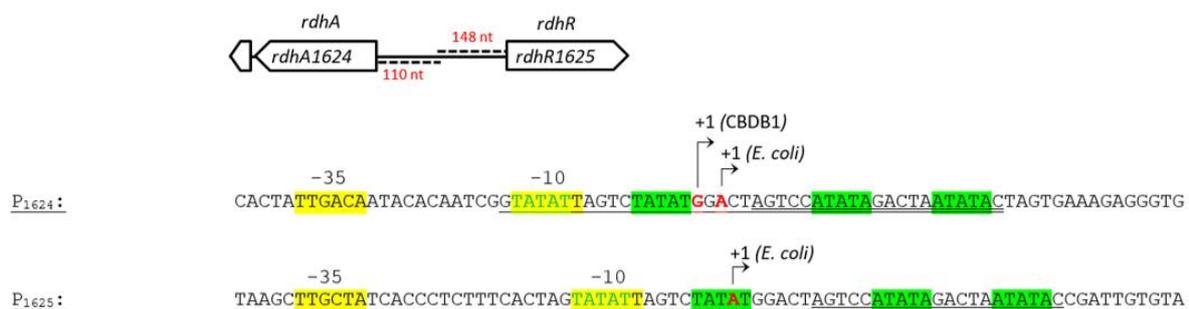


Abbildung 10. Promoterbereiche und Transkriptionsstarts der Gene *rdhA1624* und *rdhR1625*. Dargestellt ist eine schematische Übersicht der Genregion mit den Abständen der Transkriptionsstarts vom Translationsstart (rot markiert), sowie die Sequenzen der Promoterbereiche mit den -35 und -10 Boxen (gelb), den *inverted repeats* (einzeln und doppelt unterstrichen), sowie den darin vorkommenden *inverted repeats* (grün markiert). Mit +1 sind die Basen der Transkriptionsstarts markiert, welche mittels 5`RACE an RNA aus CBDB1 und heterologen *E. coli* Stämmen ermittelt wurden.

## 3.2 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION DES CBDBB\_A1452-56 GENCLUSTERS

(Daten teils publiziert in Krasper et al., 2016)

Neben dem reduktiven Dehalogenasegen *rdhA1624* werden in Anwesenheit von TCBs als Elektronenakzeptoren auch weitere *rdhA*-Gene transkribiert. Besonders interessant war in diesem Zusammenhang das *rdhA*-Gen *rdhA1453*. Im Vergleich zu *rdhA1624* wies dieses Gen eine unterschiedliche Transkription in Abhängigkeit vom Elektronenakzeptor auf (Wagner et al., 2009). Beide Gene wurden in Anwesenheit von TCBs vermehrt transkribiert, doch während *rdhA1624* mit 1,2,4-TCB vermehrt transkribiert wurde, so war eine erhöhte Transkription von *rdhA1453* mit 1,2,3-TCB zu beobachten. Außerdem ist *rdhA1453* ungewöhnlich im Genom von CBDB1 lokalisiert. *RdhA1453* befindet sich in einem Cluster mit einem zweiten putativen Dehalogenasegen *rdhA1455* und ist nicht wie die meisten *rdhA*-Gene in CBDB1 direkt mit einem *rdhR*-Gen assoziiert (Abbildung 3). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, wie *rdhA1453* im Verlauf der OHR reguliert wird und ob es Bestandteil eines Operons aus 2 *rdhAB*-Genen ist, das unter der Kontrolle des gleichen MarR-Regulators steht.

### 3.2.1 Transkription des *rdhAB1452-55* Operons in CBDB1

Zunächst sollte analysiert werden, ob das vermeintliche Operon eine Transkriptionseinheit bildet. Hierfür wurden Transkriptionsversuche mit 1,2,3-TCB als Elektronenakzeptor in CBDB1 durchgeführt. Zwei Kulturen wurden parallel 10 %ig aus einer Zweiflüssigphasen-Stammkultur inokuliert, so dass eine Ausgangszellzahl von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Kultur erreicht wurde. Die Kulturen wurden einer zweistufigen Hungerphase ausgesetzt (2.3.1.3) und anschließend mit 50  $\mu$ M 1,2,3-TCB versetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 30 °C im Dunkeln wurden die Transkriptionsanalysen durchgeführt. Nach der Isolation der Gesamt-RNA aus 2 ml der Kultur und einer anschließenden reversen Transkription zu cDNA, sowie der DNA-Isolation aus 1 ml der Kultur, wurde die erhaltene cDNA und DNA als *template* für verschiedene PCRs verwendet. In Abbildung 11 ist schematisch dargestellt, welche Bereiche des *rdhAB1452-1455* Operons auf eine Transkription hin überprüft wurden. Alle drei Gene *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhR1456* wurden in Anwesenheit von 1,2,3-TCB transkribiert [Abbildung 11 (b), (f), (g)]. Des Weiteren wurde die Transkription der *rdhAB*-Gene *rdhAB1452-53* und *rdhAB1454-55* als jeweilige Transkriptionseinheit mit Hilfe einer überlappenden PCR nachgewiesen [Abbildung 11 (a), (e)]. Die Cotranskription von *rdhA1455* und *rdhA1453* wurde mit Hilfe von PCRs, die den intergenen Bereich zwischen *rdhA1453* und *rdhB1454* abdeckten, untersucht. Hierbei wurde in PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primern (Anhang Tabelle III) Produkte, welche für eine Cotranskription sprechen, beobachtet [Abbildung 11 (c), (d)]. Außerdem wurde ein Produkt

beobachtet, dass den gesamten intergenen Bereich, *rdhB1454* und den hinteren Teil von *rdhA1455* überspannt [Abbildung 11 (h)]. *RdhAB1452-1455* kann somit als Transkriptionseinheit betrachtet werden und wird im Folgenden als *rdhAB1452-55* Operon bezeichnet.

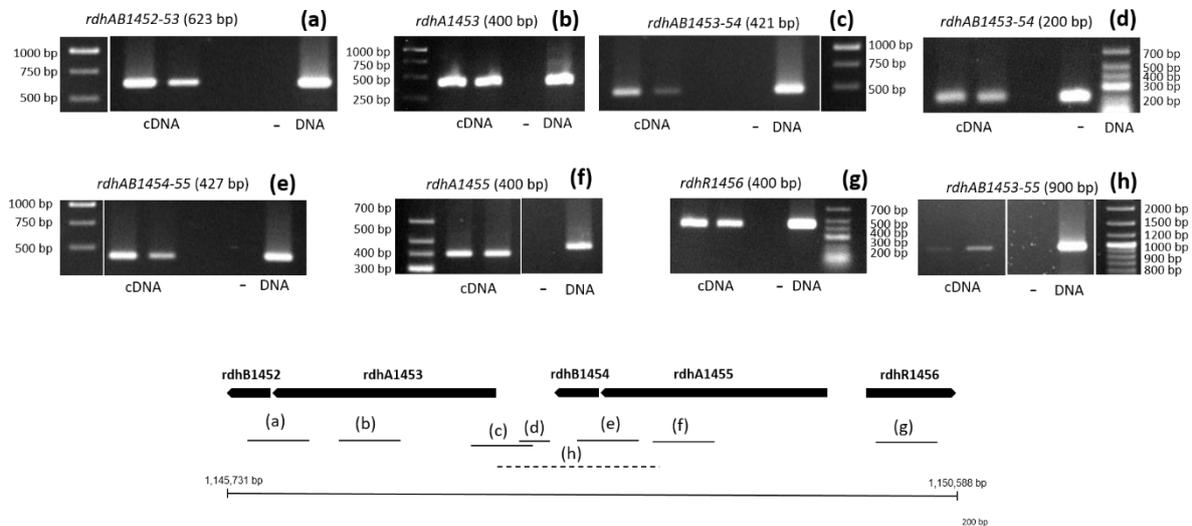


Abbildung 11. Organisation des *rdhAB1452-1455* Operons im *D. mccartyi* Stamm CBDB1 und Ergebnisse der RT-PCR. Für die RT-PCR wurde RNA aus CBDB1 Kulturen mit 50  $\mu$ M 1,2,3-TCB nach 24 h Inkubationszeit verwendet. Die durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesenen RT-PCR-Produkte und deren Lokalisierung innerhalb des Genclusters sind mit a-h bezeichnet.

### 3.2.2 Induktion der Transkription durch 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol

Da die *rdhA*-Gene *rdhA1453* und *rdhA1455* eine Transkriptionseinheit zu bilden scheinen, sollte im Folgenden analysiert werden, ob die transkriptionelle Regulation dieser Gene ebenfalls simultan erfolgt und die RdhAs möglicherweise ähnliche Funktionen in der OHR erfüllen. Im Zuge dessen sollte auch überprüft werden, ob der assoziierte Regulator *rdhR1456* ebenfalls ähnlich zu den *rdhA*-Genen transkribiert wird. Hierfür wurde ein zeitlicher Verlauf der Transkription aller drei Gene während der OHR mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Elektronenakzeptor (Aceton) untersucht. Die Versuchskulturen (jeweils 50 ml) wurden 10 %ig aus einer Stammkultur inokuliert und einer einfachen Hungerphase (72 h) ohne TCBs unterzogen, um die Transkriptmenge zu reduzieren. Anschließend erfolgte der Zusatz von 50  $\mu$ M 1,2,3-TCB, bzw. 50  $\mu$ M 1,2,4-TCB und Wasserstoff im Überschuss. Es erfolgte eine Probenahme zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h, indem jeweils zwei Kulturen einer Versuchsvariante vollständig geerntet und für die RNA-Extraktion (45 ml; 2.4.2), die DNA-Extraktion (1 ml; 2.4.1) und die gaschromatographische Analyse (0,5 ml; 2.6.1.2) verwendet wurden. Die Transkription der drei Gene wurde anschließend im Verlauf der reduktiven Dechlorierung der TCBs mittels qRT-PCR (0) anhand der erhaltenen cDNA verfolgt. Abbildung 12 zeigt den Verlauf der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB zu den Dechlorierungsprodukten 1,3-DCB und 1,4-DCB innerhalb des Versuchszeitraumes von 72 h. Sowohl 1,2,4-TCB als auch 1,2,3-TCB wurden im

Verlauf des Versuches, wie zu erwarten war, nach bekanntem Dechlorierungsmuster vollständig dechloriert (Adrian et al., 2000).

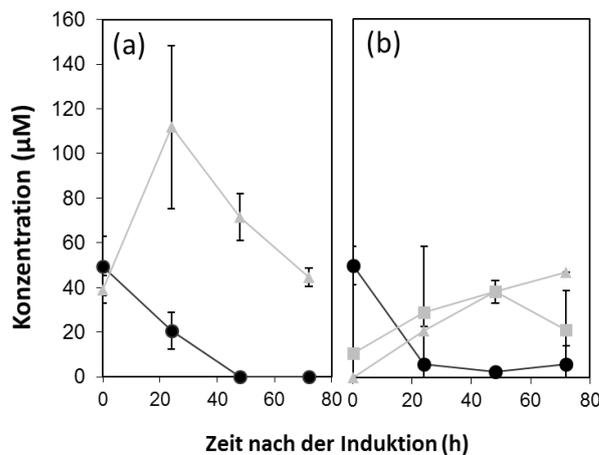


Abbildung 12. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB (a) und 1,2,4-TCB (b). Dargestellt sind Mittelwerte der Konzentrationen von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB (●), 1,3-DCB (▲) und 1,4-DCB (■) zweier paralleler Kulturen.

Von den *rdhA*-Genen *rdhA1453* und *rdhA1455* wurden im Versuchsverlauf zunehmende Transkriptmengen gebildet. Dabei wurde, wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, in Gegenwart von 1,2,3-TCB (a) als auch mit 1,2,4-TCB (b) als Elektronenakzeptor eine zunehmende Transkription nach 48 h um das 24-26 fache für *rdhA1453* und für *rdhA1455* eine 8-9 fache Zunahme der Transkription beobachtet, während keine Transkriptionsinduktion in der Kontrolle ohne Elektronenakzeptor (c) zu beobachten war. Des Weiteren wurde eine Zunahme der Transkriptkopienzahl pro Genkopienzahl des *rdhR*-Gens *rdhA1456* in Anwesenheit der TCBs festgestellt. Der Transkriptionsversuch wurde mehrfach mit vereinfachtem Versuchsaufbau wiederholt. Abweichend zum gezeigten Versuch wurde in den Versuchswiederholungen eine zweistufige Hungerphase (2.3.1.3) durchgeführt, um den Wasserstoff aus den Kulturen zu entfernen. Außerdem wurden für die RNA-Extraktion lediglich 2 ml Probe aus den Kulturen entnommen und statt einem Überschuss von  $H_2$ , wurden jeweils, 5 µM, 20 µM bzw. 0 µM  $H_2$  als Elektronendonator eingesetzt. Die Ergebnisse der Wiederholungen bestätigten die transkriptionelle Induktion aller drei Gene in Anwesenheit von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB auch unabhängig von der  $H_2$ -Konzentration (Anhang Abbildung III und IV). Jedoch wurden keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf einen möglichen Unterschied in der Höhe der Transkriptmengen der drei Gene in Gegenwart der zwei verschiedenen Elektronenakzeptoren beobachtet. Außerdem wurde festgestellt, dass die Transkriptionsmaxima der Gene mit dem Ende der reduktiven Dechlorierung korrelierten. Nach 48 h waren 1,2,3-TCB als auch 1,2,4-TCB komplett zu den Produkten 1,3-DCB und 1,4-DCB umgesetzt. Eine Transkription fand also nur effektiv in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors statt. War dieser aufgebraucht, stagnierte auch die Transkription.

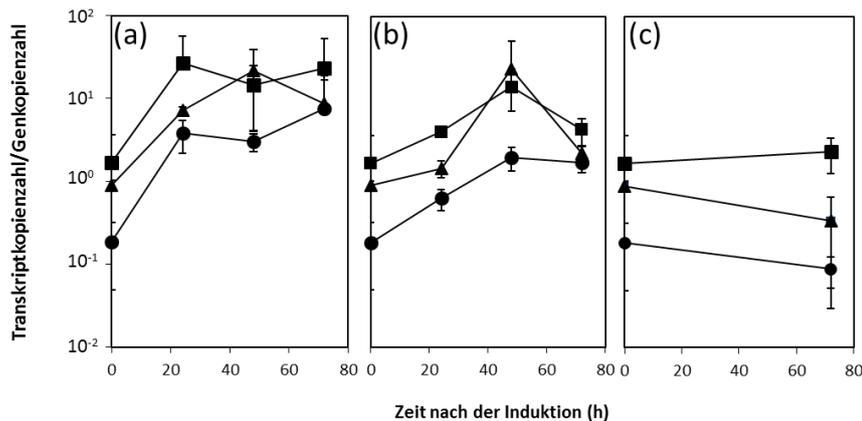


Abbildung 13. Quantitative Transkriptionsanalyse der *rdhA*-Gene *rdhA1453* (▲) und *rdhA1455* (■), sowie des *rdhR*-Gens *rdhR1456* (●) während der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TCB (a) und 1,2,4-TCB (b) im Vergleich zur Kontrolle (c). Die Kulturen wurden 10 % aus einer Zweiflüssigphasen-Kultur mit 1,2,3-TCB inokuliert und nach einer Hungerphase (72 h) der Versuch mittels TCBs und  $H_2$  gestartet. Dargestellt sind Mittelwerte der Transkriptkopienganzahl pro Genkopienganzahl der Versuchszeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h von jeweils 2 Kulturen in dreifacher technischer Ausführung.

### 3.2.3 Bestimmung der Promotorbereiche von *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhR1456*

Ausgehend von der beobachteten polycistronischen Transkription der beiden *rdhA*-Gene sollte geprüft werden, ob nur ein Promoter vor *rdhA1455* existiert, oder ob *rdhA1453* einen eigenen Promoter besitzt, wodurch die Transkription beider *rdhA*-Gene getrennt voneinander ablaufen kann. Um diese Frage zu klären, wurden die Transkriptionsstartpunkte beider *rdhA*-Gene *rdhA1453*, *rdhA1455* und des *rdhR*-Gens *rdhR1456* sowie eines weiteren *rdhA*-Genes von CBDB1 (*rdhA1598*) mit Hilfe von 5'RACE ermittelt. Dafür wurde RNA von CBDB1 verwendet. Die Transkriptionsstarts lagen für *rdhA1455* bei 123 nt und *rdhA1456* bei 41 nt *upstream* (Abbildung 14) vom Translationsstart. *RdhA1453* besitzt seinen Transkriptionsstart 114 nt *upstream* vom Translationsstart (Wagner, 2009). Die Transkription von *rdhA1598* beginnt 138 nt *upstream* vom ATG. In Abbildung 14 sind basierend auf den ermittelten Transkriptionsstarts (+1) schematisch die Genregion und die Promoterbereiche mit den theoretischen -10 und -35 Regionen vergleichend dargestellt. Hierfür wurde die pBROM-Software (softberry, Linux) eingesetzt. Die Software trifft eine Vorhersage zum theoretischen Transkriptionsstart und zu den  $\sigma 70$  Erkennungsstellen (-10 und -35 Regionen). Für *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhA1598* existiert um den +1-Bereich ein *direct repeat* (DR) bestehend aus 13 bzw. 11 bp mit darin enthaltenen kurzen *inverted repeats* (GTATAC). Im +1-Bereich von *rdhA1456* wurde keine derartige Region gefunden. Vergleicht man nun die Promotersequenzen miteinander, wird deutlich, dass  $P_{1453}$  und  $P_{1455}$  sehr ähnlich aufgebaut sind. Beide besitzen eine konservierte TATA-Box und eine fast identischen +1-Bereich. Lediglich die -35-Region ist bei  $P_{1453}$  nicht so gut konserviert wie bei  $P_{1455}$ . Es ist also davon auszugehen, dass eine unabhängige Transkription beider Gene möglich ist.  $P_{1598}$  besitzt ebenfalls eine sehr hohe Ähnlichkeit zu  $P_{1455}$  mit dem Unterschied, dass sich der Transkriptionsstart mit (138 nt) 15 bp weiter

im *upstream*-Bereich des Gens befindet, als bei *rdhA1455* (123 nt). Der Promoterbereich von P<sub>1456</sub> unterscheidet sich von denen der *rdhA*-Gene. Es existiert hier keine *repeat*-Region um den Transkriptionsstart, der auch viel näher am ATG liegt (41 nt *upstream*) als bei den *rdhA*-Genen. Außerdem sind sowohl die -35 Region als auch die -10 Region weniger konserviert, als bei P<sub>1455</sub>. Genregionen, die unter der Kontrolle von MarR-Regulatoren stehen, besitzen wie bereits in der Einleitung erwähnt (1.5), palindromische Sequenzen als Erkennungsstellen für den Regulator. Ob die identifizierten *repeat*-Bereiche in P<sub>1453</sub> und P<sub>1455</sub> für die Regulation des untersuchten *rdhAB1452-1455* Operons eine Rolle spielen, sollte im Folgenden untersucht werden.

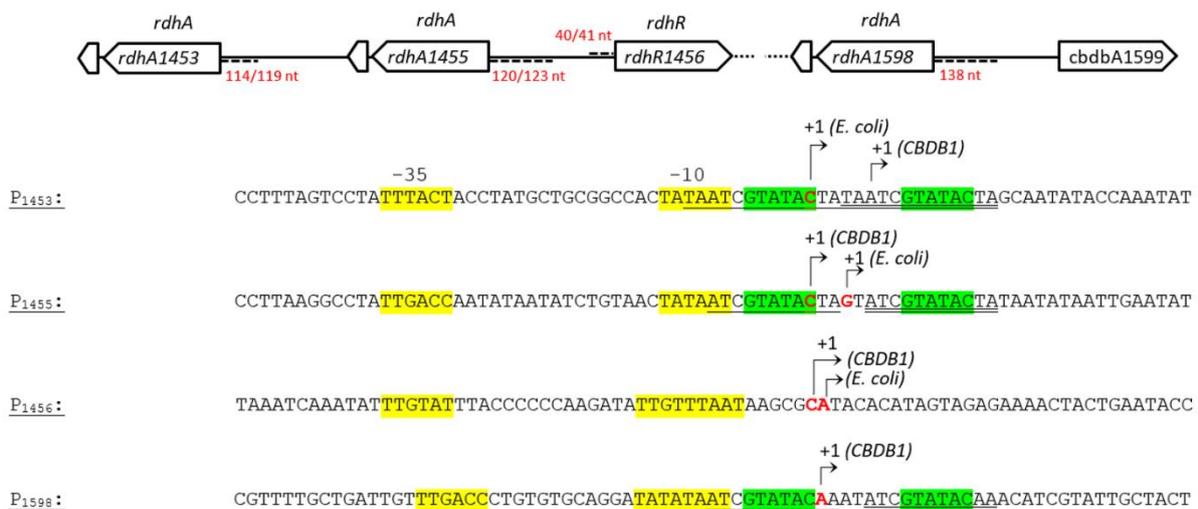


Abbildung 14. Promoterbereiche und Transkriptionsstarts der Gene *rdhA1453*, *rdhA1455*, *rdhR1456* und *rdhA1598*. Dargestellt ist eine schematische Übersicht der Genregionen mit den Abständen der Transkriptionsstarts vom Translationsstart (rot markiert), sowie die Sequenzen der Promoterbereiche mit den -35 und -10 Boxen (gelb), den direct repeats (einzeln und doppelt unterstrichen), sowie den darin vorkommenden inverted repeats (grün markiert). Mit +1 sind die Basen der Transkriptionsstarts markiert, welche mittels 5'RACE an RNA aus CBDB1 und heterologen *E. coli* Stämmen ermittelt wurden.

### 3.3 REGULATORFUNKTION VON RDHR1456

(Daten teils publiziert in Krasper et al. 2016)

#### 3.3.1 Etablierung eines heterologen *in vivo* Systems zur Untersuchung der Regulation des *rdhAB1452-55* Operons

Zur Analyse der Regulation des *rdhAB1452-55* Operons wurde, wie für *rdhA1624*, ein heterologes *in vivo* System verwendet. Hierfür wurde in das Chromosom des L-Arabinose-resistenten *E. coli* Stamms MC4100ara<sup>R</sup> die intergenen Bereiche *rdhAB1453-54*, *rdhAB1456-55* und *rdhAB1455-56* als Promoter-*lacZ* Fusionen mittels Phagentransduktion integriert. Die so erzeugten Stämme wurden als LS9 (P<sub>1453::lacZ</sub>), LS20 (P<sub>1455::lacZ</sub>) und LS21 (P<sub>1456::lacZ</sub>) bezeichnet. Vor weiteren Analysen wurden die β-

Galaktosidase-Aktivitäten der erzeugten Stämme nach einer anaeroben Kultivierung in LB-Medium bestimmt, sie sind in Abbildung 15 aufgeführt. Alle Stämme wiesen eine deutliche Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (LS4) auf. Dies bot eine Basis für alle weiteren *in vivo* Untersuchungen zur Regulation des Operons durch den assoziierten Regulator RdhR1456.

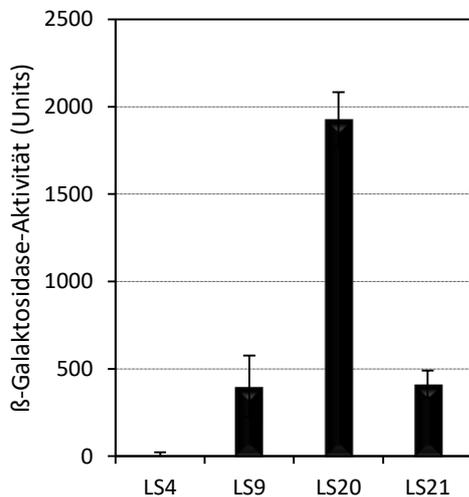


Abbildung 15.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *E. coli* Stämme LS4 (Kontrolle), LS9 ( $P_{1453::lacZ}$ ), LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ) und LS21 ( $P_{1456::lacZ}$ ). Die Anzucht erfolgte anaerob in LB-Medium. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mehrfach in unabhängigen Wiederholungen verifiziert.

### 3.3.2 *In vivo* Repression der Promoteraktivitäten von *rdhA1453* und *rdhA1455* durch *RdhR1456*

Die Regulation des *rdhAB1452-55* Operons durch RdhR1456 wurde *in vivo* mit Hilfe des pBAD-Expressionssystems untersucht. Dafür wurde die Gensequenz von *rdhR1456* mit den Primern pBAD1456EcoRI\_fw und pBAD1456HindIII\_rev entsprechend der zu Beginn der Arbeit vorliegenden annotierten Gensequenz aus dem CBDB1-Genom (EMBL-Eintrag AJ 965256.1) amplifiziert und über die Restriktionsstellen gerichtet in pBAD30 kloniert. Der resultierende Vektor wurde als pBAD1456A bezeichnet. Nach einer Überprüfung der Ribosomenbindestelle von *rdhR1456* wurde der tatsächliche Translationsstart 78 bp weiter *downstream* vermutet, was auch durch die aktuelle Genomsequenz (NC 007356.1) unterstützt wird. Deshalb wurde ein weiterer Vektor mit einem entsprechend verkürzten *rdhR1456*-Gen konstruiert. Die Amplifikation erfolgte hierfür mit den Primern pBAD1456EcoRI\_fw2 und pBADHindIII\_rev. Nach erfolgreicher Klonierung in pBAD30 wurde dieser Vektor als pBAD1456B bezeichnet.

Um zu überprüfen, ob RdhR1456A bzw. RdhR1456B unter den verwendeten Bedingungen im *in vivo* System synthetisiert werden, sollten sie mit Hilfe einer Massenspektrometrie (MS) nachgewiesen werden. Dafür wurden die *E. coli* Stämme LS20 pBAD1456A, LS20 pBAD1456B und LS21 pBAD1456B in 14 ml LB-Medium anaerob kultiviert. Jeder Stamm wurde jeweils einmal ohne und einmal mit 0,02 %

L-Arabinose parallel bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,4-0,6 kultiviert und anschließend geerntet (3.661 x g, 10 min), aufgeschlossen (2 x 30 W, 2 min) und fraktioniert (21.380 x g). Das Rohextrakt wurde in einer 12,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mittels Coomassie-Brilliant Blau gefärbt, es ist in Abbildung 16 (A) dargestellt.

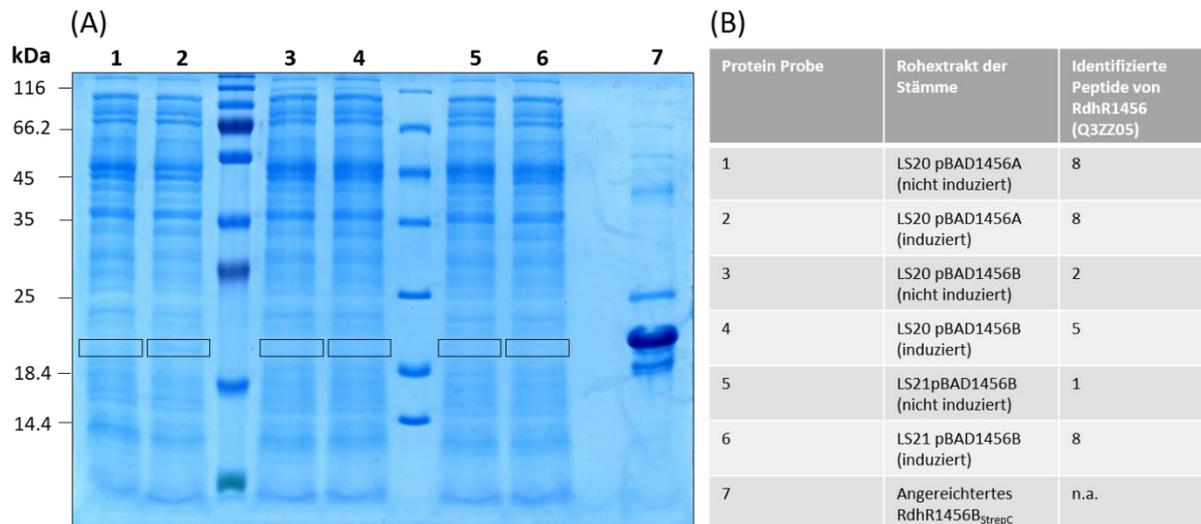


Abbildung 16. Untersuchung der Stämme LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ), LS21 ( $P_{1456::lacZ}$ ) mit pBAD1456A bzw. pBAD1456B auf Synthese von RdhR1456. Dargestellt ist in (A) ein mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbtes SDS-Gel (12,5 %) der Rohextrakte (20  $\mu$ g) der untersuchten Stämme LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ), LS21 ( $P_{1456::lacZ}$ ) mit pBAD1456A bzw. pBAD1456B nach einer anaeroben Zellanzucht in LB-Medium ohne Arabinose-Induktion (Spuren 1, 3, 5) im Vergleich zur Anzucht mit 0,02 % Arabinose (Spuren 2, 4, 6). Ein angereichertes RdhR1456<sub>strepC</sub> Protein diente als Orientierungshilfe für den ausgewählten Bereich für die MS-Analyse (7). Die markierten Bereiche wurden ausgeschnitten und mittels MS auf Vorhandensein von RdhR1456-Peptiden analysiert (B).

Es wurden im Gel bis auf eine schwache Bande in Spur 2 keine Banden mit dem theoretischen Molekulargewicht von RdhR1456A (23 kDa) oder RdhR1456B (19,9 kDa) mit Hilfe dieser Färbemethode sichtbar gemacht. Deshalb wurden blind Bereiche aus dem Gel geschnitten, die der theoretischen Größe von RdhR1456 entsprachen. Diese Gelstücke wurden mittels MS im Rahmen einer Kooperation durch Anja Kublik (UFZ, Leipzig) analysiert. Sie sind in Abbildung 16 (B) tabellarisch zusammengefasst. In allen analysierten Proteinproben wurden Peptide von RdhR1456 detektiert. Für die Stämme mit pBAD1456B war die Anzahl der Peptide abhängig von der Induktion. Für LS20 pBAD1456B wurden fünf Peptide von RdhR1456 unter induzierten Bedingungen nachgewiesen im Vergleich zu zwei Peptiden in der nicht induzierten Kontrolle. In LS21 pBAD1456B wurden ebenfalls mehr Peptide unter induzierten Bedingungen identifiziert als ohne Induktion mit L-Arabinose (8:1). Lediglich im Stamm LS20 pBAD1456A wurde kein Unterschied zwischen den Bedingungen festgestellt. Bei beiden Anzuchtvarianten wurden acht Peptide von RdhR1456 im Rohextrakt nachgewiesen. Weiterhin wurde festgestellt, dass sowohl für die Stämme mit pBAD1456B als auch für LS20 pBAD1456A lediglich Peptide aus dem Bereich nach dem vermuteten korrigierten Translationsstart B von *rdhR1456* gefunden wurden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Translationsstart B vermutlich der korrekte Start von *rdhR1456* ist. Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse wurde die Synthese des

RdhR1456 Proteins in den untersuchten Stämmen nachgewiesen. Durch die Zunahme der identifizierten Peptide in Rohextrakten von Kultivierungen mit L-Arabinose wurde ein induzierender Effekt der L-Arabinose in dieser Konzentration für das pBAD-Vektorsystem bestätigt. Für LS20 pBAD1456A war dieser Effekt nicht zu beobachten. RdhR1456A wurde in diesem Fall scheinbar unabhängig von einer Induktion synthetisiert. Die folgenden *in vivo* Interaktionsstudien wurden zunächst mit beiden Varianten pBAD1456A und pBAD1456B durchgeführt.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten des Stammes LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ) mit verschiedenen pBAD-Vektoren wurde hierfür nach einer anaeroben Kultivierung in LB-Medium ohne und mit 0,02 % L-Arabinose analysiert (Abbildung 17). Als Kontrolle fungierte LS20 pBAD30, der unter beiden Bedingungen eine annähernd gleiche Aktivität von  $1.182,1 \pm 217,8$  bzw.  $1.173 \pm 84,0$  Units aufwies. Dagegen war für LS20 pBAD1456A unter beiden Bedingungen nahezu keine Aktivität messbar. Für LS20 pBAD1456B ergab sich ein anderes Bild, unter nicht induzierten Bedingungen wurde eine Aktivität von  $1.786,8 \pm 60,1$  Units ermittelt, während der Stamm mit Induktion eine deutlich reduzierte Aktivität von  $804,9 \pm 118,8$  Units erreichte.

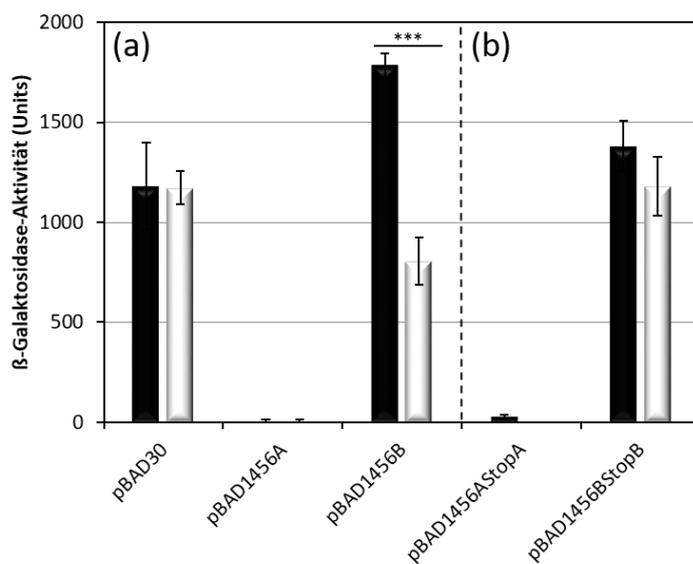


Abbildung 17. Einfluss von verschiedenen pBAD1456-Varianten auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ). Die Anzucht erfolgte anaerob in LB-Medium ohne (Schwarz) und mit 0,02 % L-Arabinose (grau). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats in Units. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mehrfach in unabhängigen Experimenten verifiziert. (pBAD = pBAD30, 1456A = rdhR1456 vor der Reannotation, 1456B = rdhR1456 nach der Reannotation, Stop = Startcodon an Position A bzw. B der Annotation wurde zu einem Stopcodon mutiert). Signifikante Unterschiede wurden mittels T-Test ermittelt und sind mit \*\*\* für  $\alpha \leq 0,001$  gekennzeichnet.

Aus dem Ergebnis von LS20 pBAD1456B kann geschlossen werden, dass zum einen das im MS nachgewiesene Protein RdhR1456B unter induzierten Bedingungen vorhanden war und zum anderen, dass es als Repressor für *rdhA1455* wirkt, indem es an die Promoterregion von *rdhA1455* im Stamm LS20 bindet. Der reannotierte Translationsstart von *rdhA1456* produziert somit im pBAD-Vektorsystem ein funktionsfähiges Protein, welches unter der Kontrolle des pBAD Repressors steht und nur unter

induzierten Bedingungen synthetisiert wird. Da für LS20 pBAD1456A nahezu keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sowohl unter induzierten als auch unter nicht induzierten Bedingungen zu beobachten war, und in den MS-Analysen unter beiden Bedingungen Peptide des Proteins identifiziert wurden, ist davon auszugehen, dass die Synthese des Proteins in diesem Fall konstitutiv erfolgte.

Die erhaltenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Translationsstart B der tatsächliche Start von *rdhR1456* ist. Dadurch befindet sich der pBAD Promoter zu weit *upstream* vom Translationsstart von *rdhR1456* im pBAD1456A Vektor, um eine durch das pBAD-System regulierte Expression zu gewährleisten. Außerdem befinden sich in der 78 bp umfassenden *upstream* Region von *rdhR1456B* auch die natürliche Promoterregion und die Shine-Dalgarno-Sequenz von *rdhR1456*. Die Expression wird nicht durch den pBAD-Repressor inhibiert, wodurch eine konstitutive Expression von *rdhR1456* erfolgt. Das könnte die beobachtete drastische Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des Stammes LS20 pBAD1456A zur Folge haben, da vermutlich das synthetisierte RdhR1456 an den Promoter von *rdhA1455* bindet.

Um diese Vermutung zu beweisen, wurde die Gensequenz für den Translationsstart A (ATG) im Vektor pBAD1456A zu einem Stopcodon (TAG) mittels gezielter QuikChange-Mutagenese (2.4.6.2) mutiert und der Vektor als pBAD1456AStop bezeichnet. Als zusätzliche Kontrolle wurde neben dem putativen Translationsstart A auch die Gensequenz des Translationsstarts B auf gleiche Weise zu einem Stopcodon mutiert und der Vektor im Folgenden als pBAD1456BStopB bezeichnet. Das Ergebnis der  $\beta$ -Galaktosidase-Untersuchung mit den Stämmen LS20 pBAD1456AStopA und LS20 pBAD1456BStopB ist Abbildung 17 (b) zu entnehmen.

Für LS20 pBAD1456AStopA wurde keine wesentliche  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Das spricht dafür, dass der vermeintliche Translationsstart A keinen Einfluss auf die Proteinsynthese von RdhR1456 besitzt. Dagegen unterschieden sich die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von LS20 pBAD1456BStopB unter nicht induzierten Bedingungen von  $1.382,2 \pm 125,6$  Units und  $1.179,8 \pm 147,5$  Units unter induzierten Bedingungen kaum voneinander. Das Protein kann vermutlich bei Mutation von Translationsstart B nicht mehr synthetisiert werden und somit keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS20 pBAD1456BStopB nehmen. Der tatsächliche Translationsstart von *rdhR1456* ist also vermutlich der Translationsstart B. Dieses Ergebnis untermauert die bereits erwähnte Reannotation des CBDB1-Genoms durch das *Prokaryotic RefSeq Genome Reannotation Projects* (NCBI, 2015). Im Folgenden wurden deshalb alle weiteren Untersuchungen ausgehend von diesem Translationsstart B durchgeführt und alle erzeugten Konstrukte von *rdhR1456B* nur noch mit *rdhR1456* bezeichnet.

Anschließend sollte die Interaktion von RdhR1456 mit den Promotoren des nicht direkt benachbarten *rdhA*-Gens *rdhA1455* und seinem eigenen Promoter untersucht werden. Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Assays nach Standardbedingungen der *E. coli* Stämme LS9 ( $P_{1453}::lacZ$ ), LS20 ( $P_{1455}::lacZ$ ) und LS21 ( $P_{1456}::lacZ$ ) sind im Folgenden dargestellt (Abbildung 18).

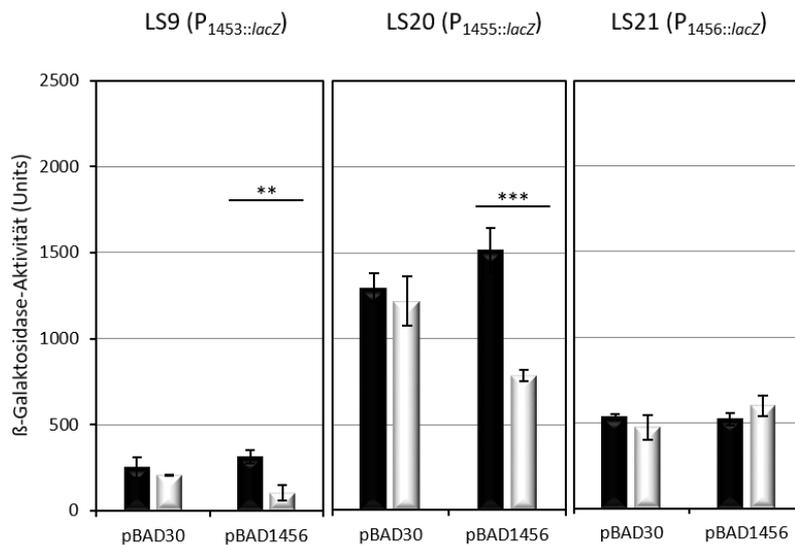


Abbildung 18. Regulatorische Wirkung von RdhR1456 auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *E. coli* Stämme LS9 ( $P_{1453}::lacZ$ ), LS20 ( $P_{1455}::lacZ$ ), LS21 ( $P_{1456}::lacZ$ ). Die Anzucht erfolgte anaerob in LB-Medium ohne (schwarz) oder mit 0,02 % L-Arabinose (grau). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung in Units. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mehrfach in unabhängigen Experimenten verifiziert. Signifikante Unterschiede wurden mittels T-Test ermittelt und sind mit \*\* für  $\alpha \leq 0,01$  und \*\*\* für  $\alpha \leq 0,001$  gekennzeichnet.

Für LS9 pBAD1456 war ein ähnlicher Effekt wie für den bereits zuvor beschriebenen LS20 pBAD456 zu beobachten. Lediglich unter induzierten Bedingungen mit 0,02 % L-Arabinose wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von  $102,4 \pm 44,6$  Units im Vergleich zur Aktivität unter nicht induzierten Bedingungen ( $312,3 \pm 38,7$  Units) signifikant herabgesetzt. Dagegen wurden für LS21 pBAD1456 keine signifikanten Unterschiede zwischen induzierten ( $598,1 \pm 60,5$  Units) und nicht induzierten Bedingungen ( $517,6 \pm 36,4$  Units) festgestellt. Damit verhielt sich der Stamm wie die Kontrolle LS21 pBAD30.

Zur Bestätigung, dass es sich bei der Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Stämmen LS9 und LS20 nicht um einen Artefakt auf Grund der Expression eines beliebigen Regulators handelte, wurden zur Kontrolle die  $\beta$ -Galaktosidase-Assays mit den Stämmen LS9, LS20 und LS21 ebenfalls mit einem anderen Regulator (RdhR1625) durchgeführt. Dieser wurde genauso wie RdhR1456 über das pBAD-Vektorsystem in die Stämme gebracht und unter gleichen Bedingungen exprimiert. Unter dem Einfluss dieses Regulators kam es jedoch in keinem der untersuchten Stämme zu einer Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten (siehe Abbildung V im Anhang).

Abschließend lässt sich zur *in vivo* Regulation des *rdhAB1453-55* Operons also sagen, dass sowohl *rdhA1453* als auch *rdhA1455* durch RdhR1456 scheinbar negativ reguliert werden, jedoch RdhR1456 keiner direkten Autoregulation unterliegt.

### 3.3.3 *In vitro* Interaktion eines C- sowie N-terminalen *Streptag*-Derivats von RdhR1456 mit den Promotorregionen von *rdhA1453* und *rdhA1455*

#### 3.3.3.1 *Reinigung von RdhR1456 als Streptag-Fusionsprotein*

Um die Bindung des RdhR1456 Proteins an die DNA der Promoterregionen von *rdhA1453* und *rdhA1455* zu beweisen, sollten *in vitro* Studien mit RdhR1456 durchgeführt werden. Das RdhR1456 Protein wurde aus der löslichen Fraktion mittels Affinitätschromatografie als C- bzw. N-terminales *Streptag*-Fusionsprotein angereicherte und als RdhR1456<sub>StrepC</sub> bzw. RdhR1456<sub>StrepN</sub> bezeichnet. Abbildung 19 zeigt die gereinigten Proteine in einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel. Die einzelnen Fraktionen der Reinigung und die Überprüfung mit Hilfe der *Streptag*-Detektion als Immunoblot ist im Anhang Abbildung I zu entnehmen. Für RdhR1456<sub>StrepN</sub> wurden neben der erwarteten Hauptbande mit einer Größe von 20,6 kDa weitere Banden detektiert. Massenspektrometrische Analysen bestätigten jedoch, dass die Banden RdhR1456 zuzuordnen waren. Diese Variante wurde wegen des möglichen Abbaus für stöchiometrische Analysen nicht verwendet.

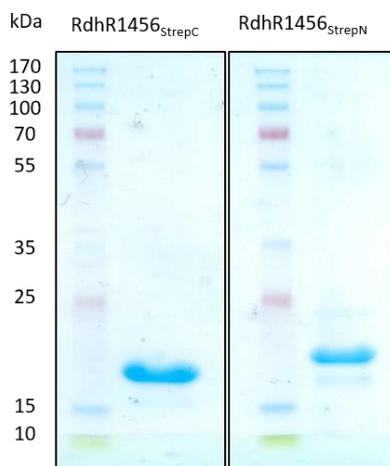


Abbildung 19. Vergleich gereinigtes RdhR1456<sub>StrepC</sub> und RdhRA1456<sub>StrepN</sub>. Die gereinigten Proteine (je 5 µg) wurden in einem 12,5 %igen SDS-Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

#### 3.3.3.2 *Eingrenzung der Bindebereiche von RdhRA1456 im rdhAB1452-55 Operon*

Zur Eingrenzung des DNA-Bindebereichs von RdhR1456 an die intergenen Bereiche IR1453 und IR1455 wurden beide DNA-Regionen aus CBDB1 mittels entsprechender Primer amplifiziert und die erhaltenen DNA-Fragmente auf Bindung mit RdhR1456 mittels EMSA untersucht. Die untersuchten DNA-Fragmente sind schematisch in Abbildung 20 (A) dargestellt. Die kompletten IR1453 und IR1455

(f1 und f3) wurden von RdhR1456<sub>StrepN</sub> gebunden [Abbildung 20 (B)]. Dies war als verändertes Laufverhalten beider DNA-Proteinkomplexe im EMSA im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein zu beobachten. Ähnlich verhielt es sich mit den Fragmenten f2 und f5, wohingegen bei f4 und f6 die DNA ihr Laufverhalten kaum in Anwesenheit von RdhR1456<sub>StrepN</sub> veränderte. Vermutlich befindet sich die Binderegion von RdhR1456 innerhalb der DNA-Bereiche der getesteten Fragmente f2 und f5.

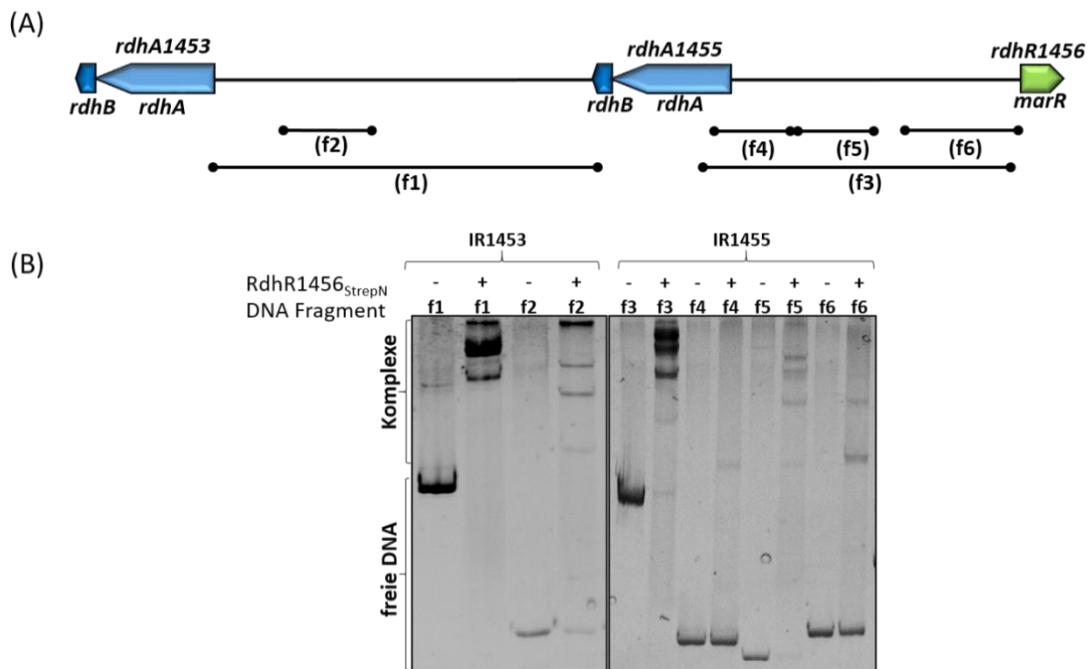


Abbildung 20. Eingrenzung der DNA-Binderegion von RdhR1456 mittels EMSA. Der EMSA wurde mit 25 nM dsDNA-Fragmenten (f1-f6) in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1,5  $\mu$ M RdhR1456<sub>StrepN</sub>-Dimer durchgeführt. Freie DNA und DNA-Protein-Komplexe wurden mittels 10 % Native-PAGE aufgetrennt, mit GelRed gefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Um die DNA-Binderegion weiter einzugrenzen und um ein mögliches Bindemotiv zu identifizieren, erfolgte eine DNase I-Footprinting-Analyse mit Hilfe von 5'-6-FAM-markierten DNA-Fragmenten der IR1453 und IR1455. Die DNA wurde nach einem DNase I-Verdau über eine Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenz der einzelnen DNA-Fragmente der Restriktion in Abhängigkeit der Größe grafisch dargestellt [Abbildung 21 (A und B)]. In Anwesenheit von RdhR1456<sub>StrepC</sub> bzw. RdhR1456<sub>StrepN</sub> sollten die DNA-Binderegionen vor dem DNase I-Verdau geschützt sein und es sollten in diesen Bereichen keine DNA-Fragmente gefunden werden und die Fluoreszenzintensität dort verringert sein. Für IR1453 wurde ein 30 bp großer geschützter Bereich identifiziert, während für IR1455 ein 24 bp großer Bereich vor dem DNase I-Verdau geschützt wurde. Die DNA Sequenzen beider Regionen sind in Abbildung 21 (C) rot markiert. Sie enthalten beide ein nahezu identisches DR (TAGTATACGATNNTAGTATACGAT), das bereits in 3.2.3 identifiziert wurde. Es stellte sich daher die Frage, ob diese potentielle DNA-Bindesequenz essentiell für die Interaktion von RdhR1456 mit der DNA ist.

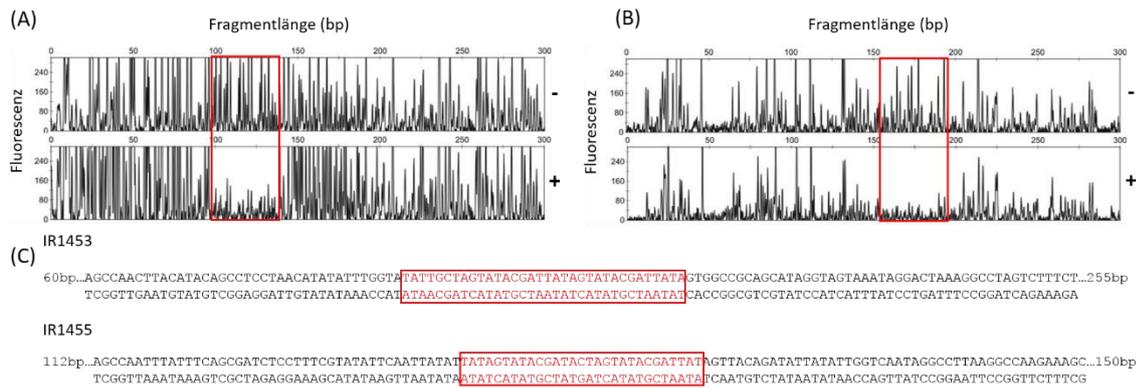


Abbildung 21. Identifizierung der DNA-Bindestelle von RdhR1456 in der IR1453 (A) und in der IR1455 (B) mittels DNase I Footprinting. Die 5'-6-FAM-markierten DNA-Fragmente der IR1453 (434 bp) bzw. IR1455 (381 bp) wurden ohne (-) oder mit 120 pmol (+) RdhR1456<sub>StrepC</sub> bzw. RdhR1456<sub>StrepN</sub> inkubiert und anschließend einem DNase I Verdau ausgesetzt. Dargestellt sind die Fluoreszenz-Intensitäten der resultierenden DNA-Fragmente nach dem DNase I Verdau nach ihrer Größe. Die Fluoreszenz-Intensitäten der DNA-Fragmente nach Inkubation mit RdhR1456 wiesen einen 24-30 bp großen Bereich mit deutlich verringerter Fluoreszenz auf (umrahmte Sequenzen in C).

### 3.3.3.3 Bedeutung der direct repeat-Region für die RdhR1456-DNA-Interaktion

$\beta$ -Galaktosidase-Untersuchungen mit einer Deletionsmutante LS23 ( $P_{1455\Delta repeat::lacZ}$ ) pBAD1456 im Vergleich zu LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ) pBAD1456 zeigten, dass keine signifikante Verringerung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Abwesenheit der *direct repeat*-Region (DR) nach Induktion durch L-Arabinose auftrat [Abbildung 22 (A)]. Während LS20 pBAD1456 im induzierten System eine 63 %ige Aktivität im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle erreichte, so wurde für LS23 pBAD1456 unter gleichen Bedingungen die Aktivität lediglich auf 91 % reduziert.

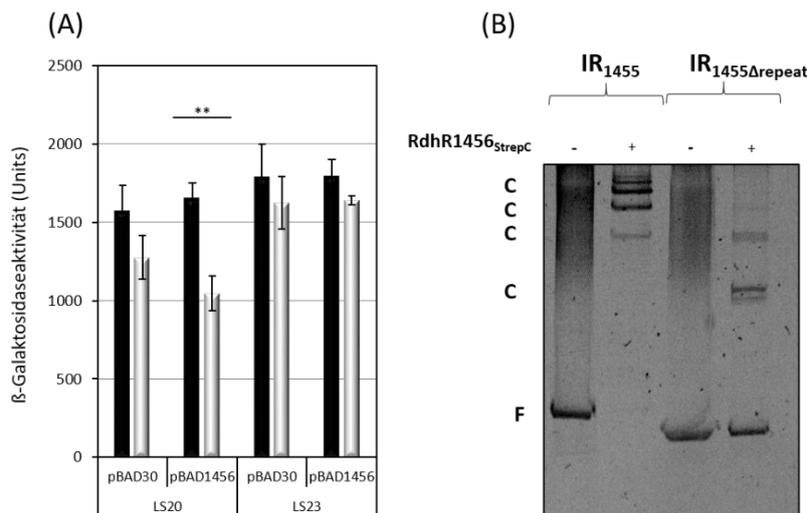


Abbildung 22. Rolle der *direct repeat*-Region für die Interaktion von RdhR1456<sub>StrepC</sub> mit der DNA. Dargestellt ist in (A) die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Stämme LS20 ( $P_{1455::lacZ}$ ) und LS23 ( $P_{1455\Delta repeat::lacZ}$ ) in Anwesenheit von pBAD1456 in Units. Die Zellen wurden anaerob mit (grau) und ohne 0,02 % L-Arabinose (schwarz) kultiviert. Das Ergebnis wurde mehrfach verifiziert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem T-Test bestimmt und sind mit \*\* für  $0,01 \geq \alpha \geq 0,001$  dargestellt,  $n = 3$ . Dargestellt in (B) ist ein EMSA mit dem DNA-Fragment f5 des intergenen Bereichs IR1455 im Vergleich zum Fragment f5 des gleichen IR ohne die repeat-Region IR1455 $\Delta repeat$  und mit RdhR1456<sub>StrepC</sub> (+). Es wurden 25 nM DNA und 0,75  $\mu$ M RdhR1456<sub>StrepC</sub> eingesetzt.

Auch *in vitro* wurde eine reduzierte Bindung des MarR-Regulators an den DNA-Bereich ohne das *DR* (IR1455 $\Delta$ repeat) gegenüber der vollständigen DNA-Region (IR1455) beobachtet [Abbildung 22(B)]. Gleiche Konzentrationen von RdhR1456<sub>StrepC</sub> bewirkten im EMSA für IR1455 einen vollständigen *Shift* der freien DNA (F) als DNA-Proteinkomplexe (C), während für IR1455 $\Delta$ repeat der größte Teil der freien DNA ihr Laufverhalten nicht änderte. Das *DR* stellt somit die entscheidende Binderegion für RdhR1456 dar.

### 3.3.4 Ermittlung der oligomeren Form von RdhR1456<sub>StrepC</sub> im *in vitro* System

Da aus der Literatur bekannt ist, dass MarR-ähnliche Proteine als Homodimere die DNA binden (Wilkinson und Grove, 2006), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass RdhR1456 ebenfalls als Homodimer an die DNA binden könnte. Um nähere Informationen darüber zu gewinnen, wurde eine analytische Ultrazentrifugation mit RdhR1456<sub>StrepC</sub> durchgeführt. Während der Ultrazentrifugation (Sedimentationsgeschwindigkeitslauf) werden die Proteine zunächst komplett sedimentiert. Durch ein im Anschluss folgendes Zentrifugationsprogramm mit geringerer Geschwindigkeit (Sedimentationsgleichgewichtslauf) gehen die Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichts wieder in Lösung und verteilen sich je nach Molekulargewicht charakteristisch im Zentrifugationsgefäß. Das Sedimentationsprofil von RdhR1456<sub>StrepC</sub> ist in Abbildung 23 am Beispiel von 120  $\mu$ g/ml RdhR1456 aufgezeigt und entspricht einem Protein mit einem Molekulargewicht von  $42,0 \pm 3,4$  kDa, was der Größe eines Homodimers entspricht. Dieses Ergebnis wurde im Bereich zwischen 40  $\mu$ g/ml bis 500  $\mu$ g/ml bestimmt und war unabhängig von der Konzentration von RdhR1456<sub>StrepC</sub> im verwendeten Puffersystem.

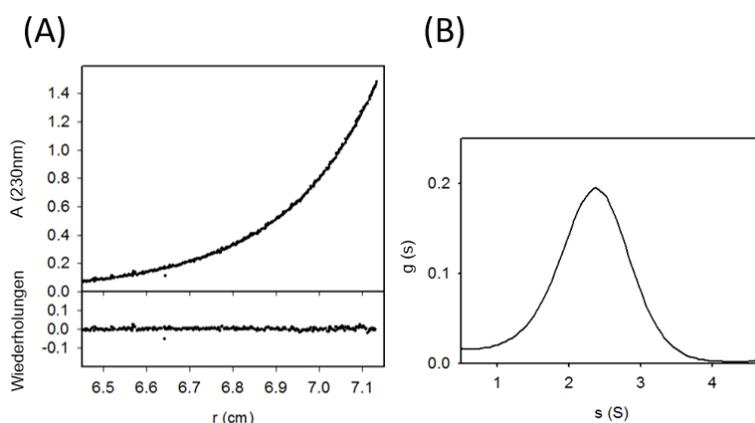


Abbildung 23. Sedimentationsprofil von RdhR1456<sub>StrepC</sub> mittels Sedimentationsgleichgewichtsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge. Dargestellt ist in (A) die Verteilung von RdhR1456<sub>StrepC</sub> (120  $\mu$ g/ml) gemessen bei einer Extinktion von 230 nm ( $A(230\text{ nm})$ ) innerhalb eines Zentrifugationsgefäßes in cm [ $r$  (cm)] bei einer Geschwindigkeit von 12.000 rpm im Anschluss an einen Sedimentationsgeschwindigkeitslauf bei 40.000 rpm. In (B) ist die Verteilung des Sedimentations-Koeffizienten ( $g$ ) von RdhR1456<sub>StrepC</sub> nach den Sedimentationskonstanten ( $s$ ) dargestellt. RdhR1456<sub>StrepC</sub> hat eine apparente Sedimentationskonstante von  $s(\text{app}) = 2,38$ . Das Ergebnis wurde freundlicherweise von Dr. H. Lilie zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation wurde auch ermittelt, in welcher Form RdhR1456<sub>StrepC</sub> an die DNA bindet. Da es im Puffersystem als Homodimer vorlag, war davon auszugehen, dass RdhR1456<sub>StrepC</sub> ebenfalls als Homodimer an die Ziel-DNA bindet. Untersuchungen mit dem 5'-6-FAM-markierten dsDNA-Oligonukleotid IR1455\_105-136 ergaben jedoch ein anderes Ergebnis. Wie zu erwarten, stieg der Anteil an DNA-Protein-Komplex im Vergleich zur freien DNA mit zunehmender Proteinkonzentration an (Abbildung 24), jedoch besaß der DNA-Protein-Komplex nicht die zu erwartende Molekularmasse von 60 kDa, was dem Molekulargewicht eines Komplexes aus RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer und einem dsDNA-Oligonukleotid entsprechen würde, sondern war mit 95,1 kDa wesentlich größer. Dieses Molekulargewicht entsprach dem eines RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Tetramers gebunden an ein dsDNA-Oligonukleotid. Bei keiner verwendeten Konzentration war ein Komplex mit der Größe des an die DNA gebundenen Homodimers auffindig zu machen. Abbildung 24 (B) zeigt dies beispielhaft für zwei Proteinkonzentrationen. Sowohl mit 30 nM Protein (grüne Linie), als auch mit einer wesentlich höheren Proteinkonzentration von 1.185 nM (rote Linie) wurde der Sedimentationskoeffizient der freien DNA lediglich zu einem höheren Sedimentationskoeffizienten verschoben, der dem eines Homotetramers entsprach. RdhR1456<sub>StrepC</sub> bindet somit entgegen der bekannten Bindung als Homodimer anderer MarR-ähnlicher Regulatoren (Wilkinson und Grove, 2006) vermutlich als Homotetramer an die Ziel-DNA von IR1455.

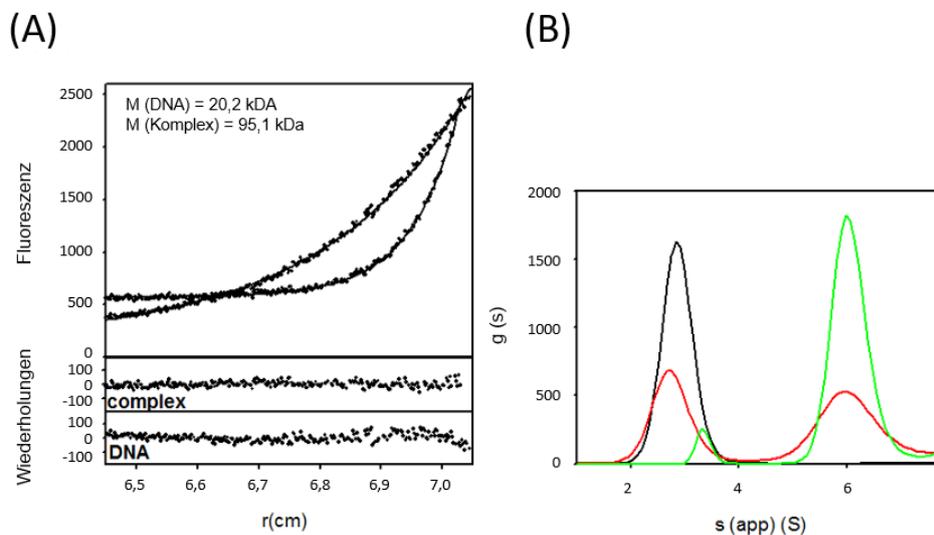


Abbildung 24. Sedimentationsgleichgewichtsläufe von 5'-6-FAM-IR1455-DNA (25 nM) einzeln und im Komplex mit RdhR1456<sub>StrepC</sub> (1,66  $\mu$ M). Dargestellt ist die 6-FAM-Fluoreszenz der freien DNA und des DNA-Proteinkomplexes abhängig von der Position im Zentrifugationsgefäßes [ $r$ (cm)] bei einer Geschwindigkeit von 12 000 rpm im Anschluss an eine Sedimentation bei 40 000 rpm (A) und die scheinbare Verteilung der Sedimentationskoeffizienten von 25 nM 5'-6-FAM-IR1455-DNA einzeln (schwarz) und im Komplex mit 30 nM (rot) bzw. 1185 nM (grün) RdhR1456<sub>StrepC</sub> (B). Das Ergebnis wurde freundlicherweise von Dr. H Lilie zur Verfügung gestellt.

### 3.3.5 Bestimmung der Bindeaffinität von RdhR1456 an verschiedene DNA-Bereiche

RdhR1456 bindet sowohl an IR1453, als auch an IR1455. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Affinität des Proteins für beide Bindemotive gleich ist oder eine der beiden Regionen bevorzugt von RdhR1456 gebunden und somit reguliert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden vergleichende EMSAs mit dsDNA-Oligonukleotiden und RdhR1456<sub>StrepC</sub> durchgeführt. Es wurde jeweils ein Konzentrationsgradient von RdhR1456<sub>StrepC</sub> mit einer konstanten Konzentration (25 nM) eines dsDNA-Oligonukleotids getestet. Je mehr Protein im Ansatz vorhanden war, desto mehr DNA-Protein-Komplexe bildeten sich aus, die im Nativ-Gel ein verzögertes Laufverhalten im Vergleich zur freien DNA besaßen. Über die Verhältnisse der DNA-Protein-Komplexe zur freien DNA ließ sich die Bindungsaffinität von RdhR1456<sub>StrepC</sub> an die verschiedenen dsDNA-Oligonukleotide berechnen. Dies erfolgte mit Hilfe einer Formel basierend auf der sigmoidalen Hill-Gleichung zur Bestimmung von  $K_d$ -Werten, welche auf Grund der ungewöhnlichen Bindung von RdhR1456<sub>StrepC</sub> als Homotetramer an die DNA abgewandelt wurde. Die Ableitung der Gleichung wurde freundlicherweise von Dr. Ralf Golbik zur Verfügung gestellt und ist in 2.5.10. aufgeführt. RdhR1456<sub>StrepC</sub> bindet an die dsDNA-Oligonukleotide IR1453 (302-328 bp) und IR1455 (105-136 bp) mit Affinitäten ähnlicher Größenordnung. Die mit Hilfe von drei unabhängigen EMSAs ermittelten  $K_d$ -Werte für ein RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer beliefen sich für IR1453 auf  $429,5 \pm 51,9$  nM und für IR1455 auf  $282,5 \pm 47,5$  nM. In Abbildung 25 (A) ist beispielhaft jeweils ein Gelbild der EMSA-Analysen dargestellt.

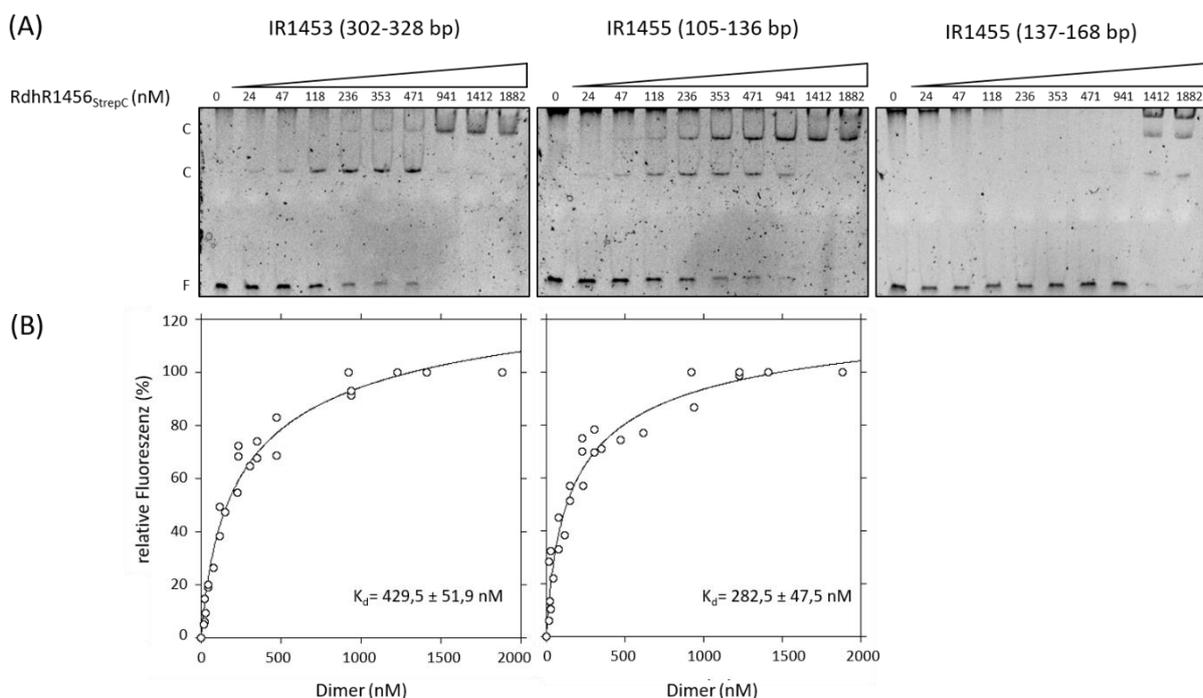


Abbildung 25. Vergleich der Bindeaffinität von RdhR1456<sub>StrepC</sub> an die dsDNA-Oligonucleotide von rdhA1453 [IR1453 (302-328 bp)] und rdhA1455 [IR1455 (105-136 bp)], [IR1455(137-168 bp)] (A) und Berechnung der  $K_d$ -Werte (B). Die EMSAs wurden mit 25 nM DNA und 0-1,882  $\mu$ M RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer durchgeführt. Die freie DNA (F) sowie die DNA-Proteinkomplexe (C) wurden in einer 10 %igen Nativen PAGE aufgetrennt und mit GelRed und UV-Licht-visualisiert. Die  $K_d$ -Werte wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen mit Hilfe der Kaleidagraph-Software berechnet.

Die mittels Kaleidagraph erstellte grafische Darstellung der prozentualen Fluoreszenz der DNA-Protein-Komplex-Banden zur Gesamt-Fluoreszenz der Gelspur ist in Abbildung 25 (B) zu sehen. Anhand dieser Kurven erfolgte die Bestimmung der  $K_d$ -Werte. Als Kontrolle wurde ein dsDNA-Oligonukleotid aus dem *downstream*-Bereich von IR1455 (105-136 bp) mitgeführt, welches theoretisch kein Bindemotiv für RdhR1456 enthielt (IR1455 (137-168 bp)). Für dieses dsDNA-Oligonukleotid wurde erst bei einem deutlichen Überschuss von RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer (1,4  $\mu$ M) eine Bindung beobachtet.

Der  $K_d$ -Wert von IR1455 (105-136 bp) wurde unabhängig mittels analytischer Ultrazentrifugation mit 6-FAM-markierter DNA ermittelt. Mit dieser Methodik ergab sich ein wesentlich geringerer  $K_d$ -Wert von 63 nM. Da die analytische Ultrazentrifugation mit fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotiden eine wesentlich sensitivere und direktere Methode als ein EMSA-Gel mit anschließender Färbung von DNA mittels Gelred darstellt, ist dem  $K_d$ -Wert der analytischen Ultrazentrifugation mehr Vertrauen zu schenken. Mit den Gelretentionsanalysen konnte jedoch ein direkter semi-quantitativer Vergleich der Bindung zwischen RdhR1456 mit verschiedenen DNA-Oligonukleotiden gezogen werden. In den in Abbildung 20 dargestellten EMSA-Gelbildern ist jeweils im oberen Bereich der Gele eine zu den geshifteten Gelbanden zusätzliche Schwärzung zu erkennen. Diese basiert vermutlich auf unspezifisch gebundenem Protein an das Poly (dI/dC) bzw. auf DNA-Protein-Komplexe, die nicht in das Gel hineingelaufen sind. Diese Komplexe wurden in die Quantifizierung nicht mit einbezogen. Dadurch wurde die tatsächlich im Gel vorhandene Protein- und DNA-Konzentration verfälscht, was möglicherweise auch zu den höheren  $K_d$ -Werten führte.

### 3.3.6 Ermittlung der essentiellen Basen für die Interaktion mit RdhR1456 innerhalb des *direct repeats*

Da RdhR1456<sub>StrepC</sub> eine etwas höhere Affinität zu IR1455 als zu IR1453 aufwies, beide dsDNA-Oligonukleotide sich in ihrer *repeat*-Region jedoch nur minimal unterschieden, sollte überprüft werden, welche Basen innerhalb des *DR* eine entscheidende Rolle für eine effiziente Bindung von RdhR1456 an die DNA spielen. Neben IR1453 und IR1455 besitzt die intergene Region von cbdb\_A1598-99 (siehe 3.2.3) ein sehr ähnliches *DR*, das sich nur im mittleren Bereich von IR1453 und IR1455 unterscheidet. Außerdem wurden in den intergenen Regionen cbdb\_A1091-92 (IR1091) und cbdb\_A1596-97 (IR1596) ebenfalls konservierte Bereiche, vor allem das GTATAC-Motif des *DR* identifiziert, für IR1596 jedoch nur eine Halbseite (Abbildung 26). Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurden die einzelnen Halbseiten des *DR* in IR1455 auf eine mögliche Bindung von RdhR1456 im EMSA unter Verwendung von 30 bp dsDNA-Oligonukleotiden getestet, in denen die erste oder zweite Halbseite fehlte (Abbildung 27).

	*****	* * * *
IR1453	TAGTATACGATTA---TAGTATACGATTAT	
IR1455	TAGTATACGATAC---TAGTATACGATTAT	
IR1598	TTGTATACGATAT---TTGTATACGATTAT	
IR1091	TCGTATACGAAATACATCGTATACGATACT	
IR1596	AAGTATACCCCAGAGCTTATTAAAAATACG	

Abbildung 26. Alignment der putativen Erkennungssequenzen von *RdhR1456* mit anderen IRs in Orientierung zu den *rdhA*-Genen im Genom vom *D. mcarrtyi* Stamm CBDB1. Konservierte Bereiche sind grau markiert.

Zunächst war festzustellen, dass *RdhR1456*<sub>StrepC</sub> sowohl für die erste, als auch für die zweite Halbseite des *DRs* eine deutlich schwächere Bindeaffinität aufwies, als für das komplette *DR* [IR1455 (105-136 bp)] (Abbildung 25). Aus den ermittelten Daten ließ sich mit Hilfe der für die Bindung des Homotetramers angewandten Gleichung (2.6.3.1) kein  $K_d$ -Wert berechnen. Die Halbseite [IR1455 (92-118 bp)] wies ab einer Protein-Dimer-Konzentration von 236 nM einen beginnenden *Shift* auf, während die Halbseite IR1455 (121-148 bp) erst ab einer Protein-Dimer-Konzentration von 471 nM einen beginnenden *Shift* zeigte. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die primäre Bindestelle von *RdhR1456*<sub>StrepC</sub> die erste Halbseite des *DR* ist.

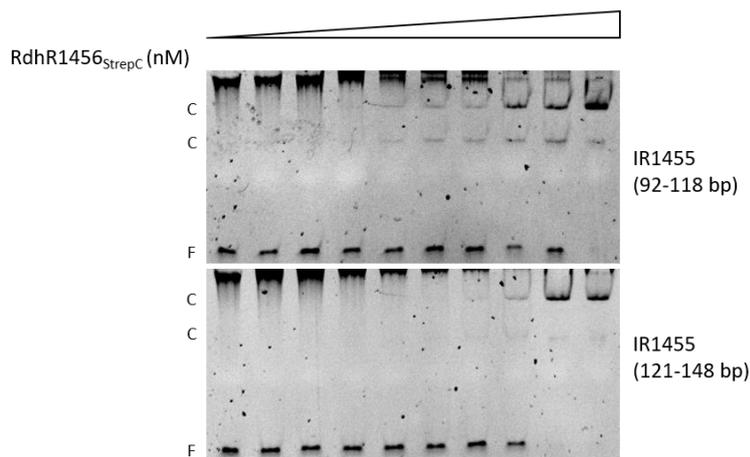


Abbildung 27. Vergleich der Bindeaffinität von *RdhR1456*<sub>StrepC</sub> an die zwei Halbseiten der direct repeat-Region. Dargestellt sind EMSAs mit 25 nM DNA und 0-1,882  $\mu$ M *RdhR1456*<sub>StrepC</sub>. Die freie DNA (F) sowie die DNA-Proteinkomplexe (C) wurden in einer 10 %igen Native PAGE aufgetrennt und mit GelRed und UV-Licht-visualisiert.

Beide Halbseiten beinhalten ein konserviertes *inverted repeat* (GTATAC), welches jedoch nur in der ersten Halbseite konserviert vorliegt (Abbildung 26). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist aus der Literatur bekannt, dass MarR-Regulatoren typischerweise *inverted repeats* als Bindemotive nutzen und daran als Homodimere binden (Wilkinson und Grove, 2006). Sollte dieses *inverted repeat* die eigentlich essentielle Bindestelle für *RdhR1456* darstellen und das *DR* nur die Plattform für die Bindung eines aus zwei *RdhR1456*-Dimeren bestehenden Tetramers bilden, so sollte *in vitro* auch an DNA-Fragmente mit ausschließlich diesem Motiv eine Bindung von *RdhR1456*<sub>StrepC</sub> erfolgen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde ein DNA-Fragment mit einer Deletion des kompletten *DRs* von IR1455 aus dem Vektor pP1455 $\Delta$ dr-lacZ mit den Primern IR1455\_78bp\_fw/rev amplifiziert und als f5 $\Delta$ dr bezeichnet.

Durch eine zweistufige QuikChange-Mutagenese erfolgte die Insertion des GTATAC-Motivs in den pRS551\_IR1455 $\Delta$ repeat mit Hilfe der Mutationsprimer IR55-r\_GTA\_f/r für die GTA-Insertion und IR55-r\_TAC\_f/r für die GTATAC-Insertion. Die resultierenden Vektoren pP1455 $\Delta$ drQ-lacZ und pP1455 $\Delta$ drQ2-lacZ dienten neben dem Ausgangsvektor pP1455 $\Delta$ dr-lacZ als *templates* für die Primer IR1455\_78bp\_fw/rev. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden als f5 $\Delta$ drQ1 (GTA-Insertion) und f5 $\Delta$ drQ2 (GTATAC-Insertion) bezeichnet. Eine vergleichende Gel-Retentionsanalyse der drei DNA-Fragmente mit RdhR1456<sub>StrepC</sub> ergab keine Unterschiede zwischen den drei DNA-Fragmenten (Abbildung 28). Sie führten alle zu einem verringerten *Shift* gegenüber der Kontroll-DNA mit dem vollständigen DR (f5), aber die Affinität von RdhR1456<sub>StrepC</sub> an die DNA wurde nicht durch die Insertion von GTATAC erhöht. Das GTATAC-*inverted repeat*-Motiv allein ist somit nicht für eine Bindung von RdhR1456<sub>StrepC</sub> an die DNA ausreichend. Andere DNA-Bereiche des gesamten DR könnten hierfür ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.

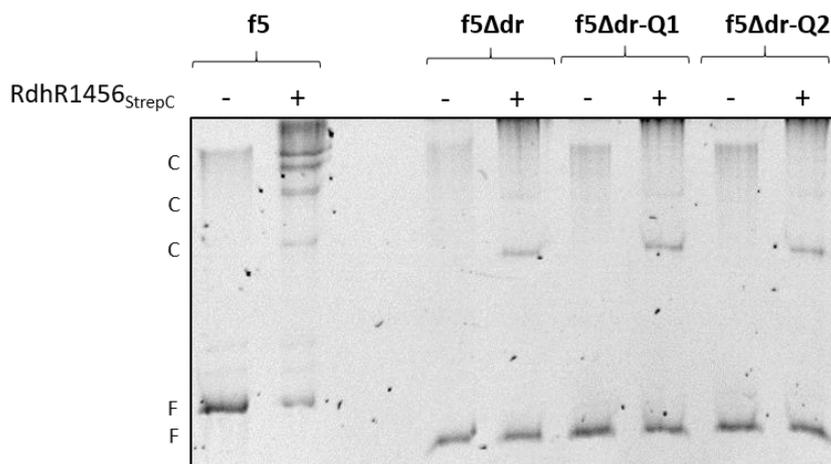


Abbildung 28. Vergleich der Bindung RdhR1456<sub>StrepC</sub> an DNA-Fragment 5 (f5) aus IR1455-56 im Vergleich zu DNA mit Mutationen (f5 $\Delta$ dr, f5 $\Delta$ dr-Q1, f5 $\Delta$ dr-Q2). Dargestellt sind EMSAs mit 25 nM DNA und 0 (-) bzw. 0,125  $\mu$ M (+) RdhR1456<sub>StrepC</sub>. Die Freie DNA (F) sowie die DNA-Proteinkomplexe (C) wurden in einer 10 %igen Native PAGE aufgetrennt und mit GelRed und UV-Licht visualisiert.

### 3.3.7 Identifizierung potentieller Liganden von RdhR1456

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Erkenntnis gewonnen, dass RdhR1456 als transkriptioneller Repressor agiert. Deshalb sollte nach dem Mechanismus der Derepression, welcher bereits in den Transkriptionsstudien beobachtet wurde, gesucht werden. Bisher existierten für *D. mccartyi* lediglich Transkriptionsstudien, welche den Anstieg der Transkription verschiedener *rdhA*-Gene beim Wachstum mit chlorierten Verbindungen nachwiesen (Wagner et al., 2009), und die Studien von Wagner (2009), welche erste Indizien für eine Derepression eines anderen MarR-Regulators (RdhR1625) durch Trichlorbenzole vermuten ließen. Von MarR-Regulatoren anderer Mikroorganismen ist bekannt, dass die Edukte oder Produkte ihres zu regulierenden Stoffwechselweges als Liganden an

den MarR-Regulator binden und somit direkten Einfluss auf den Stoffwechselweg nehmen [PenR/PntR (Zhu et al., 2013), HucR (Bordelon et al., 2006), CbaR (Providenti und Wyndham, 2001)]. Möglicherweise ist dies auch in *Dehalococcoides* der Fall. Allerdings ist für die meisten RdhAs in *D. mccartyi* das konkrete Substrat unbekannt. Da ein Transkriptionsanstieg der Gene *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhR1456* für 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB beobachtet wurde (3.2.2), wurden 1,2,3-TCB und sein Dechlorierungsprodukt (1,3-DCB) als potentielle Liganden für RdhR1456 als erstes getestet. Heterologe *in vivo* Studien in *E. coli* mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Assays und 1,2,3-TCB führten nicht zur Derepression (Mehwald, 2012). Deshalb sollten hier *in vitro* Studien mit gereinigtem RdhR1456<sub>Strep</sub> durchgeführt werden.

### 3.3.7.1 *In vitro* Liganden-Screening mittels EMSA

Für die Suche nach potentiellen Liganden für RdhR1456 wurden EMSAs, wie in 2.5.10 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich eine definierte Menge an potentiellen Liganden dem Mastermix zugefügt und vor der eigentlichen Inkubation mit der DNA gemeinsam mit RdhR1456<sub>StrepC</sub> für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die DNA wurde mittels Native PAGE (10 %) aufgetrennt und die Proben mit den potentiellen Liganden auf eine Aufhebung des *Shifts* der DNA-Protein-Komplexe im Nativ-Gel vergleichend mit Proben ohne potentielle Liganden ausgewertet. Keiner der getesteten Elektronenakzeptoren von CBDB1 (1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB) und auch keines der Dechlorierungsprodukte (1,3-DCB und 1,4-DCB) bewirkten eine Aufhebung des DNA-*Shifts* (Abbildung 29).

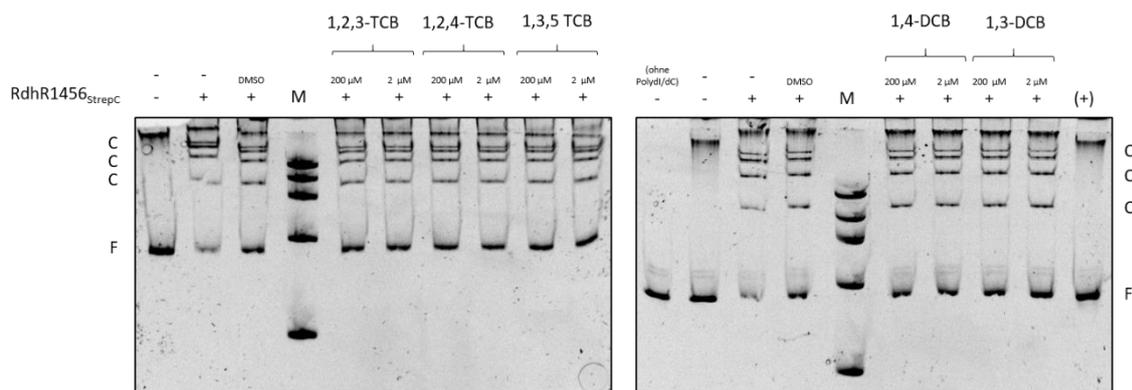


Abbildung 29. Kein Aufhebungseffekt von TCBs und DCBs auf die Bindung von RdhR1456 an IR1455. Die EMSAs wurden mit 25 nM DNA (f5) in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von 0,25  $\mu$ M RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer durchgeführt. Als Kontrolle diente denaturiertes RdhR1456<sub>StrepC</sub> [(+)]. Zusätzlich wurden 2  $\mu$ M und 200  $\mu$ M 1,2,3-TCB, 1,2,4-TCB, 1,3,5-TCB bzw. 1,3-DCB und 1,4-DCB gelöst in DMSO, sowie als Kontrolle DMSO zu den Ansätzen hinzugefügt (jeweils 1  $\mu$ l) und in einem 10 %igen Nativ-Gel aufgetrennt. Freie DNA (F) und DNA-Protein-Komplexe (C) und der DNA-Marker (M) wurden mittels GelRed gefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Neben typischen Substraten der OHR von *D. mccartyi* wurden auch kleine Moleküle getestet, die ebenfalls während des Stoffwechsels anfallen und somit eventuell eher zu einer generellen Regulation

beitragen. Mit Hilfe von Phyre<sup>2</sup> (Kelly et al., 2015) wurde anhand des homologen MarR-Regulators SCO5405 (AbsC) (20 % Sequenz-Identität) aus *Streptomyces coelicolor* die putative Kristallstruktur von RdhR1456 erstellt und anschließend anhand dieser Struktur über 3DLigandSite (Wass et al., 2010) nach potentiellen Bindestellen für Liganden gesucht (Tabelle 14). Es wurden Bindestellen für Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, CoenzymA (CoA), Ca<sup>2+</sup>, ADP, Ni<sup>2+</sup> und Glukose als potentielle Liganden von RdhR1456 vorgeschlagen.

Tabelle 14. Übersicht potentieller Liganden und Bindestellen für RdhR1456 auf Grundlage anderer Transkriptionsfaktoren.

Potentieller Ligand	Score	Ligandenbindestelle (As)	Vergleichsprotein	Organismus
<b>Mg</b>	18,4	79	2a07_K (Foxp2)	<i>Homo sapiens</i>
	9,6	79	2c6y_A (Interleukin Enhancer-Binding Factor 1),3bpy_A (Foxo4)	<i>Homo sapiens</i>
<b>Zn</b>	18,2	113	1r23_B (Smtb)	<i>Synechococcus elongatus PCC 7942</i>
	10	102-3	1r22_A (Czra)	<i>Staphylococcus aureus</i>
	9,5	65-70	1r1v_A (Czra)	<i>Staphylococcus aureus</i>
	8,9	46, 63,64	2fbh_A (Pa3341)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	9	122-23	3hru_A (Scar)	<i>Streptococcus gordonii</i>
	11,3	21-36, 116	2fbh_A (Pa3341)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>CoA</b>	11,3	21-36, 116	1mj9_A (Esa1(c304s))	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Ca</b>	9,6	79	3co6_C (Dbe1)	<i>Homo sapiens</i>
<b>ADP</b>	9,4	85, 102	1z6t_A (Apoptotic Protease Activating Factor 1)	<i>Homo sapiens</i>
<b>Ni</b>	9,1	27	2tdx_A (Diphtheria Tox Repressor (C102d Mutant))	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<b>Glc</b>	9	123	2f2e_B (Pa1607)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Alle Verbindungen wurden getestet, aber keiner der getesteten putativen Liganden zeigte reproduzierbar im EMSA eine Aufhebung des DNA-Shifts (siehe Tabelle VI im Anhang). Weitere Moleküle und Elektronenakzeptoren, die in der OHR von CBDB1 eine Rolle spielen, wie z. B. Cyanocobalamin und chlorierte Phenole wurden getestet. Zu einer reproduzierbaren Aufhebung des DNA-Shifts führte aber keiner der getesteten Kandidaten. Im Anhang (Tabelle VI) sind alle getesteten Verbindungen mit den verwendeten Konzentrationen tabellarisch aufgeführt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass nicht nur Ionen und kleine Moleküle Liganden für MarR-Regulatoren sein können. Wilke et al. (2008) zeigten, dass für den MarR-Regulator MexR aus *Pseudomonas aeruginosa* ein kleines Protein (ArmR) als Ligand fungierte. Somit ist auch eine Interaktion des MarR-Regulators RdhR1456 mit einem unbekanntem Protein als Ligand denkbar. Da RdhR1456 die Gene *rdhA1453* und *rdhA1455* reprimiert, sollte der MarR in der Wachstumsphase von CBDB1 auf 1,2,3-TCB inaktiv sein, damit beide Gene vermehrt transkribiert werden können, wie es in 3.2.2 in den Transkriptionsanalysen beobachtet wurde. Der unbekanntem Ligand sollte in dieser Wachstumsphase

also an RdhR1456 gebunden sein bzw. im Überschuss zur Verfügung stehen. Deshalb wurde CBDB1 (1 l, 10 %ig aus Zweiflüssigphasen-Kultur mit  $1 \times 10^8$  Zellen/ml inokuliert) nach Standardprotokoll mit  $50 \mu\text{M}$  1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB kultiviert und nach 72 h, nach Überprüfung der Dechlorierungsaktivität mittels gaschromatographischer Analyse anaerob geerntet. Die Zelltrümmer, die Membranfraktionen und die löslichen Fraktionen von CBDB1 wurden nach einem Zellaufschluss und einer Fraktionierung für die *in vitro* Untersuchungen in EMSAs mit gereinigtem RdhR1456<sub>StrepC</sub> verwendet. Dem Mastermix (25 nM DNA (f5), 1-1,25  $\mu\text{M}$  RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer, 50 mM Tris/HCl, 50mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % Glycerol, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 15 ng/ $\mu\text{l}$  Poly dl/dC; pH 7,5) wurden die verschiedenen Fraktionen von CBDB1 zugefügt und der DNA-Shift im Nativ-Gel mit den Kontrollen (ohne CBDB1-Extrakt, mit den denaturiertem CBDB1-Extrakten bzw. mit dem Rohextrakt von *E. coli* Rosetta) verglichen. Abbildung 30 zeigt das Ergebnis dieser *in vitro* Untersuchung.

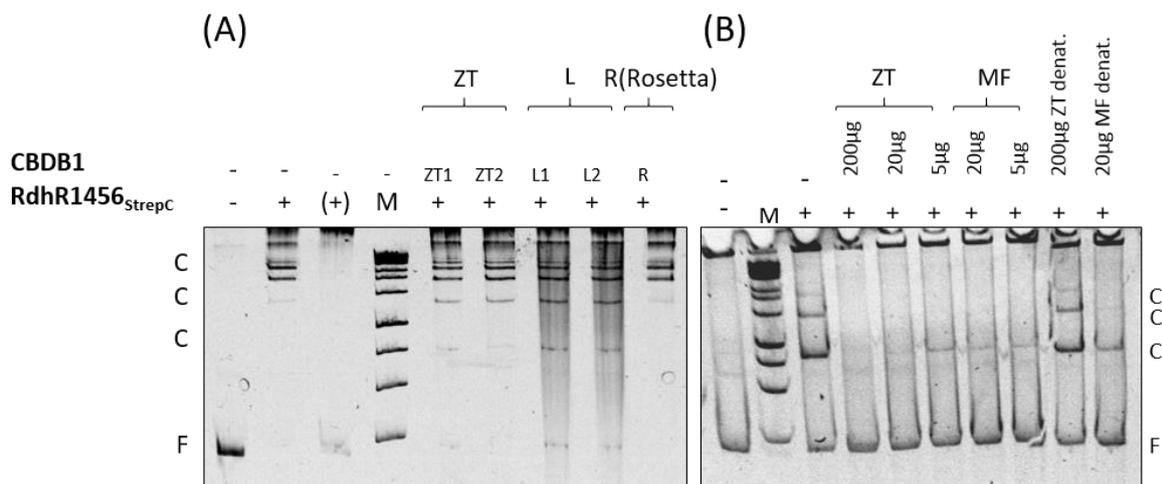


Abbildung 30. Effekt von CBDB1-Extrakten auf die Bindung von RdhR1456 an IR1455 (f5). Der EMSA wurde mit 25 nM DNA in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1,25  $\mu\text{M}$  (A) bzw. 1  $\mu\text{M}$  RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer (B) durchgeführt. Zusätzlich wurden 4  $\mu\text{g}$  Protein des Zelltrümmerextrakts (ZT) bzw. der löslichen Fraktion (L) (A) bzw. der angegebenen Konzentrationen (B) aus CBDB1 zu den Ansätzen hinzugefügt. Als Kontrollen dienen denaturiertes RdhR1456<sub>StrepC</sub> ((+)), das Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta (R) und denaturierte CBDB1-Extrakte (ZT, MF denat.). Freie DNA (F) und DNA-Protein-Komplexe (C) wurden mittels GelRed gefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Es war ein Unterschied zwischen dem DNA-Shift in den Kontrollen und dem DNA-Shift in den Spuren mit CBDB1 zu beobachten. Mit allen Fraktionen von CBDB1 kam es konzentrationsabhängig zur teilweisen Aufhebung des DNA-Shifts. Während mit 4  $\mu\text{g}$  Zelltrümmern (Abbildung 30 (A)) kaum eine Aufhebung des Shifts beobachtet wurde, so war der Shift mit 20 und 200  $\mu\text{g}$  ZT und Membranfraktion deutlich [Abbildung 30 (B)]. Der Rohextrakt von *E. coli* Rosetta, sowie die denaturierten Fraktionen von CBDB1 hingegen, führten nicht zur Aufhebung des DNA-Shifts. Diese Beobachtung bestärkte die Vermutung, dass ein unbekanntes Protein aus CBDB1 an RdhR1456 bindet und somit an der Ablösung des Transkriptionsfaktors von der DNA-beteiligt ist. Trotz Verwendung eines Proteinase-Inhibitors (PMSF) war jedoch auch die Möglichkeit des Abbaus von RdhR1456 in Proben mit CBDB1-Extrakten nicht vollständig auszuschließen.

### 3.3.7.2 *In vitro* Ligandenscreening mittels FAR-Western-Analyse

Um dem Indiz nachzugehen, dass ein unbekanntes Protein mit RdhR1456 interagiert, wurde eine Protein-Protein-Interaktionsstudie mittels FAR-Western Analyse mit CBDB1 Extrakten und gereinigtem RdhR1456<sub>StreptC</sub> durchgeführt. Dafür wurde CBDB1, wie zuvor beschrieben, kultiviert, geerntet und in verschiedene Proteinfractionen fraktioniert. Nach der Auftrennung über ein 7,5 %iges SDS-Gel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und einer FAR-Western Analyse wie in 2.5.8 beschrieben unterzogen. Der Immunoblot in Abbildung 31 (A) zeigt ausschließlich ein Signal in Spur 5 (lösliche Fraktion von CBDB1) bei einer Höhe von ca. 70 kDa. In der Kontrolle mit der löslichen Fraktion von *E. coli* XL1 Blue wurde kein Signal detektiert. Um herauszufinden, mit welchem Protein von CBDB1 RdhR1456<sub>StreptC</sub> scheinbar interagiert, wurde ein parallel angefertigtes SDS-Gel einer Silberfärbung unterzogen und eine Bande von der löslichen Fraktion von CBDB1 (Spur 5, Abbildung 31 (B)) im Bereich von 70 kDa mittels Massenspektrometrie analysiert. Des Weiteren wurde der Bereich, welcher im Immunoblot das Signal lieferte aus dem Ursprungsgel vor dem Transfer auf die PVDF-Membran ebenfalls massenspektrometrisch analysiert.

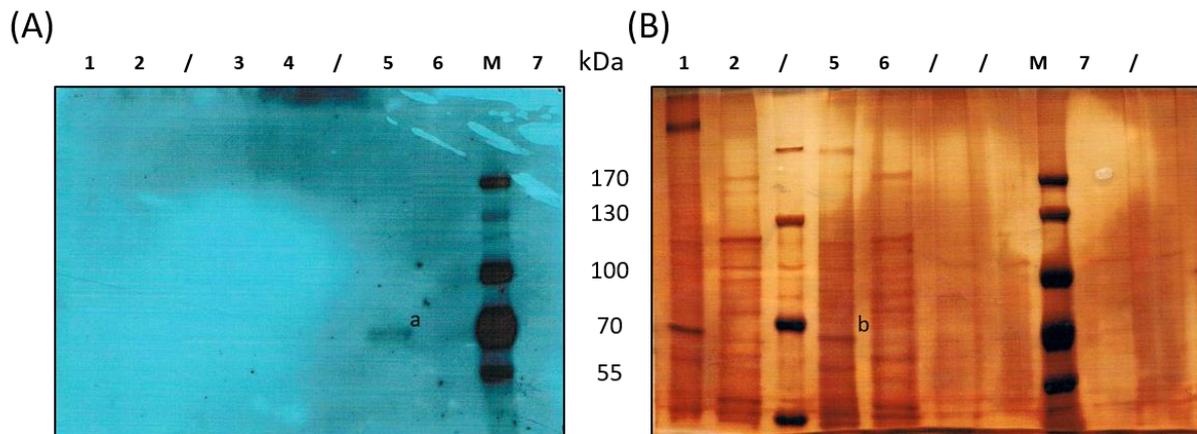


Abbildung 31. Interaktionsstudie von RdhR1456<sub>StreptC</sub> mit CBDB1-Extrakten.

- (A) Immunoblot-Detektion mittels Streptactin-HRP-Konjugat (1:10000) eines 7,5 %igen SDS-Gels auf einer PVDF-Membran. Die Proteine wurden renaturiert und mit 42 µg RdhR1456<sub>StreptC</sub> inkubiert.
- (B) Silberfärbung eines parallel angefertigten 7,5 %igen SDS-Gels der gleichen Proben (jeweils 10 µg).

Aufgetragen wurden Zelltrümmer aus CBDB1 (1) und XL1 Blue (2) (100 µg); Membranfraktionen von CBDB1 (3) und XL1 Blue (4) (10 µg); Lösliche Fraktionen von CBDB1 (5) und XL1 Blue (6) (75 µg); gereinigtes RdhR1456<sub>StreptC</sub> (7). Die verwendeten Extrakte wurden aus einer anaerob kultivierten CBDB1 Kultur (1 l) und einer anaerob in TGYEP-Medium kultivierten *E. coli* XL1 Blue Kultur (50 ml) durch Ultraschallbehandlung und Ultrazentrifugation gewonnen. Mit a und b markiert sind die mittels MS analysierten Gelbanden aus dem geblotteten SDS-Gel des Immunoblots (A, Gel siehe Anhang) und des parallel angefertigten mit Silber gefärbten SDS-Gels (B).

Es wurden in beiden Proben der Banden a und b Peptide gleicher Proteine detektiert (Tabelle 15). Am abundantesten waren das Protein CbdbA1368, das Chaperon DnaK CbdbA1358, sowie die putative Acetyl-CoA-Synthetase CbdbA1077. Aber auch zwei nicht charakterisierte Proteine wurden identifiziert (CbdbA727 und CbdbA266).

Tabelle 15. Übersicht der detektierten Peptide in den analysierten Gelbanden (a, b) der FAR-Western-Analyse.

Accession-Nr.	Gen	Beschreibung	Bande a		Bande b	
			# PSM	nachgewiesene Peptide	# PSM	nachgewiesene Peptide
Q3ZYU4	<i>cbdbA1368</i>	Konserviertes Domäne-enthaltendes Protein	9	3	9	2
Q3ZYV1	<i>cbdbA1358</i>	Chaperon Protein DnaK	7	4	12	9
Q3ZWU9	<i>cbdbA266</i>	Uncharakterisiertes Protein	n. d.	n. d.	4	3
Q3ZY60	<i>cbdbA1077</i>	Acetyl-CoA Synthetase	6	3	2	2
Q3ZXB4	<i>cbdbA727</i>	Uncharakterisiertes Protein	2	1	n. d.	n. d.
Q3ZYP6		Putative Mannosyl-3-Phosphoglycerat Synthase	1	1	n. d.	n. d.
Q3ZWY9	<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZWK7	<i>oadA</i>	Oxaloacetat Decarboxylase, alpha Untereinheit	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZYW8	<i>groL</i>	60 kDa Chaperonin	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZYB0	<i>acs</i>	Acetyl-CoA Synthetase	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZZT9	<i>atpA</i>	ATP Synthase Alpha Untereinheit	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZYE5	<i>cbdbA1172</i>	NADPH-abhängige FMN Reduktase	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZWS6	<i>cbdbA238</i>	Putative reductive dehalogenase	n. d.	n. d.	1	1
Q3ZXB5	<i>thrS</i>	Threonin--tRNA Ligase	n. d.	n. d.	3	2
Q3ZWQ1		Leucine--tRNA Ligase	1	1	1	1
Q3ZWU9	<i>cbdbA266</i>	Uncharakterisiertes Protein	1	1	1	1
Q3ZZ58		Sensor Histidine Kinase	1	1	n. d.	n. d.

Die MS-Analyse der Gelbanden, welche im FAR-Western von RdhR1456<sub>StrepC</sub> scheinbar erkannt wurden, lieferte lediglich eine erste Vermutung für mögliche Interaktionspartner, da alle löslichen Proteine, die eine ungefähre Größe von 70 kDa besaßen und somit in der entsprechenden Bande vorhanden waren, erfasst wurden. Aus diesem Grund wurde mittels Pulldown-Analyse weiter nach einem Interaktionspartner gesucht, jedoch ohne Erfolg. Es bleibt somit offen, ob RdhR1456<sub>StrepC</sub> durch die Interaktion mit einem Protein von der DNA abgelöst und dadurch reguliert wird.

### 3.4 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION DES CBDB\_A1595-1599 GENCLUSTERS

#### 3.4.1 *In vivo*-Repression des Promoters von *rdhA1598* durch RdhR1456 und RdhR1596

RdhR1456 bindet an ein *direct repeat upstream* von *rdhA1453* und *rdhA1455*, die Gene mit denen das *rdhR*-Gen assoziiert ist. Im Genom von CBDB1 wurden aber weitere Motive identifiziert, die diesem *DR* ähneln (Alignment in Abbildung 26). Die Genregion um das *rdhA*-Gen *rdhA1598* beinhaltet solch ein Motiv und ist schematisch in Abbildung 32 dargestellt.

Im Gegensatz zu den meisten *rdhA*-Genen in CBDB1 ist im Fall von *rdhA1598* nicht direkt ein *rdhR*-Gen in entgegengesetzter Orientierung *upstream* vom *rdhA*-Gen assoziiert, sondern *downstream*. Des

Weiteren befinden sich ein Gen mit unbekannter Funktion (cbdbA1599) sowie Gene für ein Zweikomponentensystem (TCS) (cbdbA1601 und cdbA1602) *upstream* von *rdhA1598*. Diese Genlokalisierung legte die Vermutung nahe, dass entweder das TCS oder der MarR-Regulator RdhR1596 für die Regulation von *rdhA1598* verantwortlich sind.

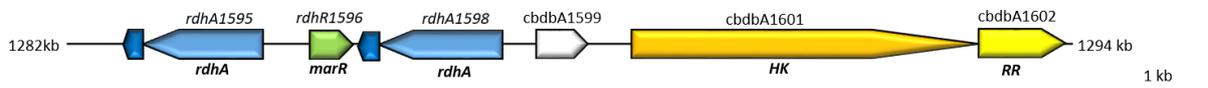


Abbildung 32. Schematische Darstellung der Genregion um das *rdhA*-Gen *rdhA1598*.

Aus der Literatur ist aber auch bekannt, dass MarR-Regulatoren neben der Regulation benachbarter Genen, auf weiter entfernt im Genom liegende Gene eine regulatorische Wirkung besitzen können, wie beispielsweise CouR (Otani et al., 2016). Es war somit aufgrund der hohen Ähnlichkeit des *DR* nicht auszuschließen, dass *rdhA1598* von RdhR1456 reguliert werden könnte. Deshalb sollten sowohl RdhR1596 als auch RdhR1456 als putative Regulatoren von *rdhA1598* untersucht werden. Die intergene Region von *rdhA1598* und *cbdbA1599* (IR1598) wurde mittels Phagentransduktion als chromosomale *lacZ*-Fusion im *E. coli* Stamm MC4100ara<sup>R</sup> konstruiert. Der resultierende Stamm wurde im Folgenden als LS22 (P<sub>1598::lacZ</sub>) bezeichnet. Um die Regulation durch RdhR1596 und RdhR1456 zu analysieren, wurden die Gene beider MarR-Regulatoren sowie eines dritten Kontrollregulators (RdhR1625) in pBAD30 kloniert und in LS22 transformiert. Die Stämme LS22 pBAD30, LS22 pBAD1456, LS22 pBAD1596 und LS22 pBAD1625 wurden unter Standardbedingungen anaerob in LB-Medium ohne bzw. mit 0,02 % L-Arabinose kultiviert und anschließend für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay verwendet. In Abbildung 33 sind die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der verschiedenen Stämme in Units dargestellt. Der Kontrollstamm LS22 pBAD30 wies keine Unterschiede in der Aktivität zwischen induzierten (schwarz) und nicht induzierten (grau) Bedingungen auf. Dagegen waren für LS22 pBAD1456 und LS22 pBAD1596 signifikante Unterschiede zwischen den die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der verschiedenen Anzuchtbedingungen zu beobachten. Für LS22 pBAD1456 wurde eine Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von  $312,1 \pm 20,6$  auf  $159,5 \pm 23,7$  Units festgestellt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS22 pBAD1596 ( $431,6 \pm 35,5$  Units) verringerte sich auf  $96,5 \pm 25,7$  Units. Im Gegensatz dazu beeinflusste RdhR1625 die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS22 pBAD1625 nicht, was für eine spezifische Interaktion beider Proteine RdhR1456 und RdhR1596 mit der Promoterregion von *rdhA1598* spricht.

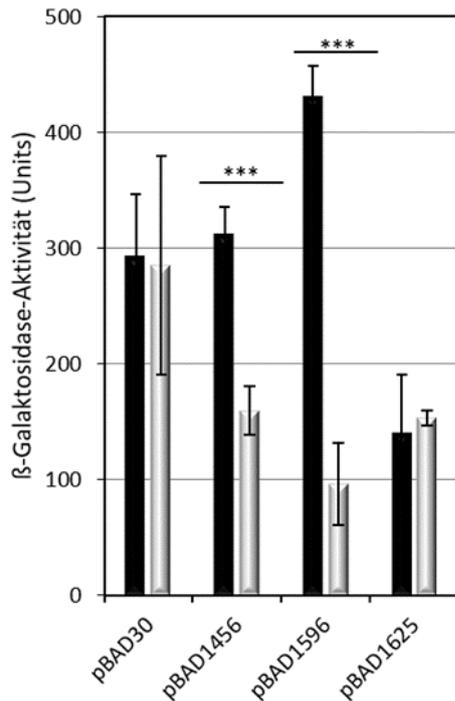


Abbildung 33. Transkriptionelle Regulation der Promoteraktivität von LS22 ( $P_{1598::lacZ}$ ) durch verschiedene MarR-Regulatoren. Dargestellt ist die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *E. coli* Stämme LS22 pBAD30 (Kontrolle), LS22 pBAD1456, LS22 pBAD1596 und LS22 pBAD1625. Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte anaerob in LB-Medium ohne (schwarz) oder mit 0,02 % L-Arabinose (grau). abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mehrfach in unabhängigen Experimenten verifiziert. Signifikante Unterschiede zwischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Varianten ohne und mit Arabinose wurden mittels T-Test bestimmt und sind mit \*\*\* für  $\alpha \leq 0,001$ ,  $n = 3$  gekennzeichnet.

### 3.4.2 Bindung von RdhR1456<sub>StrepC</sub> und RdhR1596<sub>StrepC</sub> an die Promoterregion von *rdhA1598* *in vitro*

*In vitro* Analysen mit gereinigtem RdhR1456<sub>StrepC</sub> sowie mit gereinigtem RdhR1596<sub>StrepC</sub> mit DNA-Fragmenten der Intergen Region IR1598 sollten die erhaltenen Indizien aus der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Untersuchung für eine Erkennung dieser DNA-Region durch beide Enzyme verifizieren. Für die Interaktionsstudie mit RdhR1456<sub>StrepC</sub> wurde ein dsDNA-Oligonukleotid aus der IR1598 gewählt, welches das DR beinhaltet, das Homologien zum DR von IR1455 besaß (TTGTATACGATAT-TTGTATACGATTAT). Als Kontrolle wurde ein dsDNA-Oligonukleotid aus dem intergenen Bereich von *rdhA1624* verwendet (IR1624). Im EMSA zeigte sich, dass das RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer ab einer Konzentration von 118 nM das Laufverhalten des dsDNA-Oligonukleotids IR1598 verzögerte (Abbildung 34). Im Vergleich dazu wurde die Kontrolle IR1624 erst bei einem Überschuss an RdhR1456<sub>StrepC</sub> von 941 nM teilweise im Laufverhalten verzögert, was ebenfalls bereits beim Kontroll-Oligonukleotid IR1455 (137-168 bp) in Abschnitt 3.3.3 beobachtet wurde. Aufgrund der nicht vollständigen DNA-Bindung bei maximal verwendeter Proteinmenge von 1,9  $\mu$ M RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Dimer wurde auf die Berechnung eines  $K_d$ -Wertes für IR1598 verzichtet. Anhand der qualitativen Analysen

mittels EMSA und  $\beta$ -Galaktosidase-Assay kann aber davon ausgegangen werden, dass RdhR1456 tatsächlich auch in der Lage ist an die Promoterregion von *rdhA1598* zu binden und die Transkription zu reprimieren.

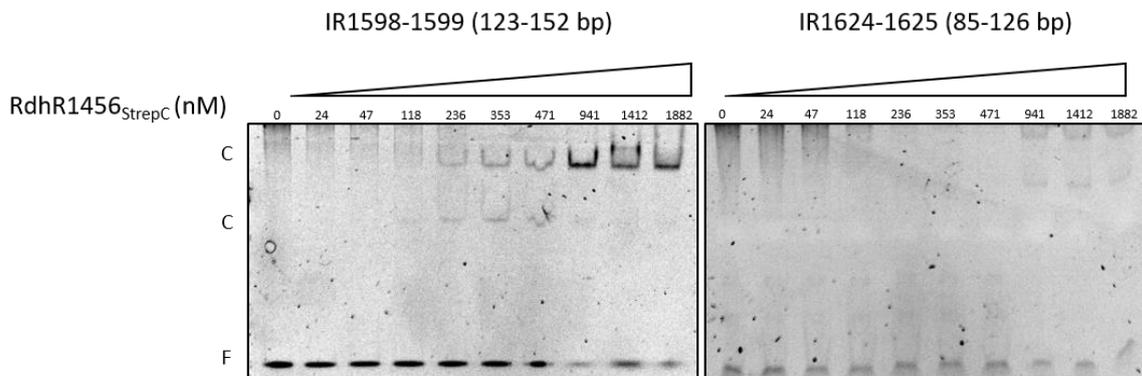


Abbildung 34. Bindeaffinität von *RdhR1456<sub>StrepC</sub>* an ein DNA-Fragment von *rdhA1598* [IR1598 (123-152 bp)]. Der EMSA wurde mit 25 nM DNA und 0-1,882  $\mu$ M *RdhR1456<sub>StrepC</sub>*-Dimer durchgeführt. Als Kontrolle diente ein DNA-Fragment von *rdhA1624*[IR1624(85-126 bp)].

Ob *RdhR1596* ebenfalls wie im *in vivo* Test auch *in vitro* an die Promoterregion von *rdhA1598* bindet, sollte mit Hilfe eines DNA-Fragments des gesamten intergenen Bereichs von *rdhA1598*-*cbdbA1599* untersucht werden. Hierfür wurde zunächst *RdhR1596* als C-terminales *Streptag*-Fusionsprotein in den *E. coli* Stamm Rosetta kloniert, analog zu *RdhR1456<sub>StrepC</sub>* heterolog synthetisiert und mittels Affinitätschromatografie angereichert [Abbildung 35 (A)]. Das so gewonnene *Streptag*-Fusionsprotein wurde als *RdhR1596<sub>StrepC</sub>* bezeichnet und für die Gelretentionsanalysen eingesetzt. Als DNA wurde nicht das dsDNA-Oligonukleotid IR1598 (123-152 bp), sondern der gesamte intergene Bereich IR1598 verwendet, da die Bindestelle von *RdhR1598* nicht wie für *RdhR1456* bereits durch DNase I-Footprinting eingegrenzt wurde. Vergleichende EMSAs mit IR1598 zu anderen intergenen Bereichen (IRRdhR1596<sub>StrepC</sub> spezifisch an IR1598 bindet oder ähnlich wie *RdhR1456* mehrere Zielregionen besitzt. Um einen unspezifischen *Shift* bei höheren Proteinkonzentrationen auszuschließen, wurden die EMSAs mit einer wesentlich höheren Poly (dl/dC)-Konzentration von 1  $\mu$ g/Ansatz statt 0,3  $\mu$ g/Ansatz durchgeführt. Während IR1598 in Anwesenheit von 0,125 und 0,5  $\mu$ M *RdhR1596<sub>StrepC</sub>*-Dimer ein zunehmend verzögertes Laufverhalten im EMSA aufwies, wurde ein DNA-Fragment des intergenen Bereichs vor *trpE* nicht durch *RdhR1596<sub>StrepC</sub>* im Laufverhalten beeinflusst [Abbildung 35 (B)]. *RdhR1596<sub>StrepC</sub>* bindet also spezifisch an die IR1598.

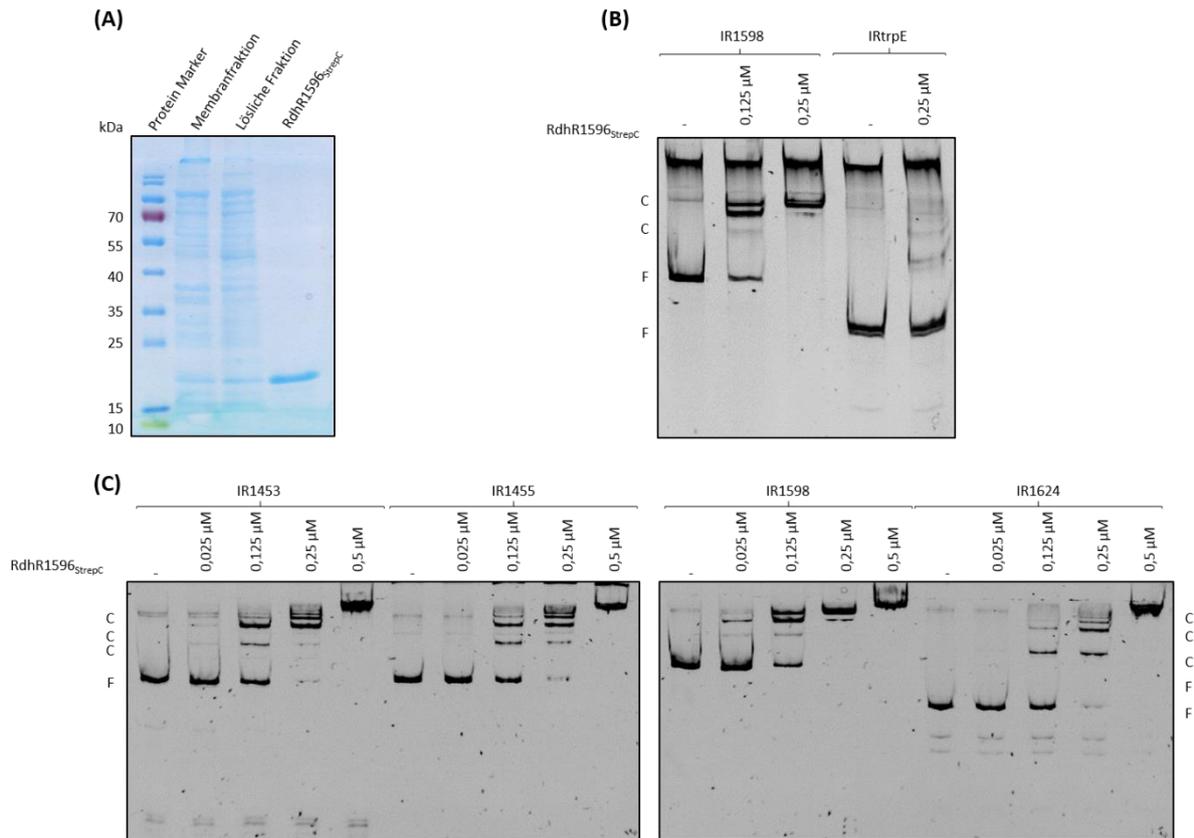


Abbildung 35. Aufreinigung von *RdhR1596<sup>StrepC</sup>* (A), *in vitro* Interaktion von *RdhR1596<sup>StrepC</sup>* mit IR1598 und IRtrpE (B) und anderen intergenen Bereichen (C). Dargestellt ist ein mit Coomassie gefärbtes 12,5 %iges SDS-Gel der Membranfraktion (50 µg) und der löslichen Fraktion (50 µg) von *E. coli* Rosetta pASKIBA3\_1596, sowie *RdhR1596<sup>StrepC</sup>* (5 µg) im Anschluss an eine Aufreinigung über eine Affinitätschromatografie und eine Mikrodialyse (A). Die EMSAs wurden mit 25 nM DNA der intergenen Regionen *rdhA1598-cbdbA1599* (IR1598), mit dem intergenen Bereich von *cbdbB30-trpE* (IRtrpE) als Negativkontrolle (B), sowie den intergenen Bereichen IR1453, IR1455 und IR1624 (C) in Anwesenheit von 0,025 bis 0,5 µM *RdhR1596<sup>StrepC</sup>*-Dimer durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 10 %igem Nativ-Gel wurden die freie DNA (F) und die DNA-Protein-Komplexe (C) mittels GelRed gefärbt und unter UV-Licht visualisiert (B).

Vergleicht man nun aber EMSA-Ergebnisse der intergenen Bereiche der *rdhA*-Gene *rdhA1453* (IR1453), *rdhA1455* (IR1455) und *rdhA1624* (IR1624) mit denen von *rdhA1598* (IR1598) [Abbildung 35 (C)], so fällt auf, dass es bei gleicher Konzentration (0,5 µM) an *RdhR1596<sup>StrepC</sup>*-Dimeren bei allen DNA-Fragmenten zu einem vollständigen *Shift* der DNA kommt. Im niedrigeren Konzentrationsbereich von 0,125 bis 0,25 µM sind Unterschiede in der Affinität von *RdhR1596<sup>StrepC</sup>* an die verschiedenen DNA-Fragmente zu erkennen. Während der DNA-*Shift* bei IR1598 bereits ab 0,025 µM beginnt, werden alle anderen Fragmente weniger affin von *RdhR1596<sup>StrepC</sup>* gebunden. Die erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass *RdhR1596* vermutlich ähnlich wie *RdhR1456* mehrere *target sites* in CBDB1 besitzt und in der Lage ist, auch weiter entfernt liegende *rdhA*-Gene zu regulieren.

### 3.5 KOMPLEXITÄT DES REGULATIONSSYSTEMS DER MARR-REGULATOREN IN *DEHALOCOCCOIDES MCCARTYI*

Für die Regulatoren RdhR1625, RdhR1456 und RdhR1596 wurde eine Interaktion mit den Promotoren der benachbarten *rdhA*-Gene beobachtet. Allerdings sind diese vermutlich nicht die ausschließlichen Zielgene der Regulatoren, da z. B. RdhR1456 ebenfalls eine Interaktion mit IR1598 aufzeigte. Um herauszufinden, ob weitere MarR-Regulatoren mit den bisher untersuchten Promoterregionen interagieren, wurden alle in CBDB1 vorkommenden *rdhA* assoziierten *rdhR*-Gene in den pBAD30 Vektor kloniert und in die *E. coli* Stämme LS9 (P<sub>1453::lacZ</sub>), LS20 (P<sub>1455::lacZ</sub>), LS21 (P<sub>1456::lacZ</sub>), LS22 (P<sub>1598::lacZ</sub>) und LS15 (P<sub>1625::lacZ</sub>) transformiert. Mit den so erhaltenen Stämmen wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Assays durchgeführt, die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme ohne Induktion wurde 100 % gesetzt und darauf die Aktivitäten unter induzierten Bedingungen (0,02 % L-Arabinose) bezogen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abbildung 36 für alle analysierten Stämme zusammengefasst dargestellt.

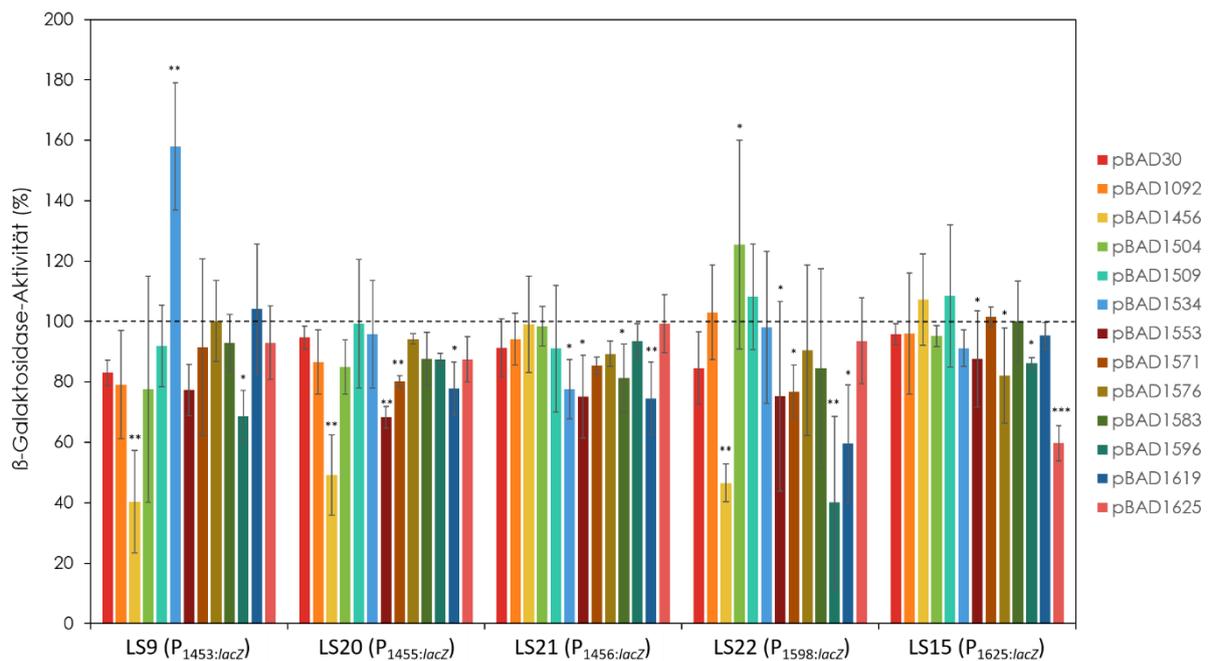


Abbildung 36. Vergleich der regulatorische Wirkung aller *rdhA* assoziierter MarR-Regulatoren aus CBDB1 auf die Promoter P<sub>1453</sub>, P<sub>1455</sub>, P<sub>1456</sub>, P<sub>1598</sub>, P<sub>1625</sub> *in vivo*. Dargestellt sind die relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme LS9, LS20, LS21, LS22 und LS15 mit den Vektoren pBAD30 (Kontrolle), pBAD1091, pBAD1456, pBAD1504, pBAD1509, pBAD1534, pBAD1553, pBAD1571, pBAD1576, pBAD1583, pBAD1596, pBAD1619 und pBAD1625 unter induzierten Bedingungen bezogen auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ohne Induktion. Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte anaerob in LB-Medium ohne (entspricht 100 %) oder mit 0,02 % L-Arabinose. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Wiederholungen mit jeweils biologischen Triplikaten. Signifikante Unterschiede zwischen der Aktivität induzierter und nicht induzierter Zellen wurden mittels T-Test pro Triplikat ermittelt und sind mit \* für  $\alpha \leq 0,05$ , \*\* für  $\alpha \leq 0,01$  und \*\*\* für  $\alpha \leq 0,001$  gekennzeichnet, wenn der signifikante Unterschied für mindestens zwei der drei Wiederholungen zutrif.

Es wurde für P<sub>1453</sub> beobachtet, dass neben RdhR1456 auch RdhR1596 und RdhR1504 Effekte auf P<sub>1453</sub> ausüben. Besonders interessant ist, dass RdhR1534 einen positiven Einfluss auf die  $\beta$ -Galaktosidase-

Aktivität von LS9 (P<sub>1453::lacZ</sub>) besitzt. Im Gegensatz dazu hat dieser Regulator keinen Einfluss auf den sehr ähnlichen Promoterbereich P<sub>1455</sub> im Stamm LS20. Bei diesem Stamm spielen andere MarR-Regulatoren neben RdhR1456 eine Rolle. Die Anwesenheit der Regulatoren RdhR1553, RdhR1571 und RdhR1619 wirkte sich negativ auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS20 (P<sub>1455::lacZ</sub>) aus. Aus den vorherigen Untersuchungen (3.3.2) ging hervor, dass *rdhA1456* nicht autoreguliert ist. Möglicherweise spielen aber andere MarR-Regulatoren bei dessen Regulation eine Rolle. So wurden negative Effekte auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS21(P<sub>1456::lacZ</sub>) durch die Regulatoren RdhR1534, RdhR1553 und RdhR1583 und RdhR1619 beobachtet. Auch für LS22 (P<sub>1598::lacZ</sub>) wurde ein regulatorischer Effekt durch mehrere MarRs beobachtet. Neben den Regulatoren RdhR1456 und RdhR1596 beeinflussten auch RdhR1553 und RdhR1571 die Aktivität dieses Promoters. Für RdhR1625 wurde bereits gezeigt, dass es transkriptionell autoreguliert wird (3.1.1). Neben einer Autoregulation unterliegt *rdhR1625* jedoch auch der transkriptionellen Kontrolle anderer MarR-Regulatoren. So verringerten auch RdhR1553, RdhR1576 und RdhR1596 die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS15(P<sub>1625::lacZ</sub>) und deuteten damit darauf hin, dass sie ebenfalls *rdhR1625* in seiner Transkription beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Regulation in CBDB1 durch die *rdhA*-assoziierten MarR-Regulatoren durchaus einen komplexeren Charakter besitzt, als bisher angenommen. MarR-Regulatoren aus CBDB1 sind in einem heterologen *in vivo* System in der Lage auch an Promoterbereiche von *rdhA*-Genen und *rdhR*-Genen zu binden, welche nicht in direkter Nachbarschaft zum jeweiligen *rdhR*-Gen im Genom kodiert sind.

## 4 DISKUSSION

---

### 4.1 RDHR1625, RDHA1456 UND RDHA1596 - BEISPIELE FÜR MARR-REGULATOREN IN *D. MCCARTYI*

RdhR1625, RdhR1456 und RdhR1596 im *D. mccartyi* Stamm CBDB1 gehören zur Gruppe der MarR-Regulatoren. Sie wurden als Beispiele für die Untersuchung der Regulation der OHR in CBDB1 durch MarR-Regulatoren in dieser Arbeit herangezogen.

#### 4.1.1 Phylogenetische Entwicklung von *rdhR*- und *marR*-Genen in *D. mccartyi*

Phylogenetisch haben sich vermutlich *rdhA*-Gene und *marR*-Gene gemeinsam entwickelt. Die Stammbäume von *marRs* und *rdhAs* verschiedener *Dehalococcoides* Stämme (Abbildung 5 und Abbildung IV im Anhang) zeigen orthologe Gene in den unterschiedlichen *D. mccartyi* Stämmen. So existieren in DCMB5, VS und GT orthologe Gene zu *rdhA1455* und *rdhR1456* mit Sequenzidentitäten zwischen 83 % und 100 % (Tabelle VII im Anhang). Sehr ähnliche *rdhAs* finden sich jedoch nicht nur in verschiedenen Stämmen, sondern auch innerhalb eines Stammes, wie die in dieser Arbeit untersuchten paralogene Gene *rdhA1453* und *rdhA1624* mit einer Sequenzidentität von 92 % belegen. Phylogenetisch lässt das auf horizontalen Gentransfer bzw. Rekombinationsereignisse während der Evolution schließen. McMurdie et al. (2009) erklärten den horizontalen Gentransfer durch mobile genetische Elemente, die in den meisten OHRBs vorkommen. Zu diesen Elementen gehören Insertionselemente, Transposasen, Prophagen, Rekombinasen und genetische Inseln. Ein Beispiel dafür, dass mobile genetische Elemente Einfluss auf die OHR besitzen, ist das *pceABCT*-Cluster in *Dsb. hafniense* Stamm TCE1, was von zwei IS Elementen umgeben ist. Bei Abwesenheit des PceA-Substrats PCE geht über die Zeit das Gencluster verloren (Banerjee und Ragsdale, 2003; Maillard et al., 2005). Ein weiterer Hinweis auf die mögliche Rolle von mobilen genetischen Elementen ist die Existenz von Bakteriophagenen in *D. mccartyi* 195 und der KB-1 Mischkultur. Die Bakteriophagen- und Transposase-Gene wurden in Hungerphasen vermehrt transkribiert (Waller et al., 2012; Grostern et al., 2010). In *D. mccartyi* BTF08 wurde ein *rdhA*-Gen innerhalb der Insertionssequenzen eines Prophagen nachgewiesen (Pöritz et al., 2013), was die Grundlage für einen *rdhA*-Gentransfer sein könnte.

Die meisten *rdhA*-Gene befinden sich in zwei Genregionen mit einer hohen Variabilität, den sogenannten HPRs. McMurdie et al. (2009 und 2011) verglichen die HPRs verschiedener *D. mccartyi* Stämme miteinander und leiteten daraus die Entwicklung verschiedener *rdhA*-Gene über

Genduplikationen und horizontale Gentransfers durch IS-Elemente innerhalb eines Stammes und zwischen verschiedenen Stämmen ab. Die paralogen *rdhAB*-Gene *rdhAB1452-53* und *rdhAB1623-24* könnten so entstanden sein. Ein Sequenzvergleich der in dieser Arbeit relevanten *rdhA*- und *marR*-Gene lieferte einige orthologe Gene und Gencluster in anderen *D. mccartyi* Stämmen (Tabelle VII im Anhang). Das *rdh1452-1456*-Gencluster existiert in den vier *D. mccartyi* Stämmen CBDB1, VS, GT und DCMB5, davon ist in dreien auch das paraloge *rdh1623-25*-Gencluster vorhanden. Bei Annahme, dass beide Gencluster im jüngsten gemeinsamen Vorfahr vorhanden waren (McMurdie et al., 2009), deutet das auf einen nachträglichen Verlust eines der Gencluster im Stamm DCMB5 hin.

Tabelle 16. Konservierung des DR-Motivs von *RdhR1456* aus CBDB1 in verschiedenen *D. mccartyi* Stämmen

STAMM	KONSERVIERUNG DES DR-MOTIVS		Sequenz-Identität
	Intergene Regionen (IR) und Alignments zu CBDB1		
	<b>IR1453</b>		
<b>CBDB1</b>	IR_rdhA1453	TAGTATACGAT <b>TA</b> TAGTATACGAT	
<b>DCMB5</b>	IR_dcmb_1339	TAGTATACGAT <b>TA</b> TAGTATACGAT	100 %
<b>GT</b>	IR_DehalGT_1189	TAGTATACGAT <b>TA</b> TAGTATACGAT	100 %
<b>VS</b>	IR_DhcVS_1260	TAGTATACGAT <b>AT</b> TAGTATACGAT *****	88 %
	<b>IR1455</b>		
<b>CBDB1</b>	IR_rdhA1455	TAGTA-TACGA--TAC-TAGTATACGAT	
<b>DCMB5</b>	IR_dcmb_1341	TAGTA-TACGA--TAC-TAGTATACGAT	100 %
<b>GT</b>	IR_DehalGT_1191	TAGTA-TACGA--TAC-TAGTATACGAT	100 %
<b>BTF08</b>	IR_btf_1057	<b>TCGTA</b> -TACGA <b>TGTATTT</b> CGTATACGAT	75 %
<b>DET 195</b>	IR_DET_1171	<b>TCGTA</b> -TACGA <b>ATATA</b> T <b>CGT</b> TACGAT	75 %
<b>BAV1</b>	IR_BAV_0988	<b>TCGTA</b> A <b>TACGA</b> <b>TGTATTT</b> CGTATACGAT * * * * *	71 %
	<b>IR1598</b>		
<b>CBDB1</b>	IR_rdhA1598	TTGTATACGATATTTGTATACGATTAT	
<b>GT</b>	IR_DehalGT_1321	TTGTATACGATATTTGTATACGATTAT	100 %
<b>BTF08</b>	IR_btf_1463	TTGTATACGAT <b>GTT</b> TTGTATACGATTAT	96 %
<b>VS</b>	IR_DhcVS_1402	TT <b>GAT</b> TACGAT <b>GTT</b> GAT <b>TACG</b> ATTAT *** * * * * * * * * *	82 %
	<b>IR1624</b>		
<b>CBDB1</b>	IR_rdhA1624	GTATATTAGTCTATATGGACTAGTCCATATAGACTAAATATAC	
<b>GT</b>	IR_DehalGT_1344	GTATATTAGTCTATAT <b>AG</b> ACTAGT <b>C</b> TATATAGACTAAATATAC	95 %
<b>VS</b>	IR_DhcVS_1427	GTATATTAGTCTATAT <b>AG</b> ACTAGT <b>C</b> TATATAGACTAAATATAC	95 %
<b>BTF08</b>	IR_btf_1488	GTATATTAGTCTATATGGACTAGTCCATATAGACTAAATATAC	100 %
<b>DET 195</b>	IR_DET_1535	<b>C</b> TATATTAGTCTATAT <b>AG</b> ACTAGT <b>C</b> TATATAGACTAAATAT <b>AG</b> *****	91 %

Rot markiert sind nicht konservierte Basen, \* zeigen homologe Bereiche in allen Stämmen

Besonders interessant war die Konservierung des DR-Erkennungsmotivs von *RdhR1456* in den intergenen Regionen verschiedener Stämmen, teils auch ohne dass die benachbarten Gene ortholog zu den in dieser Arbeit untersuchten Genen waren (Tabelle VII im Anhang). Beispielsweise finden sich

in BAV1, 195 und BTF08 *repeat*-Regionen mit einer Sequenzidentität von 71 % und 75 % zum DR IR1455 aus CBDB1 (Tabelle 16), jedoch sind die flankierenden *rdhA*- und *marR*-Gene nicht zu *rdhA1455* und *rdhR1456* ortholog (Tabelle VII im Anhang). Die DNA-Bindemotive waren somit zur Vergleichssequenz aus CBDB1 stark konserviert. Das könnte auf eine ähnliche Regulation der *rdhA*- und *marR*-Gene in den anderen *D. mccartyi* Stämmen durch die mehr oder weniger orthologen RdhRs hindeuten, was wiederum eine substratspezifische Regulation der OHR durch MarRs in Frage stellt. Für hoch konservierte Gencluster könnte man jedoch die im Stamm CBDB1 für RdhR1456 und RdhR1625 abgeleiteten Regulationsprinzipien auf andere *Dehalococcoides* Stämme verallgemeinern. So würde man annehmen, dass beispielweise im Stamm GT die *rdhA*-Gene *dehalGT\_1191* und *dehalGT\_1189* ähnlich wie *rdhA1453* und *rdhA1455* durch den assoziierten putativen MarR-Regulator *DehalGT\_1192* reguliert werden (Tabelle VII im Anhang). Ähnlich verhält es sich dann vermutlich mit den *rdhA*-Genen der Stämme DMCB5, VS, GT, 195 und BTF08, die in Assoziation mit RdhR1625- und RdhR1596-orthologen MarR-kodierenden Genen stehen.

#### 4.1.2 Vergleich der Wirkungsweise der MarR-Regulatoren RdhR1456, RdhR1625 und RdhR1596

Auf Basis der bekannten Literatur muss berücksichtigt werden, dass das Regulationsprinzip von MarR-Regulatoren nicht pauschalisiert werden kann. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es Beispiele von MarR-Regulatoren, die als globale Regulatoren wirken [SarZ (Poor et al., 2009), SlyA (Dolan et al., 2011)], andere regulieren nur benachbarte Zielgene und gelten als lokale Regulatoren [OhrR (Oh et al., 2007), MexR (Evans et al., 2001)]. Mehr als die Hälfte der bislang bekannten Regulatoren vom MarR-Typ sind autoreguliert. Ihr Wirkungsspektrum ist ebenfalls sehr weit gefächert und es gibt keine typische MarR-Konsensussequenz in der DNA. Die Untersuchung der drei MarR-Regulatoren RdhR1625, RdhR1456 und RdhR1596 sollte ermöglichen, allgemeine Regulationsmechanismen in *D. mccartyi* CBDB1 zu erkennen. Eine zusammenfassende schematische Darstellung der beobachteten Transkription von *rdhA*- und *marR*-Genen und deren Regulation durch die drei Regulatoren ist in Abbildung 37 zu sehen. Es wurde gezeigt, dass die Regulatoren als transkriptionelle Repressoren für ihre Nachbargene fungieren. Jedoch gab es auch Unterschiede. Während RdhR1625 lediglich sein benachbartes *rdhA*-Gen regulierte und einer Autoregulation unterlag, so wurden für RdhR1456 und RdhR1596 mehrere putative Target-Gene (*rdhA1453*, *rdhA1455*, *rdhA1598* bzw. *rdhA1598*, *rdhA1453*, *rdhR1625*) identifiziert. RdhA1456 war nicht autoreguliert. Diese Unterschiede basieren vermutlich auf der Lokalisierung der DNA-Binderegionen der MarRs im Bezug zur Lokalisierung der jeweiligen Promotoren. Ein MarR-Regulator, der als Repressor wirkt, bindet innerhalb der Promoterregion des Target-Gens und verhindert so die Rekrutierung der RNA-Polymerase. Bei divergent zueinander orientierten Genen, wie es für MarRs im Bezug zu ihren Zielgenen typisch ist, liegt oft der Promoter des Regulators ebenfalls innerhalb dieser DNA-Binderegion des MarRs. Eine Bindung des MarRs

reprimiert somit die Transkription beider flankierenden Gene. Die ermittelten Transkriptionsstarts von *rdhA1624* und *rdhR1625* decken sich mit dieser These [+1 in Abbildung 37(B)]. Beide Promotoren sind innerhalb bzw. in direkter Nachbarschaft zur DNA-Binderegion von RdhR1625 lokalisiert. Der Transkriptionsstart von *rdhR1456* befindet sich jedoch weit außerhalb der ermittelten DNA-Binderegion von RdhR1456 [Abbildung 37 (A)]. Die in diesem Fall nicht vorhandene Autoregulation ist somit plausibel. Aus der Literatur sind ähnliche Beispiele bekannt, so basiert die nicht vorhandene Autoregulation von CbaR aus *Comamonas testeroni* ebenfalls vermutlich auf der Lokalisierung des Promoters außerhalb der DNA-Binderegion (Providenti und Wyndham, 2001).

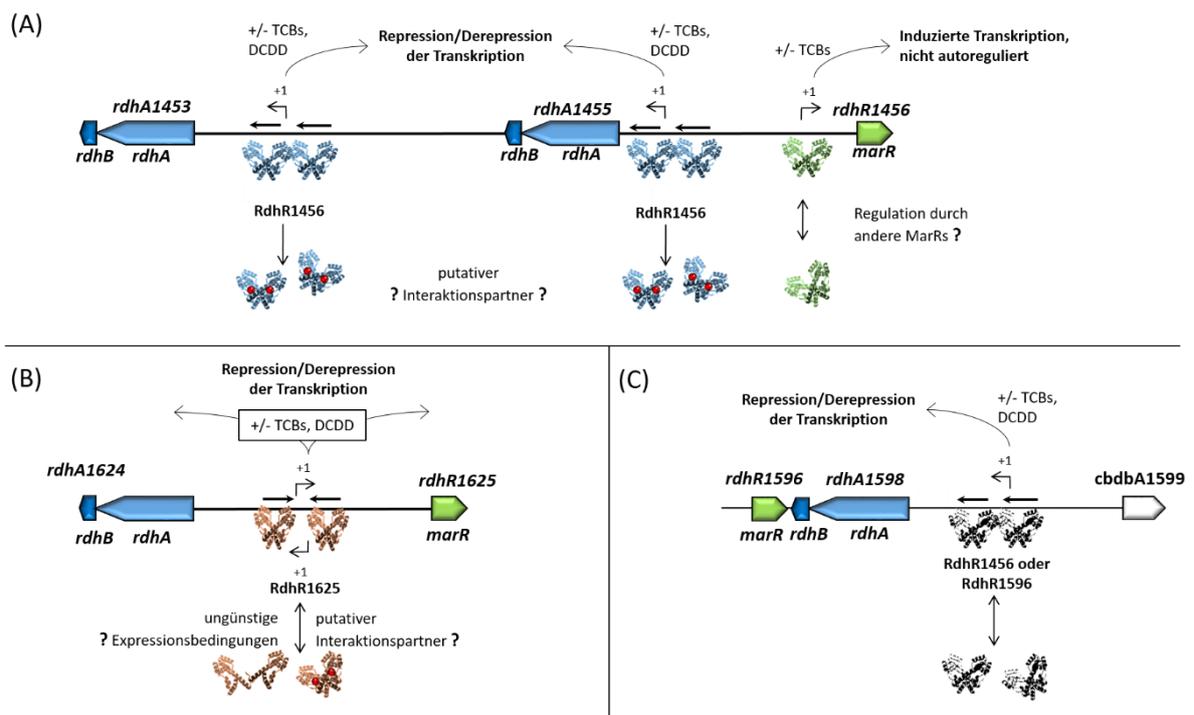


Abbildung 37. Modelle zur Regulation der Transkription von *rdhA*- und *rdhR*-Genen durch RdhR1456 (A), RdhR1625 (B) und RdhR1596 (C) nach Transkriptionsanalysen von Wagner (2009) und Ergebnissen dieser Arbeit. Dargestellt sind die Gencluster *rdh1452-56* (A), *rdh1623-25* (B) und *rdh1596-99* (C). *rdhAB*-Gene sind in blau, *marR*-Gene in grün und Gene ohne bekannte Funktion in weiß abgebildet. Parallele Pfeile zu den Genclustern deuten die DR-Motive an, Pfeile mit +1-Markierung sind die Transkriptionsstartpunkte der Gene, gebogene Pfeile stehen für die Repression bzw. Derepression der Transkription in Folge des Wachstums von CBDB1 mit TCBs oder DCDD. Gerade Pfeile deuten die Interaktion bzw. Ablösung der Regularproteine von der DNA mit einem putativen Liganden (rote Kreise) an.

Ein weiterer Unterschied zwischen RdhR1625 und RdhR1456 ist, dass RdhR1625 ausschließlich nach einer Expression unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* die Transkription seines *targets* regulierte (3.1.1.2). RdhR1456 war jedoch sowohl nach aerober als auch anaerober Expression regulatorisch aktiv (Mehwald, 2012). Vergleicht man nun die Regulatoren auf Aminosäureebene, so fällt auf, dass RdhR1596 mit einer Sequenzidentität von 44 % näher verwandt zu RdhR1456 als zu RdhR1625 (22% Sequenzidentität) ist. Außerdem besitzen RdhR1456 und RdhR1596 im Vergleich zu RdhR1625 keinen Cysteinrest. Für andere Regulatoren, wie CprK aber auch OhrR, wird postuliert, dass sie Cysteinreste nutzen, um Redoxzustände zu sensieren (Pop et al., 2006; Fuangthong und Helmann, 2002). Durch die

Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen unter oxidischen Bedingungen kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteine und somit zur Funktionsveränderung bzw. Inaktivierung. Wagner (2009) postulierte einen ähnlichen Wirkmechanismus für RdhR1625, wenn zwei RdhR1625 Moleküle sich, wie für MarRs typisch, zu einem Homodimer verbinden. Jedoch wurde diese Vermutung durch einen fehlenden Effekt des Austausches des Cysteins in RdhR1625 durch Alanin (3.1.1) widerlegt. Ein anderer Wirkungsmechanismus muss die Ursache für die ausschließlich nach anaerober Proteinbiosynthese stattfindende Regulation durch RdhR1625 sein. Möglicherweise ist die Expression unter aeroben Bedingungen ineffizienter im Vergleich zur Expression unter anaeroben Bedingungen oder das Protein wird verstärkt unter aeroben Bedingungen im heterologen System degradiert.

RdhR1456 und RdhR1625 unterscheiden sich auch in ihren DNA-Binderegionen voneinander. Während RdhR1625 sehr wahrscheinlich an ein perfektes Palindrom mit kurzen *inverted repeats* in den Halbseiten bindet (Abbildung 10) (Wagner et. al., 2013), wurden für RdhR1456 mehrere DNA-Binderegionen identifiziert, denen allen ein *direct repeat* mit kurzen *inverted repeats* in den Halbseiten gemeinsam ist (Abbildung 14). Die postulierten DNA-Bindemotive für RdhR1456 und RdhR1625 unterscheiden sich sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer *repeat*-Länge und im Abstand der Halbseiten voneinander. Während für RdhR1625 wahrscheinlich das Motiv TATAxxxxxTATA als Bindestelle für ein Dimer verwendet wird, so gibt es für RdhR1456 nur das kurze *inverted repeat* GTA-TAC in jeder Halbseite. Basierend auf den unterschiedlichen Abständen sind strukturelle Unterschiede in der Bindung von RdhR1625 und RdhR1456 nicht abwegig, denn die Bindung an die DNA erfolgt nicht nur sequenzspezifisch, sondern ist auch an die Konformation der DNA in diesem Bereich gebunden.

Alle untersuchten MarRs waren Repressoren und binden vermutlich an *inverted repeat*-Sequenzen in *rdhA*-Gen-Promotoren. Außerdem gibt es Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Regulatoren und in den Erkennungssequenzen auf der DNA. Das spricht für eine spezifische Regulation der verschiedenen *rdhA*-Gene. Allerdings kann man vermuten, dass die Interaktion verwandter Regulatoren mit konservierten Erkennungssequenzen im selben Stamm (RdhR1596 und RdhR1456) oder in anderen *D. mccartyi*-Stämmen ähnlich erfolgt. Um konkrete Aussagen über die Regulation jedes *rdhA*-Gens treffen zu können, müsste allerdings einzeln die potentielle Regulation durch den benachbarten MarR untersucht werden. Wahrscheinlich sind aber Rückschlüsse zu direkt orthologen Genclustern in anderen *Dehalococcoides* Stämmen (Tabelle im Anhang) möglich, jedoch sollte dies experimentell überprüft werden.

## 4.2 DER REGULATOR RDHR1456

Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit lag auf der Funktionsweise des MarR-Regulators RdhR1456 aus CBDB1. Das *marR*-Gen *rdhR1456* befindet sich im Genom von CBDB1 in direkter Nachbarschaft mit den *rdhA*-Genen *rdhA1453* und *rdhA1455*.

### 4.2.1 Regulation der Transkription des Genclusters *cbdb\_A1452-55*

Die Transkription der *rdhA*-Gene *rdhA1453* und *rdhA1455* wurde in Gegenwart von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB erhöht (3.2.2). Das assoziierte *marR*-Gen *rdhR1456* wurde ebenfalls unter diesen Bedingungen vermehrt transkribiert. Durch diese Tatsache, aber auch durch die identifizierten Cotranskripte von *rdhA1452/53* und *rdhA1454/55* wurde davon ausgegangen, dass es sich für *rdhA1452-1455* um eine Transkriptionseinheit handelt. Für *rdhA1455*, *rdhB1454* und *rdhA1453* konnten keine Attenuator-Regionen mit Hilfe der RibEx Software (Abreu-Goodger und Merino, 2005) identifiziert werden, was ein weiteres Indiz für eine gemeinsame mRNA von *rdhA1455* über *rdhB1454* zu *rdhA1453* ist. Andererseits konnte sowohl für *rdhA1453* als auch für *rdhA1455* ein Transkriptionsstart ermittelt werden (3.2.3). Die daraus abgeleiteten -35 und -10 Regionen beider Gene ähneln sich stark. Beide -10 Regionen sind perfekt konserviert, der Abstand zwischen -35 und -10 beträgt bei beiden Promotoren 17 bp. Die -35 Regionen unterscheiden sich jedoch. Mit TTTACT weicht die -35 Region von *rdhA1453* stärker von der Konsensussequenz ab als die von *rdhA1455* (TTGACC). Das könnte die schwächere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des Stammes LS9 gegenüber LS20 (Abbildung 15) erklären. Vermutlich wird der Promoter von *rdhA1453* in CBDB1 kaum genutzt, denn nur im heterologen System war es möglich, den Transkriptionsstart von *rdhA1453* zu ermitteln, während es experimentell nicht gelang, den von Wagner (2009) ermittelten Transkriptionsstart in CBDB1 durch 5'RACE zu bestätigen. Das deutet darauf hin, dass vermutlich in CBDB1 selten die Transkription direkt von P<sub>1453</sub> aus stattfindet. Auch ein Vergleich der Transkription von *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhA1456* mit TCBs in dieser Arbeit zeigte in allen drei unabhängigen Wiederholungen (Abbildung 13; Abbildung und IV im Anhang), dass *rdhA1455* von Beginn an ein höheres Transkriptionsniveau als *rdhA1453* aufwies. Die Transkription aller drei Gene im Operon erreichte mit 1,2,3-TCB nach 24 h und mit 1,2,4-TCB nach 48 h ihren Höhepunkt, bevor sie stagnierte bzw. abflachte. Beide TCBs, aber auch 1,2,4-TBB (Wagner et al., 2012) und PCE (Pöritz et al., 2015) sind somit anscheinend an der Induktion des *rdh1452-1455* Operons beteiligt.

Eine mögliche unterschiedliche Expression beider *rdhA*-Gene wurde auf Proteinebene durch die Studien von Schiffmann et al. (2013) mit HCB und Pöritz et al. (2015) mit 1,2,3-TCB untermauert. Das Protein RdhA1455 aus CBDB1 bzw. dessen orthologes Protein Dcmb\_1341 aus DCMB5 wurden hier in

Anwesenheit von HCB bzw. 1,2,3-TCB und PCE nachgewiesen, während RdhA1453 unter den Bedingungen nicht bzw. dessen orthologes Protein Dcmb\_1339 nur mit PCE nachweisbar war. Proteomanalysen wurden aufgrund der benötigten hohen Zellmasse meist mit Kulturen in der stationären Wachstumsphase durchgeführt. In dieser Wachstumsphase ist kaum noch RdhA1453 nachweisbar, da dessen Expressionslevel vermutlich niedriger ist als RdhA1455. Proteomanalysen von Wagner et al. (2012) mit CBDB1 beim Wachstum auf Brombenzolen wurden mit CBDB1-Kulturen in der exponentiellen Phase durchgeführt (Zellzahl  $2-4 \times 10^7$ /ml). Bei diesen Studien wurden neben RdhA1455 auch RdhA1453 beim Wachstum mit 1,2,4-TBB, 1,2-DBB und 1,3-DBB nachgewiesen, jedoch immer mit einer geringeren Abundanz als RdhA1455. RdhA1455 wurde auch hier mit anderen Brombenzolen nachgewiesen, aber nicht RdhA1453.

Aus der Literatur sind einige Beispiele bekannt, in denen die Transkription mehrerer *rdhA*-Gene in Anwesenheit eines Substrats vermehrt stattfindet bzw. in denen verschiedene Substrate zur Genexpression eines *rdhA*s beitragen (Wagner, 2009; Mukherjee et al., 2014; Rupakula et al., 2013; Wang et al., 2014; Waller et al., 2005). Diese Studien geben Anlass zur Frage, ob die verschiedenen Elektronenakzeptoren das Signal für die Transkription überhaupt darstellen, oder ob es ein eher übergeordnetes Signal zur Transkriptionsinduktion gibt, welches durch die verschiedenen Elektronenakzeptoren spezifisch verstärkt bzw. nicht verstärkt wird. Am plausibelsten erschien hierfür das Vorhandensein des für die OHR und somit auch für das Wachstum von CBDB1 ebenfalls zwingend notwendigen Elektronendonators Wasserstoff. Eine Transkriptionsanalyse der Gene *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhR1456* in Anwesenheit von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB unter Ausschluss von Wasserstoff zeigte, dass alle untersuchten Gene sowohl mit als auch ohne Wasserstoff induziert wurden. Wasserstoff konnte also als möglicher zusätzlicher Faktor für die Transkriptionsinduktion der *rdhA*- und *rdhR*-Gene in CBDB1 ausgeschlossen werden. Interessanter Weise spielt Wasserstoff neben TCBS selbst für die Induktion der meisten Hydrogenasegene kaum eine Rolle (Hartwig et al., 2013). Es bleibt somit offen, ob neben den Elektronenakzeptoren nicht auch andere Umweltbedingungen eine Rolle für die teils allgemeine Induktion von *rdhA*-Genen in CBDB1 spielen.

Ein weiteres im Verdacht stehendes übergeordnetes Signal für die Induktion von *rdhA*-Genen ist der Acetylierungsgrad von Proteinen. In jüngsten Studien wurde der Acetylierungsgrad der Proteine in CBDB1 in verschiedenen Wachstumsphasen untersucht und festgestellt, dass sich dieser im Verlauf des Wachstums verändert (Türkowsky et al., 2016). Acetylierungen von Proteinen des Stoffwechsels sind von Prokaryoten bis hin zu den Säugetieren weit verbreitet und besitzen eine Schlüsselfunktion in der Koordination des gesamten Stoffwechsels. Der Acetylierungsgrad der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in *Salmonella enterica* ist z. B. abhängig von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle. In Anwesenheit von Glukose ist die GAPDH stärker acetyliert als mit Acetat als C-

Quelle. Dadurch wird der Stoffwechsel entweder in Richtung Glykolyse oder Gluconeogenese gelenkt (Angelica und Fong, 2011). Der Acetylierungsgrad von metabolischen Enzymen innerhalb der Zelle steht somit vermutlich auch in CBDB1 im Zusammenhang mit günstigen Wachstumsbedingungen und wird deshalb in Betracht gezogen, an der Regulation der OHR beteiligt zu sein.

Auch der Einfluss, unter denen die für die Transkription notwendigen Sigma-Faktoren stehen, sollte bei der Regulation der OHR Beachtung finden. Denn bei der Interaktion der MarR-Regulatoren mit den Promoterregionen der Target-Gene handelt es sich um eine kompetitive Bindung, die durchaus durch Konkurrenz mit anderen DNA-Bindeproteinen aufgehoben werden kann. Wenn man bedenkt, dass der in dieser Arbeit untersuchte Regulator RdhR1456 eine relativ geringe Affinität von  $K_d$ : 63 nM zur Zielsequenz besitzt, so ist es durchaus möglich, dass andere Transkriptionsfaktoren bzw. das RNA-Polymerase-Holoenzym mit dem Sigma70-Faktor eine höhere Affinität zur Target-Region besitzen und somit den MarR verdrängen können. Für das RNA-Polymerase (RNAP)-Holoenzym ist z. B. bekannt, dass es an die konservierte Sigma70 Promoterregion mit einer Affinität von unter 1 nM binden kann und auch Sigma70 allein hat eine Affinität von ca. 40  $\mu$ M an eine konservierte -10 Region (Mekler et al., 2011). Befindet sich die Zelle in günstigen Umweltbedingungen, so wird viel RNAP-Holoenzym mit Sigma70 für die Transkription der *house keeping* Gene in der Zelle vorhanden sein und möglicherweise erfolgreich den MarR-Regulatoren um die Promotorregionen der *rdhAs* konkurrieren. Dies geschieht womöglich auch ohne, dass ein spezieller Ligand den MarR von der Target-DNA ablöst.

#### 4.2.2 Bindung von RdhR1456 an die DNA

Die durchgeführten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Untersuchungen (3.3.2) und die Gelretentionsstudien (3.3.3) zeigten, dass RdhR1456 an  $P_{1455}$  und  $P_{1453}$  bindet. Die DNA-Binderegionen sind jedoch nicht identisch. Für  $P_{1453}$  wurde ein perfektes 13 bp *DR* identifiziert, während für  $P_{1455}$  ein 11 bp *DR* ermittelt wurde. Vergleichende EMSAs zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_d$ , die mit den dsDNA-Oligonukleotiden IR1453(302-328bp), IR1455(105-136bp) durchgeführt wurden, deuteten aber darauf hin, dass RdhR1456 eine schwächere Affinität zu  $P_{1453}$ , als zu  $P_{1455}$  aufweist (3.3.5). Allerdings enthielten die dsDNA-Oligonukleotide zwar jeweils das GTATAC-Motiv, aber für IR1453(302-328bp) fehlte das im DNase I-Verdau mit geschützte TA-Motiv im Randbereich, welches aber in IR1455(105-136bp) mit vorhanden war (siehe Abbildung VII im Anhang). Die Randbereiche um das GTATAC-Motiv könnten somit auch einen Einfluss auf die Bindeaffinität besitzen und dazu führen, dass im untersuchten dsDNA-Oligonukleotid IR1453(302-328bp) die Bindeaffinität geringer ausfällt, als für IR1455, obwohl es ein perfektes *repeat* enthält. Ein weiteres Indiz dafür, dass das für die DNA-Bindung essentielle *direct repeat* nicht ausschließlich für die DNA-Bindung verantwortlich ist lieferten Gelretentionsanalysen mit einem DNA-Fragment mit ausschließlich den Randregionen des *DRs* von

*rdhA1455* (IR1455Δrepeat). Es wurde eine geringfügige Bindung von RdhR1456 ermittelt und auch in β-Galaktosidase-Aktivitäts-Messungen wurde noch eine ca. 10 %ige Reduktion der β-Galaktosidase-Aktivität von LS23 pBAD1456 festgestellt (Abbildung 22). Außerdem führte die Insertion eines der vermuteten entscheidenden *inverted repeats* GTATAC in IR1455Δrepeat allein nicht zur Wiederherstellung des DNA-Shifts im EMSA (Abbildung 28). Studien belegen, dass die DNA-Bindung von MarR-Regulatoren nicht ausschließlich sequenzspezifisch verläuft. Auch Interaktionen der MarR-Regulatoren mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA und die Konformation der DNA spielen eine Rolle (Dolan et al., 2011; Perera and Grove, 2010; Quade et al., 2012; Stevenson et al., 2007). MarRs können somit mit einer niedrigen Affinität auch unspezifisch an die DNA binden, was jedoch in den Gelretentionsanalysen durch Poly(dI/dC)-DNA verringert wurde. Für viele MarRs wurden zwar die putativen DNA-Bindemotive beschrieben, doch die komplett vor einem DNase I-Verdau geschützten DNA-Bereiche sind teilweise deutlich größer und bilden meist ein mehr oder weniger perfektes *inverted repeat*. So wurde z. B. für BldR aus *Sulfolobus solfataricus* ein viel größerer Bereich zur DNA-Bindung identifiziert (AGAGTTTAAAAATTAATTTATTATAAAG), als nur die darin enthaltenen vier Basenpaar *inverted repeats* TAATxx(x)ATTA (Fiorentino et al., 2007; di Fiore et al., 2009). Für das bereits in der Einleitung erwähnte CouR aus *Rhodococcus jostii*, welches eine strukturelle Ähnlichkeit von 80 % mit RdhR1456 aufweist, wurden 6 bp *inverted repeats* (GATTGAXxxxxTCAATG) mit einer 5 bp Spacer-Region als Zielregion postuliert (Otani et al., 2016). Die DNA-Erkennungssequenz von RdhR1456 besitzt ebenfalls eine aus 6 bp bestehende Konsensus-Sequenz (GTATAC(x)<sub>7</sub>GTATAC), mit einer 7 bp Spacer-Region, die man sowohl als *direct repeat* als auch als *inverted repeat* betrachten kann. Bei MexR liegen die *inverted repeats* der DNA-Erkennungsstelle (je 5 bp) 5 bp auseinander und sind in zwei benachbarten *major grooves* lokalisiert, mit denen die Erkennungshelices vom MexR-Dimer dann interagieren. Die Arginine in den Erkennungshelices von MexR, welche einen basenspezifischen Kontakt zur DNA herstellen, liegen dabei ca. 29 Å auseinander (Chen et al., 2010). Der typische Abstand für zwei *major grooves* sind ca. 34 Å, da für eine lineare B-DNA eine Windung aus ca. 10 bp besteht und jede Base ca. 3,4 Å ausmacht (Drew et al., 1981). Die DNA wird somit für die Bindung von MexR leicht gebogen. Die bisher vermuteten DNA-Bindestellen von RdhR1456, die *inverted repeats* GTA-TAC, besitzen keinen Abstand, was eine ähnliche Bindung wie in MexR unwahrscheinlich macht. Nimmt man aber eine Bindung des RdhR1456-Dimers an beide GTATAC-Motive an, so wäre ein Abstand von 7-10 bp, je nach Art der tatsächlichen Zielsequenz, gewährleistet, was eine Bindung der Erkennungshelices der RdhR1456-Monomere in den benachbarten *major grooves* möglich machen würde. Betrachtet man die Länge der putativen DNA-Bindehelix α4 von RdhR1456, ist diese laut Chimera Vorhersage 17-22 Å lang (Asn68-Lys79(17,2 Å) oder Pro67-Lys80(22,2 Å)). Das bedeutet eine Abdeckung von 5-6 bp DNA (3,4 Å pro Base), wenn die α4 komplett mit der DNA in Interaktion steht. Nach dieser Berechnung würde GTATAC die optimale Länge als Bindestelle eines RdhR1456-Monomers

besitzen. Da es sich bei GTATAC um ein Palindrom handelt, wäre es möglich, dass das zweite RdhR1456-Dimer des beobachteten Tetramers an dieselben Sequenzmotive auf dem Gegenstrang bindet.

Es gibt aber auch eine zweite Möglichkeit einer möglichen Protein-DNA-Interaktion. Von NicR2 aus *Pseudomonas putida*, einem ungewöhnlichen DNA-Bindeprotein aus der HTH-Familie ist bekannt, dass es als Homotetramer an die DNA bindet. Dabei nutzt der Repressor ein *inverted repeat* bestehend aus zwei 7 bp umfassenden Halbseiten mit einem 6-8 bp *Spacer*. Jede Halbseite wird von je einem NicR2-Dimer gebunden (Wang et al., 2014). RdhR1456 zählt auch zur HTH-Proteinfamilie und könnte eventuell auch nach diesem unkonventionellen Bindeprinzip an die DNA binden. Für diese Theorie würde die Tatsache sprechen, dass RdhR1456 in der Lage ist auch an eine Halbseite der DNA-Binderegion zu binden, wenn die zweite Halbseite fehlt (Abbildung 27). Außerdem wurde das theoretische 3D-Struktur-Modell von RdhR1456 anhand der Kristallstruktur des MarR-Regulators AbsC aus *Streptomyces coelicolor* mit Hilfe von Phyre<sup>2</sup> (Kelly et al., 2015) berechnet. Die Kristallstruktur von AbsC besteht aus vier asymmetrisch angeordneten Monomeren. Ähnlich wie für RdhR1456 entspricht das Molekulargewicht von AbsC in Lösung dem eines Homodimers (Stevenson et al., 2007). In Abbildung 38 ist ein Alignment der Tertiärstruktur von AbsC (grau) mit RdhR1456 (blau) dargestellt. Es ist vorstellbar, dass RdhR1456 ein ähnliches asymmetrisches Tetramer, wie AbsC bilden könnte, um an die DNA zu binden.

Wie RdhR1456 nun tatsächlich an die DNA bindet, bleibt mit den bisherigen Untersuchungen spekulativ. Eine Kristallstrukturanalyse vom RdhR1456-DNA-Komplex könnte darüber Aufschluss geben und sollte in weiteren Studien erfolgen.

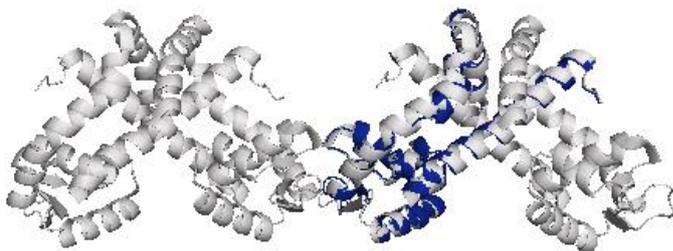


Abbildung 38. Strukturelles Alignment des AbsC-Tetramers aus *Streptomyces coelicolor* (grau) mit einem RdhR1456-Monomer (blau). Das Alignment wurde mit Hilfe von pymol mit der bekannten Kristallstruktur von AbsC und der mittels Phyre<sup>2</sup> berechneten theoretischen 3D-Struktur von einem RdhR1456-Monomer erstellt.

#### 4.2.3 Die ungeklärte Rolle von Liganden für die Funktion des RdhR1456-Regulators

Die Repressoraktivität von MarR-Regulatoren kann sehr verschieden reguliert werden. Salicylat, Antibiotika und Metall-Ionen wirken beispielsweise als Liganden (Alekhun und Levy, 1999; Chang et al., 2013; Chang et al., 2010; Guerra et al., 2011), daneben können, wie bereits für RdhR1625 diskutiert, auch eine Cysteinoxidation oder Phosphorylierungen zur Aktivität verschiedener MarR-Typ-Regulatoren beitragen (Chen et al., 2006; Sun et al., 2012). Aufgrund der Vielfältigkeit von MarR-Regulatoren ist es kaum möglich, die Liganden und deren Interaktion mit den Regulatoren vorherzusagen. Dennoch sind einige Prinzipien aus Kristallstrukturen bekannter MarR-Regulatoren ableitbar. So postulierten Chang et al. (2013) drei Gruppen von MarR-Regulatoren nach ihrer Art der Bindung von Liganden. MarR-Regulatoren, welche einen geringeren Abstand der DNA-Erkennungshelices  $\alpha 4$  und  $\alpha 4'$  des Homodimers als 19 Å besitzen, zählen zur ersten Gruppe. Bei dieser Gruppe wird die Bindung eines Liganden im Hohlraum zwischen den Dimerisierungs-Domänen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ ) beider Monomere vermutet. Beispiele dafür sind TcaR (Chang et al., 2013) und SlyA (Dolan et al., 2011). Ist der Abstand größer als 19 Å, wird der Hohlraum zwischen beiden Protomeren kleiner, die Bindung von Liganden findet dann vermutlich im jeweiligen Hohlraum zwischen der Dimerisierungshelix  $\alpha 6$  und der äußeren Helix  $\alpha 2$  in den Protomeren statt. Es werden so jeweils zwei Liganden pro Homodimer gebunden. Beispiele hierfür sind MexR und SAR2349 (Lim et al., 2002; Chang et al., 2013). Für MarR-Regulatoren, die durch Metall-Ionen, Phosphorylierungen oder Oxidationen reguliert werden, lassen sich auf Basis des Abstands der DNA-Erkennungshelices keine Aussagen über die Ligandenbindung treffen. Schaut man sich die postulierte Homodimer-Struktur von RdhR1456 (Abbildung 4) an, so ist die zweite Möglichkeit für eine Ligandenbindung am wahrscheinlichsten, da zwischen  $\alpha 2$  und  $\alpha 6$  am ehesten ein Hohlraum für einen Liganden besteht. Außerdem wurde anhand von 3DLigandSite (Wass et al., 2010) bei der Vorhersage von potentiellen Liganden für RdhR1456 für die Kandidaten CoA und Zn z. B. eine Bindung durch Aminosäuren in der  $\alpha 2$ - und  $\alpha 6$ -Helix vorhergesagt (Tabelle 14). Auf Basis von Strukturähnlichkeiten mit anderen MarRs wurden vorrangig Metall-Ionen als potentielle Liganden vorgeschlagen, jedoch war ein *Screening* auf alle vorgeschlagenen Liganden nicht erfolgreich (siehe Tabelle VI im Anhang). Da bekannte MarR-Regulatoren von Stoffwechselwegen durch ihre Stoffwechseledukte oder -produkte reguliert werden, wurde ein *Screening* auf Chlorbenzolen und Chlorphenolen durchgeführt. Die Tatsache, dass auch durch dieses *Screening* kein Ligand identifiziert wurde, kann viele Ursachen haben. Zum einen wurde nur eine Auswahl von chlorierten Verbindungen getestet, zum anderen weisen diese nur eine begrenzte Löslichkeit im wässrigen Milieu auf, was zu negativen Ergebnissen führen könnten, die nicht auf den getesteten Liganden, sondern auf den Versuchsaufbau zurückzuführen wäre. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass einige MarR-Regulatoren durch mehrere Liganden gleichzeitig reguliert werden. So ist es möglich, dass einer der getesteten Verbindungen nur in Kombination mit einem anderen funktional

ist oder andere Versuchsbedingungen wie z. B. ein anderes Redoxpotential oder eine Aktivierung des Liganden durch z. B. eine Acetylierung für die Bindung notwendig sind. Bei Sar2349 aus *Staphylococcus aureus* ist z. B. die Bindung von Salicylat und Kanamycin gleichzeitig möglich, da zwei Bindestellen vorhanden sind (Chang et al., 2013).

Ausgehend von den Untersuchungen dieser Arbeit ist es auch nicht auszuschließen, dass ein unbekanntes Protein, vielleicht ähnlich wie ArmR bei MexR aus *Pseudomonas aeruginosa* (Starr et al., 2012), als Interaktionspartner von RdhR1456 fungiert und zu Konformationsänderungen im Protein führt. Die FAR-Western Analysen mit CBDB1 Extrakten als Pool für den möglichen Interaktionspartner für RdhR1456 führten zu einem Signal und lieferten einige Kandidatenproteine, wie DnaK und Acetyl-CoA-Synthetase (Tabelle 15). DnaK agiert gewöhnlich als Faltungshelfer von Proteinen, was eine Interaktion mit dem heterolog produzierten RdhR1456 plausibel macht. CbdbA1077 wurde als CoA-Bindeligase annotiert (Adrian et al., 2007b). Aus der Literatur ist bekannt, dass MarRs mit CoA oder Verbindungen, die mit CoA aktiviert sind, interagieren können. So bindet z. B. Cumaroyl-CoA an CouR aus *Rhodococcus jostii* (Otani et al., 2016). CoA und Acetyl-CoA zeigten in EMSAs mit RdhR1456 jedoch keine Interaktion.

Dass neben potentiellen Liganden auch andere Regulatoren für die Regulation von MarRs wichtig sein können, zeigten Schielke et al. (2009) und Rouanet et al. (1999). Beide wiesen nach, dass innerhalb der intergenen Regionen der zu steuernden Zielgene mehrere Regulatoren gleichzeitig binden können. Der Einfluss durch mehrere Regulatoren, aber auch die Konkurrenz zwischen den Regulatoren um überlappende DNA-Erkennungssequenzen spielten eine Rolle für die Regulation der Zielgene. Diesen Aspekt sollte man in Anbetracht des beobachteten *Crosstalks* zwischen verschiedenen MarR-Regulatoren in CBDB1 auch beachten.

### 4.3 CROSSTALK DER MARRS IN CBDB1

Die *in vivo* Studien zur Komplexität des MarR basierten Regulationssystems in CBDB1 in Abschnitt 3.5 lieferten Hinweise darauf, dass die *rdhA*-Gene in CBDB1 nicht ausschließlich durch den jeweils assoziierten MarR-Regulator reguliert werden. Auch im Genom weiter entfernt kodierte RdhRs interagierten mit Promotoren weiterer *rdhA*-Gene, aber auch *rdhR*-Gene. Abbildung 39 gibt einen Überblick über die vor allem in der HPR2 Genregion von CBDB1 lokalisierten *rdhR*-Gene und deren assoziierten *rdhA*-Gene.

Der Einfluss der RdhRs auf die Promoteraktivität der *rdhA*-Gene *rdhA1453*, *rdhA1455* und *rdhA1598* sowie der *rdhR*-Gene *rdhR1456* und *rdhR1625* ist in Tabelle 17 zusammengefasst und für *rdhA1453* in Form von Pfeilen in Abbildung 39 schematisch dargestellt.

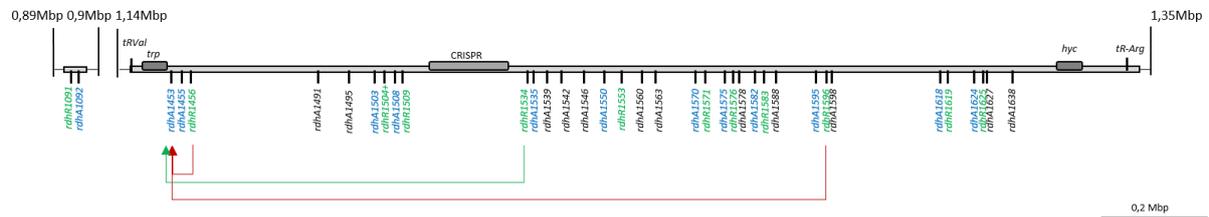


Abbildung 39. Schematische Darstellung der Lokalisation von *rdhA* assoziierten *rdhA*-Genen (blau) und *rdhR*-Genen (grün) in *CBDB1* in der *HPR2* Genregion. Die regulatorische Wirkung der *RdhRs* auf die Transkription des *rdhA1453*-Gens ist mit Hilfe von Pfeilen (rot für negative Regulation, grün für positive Regulation) veranschaulicht. Die genetische Lokalisierung wurde in Anlehnung an McMurdie et al. (2009) angefertigt. *RdhA*-Gene, die nicht mit einem *rdhR*-Gen assoziiert sind, sind in schwarz dargestellt

Aus der beobachteten Hemmung oder Aktivierung der Promoteraktivität kann postuliert werden, dass *RdhR1456* neben *rdhA1453* und *rdhA1455* auch *rdhA1598* reprimiert. *RdhA1534* hat dagegen einen positiven Einfluss auf die Transkription von *rdhA1453*, während es die Transkription von *rdhR1456* negativ beeinflusst. Ein Beispiel aus der Literatur für einen *MarR*-Regulator mit dualer Funktion als Aktivator und Repressor ist *SlyA* aus *Salmonella enterica*. *SlyA* wirkt als globaler Regulator auf verschiedene Zielgene (Stapleton et al., 2002).

Tabelle 17. Zusammenfassung des beobachteten Einflusses von *RdhR*-Regulatoren auf die Promoteraktivität von *rdhA*- und *rdhR*-Genen aus *CBDB1* anhand von heterologen *in vivo*-Untersuchungen.

<i>rdhA</i> -/ <i>rdhR</i> -Gen	<i>MarR</i> -Regulatoren
<b><i>rdhA1453</i></b>	<i>RdhR1456</i> , <i>RdhR1534</i> (+), <i>RdhR1596</i>
<b><i>rdhA1455</i></b>	<i>RdhR1456</i> , <i>RdhR1553</i> , <i>RdhR1571</i> , <i>RdhR1619</i>
<b><i>rdhR1456</i></b>	<i>RdhR1534</i> , <i>RdhR1553</i> , <i>RdhR1571</i> , <i>RdhR1583</i> , <i>RdhR1619</i>
<b><i>rdhA1598</i></b>	<i>RdhR1456</i> , <i>RdhR1504</i> (+), <i>RdhR1553</i> , <i>RdhR1571</i> , <i>RdhR1596</i> , <i>RdhR1619</i>
<b><i>rdhR1625</i></b>	<i>RdhR1553</i> , <i>RdhR1576</i> , <i>RdhR1596</i> , <i>RdhR1625</i>

(+): Erhöhung der Promoteraktivität; in der Regel Hemmung der Promoteraktivität

Die beispielhafte Analyse der Regulation einzelner *rdhA*- und *rdhR*-Gene in *CBDB1* durch *MarR*-Regulatoren zeigt, dass die transkriptionelle Regulation der *rdhA*-Gene in *CBDB1* vermutlich über ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Regulatoren abläuft. Ähnliches wurde im *D. mccartyi* Stamm 195 für die gesamte Regulation der zellulären Abläufe mit Hilfe einer bestimmten statistischen Netzwerkanalyse (SPINE-Analyse) resultierend aus Transkriptomdaten postuliert. Dabei wurden die verschiedensten Umweltfaktoren, wie die Wasserstoffkonzentration oder die verschiedenen Elektronenakzeptoren, zur Beeinflussung des Regulationsnetzwerkes berücksichtigt. Es ergab sich hier ein sehr verzweigtes Regulationsnetzwerk der verschiedensten zu *Clustern* zusammengefassten Gene (Mansfeldt et al., 2015). Die Hinweise zum möglichen Zusammenspiel der verschiedenen *RdhR*-

Regulatoren in CBDB1 deuten an, dass die Gesamtregulation in CBDB1 ebenfalls so komplex wie in 195 aussehen könnte. Es ist anzunehmen, dass die MarR-Regulatoren und ihre komplexen Interaktionsmöglichkeiten einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung dieses Regulationsnetzwerkes leisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf ein komplexes Regulationssystem der *rdhA*- und *rdhR*-Gene durch die *rdhA* assoziierten MarR-Regulatoren gewonnen. Zwar wurde auch gezeigt, dass Regulatoren, wie RdhR1456 und RdhR1625 spezifisch ihre assoziierten Gene regulieren (3.1 und 3.3), jedoch stellen sie scheinbar nicht die ausschließlichen Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Gene dar, sondern könnten in Konkurrenz oder in Zusammenspiel mit anderen MarR-Typ Regulatoren aus CBDB1 stehen. Für eine Bestätigung der Befunde aus dem heterologen *in vivo*-System wären Deletionsmutanten notwendig, die in CBDB1 bislang jedoch nicht realisierbar sind. Dass eine Kombination mehrerer MarR-Regulatoren tatsächlich gleichzeitig die Zielgene reguliert, konnte z. B. für PenR und PntR aus *Streptomyces* sp. bei der Biosynthese von Pentalenolacton gezeigt werden. In Deletionsmutanten wurde durch Komplementation mit *pntR* oder *penR* die Produktion von Pentalenolacton wieder hergestellt (Zhu et al., 2013). Auch aus *Corynebacterium jeikeim* ist eine komplexe Regulation des Lipid-Metabolismus durch den MarR-Regulator FamR in Kombination mit dem globalen Regulator GlxR bekannt. Hierbei werden *fad*-Gene sowohl durch GlxR als auch FamR reguliert, wobei die Expression von FamR durch GlxR reguliert wird (Barzantny et al., 2012).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass MarR-Regulatoren in die Transkriptionskontrolle von *rdhA*-Genen involviert sind. Der untersuchte MarR-Regulator RdhR1456 und seine Erkennungsstellen in den Promotoren von *rdhA*-Genen sind in verschiedenen *D. mccartyi* Stämmen konserviert, was seine Bedeutung in der Organohalid-Respiration unterstützt. Seine Interaktion mit der DNA wurde charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass MarR-Regulatoren auch mit Promotoren anderer *rdhA*-Gene interagieren können. Zahlreiche Aspekte bleiben jedoch offen, wie z. B. die Art der Liganden und die Rolle von anderen Transkriptionsfaktoren, um ein Gesamtverständnis der regulatorischen Prozesse im Verlauf der Organohalid-Respiration zu erhalten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

In der vorliegenden Dissertation wurden die nachfolgend zusammengefassten Erkenntnisse gewonnen.

- 1) Der MarR-Regulator RdhR1625 aus CBDB1 wirkt als transkriptioneller Repressor der Gene *rdhA1624* und *rdhR1625*. RdhR1625 ist ausschließlich nach Proteinbiosynthese in anaerob kultivierten Zellen funktional. Dabei spielt ein redoxabhängiger Cysteinrest von RdhR1625 keine Rolle. 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB wurden mittels  $\beta$ -Galakosidase-Assays im heterologen *in vivo* System als potentielle Liganden von RdhR1625 ausgeschlossen. Der exakte Transkriptionsstart von *rdhA1624* wurde mittels 5'RACE sowohl heterolog in *E. coli* als auch direkt in CBDB1 mit 108 bp bzw. 110 bp *upstream* des Translationsstarts bestimmt. Der Transkriptionsstart von *rdhR1625* wurde 148 nt vor dem Translationsstart von *rdhR1625* bestimmt. Die Promoterbereiche von *rdhA1624* und *rdhR1625* überlappen sich und liegen innerhalb eines perfekten *inverted repeats*, was vermutlich als DNA-Bindedomäne von RdhR1625 genutzt wird.
- 2) Das *rdhAB1452-1455*-Operon wird gemeinsam mit dem assoziierten *rdhR*-Gen *rdhR1456* im Verlauf der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB transkribiert. Der Zeitpunkt der Transkriptionsmaxima korreliert mit dem Zeitpunkt der vollständigen Dechlorierung der TCBs zu DCBs. Transkriptionsanalysen mit 1,2,3-TCB zeigten, dass die *rdhA*- und *rdhB*-Gene *rdhAB1452/53* und *rdhAB1454/55* jeweils gemeinsam transkribiert werden und zusammen ein großes Cotranskript (*rdhAB1452-55*) bilden. Beide *rdhA*-Gene *rdhA1455* und *rdhA1453* besitzen jedoch eigene Promotoren, welche auch in einem heterologen *in vivo* System funktionsfähig sind. Der Transkriptionsstart von *rdhA1453* befindet sich 114 bzw. 119 nt entfernt von *rdhA1453*, der Transkriptionsstart von *rdhA1455* ist 120 bzw. 123 nt von *rdhA1455* entfernt und der des *rdhR*-Gens befindet sich 40 bzw. 41 nt entfernt von *rdhR1456*. Die Promotoren von *rdhA1453* und *rdhA1455* befinden sich innerhalb eines nahezu identischen *direct repeats* (DR), während der Promoter von *rdhR1456* außerhalb liegt.
- 3) Der MarR-Regulator RdhR1456 aus CBDB1 reprimiert im heterologen *in vivo* System die Promotoren von *rdhA1453* und *rdhA1455* jedoch nicht den Promotor von *rdhR1456*. Eine DNase I-Footprinting-Analyse und Gelretentionsanalysen zeigten, dass ein heterolog

synthetisiertes *StrepTag*-Fusionsprotein von RdhR1456 mit dem *DR* (TAGTATACGATNNTAGTATACGAT) innerhalb der Promoter-Regionen von *rdhR1453* und *rdhA1455* interagiert. Das *DR* ist für die Interaktion von RdhR1456 mit der Ziel-DNA essentiell, obwohl auch Randbereiche einen Einfluss auf die Interaktion besitzen. RdhR1456<sub>StrepC</sub> lag in Lösung als Homodimer vor. Eine analytische Ultrazentrifugation mit einem fluoreszenzmarkierten dsDNA-Oligonukleotid (IR1455) lieferte den Beweis für die Interaktion eines RdhR1456<sub>StrepC</sub>-Tetramers mit der DNA, was auf die kooperative Bindung von zwei Homodimeren hinweist. Die Affinität von RdhR1456 belief sich nach Berechnung aus Gelretentionsanalysen mit den ds-DNA-Oligonukleotiden IR1453 und IR1455 auf  $K_d$ -Werte von 430 und 283 nM. Dagegen wurde mittels Ultrazentrifugation für IR1455 ein  $K_d$ -Wert von 63 nM bestimmt.

- 4) Die Untersuchung des Einflusses potentieller Liganden auf die Regulation durch RdhR1456 führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Eine Vielzahl getesteter putativer Liganden (ZnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Glucose, CoA, ADP, CaCl, TCBs, DCBs, DCPs, TCP, TeCP, Vitamine, NAD, FAD, FMN) konnte im Rahmen dieser Arbeit unter den verwendeten Bedingungen als Liganden ausgeschlossen werden. FAR-Western-Analysen und EMSAs mit CBDB1-Extrakten lieferten erste Indizien für eine mögliche Interaktion mit einem Protein aus CBDB1.
- 5) Der Promoter von *rdhA1598* besitzt ebenfalls die konservierte *DR*-Region. RdhR1456 bindet an diese Region und reprimiert *rdhA1598*. Neben RdhR1456 interagiert auch RdhR1596 mit der IR *downstream* vom *rdhA1598*-Gen. Dies konnte *in vivo* durch  $\beta$ -Galaktosidase-Assays und *in vitro* mittels EMSAs gezeigt werden. RdhR1596 interagiert jedoch *in vitro* auch mit anderen IRs.
- 6) Eine Analyse der Regulation der *rdhA*-Gene *rdhA1453*, *1455*, *1598* und der *rdhR*-Gene *rdhR1625* und *rdhR1456* im heterologen *in vivo* System durch MarR-Regulatoren aus CBDB1 deutete auf eine unvorhergesehene Komplexität der Regulation in CBDB1 hin. RdhR1534, RdhR1596 und RdhR1456 beeinflussen die Transkription von *rdhA1453*. *RdhA1453* wird vermutlich von RdhR1534 positiv reguliert. Die Transkription von *rdhA1455* wird nicht nur durch RdhR1456 sondern auch durch die RdhRs RdhR1553, RdhR1571 und RdhR1619 beeinflusst. Die RdhRs RdhR1456, -1504, -1553, -1571, -1596 und -1619 spielen bei der Regulation von *rdhA1598* eine Rolle. Und auch die *rdhR*-Gene werden vermutlich von mehreren anderen RdhRs reguliert. So wird *rdhR1456* durch RdhR1534, -1553, -1583 und -1619 und *rdhR1625* durch RdhR1553, -1576, -1596 und -1625 reprimiert.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abreu-Goodger, C. and Merino, E.** (2005) RibEx: A web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **33**, 690-692.
- Adrian, L., Hansen, S. K., Fung, J. M., Görisch, H. and Zinder, S. H.** (2007a) Growth of *Dehalococcoides* strains with chlorophenols as electron acceptors. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 2318-2323.
- Adrian, L., Rahnenführer, J., Gobom, J. and Hölscher, T.** (2007b) Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl Environ Microbiol.* **73**(23), 7717-7724.
- Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J. and Görisch, H.** (2000) Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* **408**, 580-583.
- Alekshun, M. N. and Levy S. B.** (1999) Characterization of MarR superrepressor mutants. *J. Bacteriol.* **181**, 3303-3306.
- Angelica, M. D. and Fong, Y.** (2011) Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 108-116.
- Aoki, R., Takeda, T., Omata, T., Ihara, K. and Fujita, Y.** (2012) MarR-type transcriptional regulator ChIR activates expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in response to low-oxygen conditions in Cyanobacteria. *J Biol Chem.* **287**, 13500-13507.
- Banerjee, R. and Ragsdale, S. W.** (2003) The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 209-247.
- Barber, J. L., Sweetman, A. J., Van Wijk, D. and Jones, K. C.** (2005) Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Sci. Total Environ.* **349**, 1-44.
- Barzantny, H., Guttman, S., Brune, I. and Tauch, A.** (2012) Transcriptional control of lipid metabolism by the MarR-like regulator FamR and the global regulator GlxR in the lipophilic axilla isolate *Corynebacterium jeikeium* K411. *Microb. Biotechnol.* **6**, 118-130.
- Berthelmann, F. and Brüser, T.** (2004) Localization of the tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS* **569**, 82-88.
- Bertram, R. and Hillen, W.** (2008) The application of Tet repressor in prokaryotic gene regulation and expression. *Microb. Biotechnol.* **1**, 2-16.
- Birukou, I., Seo, S. M., Schindler, B. D., Kaatz, G. W. and Brennan, R. G.** (2014) Structural mechanism of transcription regulation of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux operon *mepRA* by the MarR family repressor MepR. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2774-2788.
- Bommer, M., Kunze, C., Fessler, J., Schubert, T. and Diekert, G.** (2014) Structural basis for organohalide respiration. *Science* **346**, 455-458.
- Bordelon, T., Wilkinson, S. P., Grove, A. and Newcomer, M. E.** (2006) The crystal structure of the transcriptional regulator HucR from *Deinococcus radiodurans* reveals a repressor preconfigured for DNA binding. *J. Mol. Biol.* **360**, 168-177.
- Brooun, A., Tomashek, J. J. and Lewis, K.** (1999) Purification and ligand binding of EmrR, a regulator of a multidrug transporter. *J Bacteriol.* **181**, 5131-5133.

- Brugarolas, P., Movahedzadeh, F., Wang, Y., Zhang, N., Bartek, I. L., Gao, Y. N., Franzblau, S. G. and He, C.** (2012) The oxidation-sensing regulator (MosR) is a new redoxdependent transcription factor in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 37703-37712.
- Bunge, M. and Lechner, U.** (2009) Anaerobic reductive dehalogenation of polychlorinated dioxins. *Appl Microbiol Biotechnol.* **84**, 429–444.
- Buttet, G. F., Holliger, C. and Maillard, J.** (2013) Functional genotyping of *Sulfurospirillum spp.* in mixed cultures allowed the identification of a new tetrachloroethene reductive dehalogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6941-6947.
- Casadaban, M. J., Cohen, S. N.** (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**, 4530–4533.
- Casadaban, M. J., Chou, J. and Cohen, S. N.** (1980) *In vitro* gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of trans-lational initiation signals. *J. Bacteriol.* **143**, 971-980.
- Chang, Y.-M., Chen, C. K.-M., Ko, T. P., Chang-Chien, M. W. and Wang, A. H. -J.** (2013) Structural analysis of the antibiotic-recognition mechanism of MarR proteins. *Acta Cryst.* **69**, 1138-1149.
- Chang, Y.-M., Jeng, W.-Y., Ko, T.- P., Yeh, Y.-J., Chen, C. K.-M. and Wang, A. H.-J.** (2010) Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8617-8622.
- Chen, H., Hu, J., Chen, P. R., Lan, L., Li, Z., Hicks, L. M., Dinner, A. R. and He, C.** (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13586-13591.
- Chen, H., Yi, C., Zhang, J., Zhang, W., Ge, Z., Yang, C. G. and He, C.** (2010) Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. *EMBO Rep.* **11**, 685–690.
- Chen, P. R., Bae, T., Williams, W. A., Duguid, E. M., Phoebe, A. R., Schneewind, O. and He, C.** (2006) An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 591-595.
- Chung, C. T., Niemela, L. and Miller, R. H.** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Davis, J. R. and Sello, J. K.** (2010) Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 921-929.
- Davis, J. R., Brown, B. L., Page, R. and Sello, J. K.** (2013) Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3888-3900.
- Deochand, D. K., Perera, I. C., Crochet, R. B., Gilbert, N. C., Newcomer, M. E. and Grove, A.** (2016) Histidine switch controlling pH-dependent protein folding and DNA binding in a transcription factor at the core of synthetic network devices. *Mol. BioSyst.* **12**, 2417-2426.
- Dolan, K. T., Duguid, E. M. and He, C.** (2011) Crystal Structures of SlyA Protein, a Master Virulence Regulator of *Salmonella*, in Free and DNA-bound States. *J. Biol. Chem.* **286**, 22178-22185.
- Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R. E.** (1981) Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2179-2183.
- Duhamel, M., Grostern, A., Dworatzek, S. and Edwards, E. A.** (2010) Chloroform respiration to dichloromethane by a *Dehalobacter* population. *Environ. Microbiol.* **12**, 1053–1060.

- Durchschlag H.** (1986) Specific volumes of biological macromolecules and some other molecules of biological interest, In Hinz HJ (ed), Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology. *Springer, Heidelberg, Germany* 45-128.
- Englesberg, E., Anderson, R. L., Weinberg, R., Lee, N., Hoffee, P., Huttenhauer, G. and Boyer, H.** (1962) L-arabinose-sensitive, L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 137-146.
- Evans, K., Adewoye, L., Poole, K. and Acteriol, J. B.** (2001) MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* **183**, 807-812.
- Fiore, A. Di, Fiorentino, G., Vitale, R. M., Ronca, R., Amodeo, P., Pedone, C., Bartolucci, S. and Simone, G. De.** (2009) Structural analysis of BldR from *Sulfolobus solfataricus* provides insights into the molecular basis of transcriptional activation in Archaea by MarR family proteins. *J. Mol. Biol.* **388**, 559-569.
- Fiorentino, G., Ronca, R., Cannio, R., Rossi, M. and Bartolucci, S.** (2007) MarR-like transcriptional regulator involved in detoxification of aromatic compounds in *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **189**, 7351-7360.
- Fuangthong, M. and Helmann, J. D.** (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 6690-6695.
- Galan, B., Kolb, A., Sanz, J. M., García, J. L. and Prieto, M. A.** (2003) Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: The HpaR repressor. *Nucleic Acids Res* **31**, 6598-6609.
- Goris, T., Schubert, T., Gadkari, J., Wubet, T., Tarkka, M., Buscot, F., Adrian, L. and Diekert, G.** (2014) Insights into organohalide respiration and the versatile catabolism of *Sulfurospirillum multivorans* gained from comparative genomics and physiological studies. *Environ. Microbiol.* **16**, 3562-3580.
- Griffith, K. L., Wolf, K. R. Jr.** (2002) Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays, *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 397-402.
- Guerra, A. J., Dann III, C. E. and Giedroc, D. P.** (2011) Crystal structure of zinc-dependent MarR family transcriptional regulator AdcR in the ZN(II)-bound state. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19614-19617.
- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J. and Beckwith, J.** (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>(BAD)</sub> promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121-4130.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hartwig, S., Segler, L., Lechner, U. and Sawers, G.** (2013) Regulation of the genes encoding reductive dehalogenases and the uptake-hydrogenase Hup in *Dehalococcoides mccartyi* CBDB1, *Tagungsband FEMS 2013*, **311**.
- He, J., Ritalahti, K. M., Aiello, M. R. and Löffler, F. E.** (2003) Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 996-1003.
- Hug, L. A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F. E., Smidt, H., Edwards, E. A. and Adrian, L.** (2013) Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120322.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jayachandran, G., Görisch, H. and Adrian, L.** (2003) Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Arch. Microbiol.* **180**, 411-416.

- J.C.S.G.** (2010) Crystal structure of a MarR family transcriptional regulator (Cd1569) from *Clostridium difficile* 630 at 2.20 Å Resolution. (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3nqo> Information bezogen am 22.04.1017).
- Jones, G. A. and Pickard, M. D.** (1980) Effect of titanium (III) citrate as reducing agent on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1144-1147.
- Krasper, L., Lilie, H., Kublik, A., Adrian, L., Golbik, R. and Lechner, U.** (2016) The MarR-type regulator Rdh2R regulates *rdh* Gene transcription in *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1. *J. Bacteriol.* **198**, 3130-3141.
- Kruse T., Smidt H. and Lechner U.** (2016) Comparative genomics and transcriptomics of organohalide-respiring bacteria and regulation of *rdh* gene transcription. In Adrian, L. and Löffler, F. E. (eds.) Organohalide Respiring Bacteria. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 345-376.
- Krzmarzick, M. J., Crary, B. B., Harding, J. J., Oyerinde, O. O., Leri, A. C., Myneni, S.C. and Novak, P. J.** (2012) Natural niche for organohalide-respiring chloroflexi. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 393-401.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S. H., Kuhl, H., Reinhardt, R. and Adrian, L.** (2005) Genome sequence of the chlorinated compound – respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1269-1273.
- Kublik, A., Deobald, D., Hartwig, S., Schiffmann, C. L., Andrades, A., von Bergen, M., Sawers, R. G. and Adrian, L.** (2016) Identification of a multi-protein reductive dehalogenase complex in *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1 suggests a protein-dependent respiratory electron transport chain obviating quinone involvement. *Environ. Microbiol.* **18**, 3044-3056.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Leri, A. C., Hakala, J. A., Marcus, M. A., Lanzirotti, A., Reddy, C. M. and Myneni S. C. B.** (2010) Natural organobromine in marine sediments: New evidence of biogeochemical Br cycling. *Global Biogeochem. Cycles* **24**, 1-15.
- Lim, D., Poole, K. and Strynadka, N. C.** (2002) Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **277**, 29253- 29259.
- Löffler, F. E. and Edwards, E. A.** (2006) Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 274-284.
- Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Müller, J. A., Fullerton, H., Zinder, S. H. and Spormann, A. M.** (2013) *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 625-635.
- Ludwig, M., Pandelia, M. E., Chew, C.Y., Zhang, B., Golbeck, J. H., Krebs, C. and Bryant, D. A.** (2014) ChlR Protein of *Synechococcus* sp. PCC 7002 is a transcription activator that uses an oxygen-sensitive [4Fe-4S] cluster to control genes involved in pigment biosynthesis. *J Biol Chem.* **289**, 16624-16639.
- Lutz, R. and Bujard, H.** (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I<sub>1</sub>-I<sub>2</sub> regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1203-1210.
- Mansfeldt, C. B., Logsdon, B. A., Debs, G. E. and Richardson, R. E.** (2015) SPINE: SParse elgengene NETWORK linking gene expression clusters in *Dehalococcoides mccartyi* to perturbations in experimental conditions. *PLoS One* **10**, 1-15.
- Mansfeldt, C. B., Rowe, A. R., Heavner, G. L. W., Zinder, S. H. and Richardson, R. E.** (2014) Meta-analyses of *Dehalococcoides mccartyi* strain 195 transcriptomic profiles identify a respiration rate-Related gene expression

transition point and interoperon recruitment of a key oxidoreductase Ssubunit. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 6062-6072.

**Maphosa, F., de Vos, W. M. and Smidt, H.** (2010) Exploiting the ecogenomics toolbox for environmental diagnostics of organohalide-respiring bacteria. *Trends Biotechnol.* **28**, 308-316.

**Marco-Urrea, E., Seifert, J., von Bergen, M. and Adrian, L.** (2012) Stable isotope peptide mass spectrometry to decipher amino acid metabolism in *Dehalococcoides* strain CBDB1. *J. Bacteriol.* **194**, 4169-4177.

**Martin, R. G. and Rosner, J. L.** (1995) Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5456-5460.

**Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J. M. and Zinder, S. H.** (1997) Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**, 1568-1571.

**Mazon, H., Gàbor, K., Leys, D., Heck, A. J. R., van der Oost, J. and van den Heuvel, R. H. H.** (2007) Transcriptional activation by CprK1 is regulated by protein structural changes induced by effector binding and redox state. *J. Biol. Chem.* **282**, 11281-11290.

**McCallum, N., Bischoff, M., Maki, H., Wada, A., and Berger-Bachi, B.** (2004) TcaR, a putative MarR-like regulator of *sarS* expression. *J. Bacteriol.* **186**, 2966-2972.

**McMurdie, P. J., Behrens, S. F., Müller, J. A., Göke, J., Ritalahti, K. M., Wagner, R., Goltsman, E., Lapidus, A., Holmes, S., Löffler, F. E. and Spormann, A. M.** (2009) Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides*. *PLoS Genet.* **5**, 1-10.

**McMurdie, P. J., Hug, L. A., Edwards, E. A., Holmes, S. and Spormann, A. M.** (2011) Site-specific mobilization of vinyl chloride respiration islands by a mechanism common in *Dehalococcoides*. *BMC Genomics* **12**, 287.

**Mehwald, W.** (2012) Interaktion eines MarR-Regulators mit den Promoterregionen von Dehalogenase-Genen in *Dehalococcoides*. Bachelorarbeit, Martin Luther Universität, Halle.

**Miller, J. H.** (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

**Morris, R. M., Sowell, S., Barofsky, D., Zinder, S. and Richardson, R.** (2006) Transcription and mass-spectroscopic proteomic studies of electron transport oxidoreductases in *Dehalococcoides ethenogenes*. *Environ. Microbiol.* **8**, 1499-1509.

**Mukherjee, K., Bowman, K. S., Rainey, F. A., Siddaramappa, S., Challacombe, J. F. and Moe, W. M.** (2014) *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* BL-DC-9<sup>T</sup> simultaneously transcribes many *rdhA* genes during organohalide respiration with 1,2-DCA, 1,2-DCP, and 1,2,3-TCP as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* **354**, 111-118.

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology.* **24**, 17-27.

**Nasser, W., Reverchon, S., Vedel, R. and Boccara, M.** (2005) PecS and PecT coregulate the synthesis of HrpN and pectate lyases, two virulence determinants in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**, 1205-1214.

**Nijenhuis, I. and Zinder, S. H.** (2005) Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1664-1667.

**Oh, S.-Y., Shin, J.-H. and Roe, J.-H.** (2007) Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxides in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **189**, 6284-6292.

- Otani, H., Stogios, P. J., Xu, X., Nocek, B., Li, S.-N., Savchenko, A. and Eltis, L. D. (2016) The activity of CouR, a MarR family transcriptional regulator, is modulated through a novel molecular mechanism. *Nucleic Acids Res.* **44**, 595-607.
- Palm, G. J., Khanh Chi, B., Waack, P., Gronau, K., Becher, D., Albrecht, D., Hinrichs, W., Read, R. J. and Antelmann, H. (2012) Structural insights into the redox-switch mechanism of the MarR/DUF24-type regulator HypR. *Nucleic Acids Res* **40**, 4178-4192.
- Perera, I. C. and Grove, A. (2010) Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J. Mol. Cell Biol.* **2**, 243-254.
- Poor, C. B., Chen, P. R., Duguid, E., Rice, P. A. and He, C. (2009) Crystal structures of the reduced, sulfenic acid, and mixed disulfide forms of SarZ, a redox active global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **284**, 23517-23524.
- Pop, S. M., Gupta, N., Raza, A. S. and Ragsdale, S. W. (2006) Transcriptional activation of dehalorespiration: Identification of redox-active cysteines regulating dimerization and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 26382-26390.
- Pöritz, M., Goris, T., Wubet, T., Tarkka, M. T., Buscot, F., Nijenhuis, I., Lechner, U. and Adrian, L. (2013) Genome sequences of two dehalogenation specialists - *Dehalococcoides mccartyi* strains BTF08 and DCMB5 enriched from the highly polluted Bitterfeld region. *FEMS Microbiol. Lett.* **343**, 101-104.
- Pöritz, M., Schiffmann, C. L., Hause, G., Heinemann, U., Seifert, J., Jehmlich, N., von Bergen, M., Nijenhuis, I. and Lechner, U. (2015) *Dehalococcoides mccartyi* strain DCMB5 respire a broad spectrum of chlorinated aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol.* **81**, 587-596.
- Providenti, M. A. and Wyndham, R. C. (2001) Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the *cbaABC*-encoded chlorobenzoate catabolism pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3530-3541.
- Quade, N., Mendonca, C., Herbst, K., Heroven, A. K., Ritter, C., Heinz, D. W. and Dersch, P. (2012) Structural basis for intrinsic thermosensing by the master virulence regulator RovA of *Yersinia*. *J Biol Chem.* **287**, 35796-35803.
- Reinecke, W. und Schlömann, M. (2007) Umweltmikrobiologie. *Spektrum Akademischer Verlag.* 156-57.
- Rouanet, C., Nomura, K., Tsuyumu, S. and Nasser, W. (1999) Regulation of *pelD* and *pelE*, encoding major alkaline pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi*: Involvement of the main transcriptional factors. *J. Bacteriol.* **181**, 5948-5957.
- Rouanet, C., Reverchon, S., Rodionov, D. A. and Nasser, W. (2004) Definition of a consensus DNA-binding site for PecS, a global regulator of virulence gene expression in *Erwinia chrysanthemi* and identification of new members of the PecS regulon. *J. Biol. Chem.* **279**, 30158-30167.
- Rupakula, A., Kruse, T., Boeren, S., Holliger, C., Smidt, H. and Maillard, J. (2013) The restricted metabolism of the obligate organohalide respiring bacterium *Dehalobacter restrictus*: lessons from tiered functional genomics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120325.
- Ryder, S. P., Recht, M. I. and Williamson, J. R. (2008) Quantitative analysis of protein-RNA interaction by gel mobility shift. *Methods Mol. Biol.* **488**, 99-115.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor NY 2nd edition.
- Sander, J. D. and Joung, J. K. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347-355.

- Schielke, S., Huebner, C., Spatz, C., Nägele, V., Ackermann, N., Frosch, M., Kurzai, O. and Schubert-Unkmeir, A. (2009) Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family. *Mol. Microbiol.* **72**, 1054-1067.
- Schiffmann, C. L., Jehmlich, N., Otto, W., Hansen, R., Nielsen, P. H., Adrian, L., Seifert, J. and von Bergen, M. (2013) Proteome profile and proteogenomics of the organohalide-respiring bacterium *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1 grown on hexachlorobenzene as electron acceptor. *J. Proteomics* **98**, 59-64.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606-1619.
- Schumacher, W. and Holliger, C. (1996) The proton/electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in "*Dehalobacter restrictus*". *J. Bacteriol.* **178**, 2328-2333.
- Segler, L. Induktion der *rdhA*-Gene in *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 bei Wachstum auf Dioxinen. Diplomarbeit, *Martin Luther Universität, Halle* (2011).
- Seshadri, R., Adrian, L., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Phillippy, A. M., Methe, B. A., Ward, N. L., Nelson, W. C., Deboy, R. T., Khouri, H. M., Kolonay, J. F., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Brinkac, L. M., Sullivan, S. A., Madupu, R., Nelson, K. E., Kang, K. H., Impraim, M., Tran, K., Robinson, J. M., Forberger, H. A., Fraser, C. M., Zinder, S. H. and Heidelberg, J. F. (2005) Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science* **307**, 105-108.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1342-1346.
- Simons, R. W., Houtman, F., Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.
- Smidt, H. and de Vos, W. M. (2004) Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 43-73.
- Smidt, H., Song, D., van der Oost, J. and de Vos, W. M. (1999) Random transposition by Tn916 in *Desulfitobacterium dehalogenans* allows for isolation and characterization of halo-respiration-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **181**, 6882-6888.
- Smidt, H., Van Leest, M., Van der Oost, J. and De Vos, W. M. (2000) Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Bacteriol.* **182**, 5683-5691.
- Stapleton, M. R., Norte, V. A., Read, R. C. and Green, J. (2002) Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *J. Biol. Chem.* **277**, 17630-17637.
- Starr, L. M., Fruci, M. and Poole, K. (2012) Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* efflux operon: Involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. *PLoS One* **7**, 1-9.
- Steigmiller, S., Turina, P. and Gräber, P. (2008) The thermodynamic H<sup>+</sup>/ATP ratios of the H<sup>+</sup>-ATP synthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3745-3750.
- Stevenson, C. E. M., Kock, H., Mootien, S., Davies, S. C., Bibb, M. J. and Lawson, D. M. (2007) Crystallization and preliminary X-ray analysis of AbsC, a novel regulator of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 233-235.
- Sun, F., Ding Y., Ji Q., Liang Z., Deng X., Wong C. C., Yi C., Zhang L., Xie S., Alvarez S., Hicks L. M., Luo C., Jiang H., Lan L. and He C. (2012) Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 15461-15466.

- Tang, S. and Edwards, E. A.** (2013) Identification of *Dehalobacter* reductive dehalogenases that catalyse dechlorination of chloroform, 1,1,1-trichloroethane and 1,1-dichloroethane. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120318.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Türkowsky, D., Greiner-Haas, F., Lechner, U., von Bergen, M., Jehmlich, N.** (2016) Substrate-induced protein acetylation dynamics in *Dehalococcoides mccartyi* CBDB1. *Biospektrum*, Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2016, 284.
- Wagner, A.** (2009) Untersuchungen zur Identifikation, Transkription und Regulation der reduktiven Dehalogenasene von *Dehalococcoides* sp. Dissertation, *Martin Luther Universität, Halle*.
- Wagner, A., Adrian, L., Kleinsteuber, S., Andresen, J. R. and Lechner, U.** (2009) Transcription analysis of genes encoding homologues of reductive dehalogenases in "*Dehalococcoides*" sp. strain CBDB1 by using terminal restriction fragment length polymorphism and quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1876-1884.
- Wagner, A., Segler, L., Kleinsteuber, S., Sawers, G., Smidt, H. and Lechner, U.** (2013) Regulation of reductive dehalogenase gene transcription in *Dehalococcoides mccartyi*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120317.
- Waller, A. S., Hug, L. A., Mo, K., Radford, D. R., Maxwell, K. L. and Edwards, E. A.** (2012) Transcriptional analysis of a *Dehalococcoides*-containing microbial consortium reveals prophage activation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1178-1186.
- Waller, A. S., Krajmalnik-Brown, R., Löffler, F. E. and Edwards, E. A.** (2005) Multiple reductive-dehalogenase-homologous genes are simultaneously transcribed during dechlorination by *Dehalococcoides*-containing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8257-8264.
- Wang, L., Tang, H., Yu, H., Yao, Y. and Xu, P.** (2014) An unusual repressor controls the expression of a crucial nicotine-degrading gene cluster in *Pseudomonas putida* S16. *Mol. Microbiol.* **91**, 1252-1269.
- Wang, S., Chng, K. R., Wilm, A., Zhao, S., Yang, K.-L., Nagarajan, N. and He, J.** (2014) Genomic characterization of three unique *Dehalococcoides* that respire on persistent polychlorinated biphenyls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12103-12108.
- Wass, M. N., Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. E.** (2010) 3DLigandSite: Predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* **38**, 469-473.
- Wilke, M. S., Heller, M. Creagh, A. L., Haynes, C. A., McIntosh, L. P., Poole, K. and Strynadka, N. C.** (2008) The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 14832-14837.
- Wilkinson, S. P. and Grove, A.** (2004) HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 51442-51450.
- Wilkinson, S. P. and Grove, A.** (2006) Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**, 51-62.
- Wilson, D. O., Johnson, P. and McCord, B. R.** (2001) Nonradiochemical DNase I footprinting by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 1979-1986.
- Wu, Y., Li, Q. and Chen, X.-Z.** (2007) Detecting protein-protein interactions by far western blotting. *Nat. Protoc.* **2**, 3278-3284.
- Xiong, A., Gottman, A., Park, C., Baetens, M., Pandza, S. and Matin, A.** (2000) The EmrR protein represses the *Escherichia coli* *emrRAB* multidrug resistance operon by directly binding to its promoter region. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2905-2907.

**Zhu, D., Wang, Y., Zhang, M., Ikeda, H., Deng, Z. and Cane, D. E.** (2013) Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* Species by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR. *J. Bacteriol.* **195**, 1255-1266.

**Zinder, S. H.** (2016) The Genus *Dehalococcoides*. In Adrian, L. and Löffler, F. E. (eds.) Organohalide Respiring Bacteria. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 107-136.

## 7 ANHANG

Tabelle 1. Beispiele von Regulatoren in *D. mccartyi* neben TCS und MarR

Regulator	CBDB1	DCMB5	BAV1	VS	DET	GT
MerR	cbdb_A1223	dcmb_1453	DehaBAV1_1219	DhcVS_1444	DET1412	DehalGT_1361
NrdR	cbdb_A286				DET0344	
Fur	cbdb_A24	dcmb_1359		DhcVS_1279	DET0630	DehalGT_1208
LuxR		dcmb_1210	DehaBAV1_0295	DhcVS_1373	DET1063	DehalGT_0899
AsnC	cbdb_A1685	dcmb_1200	DehaBAV1_1152	DhcVS_1123	DET1341	DehalGT_1077
Crp/Fnr	cbdb_A262				DET1499	
AbrB	cbdb_A1710	dcmb_1502	DehaBAV1_1227	DhcVS_1498	DET1419	DehalGT_1137
TetR	cbdb_A1404	dcmb_1466	DehaBAV1_0252	DhcVS_1457	DET1580	DehalGT_1374
BadR/Rrf2			DehaBAV1_1341			DehalGT_1388
PadR		dcmb_1035	DehaBAV1_0982	DhcVS_710		DehalGT_0691
ArsR	cbdb_A1168	dcmb_1108		DhcVS_1032		DehalGT_0986
DksA/TraR		dcmb_1232	DehaBAV1_1184			
Biotin-Acetyl-CoA-Carboxylase-Ligase/ BirA				DhcVS_753		
Phosphat Uptake Regulator PhoU			DehaBAV1_0228		DET0142	
Phagen-TF			DehaBAV1_0077			
NarL/Fix	cbdbA_1075					
MraZ					DET0340	
FmdB					DET0734	
Fis					DET0986	
AraC					DET1084	
HcrA					DET1401	
MarC					DET1449	
RecX					DET1607	
ROK					DET0049	
LexA					DET1640	

Tabelle II. Vergleich der Eigenschaften einiger MarR-Regulatoren

Regulator	Organismus	Regulation von	Regulatortyp	DNA-Bindemotiv	Liganden	Kd-Werte Liganden	Kd-Wert DNA	Referenz
<b>CouR</b>	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	p-Hydroxycinnemat-Katabolismus ( <i>cou</i> -Gene)	Repressor	<b>GATTGAGAATGTCAATG</b>	p-Coumaroyl-CoA	11 ± 1 µM	n. a.	Otani et al., 2016
<b>SlyA</b>	<i>Salmonella enterica</i>	Hämolyisin, antimikrobielle Peptide, Expression von SPI-2	Aktivator und Repressor	<b>TTAGCAGCTAA</b>	n. a.	n. a.	n. a.	Dolan et al., 2011; Stapleton et al., 2002
<b>OhrR</b>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>	organische Hydroperoxid-Resistenz	Aktivator und Repressor	<b>TACAATTAATTGTA</b>	Hydroperoxide(ROOH), ROS allgemein, Superoxid (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), Hydroxylradikal (OH), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	n. a.	5 nM(ohrA); 30 nM(ohrA*)	Fuangthong and Helmann, 2002); Oh et al., 2007
<b>MepR</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Multidrug Resistenz Efflux Pumpe ( <i>mepA</i> ), Autoregulation ( <i>mepR</i> )	Repressor	<b>GTTAGxxxxCTAAC</b>	hydrophobe, oft aromatische positiv geladenen Moleküle	n. a.	36 nM	Birukou et al., 2014
<b>SCO3205</b>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	SCO3205,3204, (5049, 5533 hypothetische Proteine)	n. a.	TTxAAxxxTCAA (24 bp im Footprint)	n. a.	n. a.	1,3 nM (3204), 2,4 nM (3205)	Stevenson et al., 2013
<b>PcaV</b>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Protocatechuat-Katabolismus, β-Ketoacidat-Signalweg, <i>pca</i> -Operon, und Autoregulation ( <i>pcaV</i> )	n. a.	OI: <b>TCAGxxxxCTGA</b> ; OV: <b>TCAGTGxxCxxA</b>	Protocatechuat (3,4-DHB=PCA), andere phenolische Verbindungen (3,5-DHB, 3-HB, 4-HB, 2,5-DHB)	668±2,6 nM	OI: 4,6 nM; Ov: 11,9 nM	Davis et al., 2013
<b>MexR</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multidrug Efflux Gene <i>mexAB</i> , <i>oprM</i>	Repressor	<b>GTTGAxxxxTCAAC</b> (28 bp im Footprint)	Antirepressor-Peptid ArmR; oxidativer Stress (CHP)	160–290 nM	n. a.	Chen et al., 2010; Evans et al., 2001; Wilke et al., 2008
<b>BldR</b>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Alkohol Dehydrogenase Gene (Sso2536), Autoregulation(1352)	Aktivator, auch Autoregulator	<b>TAATxx(x)ATTA</b>	Benzaldehyde	n. a.	0,8 µM (2536); 1 µM(BldR)	Di Fiore et al., 2009; Fiorentino et al., 2007
<b>ChlR</b>	<i>Synechococcus</i> ; <i>Synechocystis</i> sp.	Pigment Biosynthese( <i>acsIII</i> , <i>ho2</i> , <i>hemN</i> und <i>desF</i> ); Tetrapyrrol-Biosynthese (Pigmente)	Aktivator	<b>TT(A/C)CC-xxx(x)-GG(T/A)AA</b>	Sauerstoffmangel	n. a.	Bindung nur mit Mutante (D35H) bestätigt	Aoki et al., 2012; Ludwig et al., 2014;
<b>CbaR</b>	<i>Comamonas testosteroni</i>	3-Chlorbenzoate-Katabolismus ( <i>cbaABC</i> -Operon)	Repressor, nicht autoreguliert!	Motiv 1: <b>GTTGxxxxxx(xxx)CAAC</b> Motiv 2: <b>GTTGxxxxxx(xxx)TAAC</b>	Hydroxybenzoat (verbessert Bindung), PCA, Benzoat, <b>3CBA</b> → lösen es ab	n. a.	n. a.	Providenti and Whyndham, 2001
<b>EmrR</b>	<i>Escherichia coli</i>	Multidrug Resistenz Gene	n. a.	<b>CTGTCGTTACTATATCGGCTG</b>	versch. Antibiotika, Protonophores, 2,4-Dinitrophenol, Salicylat, Nalidixinsäure, Carbonoyl-CN, CCCP, TCS	n. a.	n. a.	Brooun et al., 1999; Xiong et al., 2000;
<b>TcaR</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Biofilmbildung ( <i>spa/sarS</i> reguliert)	Repressor	<b>TTxxAAxTTxxAAxxxxTTxxAAxTTxxAA</b> (Pseudopalindrom)	versch. Antibiotika (Penicillin, Chloramphenicol, Salicylat, Aminoglycoside)	n. a.	n. a.	Chang et al., 2010; McCallum et al., 2004

Regulator	Organismus	Regulation von	Regulatortyp	DNA-Bindemotiv	Liganden	Kd-Werte Liganden	Kd-Wert DNA	Referenz
<b>HypR</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Flavin Oxidoreduktase Gen <i>hypO</i>	Aktivator, wahrscheinlich Autorepressor	<b>GTATCAAATTGATAC</b>	Redoxensing (NaOCl und Diamide)	n. a.	0,18 µM (reduziert), 0,14-0,12 µM (oxidiert)	Palm et al., 2012
<b>SarZ</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	oxidative Resistenz, Virulenz, global (fast 90 Gene), auch <i>pflAB</i>	globaler Repressor und Aktivator	n. a.	Redoxzustand (CHP, Hydroperoxid)	n. a.	n. a.	Poor et al., 2009
<b>RovA</b>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Virulenz-Gene ( <i>rovA</i> , <i>inv</i> ), Autoregulator, eher global	Repressor, Autoregulation	(A/T)ATTAT(A/T)T (nicht nur Palindrome!)	Temperatur	n. a.	32-46 nM	Quade et al., 2012
<b>MarR</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>marRAB</i> -Operon, Transkriptionsaktivator <i>marA</i> für Multidrug Efflux system	Repressor	<b>TTGCCTGGCAA</b>	Salicylat	0,5 mM	n. a.	Alekshun et al., 2001; Martin and Rosner, 1995
<b>PenR/PntR</b>	<i>Streptomyces</i>	Pentalenolacton-Biosynthese	Aktivator, Autorepressor (PenR)	GAAAT(A/G)(T/C)ATCGCTTAT (A/G)TA(A/G)GCTCTTATATAA G; <b>CTTATATA(A/G)G</b>	Pentalenolacton D und F (lösen PenR von DNA)	8 ±7 µM (PenR); 6±2 µM (PntR)	9-31 nM	Zhu et al., 2013
<b>PecS/PecT</b>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Virulenz, Pectat-Lyase, HrpN	Repressor	<b>CGANWTCGTATATTACGANN NCG</b>		n. a.	25 nM ( <i>hrpNEch</i> )	Nasser et al., 2005; Ruanet et al., 2004
<b>HucR</b>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Autoregulator, Uricase	Repressor	<b>TAGGTAGACATCTAAGTA</b> (21 bp im Footprint geschützt)	Urinsäure, pH	12 µM	0,2 nM (pH8); 0,26 nM (pH6)	Bordelon et al., 2006; Wilkinson und Groove, 2004

Tabelle III. Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide

Grün: Basenpaarüberhang; Rot: Restriktionsschnittstellen bzw. Mutationen; Blau: Insertionen

Anwendungsbereich	Primernamen	Sequenz 5`-3`	Position in CBDB1 / Vektor
<b>1) Klonierungsprimer</b>			
<b>pRS551 Klonierungen</b>			
LS13,15	IRBam1624fw	CCCCGGATCCAGATTTCCCTTTGCAATTC	1318391-410
	IRBam1624rev	CCCCGGATCCCTTATTGCCTGTGTATTAATT	1318615-36
LS9	IRBam1453fw	GGCCGGATCCTTTTCAATTTTCCTTTTACC	1147516-35
	IRBam1453rev	GGCCGGATCCGTGGCTTATTATTGGTTTA	1148202-21
LS20,21	IRBam1455fw	GGCCGGATCCTTTTAATTTTCCTTTTATC	1149746-66
	IR1455+60_Bam_r	CCCCGGATCCATAGCCTTCTCGGTATTC	1150058-75
LS22	IR1598Bam_f	GGCCGGATCCATTCCATTTCTCCTTTTCATATGC	1287451-74
	IR1598Bam_r	GGCCGGATCCCACTGGACATCATGTTATCTCTCC	1287879-902
<b>pBAD30 Klonierungen</b>			
cbdbA1091	1092ecoRI_f	GGCCGAATTCATGGAATTTAGCGACTTTTATAAA	885557-80
	1092sall_r	GGCCGTCGACCTATCCTTTTTTATCTAAGCG	885119-39
cbdbA1456A	pBAD_1456EcoRI_fw	GGCCGAATCTTGTATTTACCCCAAG	1149998-50015
cbdbA1456B	pBAD_1456Eco_fw2	GGCCGAATCATGACTCACAGACTAAGG	1150076-93
cbdbA1456A bzw. B	pBAD_1456HindIII_r	ev	
cbdbA1504	1504ecoRI_f kor	GGCCGAATTCACTTTTTGGCGGATAGAAAAGG	1191289-310
	1504hindIII_r kor	GGCCAAGCTTCTATTCTGAATCCAATTCTAATG	1191761-83
cbdbA1509	1509sall_f	GGCCGTCGACATGGACTATTCTAAATCAAG	1195021-41
	1509hindIII_r	GGCCAAGCTTCTAGATTGATGCCGAAAAG	1195542-60
cbdbA1534	1534ecoRI_f	GGCCGAATTCATGTTTCTGGAGTTACTGGTG	1221553-73
	1534hindIII_r	GGCCAAGCTTTTAAGAGAAGGGTGAGGAATA	1222021-41
cbdbA1553	1553ecoRI_f	GGCCGAATTCATGATTAATTCATTGGGAAG	1241686-707
	1553hindIII_r	GGCCAAGCTTTTATTTCGTATTTAAAGGGTG	1242179-98
cbdbA1571	1571ecoRI_f	GGCCGAATTCATGTCACCTAAATCAACAATAG	1259380-401
	1571hindIII_r	GGCCAAGCTTTTAACTACTTGCTTTTTGGATG	1259864-86
cbdbA1576	1576ecoRI_f	GGCCGAATTCATGCTAATTTTTCTTTTTTG	1265283-304
	1576hindIII_r	GGCCAAGCTTCTACAAATCAATTGTGTCTTT	1265739-59
cbdbA1583	1583ecoR1_f	GGCCGAATTCATGGCTGAGGTACCGGGTAG	1272454-73
	1583hindIII_r	GGCCAAGCTTTTAAATCAGATTTAAATTTTCAT ATGC	1271952-79
cbdbA1596	1596EcoI_fw	GGCCGAATTCATGCCAAGCAACAACACTTTTG	
	1596HindIII_rev	GGCCAAGCTTTCAGGAGTTGTTCTTGAGGG	
cbdbA1619	1619ecoRI_f	GGCCGAATTCATGACCCGACTCCGAGGC	1311430-48
	1619sall_r	GGCCGTCGACTCAGGGCAAATCCTCAGATTTTC	1311933-54
cbdbA1625	cbdbA1625Ecofw	CCCGGAATTCATGAACGAATTTGAGACTCTG	
	1625Hind_rev	CCGGAAAGCTTTAAATGTATTTAAACGGGGTC	
<b>pASKIBA3/7 Klonierungen</b>			
cbdbA1625 in pASKIBA3	cbdbA1625-IBA3-for	ATGGTAGGTCTCAATGAACGAATTTGAGACTC TGGAACCTG	1318637-63
	cbdbA1625-IBA3-rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTAATGTATTTAAACGG GGTCAGGGT	1319099-122
cbdbA1625 in pASKIBA7	1625_IBA7_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCAACGAATTTGAGACTC TGGAACCTG	1318640-63
	1625_IBA7_rev	ATGGTAGGTCTCATATCAAATGTATTTAAACGG GGTCAGGGT	1319099-123
cbdbA1456 in pASKIBA3	1456_IBA3_f	TGCTGCGGTCTCAATGACTCACAGACTAAGGGA AAAC	1150076-99

Anwendungsbereich	Primername	Sequenz 5' - 3'	Position in CBDB1 / Vektor
cbdbA1456 in pASKIBA7	1456_IBA3_r	TGCTGCGGTCTCTGCGCTGATTATCTGCCCGTCA GATTC	1150565-85
	1456_IBA7_f	TGCTGCGGTCTCTGCGCACTCACAGACTAAGGG AAAAAC	1150079-99
	1456_IBA5/7_r	TGCTGCGGTCTCTTATCAGATTATCTGCCCGTCA GATTC	1150565-86
cbdbA1596 in pASKIBA3	1596_IBA3_fw	ATGGTAGGTCTCAAATGCCAAGCAACAACACTT TTGAGATTT	1285082-109
	1596_IBA3_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGAGTTGTTCTTGAG GGATATTTTC	1285571-94
<b>pACYC184 Klonierung</b>			
IR1624:: <i>lacZ</i>	IR1624Sall_r	CCCGGTCGAC CTT ATT GCC TGT GTT ATT AAT T	1318615-36
	<i>lacZ</i> _Sall_r	GGCC GTCGAC TTATTTTGGACACCAGACCAAC (pRS551)	
<b>pJet-Klonierung</b>			
Teilsequenz von cbdbA1455	1455pGEM_f	TCTGCCGTCCAATAACAGC	668-87
	1455pGEM_r	ATCTGCACACTTGGTACAGG	1048-67
Teilsequenz von cbdbA1456	1456pGEM_f	ATGGTCCACACTTATGCAGG	1150111-130
	1456pGEM_r	GCGGGTAGCATTGAATTTGG	1150527-46

## 2) Quikchange-Mutagenese-Primer

Mutation in cbdbA1625 GTG-->GGC (Cys-->Ala)	Quick_1625ala_fw	GCCATATTACATGAACTCATGGCTCTGGGCGGA GAATCCACCCC	1318763-806
	Quick_1625ala_rev	GGGGTGGATTCTCCGCCAGAGCCATGAGTTCA TGTAATATGGC	1318763-806
Mutation in cbdbA83 GAT-->GAA (Asp-->Glu)	Quick83Glu_fw	CCGATATTATAGTATTGGAAGTTTTGATGCCG GTAATGGATGGC	66721-65
	Quick83Glu_rev	GCCATCCATTACCGGCATCAAAACTTCCAATACT ATAATATCCGG	66721-65
Mutation in cbdbA1456A ATG-->TAG	Quick1456AStopB_fw	CCGAGAAGGCTATTAGACTCACAGACTAAGGGA AAACGGCTACGC	1150063-107
	Quick1456AStopB_rev	GCGTAGCCGTTTTCCCTTAGTCTGTGAGTCTAAT AGCCTTCTCGG	1150063-107
Mutation in cbdbA1625 ATG-->TAG	pBAD30_1625_Stop_fw	TGG GCT AGC GAA TTC TAG AAC GAA TTT GAG ACT CTG GAA CTG G	1318639-64
	pBAD30_1625_Stop_rev	CCAGTTCAGAGTCTCAAATTCGTTCTAGAATTC GCTAGCCCA	1318639-64
Mutation in cbdbA1456B ATG-->TAG	pBAD30_1456BStopB_fw	CCGTTTTTTGGGCTAGCGAATTCTAGACTCACA GACTAAGGG	1150078-94
	pBAD30_1456BStopB_r	CCCTTAGTCTGTGAGTCTAGAATTCGCTAGCCCA AAAAAACGG	1150078-94
Mutation in cbdbA1456A TTG-->TAG	pBAD1456Astop_fw	CCCGTTTTTTGGGCTAGCGAATTCTAGTATTTA CCCCCAAG	1150000-15
	pBAD1456Astop_r	CTTGGGGGGTAAATACTAGAATTCGCTAGCCCA AAAAAACGGG	1150000-15
Mutation in IR1455Δr GTA-Insertion	IR55-r_GTA_f	CCAATATAATATCTGTAACATAAGTATAATATAA TTGAATATACGAAAGG	1149829-52/GTA/ 77-99
	IR55-r_GTA_r	CCTTCGTATATTCAATTATATTACTATAGTTA CAGATATTATATTGG	1149829-52/GTA/ 77-99
Mutation in IR1455Δr GTATAC-Insertion	IR55-r_TAC_f	CAATATAATATCTGTAACATAAGTATAATATAA AATTGAATATACGAAAG	1149829- 52/GTATAC/ 77-99

Anwendungsbereich	Primername	Sequenz 5' - 3'	Position in CBDB1 / Vektor
	IR55-r_TAC_r	CTTTCGTATATTCAATTATATTA <b>GTATACT</b> ATAGT TACAGATATTATATTG	1149829- 52/GTATAC/ 77-99
<b>3) RT-PCR-Primer</b>			
Cotranskription			
Fragment a	1452-53_rev 1454-55_fw	ACTCCCAAATACGGGGTAAC ATTGCCAGCAGAATAAGGCC	1145854-73 1146461-80
Fragment b	1453intern_f 1453intern_r	TAGTGGGTGAAGACATACGG GCCATTAGATTCTTTGGCGG	1146483-503 1146866-85
Fragment c	IR1453_fw IR1453-54_rev	CATTTTTCAATTTTCCTTTTACC ATCTCAATTACCCGTGATTG	1147929-49 1145854-73
Fragment d	SP2_1453_CBDB1 IR1453_281_rev	GATACCGATTGCCGAAGATG CGTTATCCAATATCCTGGTAG	1147375-94 1147777-97
Fragment e	1453-54qPCR_f 1453-54qPCR_r	AAAGGCCTAGTCTTTCTAAGC CTGTTGGTGTTTAGGTTATGG	1147678-98 1147870-50
Fragment f	1454-55_fw 1454-55_rev	ATTGCCAGCAGAATAAGGCC ACTACATTGGCAACTACGCC	1147990-8009 1148397-416
Fragment g	1455pGEM_f 1455pGEM_r	TCTGCCGTCCAATAAACAGC ATCTGCACACTTGGTACAGG	1148616-35 1149036-55
Fragment h	1456pGEM_f 1456pGEM_r	ATGGTCCACACTTATGCAGG GCGGGTAGCATTGAATTTGG	1150111-30 1150527-46
Fragment i	IRBam1453fw 1455intern_rev	<b>GGCCGGATCC</b> TTTTCAATTTTCCTTTTACC TGGTCAGGACTACATTGG	1147516-35 1148407-24
qPCR			
Teilsequenz von cdbA84	cdbA84_f cdbA84_r	CTTATATCCTCAAAGCCTGA TGTTGTTGGCAACTGCTTC	67640-59 67823-41
Teilsequenz von cdbA1624	cdbA1624_f cdbA1624_r	CAGTCACTCGAAGCTACCA CTGCTAAAGGATTAGCCAAAA	1317556-74 1317403-23
Teilsequenz von cdbA1453	cdbA1453_f cdbA1453_r	AATCTCTCGAGGGCACTC CCAGAGGGCTGGTAAGGT	1146681-98 1146531-48
Teilsequenz von cdbA1455	1455qPCR_f 1455qPCR_r	TATGTTCAAGGACGGCTAACG GGTTTCCTCCGTAATACCG	1148959-78 1148779-98
Teilsequenz von cdbA1456	1456qPCR_f 1456qPCR_r	GAATAGCCGAATTGTATTCC AGTTTCTCTTAAGTGCATACC	1150251-71 1150385-405
Teilsequenz der Luciferase	Luci_f Luci_r	TTCCAGGGATACGACAAGG CGGACATAATCATAGGTCCT	1787-805 1968-87
5'RACE			
heterologer Transkriptionsstart in <i>E. coli</i>	pcr anchor primer SP1_pRS551_race SP2_pRS551_race SP3_pRS551_race	GACCACGCGTATCGATGTCGAC CATTCAAGGCTGCGCAACTG TCTTCGCTATTACGCCAGC CTGCAAGGCGATTAAGTTGG	n.a. 261-79 217-35 179-98
Transkriptionsstart von cdbA1453	SP1_1453_CBDB1 SP2_1453_CBDB1 SP3.1_1453_CBDB1	AAAGTCTTAAACGTGCCCGC GATACCGATTGCCGAAGATG GAGAGTGTGGAATGGAATTAG	1147274-93 1147375-94 1147490-511
Transkriptionsstart von cdbA1455	SP1_1455_CBDB1_ra ce SP2_1455_CBDB1_ra ce SP3_1455_CBDB1_ra ce	CCAGTCAATTTCCGGTAGTG CAGTCCTTTCATGAAATTACGG TAGTGTGATGGAATTAGGC	1149542-60 1149695-716 1149724-43

Anwendungsbereich	Primernamen	Sequenz 5' - 3'	Position in CBDB1 / Vektor
Transkriptionsstart von cbdbA1456	SP1_1456_CBDB1_race	CAG GTC TTT TCT GCG TAC G	1150150-68
	SP2_1456_CBDB1_race	TGGACCATATTGCGTAGCC	1150100-18
	SP3_1456_CBDB1_race	GTGAGTCATATAGCCTTCTCG	1150064-84
	SP0_1456_CBDB1	GGAATGATACAGACGTTCC	1150207-25
	SP01_1456_CBDB1	TTCAGGGGAAACGCCGTAC	1150174-92
	SP2.2_1456_CBDB1	CAGACGTTCCAGTATGCCCG	1150197-216
Transkriptionsstart von cbdbA1598	SP1_1598_CBDB1	CAATTCGGCTATTCGGGTGGG	1150244-64
	SP1_1598_CBDB1	TTATCTGCACTGACCGAACC	1287189-208
	SP2_1598_CBDB1	CATATCCAGTCTATCTCGG	1287241-260
	SP3_1598_CBDB1	GGGAAGCTGTACATCATCC	1287321-40

#### 4) DNaseI Footprinting

IR1453	6FAM_IR1453_fw	6-FAM-TT TTC AAT TTT CCT TTT ACC	1147516-35
	IR1453-54_rev	ATCTCAATTACCCGTGTATTG	1147929-49
IR1455	6FAM_SP2_1455_CBDB1		
	DB1	6FAM_CAGTCCTTTCATGAAATTACG	1149695-715
	IR1455+60_Bam_r	CCCCGGATCCATAGCCTTCTCGGTATTC	1150058-75

#### 5) EMSA

##### Primer für IR-Fragmente

Fragment f1	IRBam1453fw:	GGC CGG ATC CTT TTC AAT TTT CCT TTT ACC	1147516-35
	IR1453-54_rev	ATCTCAATTACCCGTGTATTG	1147929-49
Fragment f2	IR1453_257bp_f	AAAGACTAGGCCTTAGTCC	1147673-92
	IR1453_359bp_r	AGCCTCCTAACATATATTTGG	1147591-611
Fragment f3	SP2_1455_CBDB1	CAGTCCTTTCATGAAATTACG	1149695-715716
	IR1455+60_Bam_r	CCCCGGATCCATAGCCTTCTCGGTATTC	1150058-75
Fragment f4	SP3_1455_CBDB1	TAGTGTGATGGAAATTAGGC	1149724-43
	IR1455_97bp_rev	GAATATACGAAAGGAGATCG	1149823-42
Fragment f5	IR1455_78bp_fw	CGATCTCCTTTCGTATATTC	1149823-42
	IR1455_181bp_rev	AGCTTCTTGGCCTTAAGG	1149908-26
Fragment f6	pBAD1456EcoR1fw	GGCCGAATTCCTGTATTTACCCCAAG	1149998-50015
	SP2_1456_CBDB1_race	TGGACCATATTGCGTAGCC	1150100-81
IRtrpE	IRtrpE fw	TTAACGGGCACCTCGC	1138133-49
	IRtrpE rev	TAAAAGTTAAACCTCCCG	1137739-58

##### Oligonukleotide

IR1455 (105-136 bp)	IR55_105-136_f	TTATAGTATACGATACTAGTATACGATTATAG	1149850-81
	IR55_105-136_r	CTATAATCGTATACTAGTATCGTATACTATAA	1149850-81
IR1455 (137-168 bp)	IR55_137-168_f	TTACAGATATTATTTGGTCAATAGGCCTTAA	1149882-913
	IR55_137-168_r	TTAAGGCCTATTGACCAATATAATATCTGTAA	1149882-913
IR1455 (92-118 bp)	IR1455_92-118_f	ATATTCATTTATATTATAGTATACGATTTA	1149837-63
	IR1455_92-118_r	TAAATCGTATACTATAATATAATTGAATAT	1149837-63
IR1455 (121-148 bp)	IR1455_121_148_f	TTATAGTATACGATTATAGTTACAGATATT	1149866-92
	IR1455_121-148_r	AATATCTGTAACATAATCGTATACTATAA	1149866-92
IR1598 (123-152 bp)	IR1598_123_152_f	TTTGTATACGATATTTGTATACGATTATAT	1287573-603
	IR1598_123_152_r	ATATAATCGTATACAAATATCGTATACAAA	1287573-603
IR1453 (107-133 bp)	IR53_107-133_f	CTATAATCGTATACTATAATCGTATAC	1147622-48
	IR53_107-133_r	GTATACGATTATAGTATACGATTATAG	1147622-48
IR1624 (85-126 bp)		GTATATTAGTCTATATGGACTAGTCCATATAGAC	
	IR1624_85-126f/r	TAATATAC	1318475-516

Anwendungsbereich	Primernamen	Sequenz 5' - 3'	Position in CBDB1 / Vektor
IR84 (184-213 bp)	IR84_184-213_f	TTCACACTCTTCTTGTTTAATTCTTTAGAT	67310-39
	IR84_184-213_r	ATCTAAAGAATTAACAAGAAGAGTGTGAA	67310-39

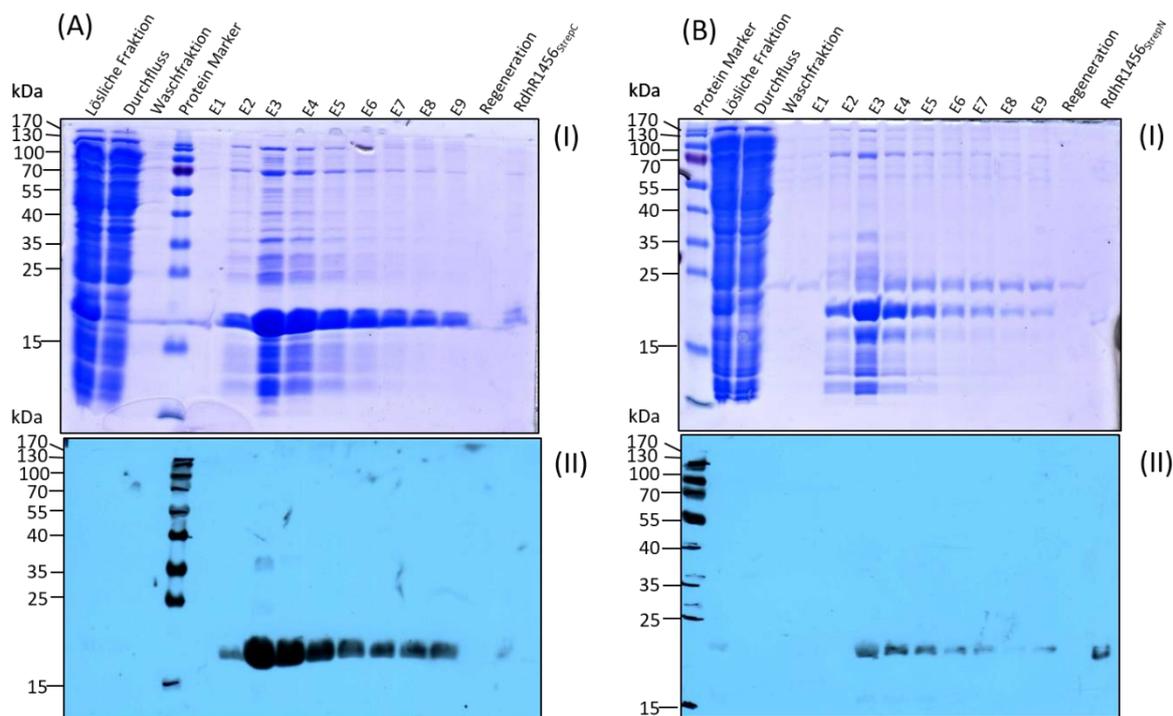


Abbildung I. Reinigung von in *E. coli* Rosetta heterolog synthetisiertem RdhR1456 als C-terminales (A) und N-terminales (B) StrepTag-Fusionsprotein. Dargestellt sind die mittels Coomassie gefärbten 15%igen SDS-Gele (I) sowie die Immunoblots (II) von jeweils 8  $\mu$ l aufgetrennten Proteinfractionen der StrepTag-Reinigungen. Der Immunoblot erfolgte mit Hilfe von Anti-Strep-Konjugat (HRP) in einer Konzentration von 1:100000. E1-E9 entsprechen den Elutionsfraktionen mit 1 mM  $\alpha$ -Desthiobiotin.

Tabelle IV. Einfluss des Vektorsystems für *rdhR1625* auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS5 ( $p_{1625-14}::lacZ$ )

Stamm	Vektorsystem	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Induktion mit 0,02 % L-Arabinose in Bezug zur nicht induzierten Kontrolle (100 %)
LS5 ( $P_{1625-14}::lacZ$ )	pBAD30	95,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	pBAD30_1625	66,2 $\pm$ 8,1 <sup>a</sup>
	pBAD30_1625_SD	65,9 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup>
	pBAD24_1625	64,93 $\pm$ 7,7 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen Wiederholungen; <sup>b</sup> Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Wiederholungen; jede Wiederholung erfolgte als biologisches Triplikat

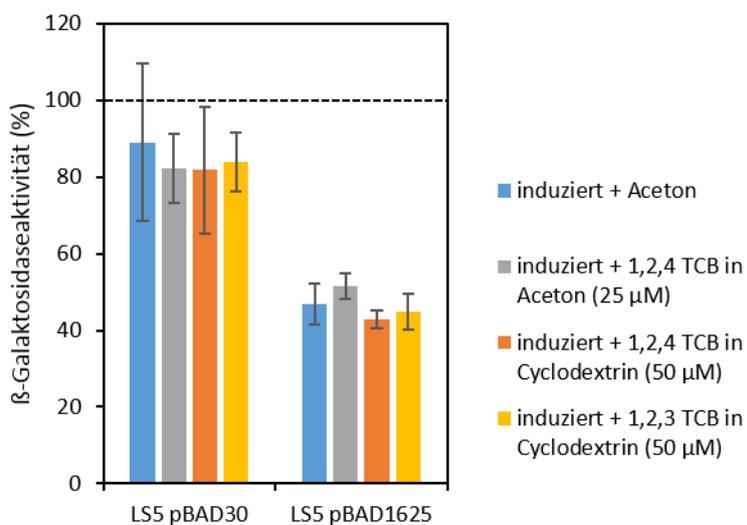


Abbildung II. Einfluss von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von LS5 ( $P_{1625::lacZ}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten einer Dreifachbestimmung von LS5 pBAD30 (Kontrolle) und LS5 pBAD1625 nach anaerober Anzucht in LB-Medium mit 0,02 % L-Arabinose als Induktor. Vergleichend dazu sind die Aktivitäten mit zusätzlicher Zugabe von 25  $\mu$ M 1,2,4-TCB aus einer AcetonstammLösung oder 50  $\mu$ M 1,2,3- und 1,2,4-TCB aus einer  $\beta$ -CyclodextrinstammLösung dargestellt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden auf die Gesamtaktivität der Stämme ohne Induktion (100 %-Markierung) normalisiert.

Tabelle V:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von LS13 ( $P_{1624::lacZ}$ ) unter Einfluss von  $\sigma$ ECF und RdhR1625

Stamm	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Units)	
	nicht induziert	induziert( 0,02% Arabinose)
LS4	55,7 $\pm$ 13,1	n. a.
LS13	78,3 $\pm$ 34,4	n. a.
LS13 pACYCECF	64,0 $\pm$ 82,7	56,6 $\pm$ 65,4
LS13 pBAD1625	50,3 $\pm$ 42,2	87,0 $\pm$ 46,1

Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats

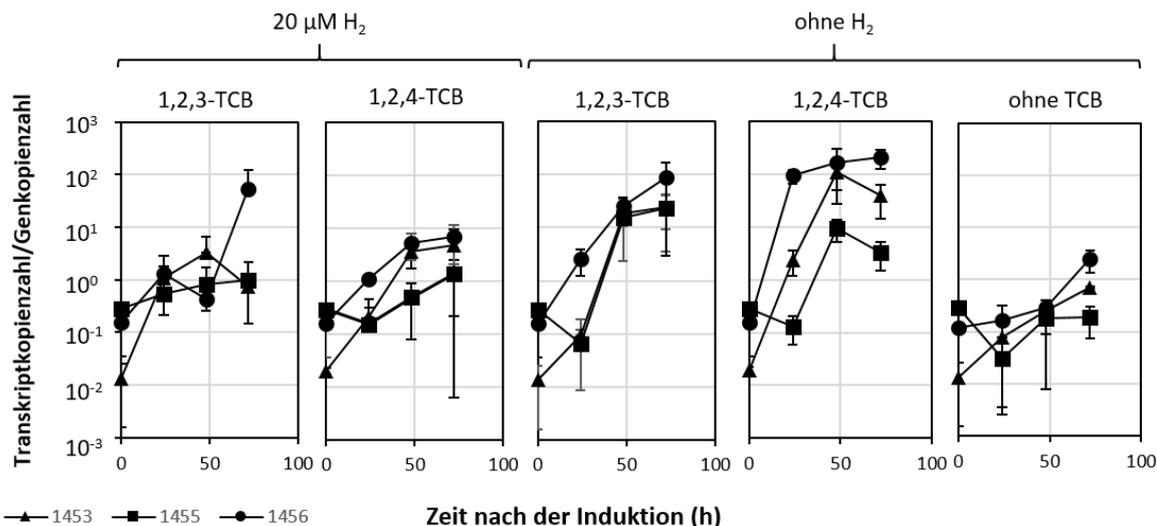


Abbildung III. Quantitative Transkriptionsanalyse der *rdhA*-Gene *rdhA1453* (▲) und *rdhA1455* (■), sowie des *marR*-Gens *rdhR1456* (●) nach der Induktion mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB in An- bzw. Abwesenheit von 20 µM H<sub>2</sub>. Die Kulturen wurden 10 % aus einer Zweiflüssigphasen-Kultur mit 1,2,3-TCB inokuliert und nach einer zweistufigen Hungerphase (48 h mit H<sub>2</sub>, 48 h ohne H<sub>2</sub>) der Versuch mittels TCBs und H<sub>2</sub> gestartet. Dargestellt sind Mittelwerte der Transkriptkopienzahl pro Genkopienzahl der Versuchszeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h von jeweils zwei Kulturen in dreifacher technischer Ausführung.

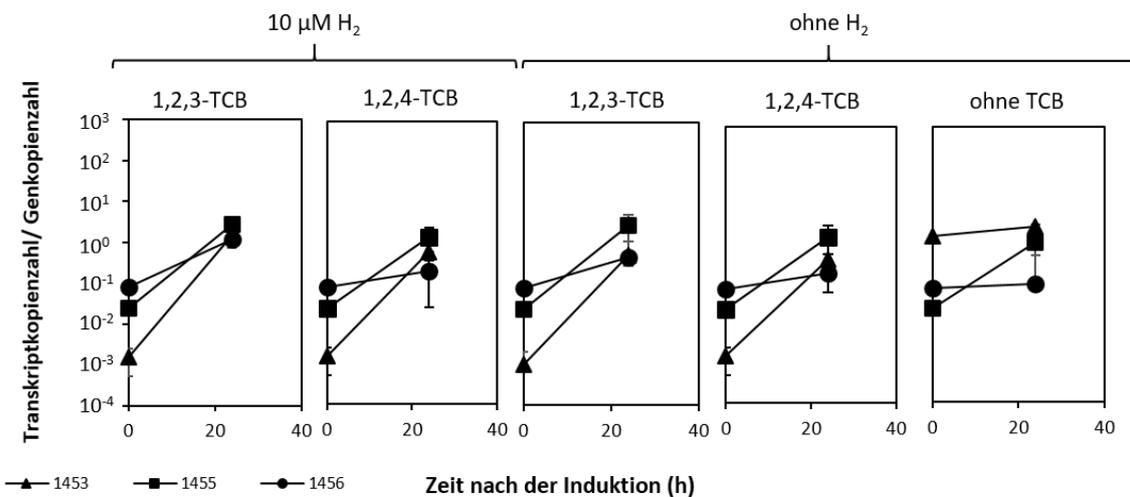


Abbildung IV. Quantitative Transkriptionsanalyse der *rdhA* Gene *rdhA1453* (▲) und *rdhA1455* (■), sowie des *marR*-Gens *rdhR1456* (●) nach der Induktion mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB in An- bzw. Abwesenheit von 10 µM H<sub>2</sub>. Die Kulturen wurden 10 % aus einer Zweiflüssigphasen-Kultur mit 1,2,3-TCB inokuliert und nach einer zweistufigen Hungerphase (48 h mit H<sub>2</sub>, 48 h ohne H<sub>2</sub>) der Versuch mittels TCBs und H<sub>2</sub> gestartet. Dargestellt sind Mittelwerte der Transkriptkopienzahl pro Genkopienzahl der Versuchszeitpunkte 0 h und 24 h von jeweils zwei Kulturen in dreifacher technischer Ausführung.

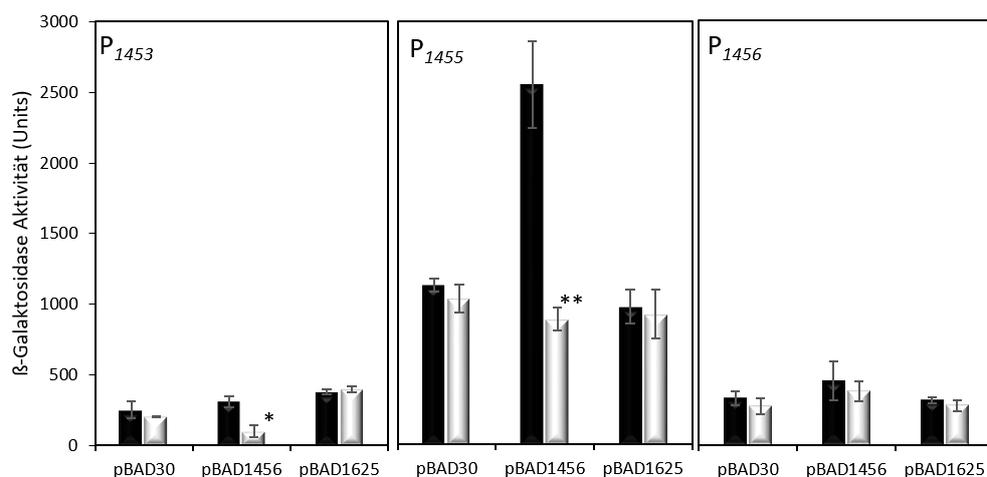


Abbildung V. Regulatorische Wirkung von *RdhR1456* und *RdhR1625* auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Stämme LS9, LS20 und LS21. Die Anzucht erfolgte anaerob in LB-Medium ohne (schwarz) oder mit 0,02 % L-Arabinose (grau). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung in Units. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mehrfach in unabhängigen Experimenten verifiziert. Signifikante Unterschiede wurden mittels T-Test ermittelt und sind mit \* für  $\alpha \leq 0,05$  und \*\* für  $\alpha \leq 0,01$  gekennzeichnet.

Tabelle VI. Keine Inhibition der Komplexbildung von DNA-Fragmenten mit *RdhR1456*<sub>StrepC/N</sub> in Gelretentionsstudien in Anwesenheit der hier aufgeführten getesteten potentiellen Liganden.

Ligand	<i>RdhR1456</i> <sub>StrepC</sub>		<i>RdhR1456</i> <sub>StrepN</sub>	
	getestete Ligandenkonzentrationen	Anzahl der Experimente/ dsDNA-Oligonukleotid bzw. DNA-Fragment	getestete Ligandenkonzentrationen	Anzahl der Experimente/ dsDNA-Oligonukleotid bzw. DNA-Fragment
<b>1,2,3-Trichlorobenzol</b>	2-200 $\mu$ M	6/IR4, f5, IR55 (105-136)	n. a.	n. a.
<b>1,3-Dichlorobenzol</b>	2-200 $\mu$ M	6/f5, IR55 (105-136)	n. a.	n. a.
<b>1,4-Dichlorobenzol</b>	2-200 $\mu$ M	2/f5	n. a.	n. a.
<b>1,2,4 -Trichlorobenzol</b>	2-200 $\mu$ M	2/f5	n. a.	n. a.
<b>1,3,5-Trichlorbenzol</b>	2-200 $\mu$ M	2/IR55 (105-136)	n. a.	n. a.
<b>Phenol</b>	1-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136)	n. a.	n. a.
<b>3-Monochlorphenol</b>	1-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136)	n. a.	n. a.
<b>2,3-Dichlorophenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/f4-5, 1/IR 55-56, 2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,4-Dichlorophenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/f4-5, 1/IR 55-56, 2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,5-Dichlorophenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/f4-5, 1/IR 55-56	n. a.	n. a.
<b>3,4-Dichlorophenol</b>	10-200 $\mu$ M	1/f4-5, 6/IR 55-56, 2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>3,5-Dichlorophenol</b>	10-100 $\mu$ M	1/f4-5, 4/IR 55-56, 2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,3,5-Trichlorphenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,4,5-Trichlorphenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,4,6-Trichlorphenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,3,6-Trichlorphenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>2,3,5,6-Tetrachlorphenol</b>	10-100 $\mu$ M	2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.

Ligand	RdhR1456 <sup>StrepC</sup>		RdhR1456 <sup>StrepN</sup>	
	getestete Ligandenkonzentrationen	Anzahl der Experimente/ dsDNA-Oligonukleotid bzw. DNA-Fragment	getestete Ligandenkonzentrationen	Anzahl der Experimente/ dsDNA-Oligonukleotid bzw. DNA-Fragment
<b>2,3,4,5-Tetrachlorphenol</b>	10-100 µM	2/IR55 (105-136 bp)	n. a.	n. a.
<b>1,2,4-Tribromobenzol</b>	10-100 µM	2/IR4, IR 55-56	n. a.	n. a.
<b>1,2-Dibromobenzol</b>	10-100 µM	2/IR4, IR 55-56	n. a.	n. a.
<b>Cyanocobalamin</b>	10-100 µM	5/IR55 (105-136)	100 µM	2/IR55 (105-136)
<b>5',6'-N,N-Dimethylbenzimidazol</b>	10-100 µM	5/IR55 (105-136)	100 µM	2/IR55 (105-136)
<b>NAD</b>	0,3-3 µM	5/IR55 (105-136)	100 µM	2/IR55 (105-136)
<b>NADP</b>	0,3-3 µM	5/IR55 (105-136)	100 µM	2/IR55 (105-136)
<b>NADH</b>	0,3-3 µM	7/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>NADPH</b>	0,3-3 µM	7/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>FAD</b>	0,3-3 µM	6/IR55 (105-136)	n.a.	n.a.
<b>FMN</b>	1,5-100 µM	3/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>S-Adenosylmethion</b>	0,3-3 µM	7/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>Acetylphosphat</b>	0,3-3 µM	7/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>Acetyl CoA</b>	0,3-3 µM	7/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>CoA</b>	100 µM-1 mM	5/IR55 (105-136)	100 µM-1 mM	3/IR55 (105-136)
<b>cAMP</b>	1,5-100 µM	3/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>ADP</b>	100 µM-1 mM	3/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	100 µM-1 mM	5/IR55 (105-136)	100 µM-1 mM	3/IR55 (105-136)
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	100 µM-1 mM	4/IR55 (105-136)	100 µM-1 mM	2/IR55 (105-136)
<b>ZnCl<sub>2</sub> + CoA</b>	100 µM-1 mM	2/IR55 (105-136)	100 µM-1 mM	2/IR55 (105-136)
<b>ZnCl<sub>2</sub> + NiCl<sub>2</sub></b>	100 µM-1 mM	3/IR55 (105-136)	100 µM-1 mM	3/IR55 (105-136)
<b>ADP + CoA</b>	100 µM	1/IR55 (105-136)	100 µM	1/IR55 (105-136)
<b>NiCl<sub>2</sub> + CoA</b>	100 µM-1 mM	3/IR55 (105-136)	100 µM-1mM	3/IR55 (105-136)
<b>CBDB1 Vitaminlösung</b>	100 X	2/IR55 (105-136)	100X	2/IR55 (105-136)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1 mM	2/IR55 (105-136)	1 mM	2/IR55 (105-136)
<b>Glucose</b>	1 mM	2/IR55 (105-136)	1 mM	2/IR55 (105-136)

Tabelle VII. Übersicht zu orthologen *rdhA*- und *rdhR*-Genen zu *CBDB1* in den *D. mccartyi* Stämmen *VS*, *GT*, *DCMB5*, *BTF08*, *BAV-1* und *DET 195*.

Stamm	Genlocus	Sequenz-identität	Genlocus	Sequenz-identität	Genlocus	Sequenz-identität	Genlocus	Sequenz-identität	Genlocus	Sequenz-identität	Genlocus	Sequenz-identität		
<b>CBDB1</b>	<i>rdhA1453</i> ( <i>cbdb_A1453</i> ) ←	92 % ( <i>rdhA1624</i> )	<i>rdhA1455</i> ( <i>cbdb_A1455</i> ) ←		<i>rdhR1456</i> ( <i>cbdb_A1456</i> ) →		<i>rdhA1598</i> ( <i>cbdb_A1598</i> ) ←		<i>cbdb_A1599</i> →		<i>rdhA1624</i> ( <i>cbdb_A1624</i> ) ←		<i>rdhR1625</i> ( <i>cbdb_A1625</i> ) →	
<b>VS</b>	<i>DhcVS_1260</i> ←	26,7 %	<i>DhcVS_1263</i> ←	85 %	<i>DhcVS_1264</i> →	83 %	<i>DhcVS_1402</i> ←	88 %	<i>DhcVS_1403</i> →	Nein (28 %)	<i>DhcVS_1427</i> ←	86 % (84% <i>rdhA1453</i> )	<i>DhcVS_1428</i> →	65 %
<b>GT</b>	<i>DehalGT_1189</i> ←	100 % (91% <i>rdhA1624</i> )	<i>DehalGT_1191</i> ←	100 %	<i>DehalGT_1192</i> →	100 %	<i>DehalGT_1321</i> ←	100 %	<i>DehalGT_1322</i> →	100 %	<i>DehalGT_1344</i> ←	98 % (91% <i>rdhA1453</i> )	<i>DehalGT_1345</i> →	100 %
<b>DCMB5</b>	<i>dcmb_1339</i> ←	98% (93% <i>rdhA1624</i> )	<i>dcmb_1341</i> ←	99 %	<i>dcmb_1342</i> →	100 %	/		/		/		/	
<b>BTF08</b>	/		<i>btf_1057</i> →	Nein (25 %)	<i>btf_1056</i> ←	Nein (29 %)	<i>btf_1463</i> ←	99 %	<i>btf_1464</i> →	99 %	<i>btf_1488</i> ←	97 % (91% <i>rdhA1453</i> )	<i>btf_1489</i> →	99 %
<b>BAV-1</b>	/		<i>DehaBAV1_0988</i> →	Nein (25 %)	<i>DehaBAV1_0987</i> ←	Nein (28 %)	/		/		/		/	
<b>DET 195</b>	/		<i>DET_1171</i> ←	Nein (25 %)	<i>DET_1172</i> →	Nein (29 %)	/		/		<i>DET_1535</i> ←	Nein (34 %)	<i>DET_1536</i> →	66 %

Die Orientierung der Gene im Bezug zum DNA-Leitstrang ist durch Pfeilen dargestellt. Die Sequenzidentitäten sind im Bezug zu den orthologen Genen aus *CBDB1* (obere Zeile) in Prozent dargestellt und Verbindungen oder Bedingungen unter denen die Gene vermehrt transkribiert werden sind blau markiert. Bedingungen unter denen die Genprodukte nachgewiesen wurden sind grün markiert.

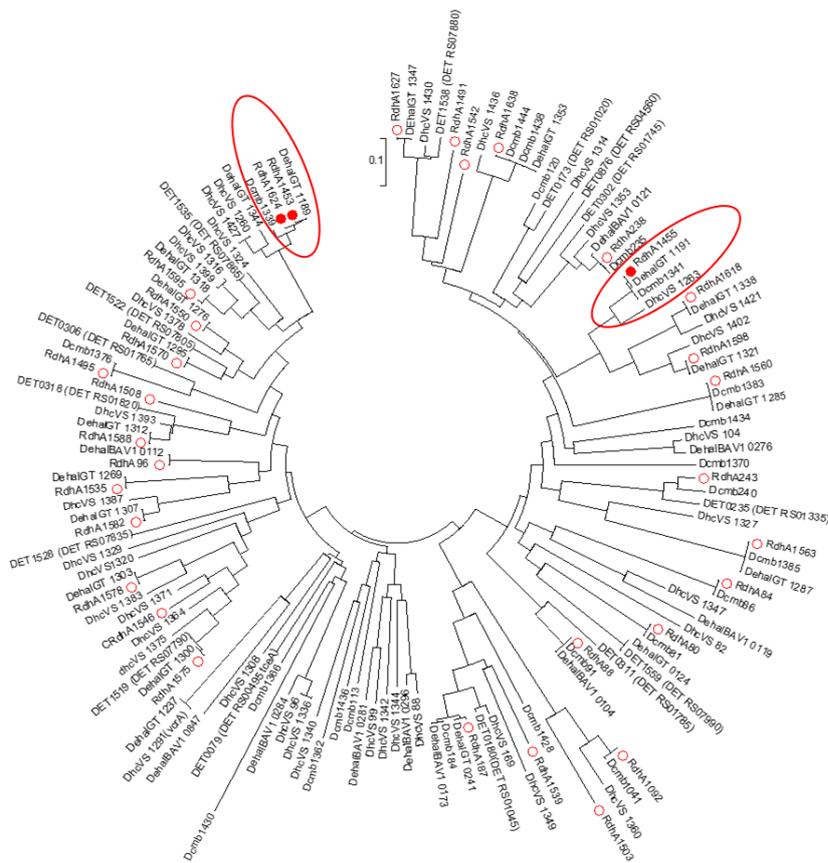


Abbildung VI. Stammbaum der reduktiven Dehalogenasegene der isolierten *D. mccartyi* Stämme CBDB1, DCMB5, VS, BAV1, GT und DET195. ClustalW Alignment der DNA mit der MEGA6 Software, neighbour-joining Methode, Skala entspricht einem Sequenzunterschied von 10 %. RdhAs aus CBDB1 sind mit roten Punkten gekennzeichnet. Umrahmt sind die rdhAs rdhA1453, RdhA1624 und rdhA1224 aus CBDB1 mit ihren zugehörigen orthologen Genen anderer Stämme.

```

P1453:          CCTTTAGTCCTATTTACTACCTATGCTGCGGCCACTATAATCTATACTATAATCTATACTAGCAATATACCAAATAT
IR1453_302-328:          TATAATCGTATACTATAATCGTATAC

P1455:          CCTTAAGGCCTATTGACC AATATAATATCTGTAACTATAATCTATACTAGTATCTATACTATAATATAATTGAATAT
(5'-6-FAM-) IR55_105-136:          CTATAATCGTATACTAGTATCGTATACTATAA
IR1455_137-168:          TTAAGGCCTATTGACCAATATAATATCTGTAA
IR1455_92-118:          taaATCGTATACTATAATATAATTGAATAT
IR1455_121-148:          AATATCTGTAAC TATAATCGTATACTAtaa

P1598:          CGTTTTGCTGATTGTTGACCCTGTGTGCAGGATATATAATCTATACAAATATCTATACAAACATCGTATTGCTACT
IR1598_123-152:          ATATAATCGTATACAAATATCGTATACAAA
    
```

Abbildung VII. Vergleich der Promotersequenzen P1453, P1455 und P1598 und der für die EMSAs und die Ultrazentrifugation genutzten dsDNA-Oligonukleotide. Die -10 und -35 Konsensus-Sequenzen und das GTATAC-Motiv sind in Gelb und Grün hervorgehoben. Rot markierte Bereiche zeigen die im DNase I-Verdau geschützten Bereiche. Klein geschriebene Buchstaben sind nicht spezifische Basen (modifiziert nach Krasper et al., 2016).

## LEBENS LAUF

---

### Persönliche Daten

**NAME:** Lydia Krasper geb. Segler

**ANSCHRIFT:** Goethestraße 6 b  
39108 Magdeburg

**GEBURTSDATUM:** 09.06.1987

### Beruflicher Werdegang

Seit 09/2016 Elternzeit

Seit 08/2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der MicroPro GmbH, Gommern

09/2015-08/2016 Technische Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Phytopathologie und Pflanzenernährung, Halle (Saale)

06/2015-09/2015 Arbeitssuchend und Qualifikation zur Qualitätsmanagementbeauftragten nach DIN EN ISO 9001:2008

10/2011-06/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Mikrobiologie, Halle (Saale)

### Schulische Ausbildung und Studium

Seit 10/2011 Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Mikrobiologie, Halle (Saale)

Thema: Regulation der Organohalid-Respiration in *Dehalococcoides mccartyi* - Stämmen

01/2011-10/2011 Diplomarbeit an der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Institut für Mikrobiologie, Halle (Saale)

Thema: Induktion der *rdhA*-Gene in *Dehalococcoides* Stamm CBDB1 bei Wachstum auf Dioxinen

10/2006-10/2011 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

08/1999-06/2006 Abitur am Börde-Gymnasium Wanzleben, Wanzleben

## PUBLIKATIONEN

---

**Krasper, L., Lilie, H., Kublik, A., Adrian, L., Golbik, R. and Lechner, U.** (2016) The MarR-type regulator Rdh2R regulates *rdh* Gene transcription in *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1. *J. Bacteriol.* **198**, 3130-3141.

**Wagner, A., Segler, L., Kleinsteuber, S., Sawers, G., Smidt, H. and Lechner, U.** (2013) Regulation of reductive dehalogenase gene transcription in *Dehalococcoides mccartyi*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120317.

## DANKSAGUNG

---

Zum Gelingen dieser Dissertation haben viele Menschen mit ihrem Rat, ihren Anregungen und praktischen Unterstützung mit beigetragen. An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen herzlich bedanken.

Zunächst möchte ich Frau PD Dr. Ute Lechner für die Vergabe und Betreuung dieses vielseitigen und anspruchsvollen Themas danken. Danke für die unzähligen fruchtbringenden Gespräche und Diskussionen, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Motivation bei Rückschlägen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Gary Sawers für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Hauke Smidt für die Übernahme des Drittgutachtens.

Desweiteren möchte ich Dr. Hauke Lilie für die zur Verfügungstellung der analytischen Ultrazentrifuge danken. Danke für die viele Hilfe rund um die Analyse mit der Ultrazentrifuge, für die Berechnung des  $K_d$ -Wertes und die Bestimmung der oligomeren Form von RdhR1456.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Ralph Golbik für die Unterstützung bei der Auswertung der Gelretentionsanalysen, einschließlich der Ableitung der Formel zur Berechnung des  $K_d$ -Wertes mittels Kaleidagraph, sowie die zur Bereitstellung der Kaleidagraph-Software.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern der Forschergruppe FOR1530 für die produktive Zusammenarbeit und die gemeinsamen Tagungen bedanken, insbesondere Anja Kublik und Dominique Türkovsky für die Massenspektrometrischen Untersuchungen.

Weiterhin möchte ich Stefanie Hartwig für die enge Zusammenarbeit während der praktischen Phase danken. Danke für die wunderbare Laborzeit, die fachliche aber auch seelische und moralische Unterstützung und für ihre Freundschaft.

Ein Dank geht auch an alle ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiter der Mikrobiologie, für das freundschaftliche Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen im Laboralltag. Ganz besonders denke ich dabei an Dörte Falke, Kinga Matern und Claudia Hammerschmidt. Danke Dörte für deine Korrekturvorschläge in der Schreibphase.

Allen Bachelor- und Masterstudenten mit denen ich zusammenarbeiten durfte, danke ich auch für die produktive und meist harmonische Zeit.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während der gesamten Promotionszeit danken. Insbesondere Daniel möchte ich dafür danken, dass er mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen ist und immer Geduld mit mir hatte. Danke Conny für dein Babysitting in der Schreibphase. Ohne euch hätte ich die Arbeit wohl nicht abgeschlossen.

Vielen Dank.

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Quellen und Zitate der benutzten Werke wurden wörtlich oder inhaltlich entnommen und die Stellen als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Magdeburg, 27.04.2017

.....

Lydia Krasper