

**Die Rolle cyto- und periplasmatischer Kupferresistenzsysteme in der
Kupfer- und Goldhomöostase in *Cupriavidus metallidurans***

Dissertation

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

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von
Herrn Niklas Hirth

Die Gutachten wurden erstellt von:

1. Prof. Dr. D. H. Nies
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. PD Dr. G. Grass

Datum der Verteidigung: 25.06.2024

I. Inhaltsverzeichnis

II. Tabellenverzeichnis IV

III. Abbildungsverzeichnis V

IV. Abkürzungsverzeichnis VI

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 12

 2.1 Organismen und Primer 12

 2.2 Medien und Zusätze 15

 2.3 Kultivierung von Organismen 17

 2.3.1 Kultivierung von *E. coli* 17

 2.3.2 Kultivierung von *C. metallidurans* 17

 2.3.3 Stammhaltung 18

 2.4 Standardmethoden für Arbeiten mit Nukleinsäuren 18

 2.4.1 Isolierung von genomischer DNA 18

 2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA 18

 2.4.3 PCR 18

 2.4.4 Agarose Gelelektrophorese 19

 2.4.5 DNA-Restriktion mittels Endonukleasen 19

 2.4.6 DNA-Ligation 19

 2.4.7 Aufkonzentrierung von DNA 19

 2.4.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen 19

 2.4.9 Konzentrationsbestimmung von DNA 20

 2.4.10 DNA-Sequenzierungen 20

 2.5. Herstellung kompetenter Zellen mit der CaCl₂-Methode (MANDEL UND HIGA 1970) 20

 2.6 DNA-Transfer 20

 2.6.1 Plasmid-Transfer mittels Transformation 20

 2.6.2 Plasmid-Transfer mittels Konjugation 20

 2.7. DNA::DNA-Hybridisierung (SOUTHERN 1975) 21

 2.7.1 Herstellung von DNA-Sonden 21

 2.7.2 Gelelektrophorese 21

 2.7.3 Blotting 21

 2.7.4 Hybridisierung 21

 2.7.5 Nachweis durch Chemilumineszenz 22

 2.8 Bestimmung der Metallresistenz in Wachstumsendpunktbestimmungen (dose response) 22

 2.9 Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität 23

 2.10 Bestimmung der Überlebensfähigkeit von *C. metallidurans* (*Live/Dead*) 24

 2.10.1 Zellanzucht 24

 2.10.2 Präparation der Proben 24

 2.10.3 Bildanalyse 24

INHALTSVERZEICHNIS

2.11 Bestimmung des Glutathiongehalts	25
2.12 Bestimmung des Metallgehalts mittels ICP-MS	26
2.12.1 Anzucht	26
2.12.2 Probenvorbereitung	26
2.12.3 Bestimmung des Metallgehaltes	27
2.13 Transmissionselektronenmikroskopie und EDX-Analyse	27
2.13.1 Zellanzucht	27
2.13.2 Probenvorbereitung	27
2.13.3 Analyse der Proben im TEM	28
2.13.4 Analyse der Proben mittels EDX	28
2.14 Statistik	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Eine Deletion des <i>cup</i> -Operons in <i>C. metallidurans</i> AE104 führt zu einer Verringerung der Kupferresistenz	29
3.2 Eine <i>gshA</i> -Disruption verringert in vielen Stämmen die Kupferresistenz	31
3.3 Bakterien werden auch bei geringen Kupferkonzentrationen abgetötet	35
3.4 Eine <i>cop</i> -Deletion trägt zur Akkumulation von Kupfer bei	38
3.5 Die Zugabe von Kupfer hat keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt	42
3.6 Die Zugabe von Kupfer führt zur Induktion des <i>gig</i> - und <i>cus</i> -Operons	44
3.7 Eine <i>cup</i> -Deletion verringert den Einfluss der synergistischen Toxizität von Gold und Kupfer ..	46
3.8 Eine <i>cop</i> -Deletion führt zu erhöhter Kupferakkumulation	49
3.9 Goldionen haben keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt	57
3.10 Das <i>gig</i> - und <i>cus</i> -Operon wurden durch Gold induziert	61
3.11 Untersuchungen der Goldnanopartikelbildung	63
4. Diskussion	68
4.1 Die Goldhomöostase in <i>C. metallidurans</i>	68
4.1.1 Die Zusammensetzung der Goldlösungen und ihre Wirkung auf <i>C. metallidurans</i>	68
4.1.2 Nachweis der Goldnanopartikelbildung	69
4.1.3 Die Goldresistenz in <i>C. metallidurans</i>	70
4.2 Die Kupferresistenz in <i>C. metallidurans</i> verlangt das Zusammenspiel mehrerer Resistenzsysteme	80
4.3 Ausblick	90
V. Zusammenfassung	i
VI. Literaturverzeichnis	ii
VII. Anhang	xvii
VIII. Danksagung	xxiii
IX. Selbstständigkeitserklärung	xxiv
X. Publikationsliste	xxv
XI. Lebenslauf	xxvi

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Liste der verwendeten Organismen.....	12
Tabelle 2. Liste der verwendeten Primer.....	14
Tabelle 3. Konzentrationen der Stammlösungen und Endkonzentrationen von Medienzusätzen.	17
Tabelle 4. IC ₅₀ -Werte mit Standardabweichungen der <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme von <i>C. metallidurans</i> AE104 nach Zugabe von Kupferchlorid	29
Tabelle 5. IC ₅₀ -Werte mit Standardabweichungen der <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme mit Disruption im Gen <i>gshA</i> nach Zugabe von Kupferchlorid.	33
Tabelle 6. Prozentualer Anteil toter Zellen in 15 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen in Live/Dead-Färbungsexperimenten nach Inkubation mit ihrer entsprechenden IC ₅₀	36
Tabelle 7. Prozentualer Anteil toter Zellen in 17 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen sowie mit Disruption im Gen <i>gshA</i> in Live/Dead-Färbungsexperimenten nach Inkubation mit ihrer entsprechenden IC ₅₀	37
Tabelle 8. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 15 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit und ohne Zugabe der angegebenen Kupferkonzentrationen.....	39
Tabelle 9. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 17 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit zusätzlicher Disruption des Gens <i>gshA</i> mit und ohne Zugabe der angegeben Kupferkonzentrationen	41
Tabelle 10. Enzymatisch bestimmter Glutathiongehalt in 17 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen in <i>C. metallidurans</i> mit und ohne Zugabe der angegeben Kupferkonzentrationen.....	43
Tabelle 11. IC ₅₀ -Werte mit Standardabweichungen der <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme von <i>C. metallidurans</i> AE104 auf gold- und kupferhaltigen Medien	47
Tabelle 12. IC ₅₀ -Werte mit Standardabweichungen der <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme von <i>C. metallidurans</i> AE104 auf gold- und kupferhaltigen Medien mit zusätzlicher Disruption in <i>gshA</i>	48
Tabelle 13. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 15 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen.....	50
Tabelle 14. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 17 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit zusätzlicher Disruption in <i>gshA</i>	52
Tabelle 15. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 15 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen.....	54
Tabelle 16. Goldgehalt in Deletionsstämmen der Kupferhomöostase mit zusätzlicher Disruption in <i>gshA</i>	56
Tabelle 17. Enzymatisch bestimmter Glutathiongehalt in 15 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen in <i>C. metallidurans</i>	58
Tabelle 18. Enzymatisch bestimmter Glutathiongehalt in 17 <i>cop</i> -, <i>cup</i> -, <i>cus</i> - und <i>gig</i> -Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit komplementierter Disruption in <i>gshA</i>	60

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Kupferhomöostase in <i>E. coli</i>	7
Abbildung 2. Schematische Darstellung der genetischen Organisation verschiedener Kupfer- und Goldresistenzsysteme.....	10
Abbildung 3. Deletion von <i>gshA</i> in <i>C. metallidurans</i> mithilfe des <i>cre-lox</i> Systems, nach Marx und Lidstrom.....	32
Abbildung 4. β -Gal-Assay mit <i>cusF-lacZ</i> Fusionsstämmen unter Zugabe von Kupferchlorid.....	44
Abbildung 5. β -Gal-Assay mit <i>gigT-lacZ</i> Fusionsstämmen unter Zugabe von Kupferchlorid.....	45
Abbildung 6. β -Gal-Assay mit <i>gigT-lacZ</i> Fusionsstämmen unter Zugabe von AuHCl_4	62
Abbildung 7. β -Gal-Assay mit <i>cusF-lacZ</i> Fusionsstämmen unter Zugabe von AuHCl_4	63
Abbildung 8. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit Gold inkubierten Zelle des Stammes AE104.....	65
Abbildung 9. STEM-Aufnahme einer mit Gold inkubierten Zelle des Stamms AE104.....	66
Abbildung 10. EDX-Spektrum der Elementanalyse des markierten Partikels aus Abbildung 9.....	67
Abbildung 11. Modell der Kupferhomöostase in <i>C. metallidurans</i>	89
Abbildung 12. Goldhomöostase in <i>C. metallidurans</i>	79
Abbildung 13. Nachweis der Deletion des Gens <i>gshA</i> im Stamm AE104 durch DNA::DNA-Hybridisierung.....	xvii
Abbildung 14. Wachstumskurve der Stämme AE104 und DN861 auf goldhaltigem Medium.....	xvii
Abbildung 15. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von GigA aus <i>C. metallidurans</i>	xviii
Abbildung 16. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von GigB aus <i>C. metallidurans</i>	xviii
Abbildung 17. Analyse der Domänen des Proteins GigB aus <i>C. metallidurans</i> mit InterProScan.....	xix
Abbildung 18. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von GigT aus <i>C. metallidurans</i>	xix
Abbildung 19. Analyse der Domänen des Proteins GigT aus <i>C. metallidurans</i> mit InterProScan.....	xix
Abbildung 20. Analyse der N-terminalen Signalpeptidesequenz von GigP aus <i>C. metallidurans</i> durch SignalP 6.0.....	xx
Abbildung 21. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von CopB aus <i>C. metallidurans</i>	xx
Abbildung 22. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von PcoB aus <i>Caulobacter crescentus</i>	xxi
Abbildung 23. Kombinierte HAADF/STEM-Aufnahme mit EDX-Analyse eines potenziellen Goldnanopartikels im Stamm AE104.....	xxi
Abbildung 24. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 ohne Zugabe von Kupfer.....	xxii
Abbildung 25. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 ohne Zugabe von Kupfer nach dem Abtöten mit Propanol.....	xxii
Abbildung 26. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 mit Zugabe von Kupfer.....	xxii
Abbildung 27. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 mit Zugabe von Kupfer nach dem Abtöten mit Propanol.....	xxii

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, die im Duden verzeichnet sind, sowie SI-Einheiten und Präfixe werden hier nicht aufgeführt.

A	Alanin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cystein
Csp	Kupferspeicherprotein
CSPD	3-(1-Chloro-3'-methoxyspiro[adamantan-4,4'-dioxetan]-3'-yl)phenyl]-dihydrogenphosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Desoxycholat
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EM	Elektronenmikroskop
ESH	<i>Eukaryotic Sterol Homeostasis</i>
ETK	Elektronentransportkette
GSH	Reduzierte Form des Glutathions
GSSG	Oxidierter Form des Glutathions
H	Histidin
HAADF	<i>High Angle Annular Dark Field</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HAE	<i>Hydrophile Amphiphile Efflux</i>
HME	<i>Heavy Metal Efflux</i>
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50 %
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid
LB(-Medium)	Luria Bertani(-Medium)
M	Methionin
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n. b.	nicht bestimmbar
OD	Optische Dichte
ONPG	Ortho-Nitrophenol-β-D-Galactopyranosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
RND	<i>Resistance Nodulation Cell Division</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCB	Natrium-Kakodylat- Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSA	Sulfosalicylsäure
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
(S)TEM	<i>(Scanning) Transmission Electron Microscope</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TG	Trockengewicht
TMM	TRIS-gepuffertes Minimalmedium
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

1. Einleitung

Die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen stellt für Organismen eine wesentliche Eigenschaft zur Sicherstellung des eigenen Überlebens dar. Dabei kommt es zu Veränderungen des Stoffwechsels, der Expression von Genen oder zu morphologischen Modifikationen (BROOKS *et al.* 2011). Die Konkurrenz um Substrate wie kohlenstoffhaltige Verbindungen und deren effiziente Umsetzung ist eine der wesentlichen Charakteristika, um in der von einem Organismus ausgefüllten ökologische Nische zu gedeihen. Neben Umweltfaktoren wie dem pH-Wert, der Temperatur oder Licht ist die Balance essenzieller aber in zu hohem Maße toxischen Substanzen ein wichtiger Aspekt. Zu diesen wichtigen Substanzen zählen auch Metalle.

In der ersten Hauptgruppe des Periodensystems finden sich physiologisch relevante Alkalimetalle, die weniger als katalytische Kofaktoren, sondern auch zur Steuerung zellulärer Prozesse wie Membranpotentialen dienen (HELLGREN *et al.* 2006; SHI *et al.* 2006; STRATFORD *et al.* 2019). Insbesondere Kalium spielt hier für die bakterielle Osmoregulation und Signaltransduktion in Biofilmen eine Rolle (EPSTEIN 1986; PRINDLE *et al.* 2015). In der zweiten Hauptgruppe finden sich Erdalkalimetalle wie Magnesium oder Calcium, die beispielsweise für die Aktivität von Polymerasen, als Signalmolekül, zur Anheftung an Oberflächen oder im Falle von Magnesium als Gegenion für ATP wichtig sind (DOMINGUEZ 2004; YANG *et al.* 2004; CRUZ *et al.* 2012; KING *et al.* 2020). Übergangsmetalle wie Eisen, Zink, Mangan, Kobalt oder Kupfer sind wichtige Kofaktoren für Enzyme und nehmen in der Redoxchemie und Regulation des Genoms eine entscheidende Rolle ein (MENON UND RAGSDALE 1998; JOHNSON 2006; KLUG 2010). Die Homöostase zwischen der erforderlichen essenziellen Menge und der Vermeidung von zu hohen toxischen intrazellulären Konzentrationen im nano- bis millimolaren Bereich ist für die Funktion der Zelle entscheidend.

Neben den essenziellen Metallen gibt es außerdem Schwermetalle wie Quecksilber, Gold oder Blei, die für die Zelle keinen Nutzen haben und deren effektive Entgiftung in Schwermetall-belasteten Lebensräumen eine Voraussetzung darstellt, um hier überleben zu können (ROANE UND KELLOGG 1996). Aus diesem Grund haben sich Resistenzsysteme in Organismen entwickelt.

Kupfer kann in den Oxidationszuständen +1 und +2 vorliegen und damit Elektronen je nach Zustand aufnehmen oder abgeben. Damit ist es wie Eisen ein redoxaktives Metall. In Proteinen gebunden kann Kupfer zur Redoxbiochemie der Zelle beitragen. Einer der prominentesten Vertreter in Bakterien sind kupferhaltige Cytochrom-c-Oxidasen (SPENO *et al.* 1995). Diese sind in die inneren Membranen eingebettet und vermitteln in aeroben Bakterien die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser nachdem Elektronen von oxidierten Cytochromen über die Kupferzentren geleitet wurden (GARCÍA-HORSMAN *et al.* 1994; SPENO *et al.* 1995; ROBINSON *et al.* 1999; HAMADA *et al.* 2014). Dabei beteiligen sie sich zusätzlich am Aufbau des zellulären Protonengradienten. Je nach Kofaktor gibt es Cytochrom-Oxidasen der Typen *cbb*₃, *caa*₃, *ba*₃ und *aa*₃. Diese gehören zur Superfamilie der Häm-Kupferoxidasen (SOULIMANE *et al.* 2000; PITCHER UND WATMOUGH 2004; SOUSA *et al.* 2012).

Bakterielle Cuproenzyme kommen auch im Stickstoffmetabolismus vor. Hier finden sich Nitrit-Reduktasen, Stickstoffmonoxid-Reduktasen und Distickstoffmonoxid-Reduktasen (MESSERSCHMIDT *et*

al. 1993; EINSLE *et al.* 1999; BROWN *et al.* 2000; ZUMFT 2005). Außerdem gibt es unter anderem Tyrosinasen, Laccasen, Multikupferoxidasen und Aminoxidasen, die jeweils Kupfer als Kofaktoren enthalten (WILMOT *et al.* 1997; HUFFMAN *et al.* 2002; CLAUS 2003; MATOBA *et al.* 2006; DJOKO *et al.* 2008). Cu-Zn-Superoxiddismutasen sind für die Entgiftung von Superoxidanionen verantwortlich, indem sie schädliche Superoxidanionen zu Sauerstoff umwandeln. Sie kommen in vielen aeroben Bakterien wie *Neisseria* oder fakultativ anaerob lebenden Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Actinobacillus* vor (KROLL *et al.* 1995; GORT *et al.* 1999).

An der Entstehung von Superoxidanionen ist Kupfer ebenfalls beteiligt (SPEISKY *et al.* 2009). Dabei kann Kupfer Reaktionen mit diesen Anionen eingehen, wodurch Cu(II) zu Cu(I) reduziert wird. Alternativ reagiert das Superoxidanionen mit Wasserstoffperoxid zu molekularem Sauerstoff, einem Hydroxidion und einem Hydroxylradikal. Diese Reaktion wird nach ihren Entdeckern Haber-Weiss-Reaktion genannt (HABER UND WEISS 1932). Cu(I) ist ebenfalls in der Lage mit dem entstandenen Wasserstoffperoxid zu reagieren. Dabei wird es selbst oxidiert und Wasserstoffperoxid wird zu einem Hydroxylion und einem Hydroxylradikal gespalten. Diese Reaktion, die im klassischen Sinne mit Eisenionen abläuft, wird Fenton-Reaktion genannt (FENTON 1876).

Des Weiteren können Kupferionen ebenfalls Eisenionen aus Eisen-Schwefel-Zentren verdrängen. Dadurch können die freierwerdenden Eisenionen wiederum Fenton-Reaktionen eingehen und so einen sekundären toxischen Effekt auslösen (MACOMBER UND IMLAY 2009; IMLAY 2014). Die freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies können wiederum die DNA schädigen (IMLAY UND LINN 1988; KEYER UND IMLAY 1996). Das falsche Besetzen von Bindestellen wird *mismetallation* genannt. Dieser Prozess kann nicht nur an Eisenbindestellen, sondern auch Zink-, Kobalt- oder Manganbindestellen auftreten was durch die höhere Stabilität von Kupfer zu diesen Bindestellen begründet (IRVING UND WILLIAMS 1953).

Die toxische Wirkung von Kupfer beeinflusst oft Enzyme, die Eisen-Schwefel-Zentren als katalytisch funktionale Gruppen benötigen, da diese häufig in Zellen vorkommen. Dazu zählt auch die Glutamatsynthese welche für die Synthese von Glutamat aus Glutamin und α -Ketoglutarat durch Transaminierung verantwortlich ist und Eisen-Schwefel-Cluster sowie Flavine als Kofaktoren besitzt (MILLER UND STADTMAN 1972). Das Enzym kann als Stressindikator genutzt werden. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym durch Stickstoffmonoxid und Kupfer gehemmt wird (BRANDES *et al.* 2007; DJOKO *et al.* 2017). Kupferionen sind ebenfalls in der Lage an Thiole wie Cystein oder das Tripeptid Glutathion im Cytoplasma zu binden und diese so zu oxidieren (RIGO *et al.* 2004; NGAMCHUEA *et al.* 2016). Dies fördert in der Zelle die Bildung von schädlichen Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, die zu einem inaktiven Protein führen können (STOHS UND BAGCHI 1995; BERKMEN 2012; HATAHET *et al.* 2014). Proteinaggregation könnte so gefördert werden und ist vor allem unter anaeroben Bedingungen zu beobachten, in denen mehr Cu(I) vorliegt (ZUILY *et al.* 2022).

Anhand der vielfältigen zellulären toxischen Effekt durch Kupfer ist es für Bakterien essenziell ist, die Aufnahme von Kupferionen strikt zu kontrollieren und bei hohem Einstrom die Ionen direkt zu binden oder sofort zu exportieren. Cu(II) könnte über Porine ins Periplasma aufgenommen werden (ANDREI *et al.* 2020). Von dort könnte der Weg ins Cytoplasma über Importer der ZIP-Familie, die zweiwertige Ionen wie Fe(II), Mn(II) oder Zn(II) transportieren, führen. Ein Beispiel hierfür ist ZupT aus *E. coli* (GRASS

et al. 2002). Alternativ könnte Cu(I) aus dem Periplasma über Natrium-Importer in die Zelle gelangen. Eine Vermutung ist, dass Cu(I) über diese Importer besser ins Cytoplasma aufgenommen wird und daher toxischer für Zellen ist als Cu(II) (OUTTEN *et al.* 2001; GRASS *et al.* 2005). Der Oxidationszustand der Ionen könnte daher eine Rolle bei der Kupferaufnahme spielen. Anstelle des Imports über Importer, die ein breites Substratspektrum besitzen, gibt es auch Wege, um Kupfer direkt an die benötigten Stellen im zellulären Metabolismus zu führen. So gibt es im α -Proteobakterium *Rhodobacter capsulatus* das kupferimportierende Protein CcoA. Dieses spielt eine wichtige Rolle für den Import von Kupferionen, die in das Kupferzentrum B der Cytochrom-Oxidase vom Typ *cbb₃* eingebaut werden (KHALFAOUI-HASSANI *et al.* 2018). In *E. coli* erfolgt die Aufnahme von Kupfer über das Siderophor Yersiniabactin, das Ionen außerhalb der Zelle komplexiert (KOH *et al.* 2017). Die Aufnahme von Kupfer kann ebenso durch komplexierende Chalkophore erfolgen. Diese wurden in methanotrophen Bakterien wie *Methylococcus capsulatus* oder *Methylosinus trichosporium* gefunden (HAKEMIAN *et al.* 2005; CHOI *et al.* 2010; KOH *et al.* 2017). Dabei werden Kupferionen außerhalb der Zelle komplexiert und über einen TonB-abhängigen Importprozess über die äußere Membran transportiert und dann über einen ABC-Transporter ins Cytoplasma importiert (HAKEMIAN *et al.* 2005; CHOI *et al.* 2010; EL GHAZOUANI *et al.* 2011; GU *et al.* 2016; KOH *et al.* 2017).

Im Periplasma könnte der Import ins Cytoplasma wie angesprochen vom Oxidationszustand der Kupferionen abhängen. Die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) wird durch Multikupferoxidasen geleistet. Diese Enzyme besitzen Kupferzentren mit katalytischen Funktionen in der Kupferoxidation (SOLOMON *et al.* 1996). Die Multikupferoxidase CueO aus *E. coli* besitzt vier Kupferzentren (T1-4), wobei T3 mit zwei Kupferatomen besetzt ist und jedes weitere mit einem. T1 ist für die Oxidation von Kupfer relevant und T2 und T3 für die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird (DJOKO *et al.* 2010). Das Enzym gehört zu den Laccasen, die in ihrer ursprünglichen Rolle für die Oxidation von phenolischen Substraten wichtig sind. CueO ist in der Lage die Oxidation zu katalysieren, allerdings wird das für die Oxidation von phenolischen Substraten erforderliche T4 durch eine Methionin-reiche Helix blockiert. Wird diese durch Teildeletion des Bereichs aus dem Protein entfernt, können T1 und T4 interagieren und die Reaktion kann stattfinden (DJOKO *et al.* 2010).

Das Bakterium *Cupriavidus metallidurans* ist ein Modellorganismus für die Erforschung bakterieller Metallresistenzen und wurde in einer Zinkhütte in Belgien isoliert (MERGEAY *et al.* 1985). Er gehört zu den Gram-negativen β -Proteobakterien der Familie der *Burkholderiaceae*. Der Wildtypstamm wird als CH34 bezeichnet und besitzt diverse Determinanten, die Resistenzen gegen Schwermetalle wie Kupfer, Zink, Nickel, Cadmium und Cobalt (NIES *et al.* 1987; MONCHY *et al.* 2006) codieren. Beispiele sind *czc* (Cobalt, Zink, Cadmium), *cnr* (Cobalt, Nickel) und *cop* (Kupfer). Dabei liegen diese Determinanten auf den Plasmiden pMOL28 und pMOL30 (NIES 1992; LIESEGANG *et al.* 1993; MONCHY *et al.* 2006). Zusätzlich zum Wildtypstamm CH34 gibt das plasmidfreie Derivat AE104, das diese Plasmide nicht enthält. Auf dem Chromosom von *C. metallidurans* befindet sich eine weitere *cop*-Determinante. Dieses wird als *cop₂*-Cluster bezeichnet und ist nicht identisch zum *cop₁*-Cluster auf dem Megaplasmid pMOL30. Beide Determinanten codieren für eine Kupferoxidase (CopA₁ bzw. CopA₂).

Die Identität der beiden Proteine beträgt 77 %. Auf dem Megaplasmid pMOL30 im Stamm CH34 sind weitere putative Kupferresistenzgene Teil der *cop*₁-Determinante. Diese fehlen auf dem Chromosom und sind daher im Stamm AE104 nicht vorhanden. *CopA*₁ und *copA*₂ liegen jeweils in einem Operon *copABCD*, wobei stromabwärts von *copD*₁ zusätzlich das Gen *copI* liegt. Stromaufwärts beider Cluster liegt ein Zweikomponentensystem *copRS*, das vermutlich für die Regulation von *copA* in *C. metallidurans* verantwortlich ist (GROBE *et al.* 2023).

Im Unterschied dazu gibt es ein solches System in *E. coli* nicht. Hier wird die Regulation des orthologen Gens *cueO*, das für eine Multikupferoxidase codiert, durch den MerR-ähnlichen Regulator CueR übernommen (OUTTEN *et al.* 2001). Zusätzliche Resistenzgene können in *E. coli* über das Plasmid pRJ1004 von den Genen *pcoABCDE* vermittelt werden (BROWN *et al.* 1995; ROUCH UND BROWN 1997). Das Gen *pcoA* codiert für eine Multikupferoxidase wie CueO bzw. CopA aus *C. metallidurans* (DJOKO *et al.* 2008). PcoB ist ein β -Fass-Protein in der äußeren Membran und vermutlich an der Aufnahme von Kupfer beteiligt (LI *et al.* 2022b). PcoC und PcoD könnten an der Aufnahme von Kupfer beteiligt sein (HUFFMAN *et al.* 2002). PcoE kann bisher keine Funktion zugewiesen werden. *pcoABCD* bilden vermutlich ein Operon und werden durch das Zweikomponentensystem PcoRS reguliert. Dieses liegt in unmittelbarer Nähe. *PcoE* liegt außerhalb des Operons und besitzt einen eigenen Promotor. Die Induktion erfolgt über das Zweikomponentensystem CusRS, das ebenfalls auf dem Plasmid codiert ist (BROWN *et al.* 1995; MUNSON *et al.* 2000). Determinanten mit großer Ähnlichkeit zu CusRS sind auch aus den pflanzenpathogenen γ -Proteobakterien *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* und *Xanthomonas campestris* bekannt (MELLANO UND COOKSEY 1988; BROWN *et al.* 1992; COOKSEY 1993).

Neben dem Gleichgewicht zwischen Cu(I) und Cu(II) innerhalb des Periplasmas ist der Export von überschüssigen Kupferionen aus diesem ein weiterer wichtiger Faktor der Homöostase. In *C. metallidurans* ist dafür der CusCBA-Komplex verantwortlich. Die Stöchiometrie ist CusC₃B₆A₃. Dabei bildet der *outer membrane factor* CusC einen Kanal in der äußeren Membran und ermöglicht so den Export von Kupfer aus der Zelle. Das RND-Protein CusA nutzt für den Export den von der Zelle aufgebauten Protonengradienten als Energiequelle, um Kupferionen über das *membrane fusion protein* CusB zu exportieren. Die RND-Proteine sind in sieben verschiedene Familien unterteilt. Diese haben sekretorische Funktionen (SecDF-Familie) oder können diverse hydrophobe und amphiphile Substrate transportieren (HAE1-, HAE2- und HAE3-Familie), der Funktionen in der Zellteilung haben (NFE-Familie) oder der eukaryotischen Sterol-Homöosatase (ESH-Familie). CusA gehört zur HME-Familie, die für den Export von Schwermetallionen verantwortlich sind (NIES 2006). Dabei kommen die RND-Proteine in Bakterien, Archaeaen und Eukaryoten vor, jedoch nicht alle Proteinfamilien in all diesen Taxa (TSENG *et al.* 1999). RND-Proteine können auch in der bakteriellen Antibiotikaresistenz beteiligt sein (FERNANDO UND KUMAR 2013; ANES *et al.* 2015).

Die Proteinstruktur des CusCBA-Komplexes wurde in *E. coli* bereits analysiert (LONG *et al.* 2010; SU *et al.* 2011; LEI *et al.* 2014). Anhand der Kristallstruktur von CusA wird vermutet, dass Kupfer über einen Methionin-abhängigen Weg über CusA zu CusB geleitet und von dort über das Kanalprotein CusC exportiert werden könnte (LONG *et al.* 2010). In *C. metallidurans* werden die Gene *cusDCBAF* in einem

Operon organisiert. In *E. coli* besteht das Operon aus den Genen *cusCFBA*, ein zu *cusD* orthologes Gen konnte nicht identifiziert werden. Das Protein CusF aus *E. coli* ist ein kupferbindendes Chaperon und leitet vermutlich Ionen zu CusA. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren H36, M47 und M49 für die Bindung von Cu(I) an CusF wichtig sind (LOFTIN *et al.* 2005). Für den CusCBA-Komplex aus *E. coli* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass er an der Resistenz gegen Ag(I) beteiligt ist (FRANKE *et al.* 2001). Die Regulation des Operons in *E. coli* erfolgt über das in der genetischen Umgebung gelegene Zweikomponentensystem CusRS, das Kupfer im Periplasma sensiert (RISMONDO *et al.* 2023). In *C. metallidurans* ist kein System bekannt, das diese Funktion übernimmt und so das entsprechende Operon reguliert. Es besteht die Vermutung, dass die Sensierung von einem anderen System übernommen wird. CopRS scheint in diesem Vorgang nicht beteiligt zu sein (PREUßNER 2023).

P-Typ ATPasen findet sich in allen Lebewesen, von Bakterien bis zum Menschen (RENSING *et al.* 2000; JORDAN *et al.* 2001; ARGÜELLO 2003; DE HERTOOGH *et al.* 2004). Eine Veränderung der kupferexportierenden ATPase ATP7B im Menschen hat die Ausprägung von Morbus Wilson, für den eine Kupferanreicherung in der Leber charakteristisch ist (CHANG UND HAHN 2017). Eine Mutation im Gen *atp7a* führt zur Menkes-Krankheit, bei der ebenfalls eine gestörte Kupferhomöostase im menschlichen Körper vorliegt (MENKES *et al.* 1962).

In pathogenen Bakterien spielt die Persistenz im humanen Wirt eine große Rolle. Hier werden von Makrophagen phagozytierte Bakterien Kupferstress ausgesetzt, um sie abzutöten. Makrophagen transportieren Kupfer in Phagosomen, in denen sich die phagozytierten Bakterien befinden. Der Export durch ATPasen stellt hier für die Bakterien neben anderen Faktoren eine wichtige Eigenschaft dar, um in einem Wirt überleben zu können (WHITE *et al.* 2009; STAFFORD *et al.* 2013; LADOMERSKY *et al.* 2017).

CopA aus *E. coli* kann Cu(I) über die innere Membran transportieren. Eine ATPase, die Cu(II) exportiert, besitzt der Organismus nicht. Eine solche findet sich im thermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidis* (MANA-CAPELLI *et al.* 2003). In gram-negativen Bakterien stellt das Periplasma zunächst eine Barriere dar, die von Ionen passiert werden muss. Der cytoplasmatische Export kann in Bakterien über P-Typ ATPasen bewerkstelligt werden. Diese können Ionen entgegen dem Gradienten über die innere Membran unter Aufwand von ATP exportieren. Schwermetall-exportierende ATPasen gehören zu den P_{IB}-ATPasen. Zu diesen zählen Vertreter aus *C. metallidurans* wie CadA (Cadmium), ZntA (Zink) oder CupA (Kupfer) (LEGATZKI *et al.* 2003; WIESEMANN *et al.* 2017; SCHULZ *et al.* 2021).

Im Cytoplasma können Kupferionen von Chaperonen komplexiert werden. Diese haben die Aufgabe Kupferionen zu den korrespondierenden ATPasen zu bringen und so den Efflux zu erleichtern. Beispiele hierfür sind CopZ aus dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* und CopZ aus *E. coli*. Im letzteren Fall entstehen Chaperon und ATPase durch eine Leserahmenverschiebung aus derselben mRNA (BANCI *et al.* 2001; BANCI *et al.* 2003; DREES *et al.* 2017; MEYDAN *et al.* 2017). Die Regulation der *copA*-Expression wird in *E. coli* vom Regulator CueR übernommen, der auch *cueO* reguliert. Eine graphische Zusammenfassung der wichtigsten Faktoren der Kupferhomöostase in *E. coli* ist in Abbildung 1 gezeigt.

In *C. metallidurans* gibt es ebenfalls eine kupferexportierende P-Typ ATPase (CupA) und ein Chaperon (CupC) (WIESEMANN *et al.* 2017) welche von zwei gleichnamigen Genen codiert werden. Die

Regulation erfolgt über den MerR-ähnlichen Regulator CupR. Sind keine oder wenig Kupferionen in der Zelle vorhanden, bindet dieser an die DNA und blockiert somit die Transkription durch die RNA-Polymerase (BROWN *et al.* 2003). An den Regulator gebundene Kupferionen führen zu einer Konformationsänderung der DNA und machen diesen für die RNA-Polymerase zugänglich. Die Bindung von Kupfer an cytoplasmatische Chaperone wie CupC dient als Puffer, damit die schädliche Wirkung der Ionen verringert werden kann (MEYDAN *et al.* 2017).

Eine weitere Möglichkeit Kupferionen im Cytoplasma zu binden besteht durch das Tripeptid Glutathion (STEWART *et al.* 2020). Dieses wird aus den Aminosäuren Cystein, Glutamat und Glycin in einer zweischrittigen Synthese unter Verwendung von ATP synthetisiert. Im Cytoplasma liegt Glutathion in seiner reduzierten Form (GSH) vor. Cu(II), das unter aeroben Bedingungen in die Zelle migriert, wird gebunden und zu Cu(I) reduziert oder wird schon im Periplasma reduziert und migriert danach ins Cytoplasma. Dort entsteht ein Komplex (GS-Cu(I)-SG), der als temporärer Puffer für Kupferionen dient. Der Komplex ist aber gleichzeitig Quelle für zusätzlichen oxidativen Stress in der Zelle (SPEISKY *et al.* 2009).

Weitere Mechanismen zum Puffern von überschüssigem Kupfer bieten zum einen Kupferspeicherproteine. Diese wurden im methanotrophen Bakterium *Methylosinus trichosporium* gefunden (VITA *et al.* 2015). Diese Proteine finden sich sowohl im Peri- als auch im Cytoplasma. Es wurden drei Proteine gefunden. Csp1 und 2 kommen im Periplasma vor, Csp3 im Cytoplasma. Der Transport aus dem Cytoplasma ins Periplasma über das TAT-System könnte ein Mechanismus zur Reduktion von cytoplasmatischem Kupfer sein. Die Speicherung könnte zur Reserve von Kupfer als alternativem Kofaktor für Enzyme dienen, wenn wichtiges Eisen fehlt (VITA *et al.* 2015). Ein weiterer Aspekt ist die Rolle von Polyphosphaten. Dabei handelt es sich um langkettige Phosphate, die in der Lage sind, Metalle zu binden. In *E. coli* wurden diese in Verbindung mit der Resistenz gegen Cadmium gebracht (KEASLING UND HUPF 1996). Ein Mechanismus könnte die Bindung von Metallen an Polyphosphate zusammen mit der Degradierung des Polymers zu Orthophosphat und dem anschließenden Export aus dem Cytoplasma sein (KEASLING 1997). Diese Faktoren wurden auch in *Cupriavidus*-Spezies wie *C. necator* oder nahen Verwandten aus β -Proteobakterien gefunden und sind nicht nur in *E. coli* zu finden (TUMLIRSCH *et al.* 2015; ANTOINE *et al.* 2019).

EINLEITUNG

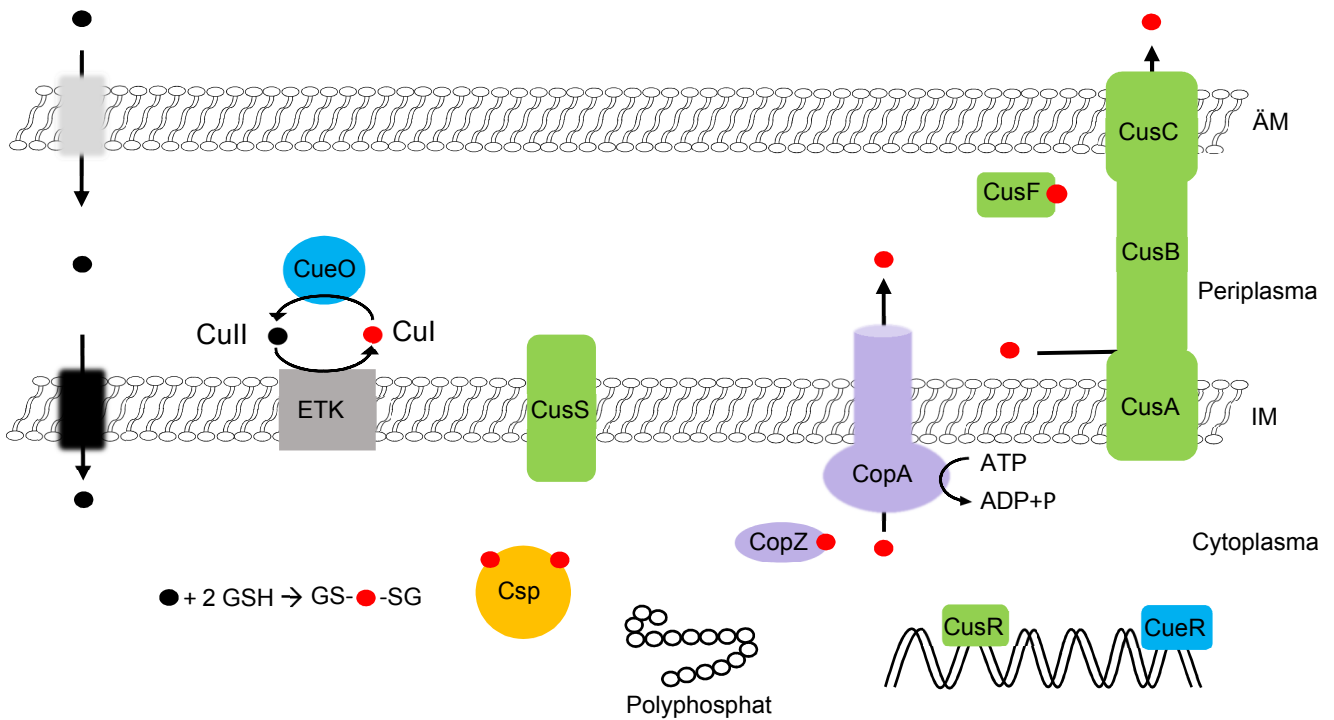


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Kupferhomöostase in *E. coli*. Cu(II) (schwarze Kugeln) gelangt über Porine (grauer Kasten) über die äußere Membran (ÄM) ins Periplasma. Von dort gelangt es über Importer der ZIP-Familie (schwarzer Kasten) über die innere Membran (IM) ins Cytoplasma, wird dort von reduziertem Glutathion (GSH) gebunden und zu Cu(I) (rote Kugeln) reduziert (GRASS *et al.* 2002; GRASS *et al.* 2005). Alternativ wird es an Kupferspeicherproteine (Csp) oder Polyphosphat (weiße Kugeln) gebunden. Cu(II) kann im Periplasma an der Elektronentransportkette (ETK) reduziert werden. Dem wirkt die Kupferoxidase CueO entgegen. Cu(I) kann über Importer für einwertige Kationen in die Zelle aufgenommen werden (OUTTEN *et al.* 2001). Unter Kupferstress werden die Gene *cueO* und *copA* von CueR hochreguliert, das Cus-Operon wird über das Zweikomponentensystem CusRS hochreguliert. Im Cytoplasma bindet Kupfer an das Chaperon CopZ und wird dadurch zur ATPase CopA geleitet. Hier erfolgt der Export ins Periplasma. Cu(I) wird hier durch das Chaperon CusF gebunden und zum RND-System CusCBA geleitet. Über Energie aus dem Protonengradienten wird Cu(I) durch CusCBA aus der Zelle exportiert.

Gold spielt im Vergleich zu Kupfer eine untergeordnete Rolle im zellulären Metabolismus. Gold kommt in den Oxidationszuständen +I und +III in der Natur vor. Eine herausragende Eigenschaft von Gold ist sein hohes Standardpotential. Dieses liegt bei der Reduktion von Au(I) zu Au(0) bzw. Au(III) zu Au(0) unter Standardbedingungen bei $E_0 = +1,692 \text{ V}$ bzw. $E_0 = +1,498 \text{ V}$. Damit liegt das Potential höher als das von Sauerstoff bei der Reduktion zu Wasser mit $E_0 = +1,229 \text{ V}$ (WEAST *et al.* 1983). Dies bedeutet, dass Goldionen in Wasser nicht stabil sind und Wasser als Reduktionsmittel nutzen können. Dieser Vorgang kann beispielsweise durch Komplexierung der Goldionen durch Chloridionen unter sauren Bedingungen verlangsamt werden. Die Stabilität der Goldionen in Komplexen ist stark von den umgebenden Liganden und den Bedingungen abhängig. In wässrig-neutralen Lösungen kann ein $[\text{AuCl}_4]^-$ -Komplex langsam zu einem $[\text{AuCl}_x\text{OH}_y]$ -Komplex werden. Dabei hängt das Verhältnis der Chlorid- zu den Hydroxidionen im Komplex vom pH-Wert ab. Je basischer das Medium, desto mehr Hydroxidionen befinden sich im Komplex (ĐUROVIĆ *et al.* 2017).

Über die Beteiligung von Gold als Kofaktor in Enzymen oder als Strukturelement ist wenig bekannt. Lediglich im Bakterium *Micrococcus luteus* gibt es eine membrangebundene NADH-Oxidase, die Gold als Kofaktor besitzt (LEVCHENKO *et al.* 2000; LEVCHENKO *et al.* 2001). Dieses scheint wichtig bei der

Methanoxidation zu sein. Dabei bindet Gold an Methan und aktiviert dieses für die anschließende Oxidation zu Methanol (LEVCHENKO *et al.* 2002). Bei der Oxidation wird etwa die Hälfte des Methans irreversibel zu Methanol oxidiert. Die andere Hälfte könnte zu anderen Produkten wie Formaldehyd reagieren. Dies wurde durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Kohlenstoff und chromatographischen Methoden gezeigt. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Methanoxidation vom Vorhandensein des Proteins gezeigt werden (LEVCHENKO *et al.* 2002). Allerdings fehlt der direkte Nachweis einer Bindung von Gold an das Protein.

Gold ist in komplexierter Form für Zellen toxisch (PAN *et al.* 2009; NARDON *et al.* 2014). Dies wird zum einen durch die thermodynamisch hohe Bereitschaft selbst reduziert zu werden bedingt, wodurch Gold ein Auslöser für oxidativen Stress in der Zelle (REITH *et al.* 2009; REITH *et al.* 2013; WIESEMANN *et al.* 2013; ZAMMIT *et al.* 2016). Zum anderen kann Gold aktive Zentren von Enzymen besetzen und diese so inhibieren. Beide Mechanismen könnten zur Inhibierung wichtiger Enzyme durch Spaltung von Disulfidbrücken führen. Infolge dessen stirbt die Zelle durch eine Störung kataboler Stoffwechselwege (WITKIEWICZ UND SHAW 1981; KARTHIKEYAN UND BEVERIDGE 2002; REITH *et al.* 2007). Ebenso ist eine Schädigung der DNA möglich (PATEL *et al.* 2013). Mikroorganismen haben deshalb Möglichkeiten zur Abwehr entwickelt, um sich gegen die toxische Wirkung von Gold zu schützen. Im Cytoplasma der Zelle kann Gold von Glutathion gebunden werden. Die dabei entstehenden linearen Komplexe (GS-Au(I)-SG) sind stabil und könnten sich in der Zelle anreichern. Glutathion-Gold-Komplexe können auch aus Gold-Komplexen mit anderen Liganden entstehen. Dabei wird der vorhandene Ligand durch Glutathion substituiert (MIRONOV UND KHARLAMOVA 2020; JIANG *et al.* 2023). Au(III) wird bei der Bindung an Glutathion zunächst reduziert, falls dies nicht durch die Bindung an andere Liganden der Fall ist (JIANG *et al.* 2023). Manche Organismen reduzieren Gold zu Nanopartikeln und reichern dieses Gold außerhalb der Zelle an. Damit wird die reaktive ionische Form Au(III) in die metallische chemisch inaktive Form Au (0) umgewandelt. Der Ausgangspunkt sind entweder Au(I) oder Au(III)-Komplexe. Dies kann innerhalb aber auch außerhalb der Zelle passieren. Beispiele dafür sind *Desulfovibrio*, ein Sulfat-reduzierendes Bakterium aber auch Cyanobakterien und Archaeen (KASHEFI *et al.* 2001; LENGKE UND SOUTHAM 2006; LENGKE *et al.* 2006).

In *C. metallidurans* konnte bisher kein spezielles Goldresistenzsystem identifiziert werden, obwohl dieses Bakterien auf Goldkörnchen gefunden werden konnte (REITH *et al.* 2006). Die Megaplasmide pMOL28 und pMOL30 sind nicht für die Goldhomöostase relevant (WIESEMANN *et al.* 2013). Die Stressantwort der Zelle ist scheinbar darauf ausgerichtet den ihr zugefügten Schaden durch oxidativen Stress (beispielsweise an der Membran oder der DNA) zu minimieren. Dies wird durch Expression der *ohr* Gene, die als Antwort auf die Bildung von Wasserstoffperoxid exprimiert werden, sowie die Bildung von Glutathion-S-Transferasen gewährleistet, die die Bindung von Glutathion an Xenobiota fördern (REITH *et al.* 2009; ZAMMIT *et al.* 2016). Zudem spielen die Proteine CupC und CupR, die im *cup*-Operon codiert werden, eine Rolle (JIAN *et al.* 2009; ZAMMIT *et al.* 2016). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass sich Nanopartikel im Periplasma anreichern können. Glutathion scheint dafür ein wichtiger Faktor zu sein (WIESEMANN 2015; WIESEMANN *et al.* 2017).

Im humanpathogenen Bakterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium hat sich ein spezielles Entgiftungssystem für Gold entwickelt. Das bemerkenswerte ist, dass dieser Organismus gar nicht an goldhaltigen Standorten vorkommt. Das System in *S. enterica* besteht aus zwei Operons, die für die ATPase *golT*, das Chaperon *golB* und den Regulator *golS* codieren. *golT* exportiert Goldionen, die von *golB* im Cytoplasma gebunden wurden, unter Verbrauch von ATP über die innere Membran. *golS* ist ein MerR-ähnlicher Regulator, der Gold im Cytoplasma sensiert und die Expression des Operons *golTSB* reguliert (CHECA *et al.* 2007; PONTEL *et al.* 2007; CHECA UND SONCINI 2011).

In unmittelbarer Nähe zu *golTSB* befindet sich das Operon *gesABC*, das für ein RND-Efflux-System codiert. Dieses kann Gold aus dem Periplasma exportieren und steht ebenfalls unter der Kontrolle von *golS* (PONTEL *et al.* 2007). Das Operon *gesABC* stellt ein Divergon zu *golTSB* dar und wird über einen anderen Promotorbereich reguliert. Für die Induktion des *ges*-Operons werden höhere Goldkonzentrationen benötigt als für *golTSB*. Die Zugabe von Kupfer induziert *golB*, wenn das Gen, das für die kupferexportierende ATPase *CopA* codiert, deletiert ist, jedoch nicht *gesABC*. Eine Beteiligung von *gesABC* an der Kupferresistenz kann daher ausgeschlossen werden. Die Deletion von entweder *golTSB* oder *gesABC* führt zu goldsensitiven Phänotypen, dieser Effekt ist in einer Doppelmutante verstärkt (PONTEL *et al.* 2007).

An der Regulation von *gesABC* ist außerdem das Zweikomponentensystem *CpxRA* beteiligt. Es ist in der äußeren Membran lokalisiert. Eine Deletion eines der Gene *cpxR* (Regulatorprotein) oder *cpxA* (Histidin-Kinase) führt zu verminderter Expression des *ges*-Operons. *CpxR* bindet stromaufwärts der -35 Promotorregion. Die Bindung wird durch Phosphorylierung des Regulatorproteins ermöglicht (GERMINATI *et al.* 2017).

In *E. coli* ist das *Cpx*-System für die Aktivierung diverser Gene verantwortlich, unter anderem die Induktion des Efflux-Systems *mdtABC*. Dieses System ist ein Efflux-System, das in Verbindung mit einer Kupfer- und Wolframresistenz gebracht werden konnte. Das jeweilige Operon *mdtABCD* aus *E. coli* beziehungsweise *S. enterica* wird vom Zweikomponentensystem *BaeSR* kontrolliert (NISHINO *et al.* 2007; LEBLANC *et al.* 2011). Hauptsächlich ist *BaeSR* jedoch für die Aktivierung von Genen für die erfolgreiche Bildung von Biofilmen verantwortlich (DOREL *et al.* 2006).

Eine Übersicht der wichtigsten Kupfer- und Goldresistenzsysteme aus *C. metallidurans*, *E. coli* und *S. enterica* ist in Abbildung 2 dargestellt. Dabei stellt *C. metallidurans* den Modellorganismus für Metallresistenz in Gram-negativen Bakterien dar, *E. coli* ist der Modellorganismus für Gram-negative Systeme und *S. enterica* einen Vertreter Gram-negativer pathogener Bakterien mit dem ungewöhnlichen Exportsystem *GesCBA* dar.

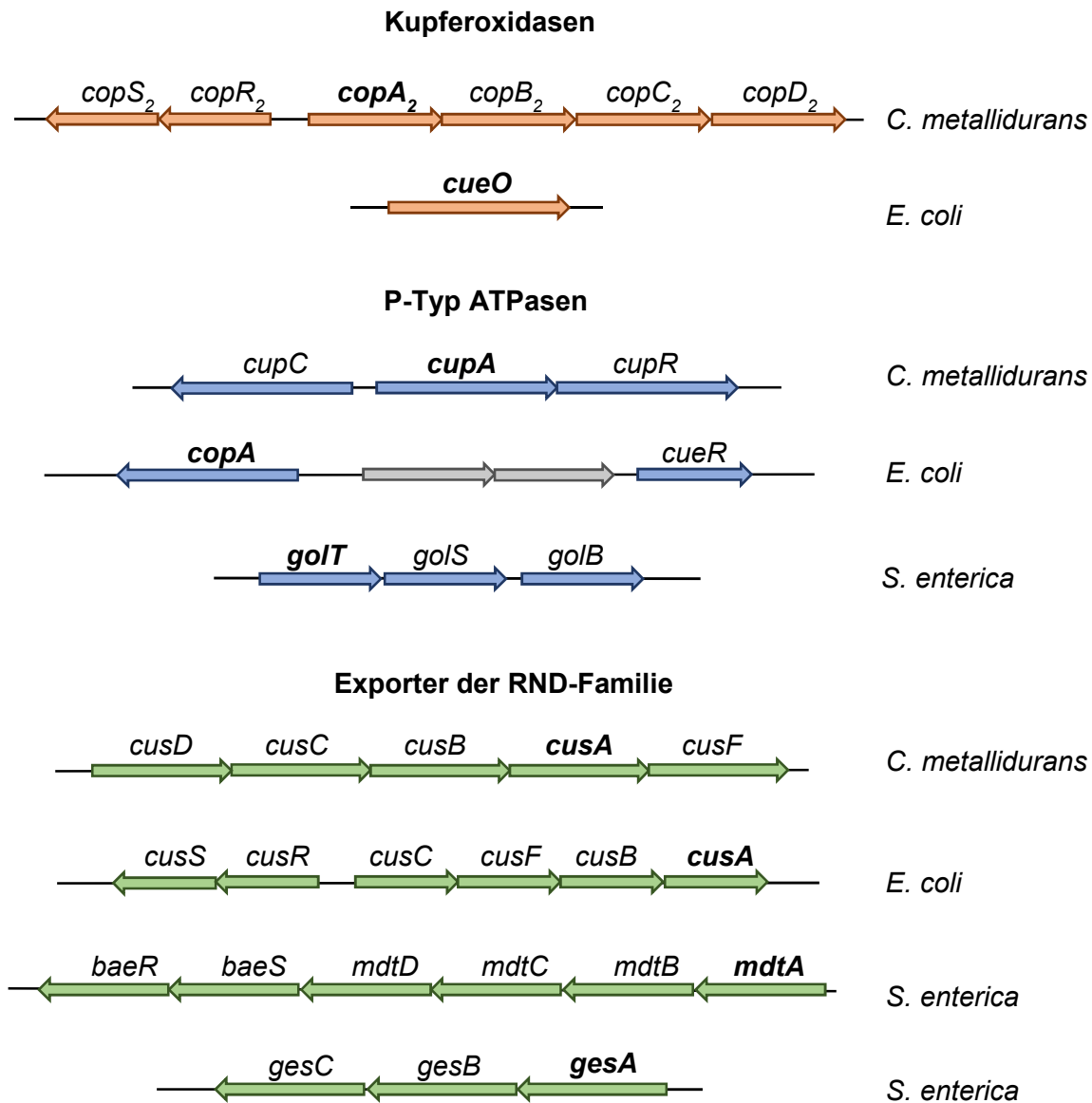


Abbildung 2. Schematische Darstellung der genetischen Organisation verschiedener Kupfer- und Goldresistenzsysteme. In *C. metallidurans* ist das Operon $copA_2B_2C_2D_2$ in direkter Nachbarschaft zum Zweikomponentensystem $copRS$ lokalisiert, das auf Kupferionen im Periplasma reagiert. Das Gen, das für die orthologe Kupferoxidase CueO aus *E. coli* codiert, ist in kein Operon eingebunden und wird durch CueR reguliert (OUTTEN *et al.* 2001). Die P-Typ ATPase CupA aus *C. metallidurans* liegt im Divergon $cupC/AR$, die Regulation erfolgt über den MerR-ähnlichen Regulator CupR, der Goldionen bindet (JIAN *et al.* 2009). In *E. coli* wird $copA$ nicht in einem Operon codiert. Die Regulation erfolgt wie bei $cueO$ durch CueR (STOYANOV *et al.* 2001). Das goldexportierende System $golT/SB$ aus *S. enterica* ist in einem Operon organisiert (CHECA *et al.* 2007). Das Cus-System aus *C. metallidurans* ist im Operon $cusDCBAF$ organisiert, besitzt im Gegensatz zu $cusCFBA$ aus *E. coli* aber kein Zweikomponentensystem in der genetischen Umgebung. Der Regulationsmechanismus ist noch unbekannt. Das System $mdtABCD$ aus *S. enterica* wird in einem Operon mit dem Zweikomponentensystem $baeSR$ codiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von $baeSR$ zu geringerer Kupferresistenz führt (NISHINO *et al.* 2007). Das Ges-System aus *S. enterica* ist für den Export von Goldionen verantwortlich. Es liegt in unmittelbarer Nähe zu $golT/SB$ (PONTEL *et al.* 2007).

In *C. metallidurans* lässt sich das Operon $gigPABT$ durch Gold induzieren. Den Namen *gig* (*gold induced genes*) hat es aufgrund dieser Eigenschaft bekommen. Die genaue Funktion der Proteine ist bisher nicht bekannt. GigT hat Ähnlichkeit mit einer Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase aus dem thermophilen Archaeon *Acidianus ambivalens*. GigB besitzt eine Thioredoxin-ähnliche Domäne, ist aber kein Thioredoxin (STEGELICH 2014). In unmittelbarer Nähe zum Operon befinden sich die Gene $rpoQ$ und $rsqA$. Diese codieren für den Sigmafaktor RpoQ und den entsprechenden Antisigmafaktor

RsqA. Eine Deletion von *rpoQ* führt zur konstitutiven Expression des *gig*-Operons (WIESEMANN 2015). Es konnte bereits gezeigt werden, dass neben dem *gig*-Cluster auch weitere Operons durch Gold induzierbar sind. In Reporterstudien konnte nachgewiesen werden, dass sich die Expression des Gens *cupA*, das für die kupferexportierende P-Typ ATPase codiert, durch Gold induzieren lässt (WIESEMANN 2015). Durch eine *cusF-lacZ* Reporterfusion konnte ebenfalls eine Induktion des *cus*-Operons gezeigt werden. Die resultierende spezifische Aktivität ist allerdings sehr viel niedriger als bei *cupA-lacZ*. Eine Beteiligung des *cop*-Clusters auf dem Plasmid pMOL30, der Arsen-Reduktasen (*arsc1* und *arsc2*), sowie der Quecksilber-Reduktase (*merA*) an der Goldresistenz wurde ausgeschlossen (REITH *et al.* 2009; WIESEMANN 2015). Die Rolle und vor allem das Zusammenspiel von *cop*, *cup*, *cus*, und *gig* in der Kupfer- und Goldhomöostase ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Durch vorangegangene Arbeiten konnten die Auswirkungen einzelner Mutationen beispielsweise auf die Resistenz gegen Kupfer und Gold nachvollzogen werden. Bisher war es allerdings nicht möglich diese Experimente zur Gänze in mehrfachen Deletionsstämmen dieser Systeme durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Gene sowie von Glutathion in der Kupfer- und Goldhomöostase in Mutantenstudien ausgehend vom Elternstamm *C. metallidurans* AE104 untersucht. Die Resistenz gegenüber Kupfer und Gold in Stämmen mit bis zu fünf Deletionen bzw. Disruptionen wurde durch Wachstumsendpunktbestimmungen bestimmt. Die Überlebensfähigkeit der Zellen in kupferhaltigen Medien wurde durch einen Zellviabilitätsassay mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Um tiefere Einblicke in die Kupfer- und Goldphysiologie zu erhalten, wurden die Metallgehalte nach Zugabe der Metalle über ICP-MS-Messungen ermittelt. Mit Hilfe eines enzymatischen Tests wurde parallel ebenfalls der Glutathiongehalt bestimmt. Die Expression des *cus*- und *gig*-Operons wurde durch Fusionen mit dem Reporter *lacZ* untersucht. Zusammen mit Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger vom Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde die Goldnanopartikelbildung in ausgewählten Stämmen unter Verwendung elektronenmikroskopischer Techniken untersucht. Lutz Berthold vom Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (IMWS) in Halle ermittelte die Zusammensetzung der Nanopartikel durch EDX-Messungen.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Primer

Tabelle 1. Liste der verwendeten Organismen. Wenn kein Vektor angegeben ist, ist der Stamm plasmidfrei.

Stamm	Vektor/Plasmid	Phänotyp bzw. Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>			
<i>E. coli</i> XL1 Blue		F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>u169</i> , <i>hsd17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), λ-	(BULLOCK 1987)
<i>E. coli</i> S17-1		<i>thi1</i> , <i>proA</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺ , <i>Tp</i> ^R , <i>Sm</i> ^R	(SIMON <i>et al.</i> 1983)
VS81	pLO2	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> , <i>colE1</i>	(LENZ <i>et al.</i> 1994)
VS218	pCM157	Expressionsvektor für <i>cre</i> -Rekombinase (<i>Tet</i> ^R)	(MARX UND LIDSTROM 2002)
VS225	pBBR1MCS 3	<i>rep</i> , <i>mob</i> , <i>Tet</i> ^R	(KOVACH <i>et al.</i> 1995)
ECA962	pECD1386	pECD794-1:: <i>cusF-lacZ</i>	(WIESEMANN 2015)
ECB207	pECD1625	pECD1002:: <i>ΔgshA</i>	diese Arbeit
ECB245	pECD1663	pBBR-MCS3:: <i>gshA</i>	diese Arbeit
ECB249	pECD1667	pECD794-1:: <i>gigT-lacZ</i>	diese Arbeit
ECB250	pECD1668	pLO2- <i>gshA</i> _{dis}	diese Arbeit
<i>Cupriavidus metallidurans</i> ^a			
AE104			(MERGEAY <i>et al.</i> 1985)
DN656		Δ <i>cupCAR</i>	(WIESEMANN <i>et al.</i> 2013)
DN657		Δ <i>gigPABT</i>	(WIESEMANN <i>et al.</i> 2013)
DN686		Δ <i>copABCD</i>	(WIESEMANN 2015)
DN729		Δ <i>cusDCBAF</i>	(WIESEMANN 2015)
DN845		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>cupCAR</i>	(GERLACH 2017)
DN846		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>cusDCBAF</i>	(GERLACH 2017)
DN847		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN848		Δ <i>cusDCBAF</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN849		Δ <i>cupCAR</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN850		Δ <i>cupCAR</i> Δ <i>cusDCBAF</i>	(GERLACH 2017)
DN851		Δ <i>cupCAR</i> Δ <i>cusDCBAF</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN852		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>cusDCBAF</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN853		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>cupCAR</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN854		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>cupCAR</i> Δ <i>cusDCBAF</i>	(GERLACH 2017)
DN855		Δ <i>copABCD</i> Δ <i>cupCAR</i> Δ <i>cusDCBAF</i> Δ <i>gigPABT</i>	(GERLACH 2017)
DN861		Δ <i>gshA</i>	diese Arbeit
DN902		<i>gshA</i> _{Disr}	diese Arbeit

Fortsetzung von Tabelle 1

DN903		$\Delta copABCD gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN904		$\Delta cupCAR gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN905		$\Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN906		$\Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN907		$\Delta copABCD \Delta cupCAR gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN908		$\Delta copABCD \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN909		$\Delta copABCD \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN910		$\Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN911		$\Delta cupCAR \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN912		$\Delta cupCAR \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN913		$\Delta cupCAR \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN914		$\Delta copABCD \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN915		$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN916		$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN917		$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DN918	pBBR1-MCS3	$\Delta gshA$	(RIETZSCHEL 2021)
DN919	pECD1663	$\Delta gshA$	(RIETZSCHEL 2021)
DN920	pBBR1-MCS3	AE104	(RIETZSCHEL 2021)
DN921	pECD1663	AE104	(RIETZSCHEL 2021)
DN922	pBBR1-MCS3	$\Delta cupCAR \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN923	pECD1663	$\Delta cupCAR \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN924	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN925	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN926	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN927	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN928	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DN929	pECD1663	$gshA_{Disr}$	(RIETZSCHEL 2021)
DNA4	pECD1663	$\Delta copABCD gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA5	pECD1663	$\Delta cupCAR gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA6	pECD1663	$\Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit

Fortsetzung von Tabelle 1

DNA7	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta cupCAR gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA8	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA9	pECD1663	$\Delta copABCD \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA10	pECD1663	$\Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA11	pECD1663	$\Delta cupCAR \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA12	pECD1663	$\Delta cupCAR \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA23	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA24	pBBR1-MCS3	$\Delta cupCAR gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA25	pBBR1-MCS3	$\Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA26	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta cupCAR gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA27	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA28	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA29	pBBR1-MCS3	$\Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA30	pBBR1-MCS3	$\Delta cupCAR \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA31	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA32	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta cusDCBAF gshA_{Disr}$	diese Arbeit
DNA33	pBBR1-MCS3	$\Delta copABCD \Delta cupCAR \Delta cusDCBAF \Delta gigPABT gshA_{Disr}$	diese Arbeit

R: Resistenz a: alle Stämme von *C. metallidurans* sind Derivate von AE104

Tabelle 2. Liste der verwendeten Primer. Enzymschnittstellen sind unterstrichen.

Name und Orientierung	Sequenz (5'→3')	Anwendung
NW <i>cop ABCD</i> MunI →	AAA <u>CAA TTG</u> CTC GTT CAG CGC CAT ATG C	Überprüfung <i>cop</i> -Deletion
NW <i>cop ABCD</i> AgeI ←	AAA <u>ACC GGT</u> GCG GCA TGG CAG AGC GCA AT	Überprüfung <i>cop</i> -Deletion
NW <i>cus</i> -like MunI →	AAA <u>CAA TTG</u> GTG GAT ATC GGA TCC AGA AC	Überprüfung <i>cus</i> -Deletion
NW <i>cus</i> -like AgeI ←	AAA <u>ACC GGT</u> AGT GGG CCA TCG CAA TCG AAG GG	Überprüfung <i>cus</i> -Deletion
<i>Rmet 4685 cre</i> Mun up → 562	AAA <u>CAA TTG</u> AAT GCA TGA TAG CGC GCC TGA	Überprüfung <i>gig</i> -Deletion
<i>Rmet 4682 cre</i> Age down ← 3707	AAA <u>ACC GGT</u> AGC GTA AGA GTC CGA ATG CGC	Überprüfung <i>gig</i> -Deletion
<i>Rmet 3525 golB cre</i> Mun → down 4502	AAA <u>CAA TTG</u> CGT TCG TGC AAG GTG AAT TCG	Überprüfung <i>cup</i> -Deletion
JM <i>golS-lacZ</i> Sal down ← 402	AAA <u>GTC GAC</u> TTA GTG ATG GCA GGC CGG G	Überprüfung <i>cup</i> -Deletion
JM 4684- <i>lacZ</i> 501 Pst →	CGG GCT GCT GCT GGA CAT TA	Fusionierung <i>gigT-lacZ</i>

Fortsetzung von Tabelle 2

JM 4682- <i>lacZ Pst</i> up 129	→	AAA <u>CTG CAG</u> CTC GGT GTT CTT CCT GTC GG	Fusionierung <i>gigT-lacZ</i>
NW <i>cusA_PstI</i>	→	AAA <u>CTG CAG CCG</u> CAG TGG TAA TGA TCG AAA A	Überprüfung <i>cusF-lacZ</i> -Fusion
Rm <i>gshA crelox BglII</i>	→	AAA <u>AGA TCT TGC</u> CTG CGG GGC ATA GAG	Deletion <i>gshA</i>
Rm Δ <i>gshA</i> -RM OR <i>MunI</i>	←	CAG <u>CAA TTG</u> GAT GAG ATG CGG GAC CAT ATC CAT	Deletion <i>gshA</i>
Rm2 Δ <i>gshA Apal</i>	→	CTC <u>GGG CCC ACC</u> GAC CCG AAT CCG ATC CTC	Deletion <i>gshA</i>
Rm2 Δ <i>gshA SacI</i> rev	←	ATG <u>GAG CTC GGC</u> GGA TCC TTG CGC ATC A	Deletion <i>gshA</i>
<i>gshA</i> Rm dis 586 <i>Pst</i>	→	AAA <u>CTG CAG</u> TAC CTG CTG CCG CCG TTG	Disruption <i>gshA</i>
<i>gshA</i> Rm dis 901 <i>Xba</i>	←	AAA <u>TCT AGA</u> GCC CTT CAC CTC GGA CCG	Disruption <i>gshA</i>
NW Promo <i>gshA SacII</i>	→	AAA <u>CCG CGG</u> TAA TGC CTG CGG GGC ATA GAG TG	Komplementation <i>gshA</i>
NW <i>gshA EcoRI</i>	←	AAA <u>GAA TTC</u> GAG GAT CGG ATT CGG GTC GGT C	Komplementation <i>gshA</i>
Allgemeine Primer			
Kan1362	→	TAA CAT ACC CTT CGG GCT ACG	Überprüfung <i>cre-lox</i> Integrationsmutanten
Kan1909	←	CCT ATG GAA CTG CCT CGG TGA	Überprüfung <i>cre-lox</i> Integrationsmutanten
pBBR_for	→	CGC AGC GGC CTA TTG GTT A	Überprüfung <i>gshA</i> Komplementation
pBBR_rev	←	CGG CTC GTA TGT TGT GTG GAA	Überprüfung <i>gshA</i> Komplementation
pGEMfwd	→	GCG AAA GGG GGA TGT GCT GC	Sequenzierungsprimer
pGEMrev	←	CGC CTG CAG GTC GAC CAT AT	Sequenzierungsprimer
T7 promo D	→	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G	Sequenzierungsprimer
pLO2 <i>lacZ</i> 5924	←	GCC TCT CGC TAT TAC GCC AG	Überprüfung <i>lacZ</i> -Fusionen
<i>lacZ</i> RalstiFusion	←	CAC AGA TGA AAC GCC GAG TTA ACG	Überprüfung <i>lacZ</i> -Fusionen

R: resistent/Resistenz

2.2 Medien und Zusätze

Nährbouillon (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

8 g Nährbouillon ad 1 l H₂O_{bidest.}

Das Medium diente zur Anzucht von *C. metallidurans*-Stämmen

Nähragar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

23 g Nähragar ad 1 l H₂O_{bidest.}

MATERIAL UND METHODEN

Das Medium diente zur Anzucht von *C. metallidurans* und wurde bei Komplementationen mit *E. coli* verwendet

BD Difco™ LB Broth, Lennox Medium (Becton Dickinson, Heidelberg)

20 g ad 1 l H₂O_{bidest.}

Das Medium diente zur Anzucht von *E. coli*

BD Difco™ LB Agar, Lennox Agarplatten (Becton Dickinson, Heidelberg)

35 g ad 1 l H₂O_{bidest.}

Das Festmedium diente zur Kultivierung von *E. coli*

TRIS-gepuffertes Minimalmedium (TMM) (MERGEAY *et al.* 1985)

Komponente A (20-fach):

800 ml H₂O_{bidest.}

121,1 g TRIS-HCl

HCl ad pH 7,0

danach Zugabe von:

93,6 g NaCl

29,8 g KCl

21,4 g NH₄Cl

4,0 g MgCl₂ × 6 H₂O

0,60 g CaCl₂ × 2 H₂O

0,024 g Eisen-Ammonium-Citrat

2 ml Spurenelementlösung SL6 (10-fach) nach (PFENNIG 1974)

ad 1 l H₂O_{bidest.}

Komponente B (20-fach):

900 ml H₂O_{bidest.}

8,6 g Na₂SO₄

2,27 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O

ad 1 l H₂O_{bidest.}

Spurenelementlösung SL6 (10-fach) nach (PFENNIG 1974)

0,10 g ZnSO₄ × 7 H₂O

0,03 g MnCl₂ × 4 H₂O

0,30 g H₃BO₃

0,20 g CoCl₂ × 6 H₂O

0,01 g CuCl₂ × 2 H₂O

0,188 g NiCl₂ × 6 H₂O

0,03 g Na₂Mo₄ × 2 H₂O

ad 1 l H₂O_{bidest.}

Zur Herstellung von festen und flüssigen TRIS-Minimalmedium wurden die Komponenten gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Den Medien wurden 2g/l Natriumgluconat (Sigma Aldrich) als Kohlenstoffquelle hinzugefügt. Für feste Medien wurden 20 g/l Agar zugegeben (Bacto™ Agar, Becton Dickinson, Heidelberg). Alle Medien wurden vor Verwendung autoklaviert. Zusätze wie Antibiotika oder

MATERIAL UND METHODEN

Farbstoffe wurden danach zugegeben. Die Lagerung von festen Medien erfolgte bei 4 °C, flüssige Medien wurden bei RT gelagert.

Kupferchloridlösungen wurden als Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 M angesetzt und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei RT. Wässrige sterile Zwischenverdünnungen wurden bei 4 °C gelagert, um die Verdunstung zu verringern. Weitere Verdünnungen wurden im Medium angesetzt und direkt für Experimente verwendet. Die Lagerung der Goldstammlösung (Trace Cert® Gold Standard für ICP, 1 g/l [5,08 mM], in 5 % HCl, Sigma Aldrich, Heidelberg) erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C. Zwischenverdünnungen wurden mit sterilem TRIS-HCl (10 mM, pH 8) angesetzt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Verdünnungen für Experimente wurden im Medium angesetzt.

Antibiotika, IPTG und X-Gal wurden bei -20 °C lichtgeschützt gelagert. Die Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. Konzentrationen der Stammlösungen und Endkonzentrationen von Medienzusätzen.

Zusatz	Konzentration (Lösungsmittel)	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Kanamycin	<i>E. coli</i> : 50 mg/ml (Wasser)		<i>E. coli</i> : 50 µg/ml
	<i>C. metallidurans</i> 100 mg/ml		<i>C. metallidurans</i> : 1,5 g/l, für Agarplatten als Feststoff ins Medium gegeben
Ampicillin	125 mg/ml (Wasser)		125 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml (50 % Ethanol)		12,5 µg/ml
IPTG	40 mg/ml		40 µg/ml
X-Gal	50 mg/ml (DMF)		50 µg/ml

2.3 Kultivierung von Organismen

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde in LB-Medium in sterilen Reagenzgläsern bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Dafür wurde ein Horizontalschüttler (GFL 3016, Burgwedel, Deutschland) verwendet. Den Medien wurde, wenn erforderlich Antibiotika zur Selektion zugegeben. Das Verhältnis zwischen Kultur- und Gefäßvolumen überschritt 1:5 nicht. Zur Überprüfung des Wachstums wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm mit einem Spektralphotometer (Smart SpecTM 3000, BIO-RAD, USA) in Küvetten (d = 1 cm) bestimmt. Zur Kultivierung auf festen Medien wurden Kulturen von *E. coli* mit einer sterilen Impföse auf festen LB-Agarplatten ausgestrichen. Falls nötig enthielten Platten zusätzlich Antibiotika, IPTG und X-Gal zur Selektion. Die Kolonien wurden dabei vereinzelt, um Verunreinigungen sichtbar zu machen. Die Agarplatten wurden aerob bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.3.2 Kultivierung von *C. metallidurans*

C. metallidurans wurde in TMM in sterilen 55 ml Reagenzgläsern mit 25 mm Durchmesser (Clark Scientific LTD) bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd kultiviert. Dafür wurde ein Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Den Medien wurde, wenn erforderlich Antibiotika zur Selektion zugegeben. Wurden die Zellen in einem Erlenmeyerkolben kultiviert, wurde dafür ein Schüttelwasserbad (Innova 3100 (New Brunswick Scientific, Eddison, NJ, USA) oder ein

Schüttelwasserbad HT (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm verwendet. Das Verhältnis zwischen Kultur- und Gefäßvolumen überschritt 1:5 nicht. Zur Überprüfung des Wachstums in Erlenmeyerkolben mit Seitenarm wurde die optische Dichte der Kulturen mit einem Klett-Colorimeter (Bel-Art Products, Pequannock, NJ, USA) überprüft. Der verwendete Filter hatte eine optimale Transmission für den Wellenlängenbereich zwischen 520 nm und 580 nm. Bei der Verwendung der Seitenarmkolben konnte zudem die Gefahr durch Kontaminationen verringert werden. Für Kulturen in Reagenzgläsern wurde ein Spektralphotometer (Smart Spec™ 3000, BIO-RAD, USA) mit Küvetten (d = 1 cm) verwendet. Zur Kultivierung auf festen Medien wurden Kulturen von *C. metallidurans* mit einer sterilen Impföse auf festen TMM-Agarplatten ausgestrichen. Die Kolonien wurden dabei vereinzelt, um Verunreinigungen sichtbar zu machen. Die Agarplatten wurden aerob bei 30 °C über Nacht inkubiert.

2.3.3 Stammhaltung

C. metallidurans wurde auf TMM angezogen und die Stämme wurden alle zwei Wochen aus Flüssigkulturen auf TMM-Agarplatten vereinzelt, um Verunreinigungen auszuschließen. Falls erforderlich, wurden den Kulturen Antibiotika zugegeben. Gewachsene Kulturen auf Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert. Für langfristige Lagerungen wurden Glycerindauerkulturen angelegt. Dafür wurden zunächst Kulturen in Flüssigmedium angelegt. 600 µl Kultursuspension und 400 µl 50% Glycerin (Endkonzentration 20%) wurden durch vortexen gemischt und bei –80 °C eingefroren. Für *E. coli* Dauerkulturen wurde entsprechend verfahren. Die Lagerung auf Agarplatten erfolgte bei 4 °C bis zu vier Wochen.

2.4 Standardmethoden für Arbeiten mit Nukleinsäuren (SAMBROOK *et al.* 1989)

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde das *NucleoSpin® Microbial DNA Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde 1 ml Zellsuspension verwendet.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, Dreiech) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.3 PCR

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

5 µL	10-fach PCR-Puffer
1-2 µL	dNTPs (10 mM)
1 µL	Primer 1 (10 pmol/µL)
1 µL	Primer 2 (10 pmol/µL)
0,7-1,5 µL	Polymerase
1-5 µL	Template
ad 50 µL	H ₂ O _{bidest.}

Das Volumen für dNTPs richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Bereichs. Das Volumen des Templates richtete sich nach dem Ursprung. Gereinigte DNA wurde in geringen Volumen zugegeben, Material für Kolonie-PCRs wurde in größeren Mengen zugegeben. Als Polymerase wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (1 U/µl; Roche, Mannheim) oder das *Expand Long Template PCR System* (5 U/µl; Roche, Mannheim) verwendet.

2.4.4 Agarose Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1 g Agarose (peqlab, Erlangen) in 100 ml 1x TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht und nach Abkühlen 150 ng/ml Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe) hinzugegeben. Nach Abkühlen wurden die Gele bei 4 °C gelagert oder unmittelbar in eine Elektrophoresekammer (*Owl™ EasyCast™ B2* Minigel-Elektrophoresesysteme Thermo Scientific, Dreieich) gegeben. DNA-Proben und 6-facher Ladepuffer (New England Biolabs GmbH, USA) wurden im Verhältnis 5:1 gemischt. Der Ladepuffer wurde dabei auf die einfache Konzentration verdünnt. Die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und bei einer Spannung von 120 V für circa 20 min aufgetrennt. Zur Feststellung der Größen wurde der *GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use* (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verwendet. Die Banden wurden in einem *Intas UV-Systems Imager* (UV-Transilluminator, INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen) betrachtet.

2.4.5 DNA-Restriktion mittels Endonukleasen

Restriktionen erfolgten in Volumen von 20 bis 100 µl mit 20 U Gesamtaktivität nach Herstellerangaben. Es wurden ausschließlich die vom Hersteller empfohlenen Puffer (10-fach konzentriert) unter den empfohlenen Bedingungen verwendet. Restriktionen erfolgten stets über Nacht.

2.4.6 DNA-Ligation

Ligationen wurden in 20 µl durchgeführt. Dabei wurden Verhältnisse zwischen Vektor und DNA-Fragment von 1:3 bis 1:10 eingehalten. Der Ligationsansatz wurde 5 min bei 45 °C im Wasserbad inkubiert und auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 2 µl 10-fach Ligationspuffer und 1 µl (1 U/µl) T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific™, Dreieich). Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Ligationen mit dem *pGEM® TEasy Vector Systems* (Promega GmbH, Mannheim) wurden in einem 10 µl Ansatz nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

2.4.7 Aufkonzentrierung von DNA

Zur Konzentrierung von DNA-haltigen Lösungen wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR clean up Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung wurde das *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Nanophotometers N60 (Implen, München).

2.4.10 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden vom Drittanbieter Microsynth AG (Lindau) durchgeführt. Dafür wurden die Proben nach Angaben des Dienstleisters vorbereitet. Der Vergleich der Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager 9 (*Clone Manager*-Version 9.0, *Scientific & Educational Software*, USA) durchgeführt. Als Referenz dienten Daten der Internetseite MicrobesOnline (<http://www.microbesonline.org/>).

2.5. Herstellung kompetenter Zellen mit der CaCl_2 -Methode (MANDEL UND HIGA 1970)

E. coli-Zellen wurden aus einer 4 ml Vorkultur 1:100 in 50 ml LB-Medium überimpft und bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen ($\text{OD}_{600} = 0,3-0,5$). Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in einer Eppendorf 5804 R Zentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm für 20 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und erneut geerntet. Die Zellen wurden in 2 ml einer 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und mit 2 ml einer 50% Glycerinlösung versetzt. Die Suspension wurde gemischt und zu 100 μl in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aliquotiert. Diese wurden bei -80 °C gelagert.

2.6 DNA-Transfer

2.6.1 Plasmid-Transfer mittels Transformation

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden in Aliquots auf Eis für 10 min aufgetaut. DNA wurde zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis erschütterungsfrei inkubiert. Es folgte eine Inkubation von 2 min bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert, 500 μl steiles LB-Medium zugegeben und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 μl des Ansatzes auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum ausgestrichen. Der Rest wurde sedimentiert, 400 μl des Überstandes entfernt und im restlichen Überstand (100 μl) resuspendiert. Die verbleibende Suspension wurde ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.6.2 Plasmid-Transfer mittels Konjugation

E. coli S17-1, der das zu transferierende Plasmid trägt, wurde mit *C. metallidurans* zu je 200 μl auf einer Nähragarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde bei 30 °C 2 Tage inkubiert. Die Bakterien wurden mit einer sterilen Impföse in 400 μl TMM resuspendiert und auf einer TMM-Agarplatte mit Antibiotika vereinzelt. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C für bis zu 5 Tage. Danach wurde eine Einzelkolonie in TMM mit Antibiotikum angezogen und erneut auf TMM Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. Die entstandenen Einzelkolonien wurden durch PCR überprüft.

2.7. DNA::DNA-Hybridisierung (SOUTHERN 1975)

2.7.1 Herstellung von DNA-Sonden

DNA-Fragmente des zu untersuchenden Bereichs wurden per PCR amplifiziert. Diese hatten eine Länge von etwa 300 bp. Die Markierung erfolgte über das *DIG DNA Labeling and Detection Kit* (Roche, Mannheim) mit Hexanukleotiden mit zufälligen Sequenzen. Die Markierung erfolgte dabei mit Digoxigenin-11-dUTP. Unmarkiertes PCR-Produkt wurde in 15 µl Wasser aufgenommen und für 10 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 2 µl 10-fach Hexanukleotid-Mix, 10x dNTP-Labeling-Mix und 1 µl Klenow-Fragment hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Sonde wurde wie unter 2.4.7 aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Gelelektrophorese

Genomische DNA wurde isoliert (2.4.2) und wie unter 2.4.5 verdaut. Die Fragmente wurden bei 70 V für circa 2 h in 1x TAE-Puffer in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und kurz unter UV-Licht begutachtet. Als Größenstandard wurde der DNA Molekülmassenmarker VII, DIG-markiert (Roche, Mannheim) verwendet.

2.7.3 Blotting

Vorbereitung des Agarosegels

- 1) 5 min in 0,25 M HCl
- 2) 20 min in Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)
- 3) 20 min in Neutralisierungslösung (1 M TRIS , pH 7.5, 1.5 M NaCl)

Alle Schritte wurden auf einer Laborwippe (Duomax 1030; Heidolph, Schwabach) durchgeführt. Eine zugeschnittene Nylonmembran (*Nylon Membranes, positively charged*, Roche, Mannheim) wurde für 10 min in Wasser und 10 min in 10-fach SSC (0.15 M Na-Citrat, pH 7.0, 1.5 M NaCl) geschwenkt. Für den Transfer wurde eine Gelelektrophoresekammer mit Filterpapier ausgelegt, mit 10-fach SSC angefeuchtet und das Gel hineingelegt. Die Seitenkammern wurden mit 10-fach SSC befüllt. Die Membran wurde auf das Gel gelegt, mit einigen Schichten Filterpapier belegt und mit einem Gewicht beschwert. 10-fach SSC wurde nach Bedarf nachgefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass nur die unterste Schicht Filterpapier unterhalb des Gels mit Puffer in den Seitenkammern in Berührung kam. Der Transfer fand über Nacht statt. Danach wurden 2 µl markierte und unmarkierte Sonde als Kontrollen auf die Membran aufgetragen. Die Proben wurden 5 min unter UV-Licht auf der Membran fixiert. Der Erfolg des Transfers wurde durch Belichtung des Gels unter UV-Licht nachvollzogen.

2.7.4 Hybridisierung

Die Membran wurde mit Wasser gespült und für zwei bis vier Stunden in einem Hybridisierungsröhrchen in 15 ml Prähybridisierungslösung (5-fach SSC, 10 g/l Blocking-Reagenz, 1 g/l N-Lauroylsarcosin, 0.2 g/l SDS) bei 68 °C in einem Hybridisierungsofen GFL 7601 (GFL, Burgwedel) inkubiert. 15 µl der markierten Sonde wurden mit 5 ml Hybridisierungslösung gemischt und für 10 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Lösungen wurden

gegeneinander ausgetauscht und die Membran bei 68 °C über Nacht inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe:

- 1) 5 min bei RT, 2-fach SSC mit 1 g/l SDS
- 2) 5 min bei 68 °C; 0,1-fach SSC mit 1g/l SDS

2.7.5 Nachweis durch Chemilumineszenz

Alle Schritte wurden bei RT auf einer Laborwippe (Duomax 1030; Heidolph, Schwabach) durchgeführt. Die Membran wurde 5 min in Waschpuffer (Puffer 1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) mit 0,3 % (v/v) Tween 20) und 30 min in Puffer 2 (Puffer 1 mit 1 % (v/v) Blocking-Reagenz) gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 30 min in Anti DIG-AP-Konjugat (1:25000 in Puffer 2). Um restliches Konjugat zu entfernen, wurde die Membran zweimal für 15 min in Waschpuffer inkubiert. Die Membran wurde für 5 min in Puffer 3 (0,1 M TRIS-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) inkubiert, überschüssiger Puffer abgetropft, in eine saubere Folie gelegt und mit Substratlösung (CSPD 1:100 in Puffer 3) versetzt. Die Folie wurde 5 min bei RT inkubiert, abgetropft und für 20 min bei 37 °C inkubiert, um die Reaktion zu starten. Die Membran wurde entweder in einem Intas *ECL Chemostar Chemilumineszenz Imager* oder auf einem ECL Film entwickelt. Dafür wurde die Membran mit dem Film für 2-24 h in eine lichtabschirmende Kassette gelegt. Der Film wurde zunächst in Entwicklerlösung (DENTAMAT 500 Calbe Chemie, Calbe) inkubiert und bei Sichtbarwerden von dunklen Banden kurz in Wasser abgewaschen und in Fixierungslösung (DENTAMAT 500 Calbe Chemie, Calbe) inkubiert. Danach wurde der Film erneut mit Wasser gewaschen.

2.8 Bestimmung der Metallresistenz in Wachstumsendpunktbestimmungen (dose response)

Zellen von *C. metallidurans* wurden in TMM für 18 h bis zur frühen stationären Phase bei 30 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen. Für eine zweite Vorkultur wurden sie zu 5 % in frisches TMM angeimpft und für 24 h bis zur späten stationären Phase unter gleichen Bedingungen angezogen. Zur Bestimmung der Metallresistenz wurden in 96-well-Platten mit flachem Boden (Greiner bio-one, Frickenhausen) zunächst Metalle in entsprechender Konzentration in 180 µl TMM vorgelegt und anschließend 20 µl Kultursuspension hinzu pipettiert. Die Proben wurden für 20 h bei 30 °C und 1300 rpm in einem NeoLab (Heidelberg) DTS 2 oder DTS 4 Thermo Schüttler inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 500 nm und 600 nm in einem Infinite MNano (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Bestimmung bei 500 nm wurde durchgeführt, um die Absorption durch Kupfer in Lösung zu minimieren. Diese ist bei einer Messung bei 600 nm erhöht. Als Referenz diente nicht beimpftes Medium mit der entsprechenden Metallkonzentration. Zur Bestimmung der Metallresistenz wurden die Konzentrationen ermittelt, bei denen eine Verringerung der optischen Dichte um 50 % stattgefunden hatte. Diese wird als IC₅₀ (*inhibitory concentration 50 %*) bezeichnet. Zur Bestimmung der IC₅₀ wurde folgende Formel verwendet:

$$f(x) = \ln(OD_0 / OD_C - 1)$$

OD₀ ist hier die optische Dichte ohne Zugabe von Metallen, OD_C die optische Dichte bei Konzentration c. Ergibt die Funktion den Wert 0 ist dies die exakte IC₅₀. Werte wurden über mindestens

drei Konzentrationen hinweg linear korreliert ($R^2 > 0,95$) und so die IC_{50} für jeden Stamm aus jedem Experiment einzeln bestimmt. Mindestens drei unabhängige Experimente wurden für die Mittelung der IC_{50} jedes Stammes herangezogen. In Experimenten bei denen Kupfer verwendet wurde, wurde die Absorption bei 500 nm verwendet.

2.9 Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität

Zellen von *C. metallidurans* wurden in TMM für 18 h bis zur frühen stationären Phase bei 30 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen. Für eine zweite Vorkultur wurden sie zu 5 % in frisches TMM angeimpft und für 24 h bis zur späten stationären Phase unter gleichen Bedingungen angezogen. Für die Hauptkultur wurden Zellen zu 1,5 % in Seitenarmkolben mit 10 ml TMM angeimpft. Dabei wurde darauf geachtet, dass das eingefüllte Volumen 20 % des Maximalvolumens nicht übersteigt. Die Kulturen wurden bis zu einer optischen Dichte von 100 Kletteinheiten bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelwasserbad (Innova 3100, New Brunswick Scientific, Eddison, NJ, USA oder HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. 96-well-Platten mit rundem Boden (Greiner bio-one, Frickenhausen) wurden mit den entsprechenden Metallkonzentrationen und mit 200 μ l Hauptkultur beimpft. Die Platten wurden bei 30 °C und 1200 rpm für 3 h in einem NeoLab (Heidelberg) DTS 2 oder DTS 4 Thermo Schüttler inkubiert. Die optische Dichte bei 600 nm wurde in einem Infinite MNano (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die gewachsenen Kulturen wurden in einer Eppendorf 5804 R Zentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm für 30 min pelletiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität wurden die Pellets bei RT aufgetaut und sofort vermessen. Dazu wurden die Pellets in 190 μ l Puffer Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β -Mercaptoethanol; β -Mercaptoethanol wurde frisch hinzugegeben) mit 10 μ l Permeabilisierungslösung (2,5 g/l CTAB, 5 g/l DOC) für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l Substratlösung (4 g/l ONPG, in Puffer Z ohne β -Mercaptoethanol) hinzugegeben und die Zeit gestoppt, bis eine Gelbfärbung auftrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung (1 M Na_2CO_3) beendet. Die Platten wurden in einem Infinite MNano (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) bei 550 nm und 420 nm vermessen und die Aktivität berechnet. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die Zelltrockenmasse herangezogen.

Dafür wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{Enzymaktivität [U]:} \quad \frac{315,8 \mu\text{mol} \times [\text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})]}{\text{Reaktionszeit [min.]}}$$

$$\text{Spezifische Enzymaktivität: [U/mg Trockenmasse]:} \quad \frac{\text{Enzymaktivität [U]}}{\text{Zelltrockenmasse [mg]}}$$

1 U entspricht hier dem Stoffumsatz in nmol pro Minute bei 30°C.

Der Korrekturfaktor 315,8 ergibt sich aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten von ONPG ($\epsilon = 4500 \text{ l/mol} \times \text{cm}$), der Dicke des Reaktionsgefäßes ($d = 0,95 \text{ cm}$), dem Korrekturfaktor der unterschiedlichen Volumen (200 μ l Zellkultur; 270 μ l Reaktionsvolumen), und dem Faktor 10^6 für die Umrechnung der Einheiten.

2.10 Bestimmung der Überlebensfähigkeit von *C. metallidurans* (Live/Dead)

2.10.1 Zellanzucht

Zellen von *C. metallidurans* wurden in TMM für 18 h bis zur frühen stationären Phase bei 30 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen. Für eine zweite Vorkultur wurden sie zu 5 % in frisches TMM angeimpft und für 24 h bis zur späten stationären Phase unter gleichen Bedingungen angezogen. Falls erforderlich, wurde beiden Kulturen Antibiotikum hinzugegeben. Für die Hauptkultur wurden 4 ml TMM ohne Antibiotikum 10 % mit gewachsener Kultur beimpft. Zu den Kulturen wurde Kupferchloridlösung entsprechend der IC₅₀ des jeweiligen Stammes zugegeben. Die Röhrchen wurden 20 h bei 30 °C und 200 rpm auf einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen.

2.10.2 Präparation der Proben

500 µl der Kultursuspension wurde 2 min in einer Tischzentrifuge Sigma 1-13 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal in 500 µl Saline (0,85 % NaCl) gewaschen und in 80 µl Saline aufgenommen. Die Probe wurde geteilt, wobei jeweils 40 µl entweder in 800 µl Saline (lebende Zellen) oder in 800 µl 70 % Isopropanol (tote Zellen) für 1 h bei RT inkubiert wurden. Die Proben wurden dabei auf einer Laborwippe (Duomax 1030; Heidolph, Schwabach) minimal bewegt. Nach der Inkubation wurden die Zellen abermals für 2 min pelletiert, zweimal in 800 µl Saline gewaschen und nach einem Ernteschritt in 400 µl Saline aufgenommen.

Zur Färbung der Zellen wurde das *LIVE/DEAD™ Bac Light™* Viabilitätskit von Thermo Fisher (Dreieich) verwendet. Die Farbstoffe (Syto™ 9, Propidiumiodid) wurden nach Herstellerangaben in Wasser gelöst, aliquotiert und lichtdicht bei -20 °C gelagert. Zur Analyse wurden beide Farbstoffe auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 1:1 gemischt. Zellen und Farbstoffmischung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) betrachtet. Die verwendeten Filter hatten folgende Spezifikationen:

Filter 2: Ex: 450-490 nm Em: 520 nm

Filter 3: Ex: 546 nm Em: 590 nm

Für die Betrachtung von lebenden Zellen wurde Filter 2 verwendet. Für die Betrachtung von toten Zellen Filter 3. Die Betrachtung der Zellen erfolgte nur kurz, um ein Ausbleichen und damit Verlust der Fluoreszenz zu minimieren. Außerdem wurden Bilder im Phasenkontrast erstellt.

2.10.3 Bildanalyse

Die Bilder wurden mit dem frei verfügbaren Programm ImageJ (ABRAMOFF *et al.* 2004) analysiert. Die Bilder wurden in das Programm geladen und in ein 8-bit Format konvertiert. Die Belichtung der Bilder wurde so angepasst, dass alle Zellen sichtbar waren. Die Bilder wurden mit der „Watershed“ Funktion bearbeitet, um Zellhaufen besser zu trennen. Zur Zählung wurde das „Analyze Particles“-Tool verwendet. Dabei wurden Partikelgrößen zwischen 20 und 500 Pixel gewählt, um einzelne Pixel im

Hintergrund nicht mit einzubeziehen. Die Zirkularität wurde mit 0,1-1 bemessen, um Zählungen aus dem Bildhintergrund auszuschließen. Zur Verifizierung der Methode und der Parameter wurden zunächst Bilder händisch ausgezählt und mit dem Ergebnis der digitalen Zählung verglichen. Zur Analyse dienten die Bilder unter Verwendung von Filter 2 zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und Filter 3 zur Bestimmung der Zahl der toten Zellen. Da beide Farbstoffe gleichzeitig verwendet wurden, konnte durch Färben aller Zellen die Gesamtzellzahl unter Verwendung von Filter 2 bestimmt werden. Aus diesen Zahlen wurde die Überlebensfähigkeit ermittelt.

2.11 Bestimmung des Glutathiongehalts

Zellen von *C. metallidurans* wurden in TMM für 18 h bis zur frühen stationären Phase bei 30 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen. Für eine zweite Vorkultur wurden sie zu 5 % in frisches TMM angeimpft und für 24 h bis zur späten stationären Phase unter gleichen Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden zu 1,5 % in Seitenarmkolben bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelwasserbad (Innova 3100, New Brunswick Scientific, Eddison, NJ, USA oder HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bis 100 Klett angezogen und erst dann Metalle hinzugegeben und die Kulturen bis zum Erreichen von 150 Klett weiter angezogen. Alternativ wurden die Zellen für etwa 20 h mit der entsprechenden Metallkonzentration bis zum Erreichen von 150 Klett angezogen, um die Bedingungen eines *dose response* Experiments nachzuempfinden. Es wurden 5 mg Zellen in einer Eppendorf 5804 R Zentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm für 30 min pelletiert. Das Zellpellet wurde nach dem Ernten zweimal in TMM unter gleichen Bedingungen gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl 5 % SSA-Lösung resuspendiert und die Zellen durch Einfrier-Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff und im Wasserbad bei 37 °C aufgeschlossen. Dabei bestand ein Zyklus aus 2 min einfrieren und 2 min auftauen mit insgesamt drei Wiederholungen. Nach dem letzten Auftauschritt wurde die Suspension ausschließlich auf Eis gelagert. Zelltrümmer wurden bei 4 °C für 20 min und 5000 rpm in einer Eppendorf 5804 R Zentrifuge pelletiert, der Überstand in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und das Pellet verworfen.

Zunächst wurde der Proteingehalt der Proben mit dem *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma GmbH, Osterode) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Eichkurve wurde von anderen Experimenten übernommen und erfolgte mit BSA. Zur Bestimmung des Glutathiongehalts wurde mit einer vorbereiteten Glutathionlösung (200 µM, in Wasser) eine Eichkurve erstellt. Diese wurde in zweifachen Verdünnungsschritten in 5 % SSA-Lösung bis zu einer Konzentration von 12,5 µM angelegt. Die Glutathioneichkurve wurde für jedes Experiment neu angelegt. Mit den Proben wurde ebenso verfahren, wobei hier nur eine achtfache Verdünnung erstellt wurde. Das Endvolumen der Proben betrug 10 µl. Für die Reaktion wurde ein Reaktionspuffer hergestellt. Für ca. 40 ml Reaktionspuffer wurden 40 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; mit 1 mM EDTA, pH 7; (GOMORI 1955)), mit 1,14 mL DTNB (1,5 mg/ml in DMSO) und Glutathion-Reduktase (6 µl in 1,25 ml Puffer verdünnen, davon 1,14 ml in Reaktionsansatz geben; nach Herstellerangaben von Sigma Aldrich, Volumenaktivität der Reduktase laut Herstellerangaben: 1165 U/ml) gemischt. Ansatz und Probe wurden gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zum Starten der Reaktion mit 50 µl NADPH-Lösung versetzt (40 mg/ml Stammlösung). Die Proben wurden sofort bei 412 nm in 8 Intervallen von 42 Sekunden bei

30 °C und 200 rpm in einem Infinite MNano (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) vermessen. Zusätzlich wurden Referenzproben zur Nullwertbestimmung mitgeführt. Diese bestanden aus Reaktionspuffer, NADPH und SSA ohne Probe. Das fehlende Volumen wurde durch SSA-Lösung ersetzt.

Zur Auswertung wurde eine Regressionsgerade anhand der Eichreihe der bekannten Glutathionlösungen erstellt. Die gemessene Absorption wurde gegen die Zeit aufgetragen. Hier wurde auf ein Bestimmtheitsmaß von minimal 0,99 geachtet. Die Steigungen der einzelnen Eichreihen der bekannten Proben wurden linear korreliert und so eine Eichreihe für das Experiment erstellt ($R^2 \geq 0,98$). Die Steigung der Probenkurven wurde durch die Steigung der Eichgeraden geteilt, um so auf den Glutathiongehalt der unbekannt Probe zu schließen. Durch Division mit dem Proteingehalt der Proben konnte so der relative Glutathiongehalt der Proben ermittelt werden.

2.12 Bestimmung des Metallgehalts mittels ICP-MS

2.12.1 Anzucht

Zellen von *C. metallidurans* wurden in TMM für 18 h bis zur frühen stationären Phase bei 30 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen. Für eine zweite Vorkultur wurden sie zu 5 % in frisches TMM angeimpft und für 24 h bis zur späten stationären Phase unter gleichen Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden zu 1,5 % in Seitenarmkolben bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelwasserbad (Innova 3100, New Brunswick Scientific, Eddison, NJ, USA oder HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bis 100 Klett angezogen, dann Metalle hinzugegeben und die Kulturen bis zum Erreichen von 150 Klett weiter angezogen. Alternativ wurden die Zellen für etwa 20 h mit der entsprechenden Metallkonzentration bis zum Erreichen von 150 Klett angezogen, um die Bedingungen eines *dose response* Experiments nachzuempfinden. 5 ml Zellsuspension wurden in einer Eppendorf 5804 R Zentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm für 30 min pelletiert. Das Zellpellet wurde nach dem Ernten zweimal in Waschpuffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7; 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8) unter gleichen Bedingungen gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Die Zellpellets wurden bis zur Aufbereitung bei -20 °C gelagert.

2.12.2 Probenvorbereitung

Zellpellets wurden bei RT aufgetaut und mit 71 µl HNO₃ (70 %, analytischer Reinheitsgrad; VWR, Darmstadt) bei 70 °C über Nacht inkubiert bis die Suspension klar wurde. Die Proben wurden bei RT abgekühlt und anschließend 2,429 ml H₂O hinzugegeben. Die Endkonzentration von HNO₃ betrug 2 %. Zur Vorbereitung von goldhaltigen Proben wurden diese in Königswasser aufgeschlossen. Königswasser wurde frisch hergestellt und bestand aus HCl (37 %, analytischer Reinheitsgrad; VWR, Darmstadt) und 70 % HNO₃ im Verhältnis 3:1. Die Konzentrationen im Königswasser betragen 28 % HCl und 18 % HNO₃. Zu den Proben wurden 420 µl Königswasser gegeben und diese bei 70 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden den Proben 2,08 ml H₂O hinzugegeben. Die Endkonzentration der Säuren betrug dabei ca. 5 % HCl und ca. 3 % HNO₃. Zur Nullwertbestimmung wurden Medienansätze ohne oder mit entsprechenden Metallkonzentrationen ohne Zellen mitgeführt.

2.12.3 Bestimmung des Metallgehaltes

Die Proben wurden in einem iCAP™-RQ ICP-MS Instrument (Thermo Fisher Scientific, Bremen) mit einem Cetac ASX-560 Autosampler (Teledyne, Cetac Technologies, Omaha, NB, USA) und einem MicroFlow PFA-200 Vernebler (Elemental Scientific, Mainz) vermessen. Als externer Standard diente der Multielementstandard XVI (Merck, Darmstadt) in 2 % HNO₃ oder 5 % HCl für Proben, die mit Königswasser aufbereitet wurden. Die Messwerte werden als Metallgehalte in *parts per billion* ausgegeben. Der Mittelwert der Nullwerte wurde ermittelt und so Nachweisgrenzen (Mittelwert ± dreifache Standardabweichung) und Bestimmungsgrenzen (Mittelwert ± zehnfache Standardabweichung) berechnet. Die Metallgehalte (in ppb) wurden anhand der Zellzahl (basierend auf einer im Labor verwendeten Eichgerade), der Avogadrokonstanten, des Verdünnungsfaktors, der molaren Masse der jeweiligen Elemente und eines Einheitenkorrekturfaktors (10⁶) in Atome/Zelle umgerechnet. Die Formel zur Berechnung ergibt sich wie folgt:

$$\frac{\text{Atome}}{\text{Zelle}} = \frac{\text{Messwerte [ppb]} \times 10^6 \times N_A}{V \times M \times Z}$$

N_A - Avogadrokonstante (6,022 × 10²³ Atome/mol)

V - Verdünnungsfaktor

M - molare Masse [g/mol]

Z - Zellzahl [Zellen/l]

Die Messungen wurden von Dr. Martin Herzberg und Diana Galea durchgeführt.

2.13 Transmissionselektronenmikroskopie und EDX-Analyse

2.13.1 Zellanzucht

Zellen von *C. metallidurans* wurden in TMM für 18 h bis zur frühen stationären Phase bei 30 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen) angezogen. Für eine zweite Vorkultur wurden sie zu 5 % in frisches TMM angeimpft und für 24 h bis zur späten stationären Phase unter gleichen Bedingungen angezogen. In einer weiteren Kultur in Seitenarmkolben mit 10 ml TMM in einem Schüttelwasserbad (HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD von 150 bis 200 Kletteinheiten angezogen und mit 50 µM Gold beimpft. Die Zellen wurden für 30 min inkubiert und anschließend in einer Eppendorf 5804 R Zentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm für 20 min pelletiert. Die Zellen wurden einmal in TMM gewaschen und anschließend in 10 ml goldfreiem TMM resuspendiert, in neue Seitenarmkolben gefüllt und über 20 h bei 30 °C und 100 rpm inkubiert.

2.13.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung wurde von Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger (Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. 3 ml der Zellsuspension wurden mit 3 ml Fixierungsreagenz (3 % Glutaraldehyd in 0,1 M SCB-Puffer) für 3 h fixiert. Anschließend erfolgte eine

Zentrifugation und die Aufnahme in 4 % Agar/SCB. Es folgte ein Waschschrift mit SCB-Puffer über Nacht bei 4 °C und drei Waschschrift für 5 min mit dem gleichen Puffer. Die Proben wurden mit Osmiumtetroxid für 1 h fixiert und in einer steigenden Reihe von Ethanolkonzentrationen dehydriert (10 %, 30 %, 50 %). Es folgte eine Inkubation mit 1 % Uranylacetat/70 % Ethanol für 1 h und weitere Dehydrierungen mit Ethanol (70 %, 90 % und 100 %). Anschließend wurden die Proben mit Epoxidharz bei 70 °C polymerisiert.

2.13.3 Analyse der Proben im TEM

Die Analyse der Proben erfolgte durch Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger (Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Die Ultradünnschnitte (80-100 nm) wurden mit einem EM900 Transmissionselektronmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV betrachtet.

2.13.4 Analyse der Proben mittels EDX

Die EDX-Analyse erfolgte durch Lutz Berthold vom Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (IMWS) Halle. Dafür wurde ein Titan³ G2 60-300 (FEI Company, Oregon, USA) verwendet. Die Proben wurden im STEM unter Beschleunigungsspannungen von 80 kV analysiert. Dabei wurde die Software Esprit 1.9 von Bruker verwendet.

2.14 Statistik

Als Maß für statistische Signifikanz wird in dieser Arbeit die Berechnung nach Cohen verwendet (COHEN 1992).

3. Ergebnisse

3.1 Eine Deletion des *cup*-Operons in *C. metallidurans* AE104 führt zu einer Verringerung der Kupferresistenz

In vorangegangenen Studien konnten die Rollen der Kupferresistenzdeterminanten *cop*, *cup*, *cus* und *gig* bereits analysiert werden (WIESEMANN 2015). Allerdings beschränkte sich diese Arbeit auf die Arbeit mit Einzeldelentionsstämmen. In einer Masterarbeit von Gerlach (2017) konnten erstmals alle möglichen Mehrfachdeletionsstämmen im Stamm AE104 erstellt werden. Diese wurden auch in Wachstumsendpunktbestimmungen untersucht. Die Bestimmung der Resistenzen in Form von IC₅₀-Werten konnte allerdings nicht mehr bewerkstelligt werden. Im Folgenden wurde die Resistenz von 15 Deletionsstämmen der Systeme *cop*, *cup*, *cus* und *gig* in Wachstumsendpunktbestimmungen untersucht.

Tabelle 4. IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen der *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen von *C. metallidurans* AE104 nach Zugabe von Kupferchlorid (n ≥ 3).

Stamm	IC ₅₀ CuCl ₂ [µM]
AE104	615 ± 68
DN686 (Δcop)	389 ± 43,2
DN656 (Δcup)	13,5 ± 1,2
DN729 (Δcus)	743 ± 61,7
DN657 (Δgig)	580 ± 29,8
DN845 ($\Delta cop \Delta cup$)	3,4 ± 0,6
DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)	197 ± 20,9
DN847 ($\Delta cop \Delta gig$)	492 ± 50,3
DN848 ($\Delta gig \Delta cus$)	597 ± 25,6
DN849 ($\Delta cup \Delta gig$)	11 ± 2,1
DN850 ($\Delta cup \Delta cus$)	4,2 ± 0,9
DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	2,2 ± 0,1
DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$)	158 ± 15,7
DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$)	0,433 ± 0,2
DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$)	0,815 ± 0,2
DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	0,469 ± 0,1

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Kulturen 10 % in 200 µl TMM in 96-*well*-Platten mit flachem Boden mit Kupferchlorid angeimpft. Nach 20 h Inkubation in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS 4 Thermo Schüttler bei 30 °C und 1300 rpm wurde die Absorption bei 500 nm gemessen und für die Berechnung der IC₅₀-Werte herangezogen. Die IC₅₀-Werte wurden aus konzentrationsabhängigen Kurven ermittelt. Dabei wurde für jeden Stamm eine eigene Kurve erstellt und diese über mehrere Experimente gemittelt.

Der Stamm *C. metallidurans* AE104 hatte eine IC₅₀ von 615 ± 68 µM Cu(II). Der Stamm DN729 (Δcus) zeigte mit 743 ± 61,7 µM zwar einen großen Unterschied im Mittelwert, jedoch sind die Standardabweichung in beiden Fällen hoch. Der Stamm DN657 (Δgig) zeigte mit einer IC₅₀ von 580 ± 29,8 µM keine Veränderung der Kupferresistenz. Verringerungen zum Stamm AE104 zeigten die

Stämme DN686 (Δcop) mit $389 \pm 43,2 \mu\text{M}$ und DN656 (Δcup) mit $13,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$. Damit war die Resistenz in diesen Stämmen um ca. 40 % bzw. 98 % verringert. Von den vier Einzeldelationen hatte die *cup*-Deletion damit den größten Einfluss auf die Kupferresistenz. Der Export von Kupferionen aus dem Cytoplasma über die ATPase CupA scheint ein wichtiger Faktor in der Kupferhomöostase zu sein.

Die Doppeldeletion von *cus* und *gig* im Stamm DN848 ($\Delta gig \Delta cus$) hatte keinen Einfluss auf die Resistenz im Vergleich zu AE104. Erst eine weitere *cop*-Deletion konnte die Resistenz auf $158 \pm 15,7 \mu\text{M}$ senken. Dies entspricht einer Verringerung der Resistenz von ca. 75 % im Vergleich zum Elternstamm AE104. In der Mutante DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) war von allen vier Determinanten nur noch *cup* vorhanden. Die Deletion von *gig* (DN657) hatte keinen Einfluss auf die Kupferresistenz im Stamm AE104. Eine zusätzliche *cop*-Deletion senkte die Resistenz von $580 \pm 29,8 \mu\text{M}$ auf $492 \pm 50,3 \mu\text{M}$ im Stamm DN847 ($\Delta cop \Delta gig$). Die zusätzliche Deletion von *cop* (DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)) konnte die Resistenz auf $197 \pm 20,9 \mu\text{M}$ senken. Damit war der Effekt der *cop*-Deletion auf DN729 (Δcus) stärker als auf DN657 (Δgig). Im Stamm DN849 ($\Delta cup \Delta gig$) war die Resistenz mit $11 \pm 2,1 \mu\text{M}$ im Vergleich zu DN656 (Δcup) nicht geringer. Deletionen in *cop* und *cus* konnten die Resistenz im Stamm DN656 (Δcup) auf $3,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ bzw. $4,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ senken. Die niedrigsten Resistenzen zeigten die Stämme DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) und DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) mit Werten von $0,433 \pm 0,2 \mu\text{M}$ bzw. $0,469 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Die Dreifachmutante DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) hatte eine IC_{50} von $0,815 \pm 0,2 \mu\text{M}$ und lag damit über den vorher genannten Stämmen. Dies ist allerdings ein sehr kleiner Unterschied (Faktor < 2).

Die Ergebnisse zeigen, dass *cup* den größten Einfluss auf die Kupferresistenz hat. Alle Mutanten, die eine Deletion in diesem Operon hatten, zeigten eine IC_{50} von $13,5 \mu\text{M}$ oder weniger. War *cup* die einzige verbleibende Determinante, konnte eine deutlich höhere Resistenz im Vergleich zum Elternstamm AE104 beobachtet werden als bei allen anderen Dreifachmutanten, die ebenso nur eine Determinante behielten (DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) Minderung um Faktor 3,9; DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) verringert um Faktor 280; DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) um Faktor 1420 geringer; DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) um Faktor 755 im Vergleich zu AE104 gemindert). Eine Deletion in *cop* schien ebenfalls einen stark negativen Einfluss zu haben, wenn auch nicht so stark wie eine *cup*-Deletion. Die Dreifachmutante DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$), die *cop* behielt, zeigte eine IC_{50} von $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Dieser Wert lag damit um das Fünffache höher als bei den niedrigsten Werten (DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) = $0,433 \pm 0,2 \mu\text{M}$).

Die Rolle von *cus* in der Kupferresistenz schien erst in Mehrfachdeletionsstämmen zum Tragen zu kommen. Sowohl im Stamm DN686 (Δcop) als auch im Stamm DN656 (Δcup) konnte durch eine Deletion in *cus* der IC_{50} -Wert verringert werden.

Die Deletion von *gig* zeigte sowohl im Stamm DN686 (Δcop) als auch im Stamm DN656 (Δcup) keinen Effekt auf die Resistenz, jedoch im Stamm DN729 (Δcus). Die IC_{50} von $4,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ im Stamm DN850 ($\Delta cup \Delta cus$) konnte durch die zusätzliche Deletion von *gig* im Stamm DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) um fast die Hälfte auf $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ gemindert werden. Im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) sogar um den Faktor 8 von $3,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ auf $0,433 \pm 0,2 \mu\text{M}$ im Stamm DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$).

Damit zeigte sich, dass *cup* gefolgt von *cop* die stärkste Relevanz für die Kupferresistenz hatte. Cup scheint mit der P-Typ ATPase CupA die größte Rolle der untersuchten Systeme in der Kupferresistenz

zu spielen. Eine Deletion von *gig* zeigte stärkere Relevanz als *cus*, wenn alle anderen Systeme durch Deletion nicht mehr vorhanden waren, *cus* auf der anderen Seite zeigte seinen Einfluss bereits im Stamm DN686 (Δcop), in dem seine Deletion die Resistenz um den Faktor 2 herabsetzte. Ist *cop* nicht mehr vorhanden, steigt die Relevanz von *cus*. Im Stamm DN850 ($\Delta cup \Delta cus$) wurde die Resistenz um den Faktor 3 zu DN656 (Δcup) geringer und im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) um den Faktor 4. Die Daten könnten auf eine Unterstützung von Cup und Cop durch Cus deuten. Damit könnte Cus hinter Cup und Cop in zweiter Reihe der Kupferresistenz stehen. Im Stamm DN657 (Δgig) hatte die Deletion von *cus* keine Auswirkung auf die Kupferresistenz. Im Stamm DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) wurde durch eine *gig*-Deletion die Resistenz von $197 \pm 20,9 \mu\text{M}$ auf $158 \pm 15,7 \mu\text{M}$ gesenkt. Eine Deletion führt zur höchsten Verringerung der IC_{50} in allen Einzeldelentionsmutanten. Zudem führt der Verbleib als einziges Resistenzsystem im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) zur höchsten gemessenen IC_{50} in allen Dreifachdeletionsstämmen.

3.2 Eine *gshA*-Disruption verringert in vielen Stämmen die Kupferresistenz

Um den Einfluss von Glutathion auf die Kupferresistenz zu untersuchen, wurde das Gen *gshA* im Stamm *C. metallidurans* AE104 deletiert. Dieses Gen kodiert für die Glutamacysteinligase, welche in einer ATP-abhängigen Reaktion die Aminosäuren Glutamat und Cystein zu γ -Glutamylcystein verbindet. Diese Reaktion stellt den ersten Schritt einer zweistufigen Synthese dar, bei der im zweiten Schritt γ -Glutamylcystein mit Glycin in einer ebenfalls ATP-abhängigen Reaktion durch die Glutathionsynthetase zu Glutathion reagiert. Eine Deletion in *gshA* verhindert somit die Synthese des Zwischenproduktes γ -Glutamylcystein. In *C. metallidurans* werden beide Enzyme von den in einem Operon befindlichen Genen *gshA* und *gshB* codiert.

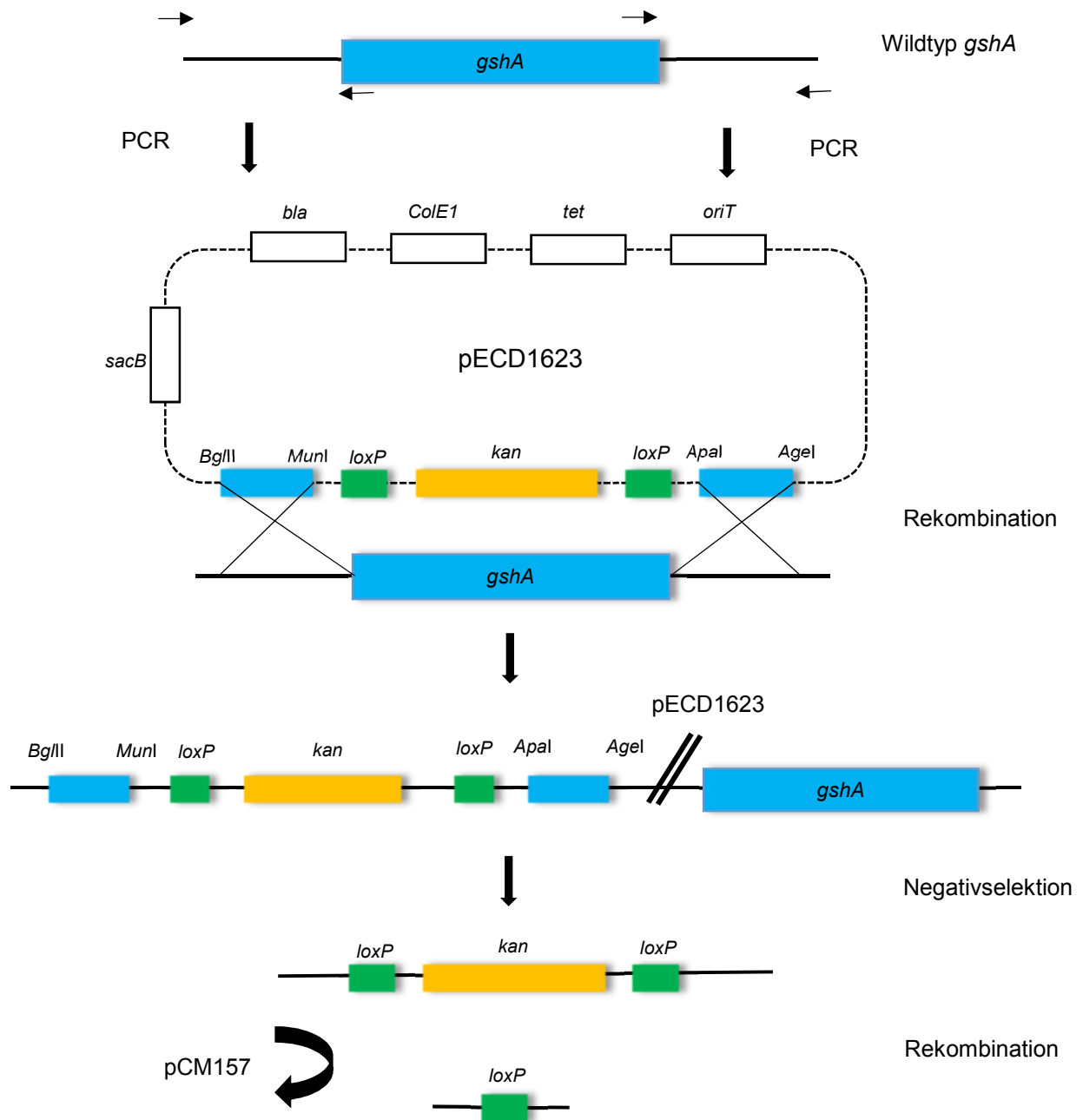


Abbildung 3. Deletion von *gshA* in *C. metallidurans* mithilfe des *cre-lox* Systems, nach Marx und Lidstrom (MARX UND LIDSTROM 2002). Stromauf- und abwärts flankierende Fragmente wurden an chromosomaler DNA von AE104 mit den Primern Rm $\Delta gshA$ crelox *Bgl*II und Rm $\Delta gshA$ OR *Mun*I bzw. Rm2 $\Delta gshA$ *Apal* fwd und Rm2 $\Delta gshA$ *Sac*I rev amplifiziert. Diese Fragmente wurden über Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Mun*I bzw. *Apal* und *Agel* in den Vektor pECD1002 eingebracht. Der resultierende Vektor ist pECD1623. Der Vektor pECD1623 wurde durch Konjugation in AE104 transferiert. Nach zwei homologen Rekombinationsschritten wurde die Kanamycinresistenz-Kassette durch die Cre-Rekombinase (auf dem Vektor pCM157) entfernt. Dabei dienten die auf dem Vektor befindlichen *loxP*-Stellen als Erkennungssequenz. Die Mutante wurde durch PCR und DNA::DNA-Hybridisierung überprüft.

Die markerlose Deletion von *gshA* konnte im Stamm AE104 erfolgreich durchgeführt werden (siehe Anhang Abb .13). Der Versuch das Gen *gshA* in Deletionsmutanten der Kupferhomöostase durchzuführen war nicht erfolgreich. Um dennoch die Synthese von Glutathion zu unterbinden, wurde entschieden das Gen *gshA* zu disruptieren. Dafür wurde das Plasmid pECD1668 verwendet. Der Vektor wurde in alle 15 Deletionsstämme und den Stamm AE104 (Tab. 4) konjugiert und die Rekombination auf dem Chromosom mittels PCR überprüft. Das Gen *gshA* wurde durch Rekombination mit dem Vektor pLO2-*gshA*_{dis} unterbrochen. Dabei wurde der gesamte Vektor in das Chromosom integriert. Diese Mutanten haben im Folgenden die genotypische Bezeichnung „*gshA*_{Disr.}“. Durch die eingebrachte

Disruption können polare Effekte auf das stromabwärts liegende Gen *gshB* nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 5. IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen der *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme mit Disruption im Gen *gshA* nach Zugabe von Kupferchlorid. (n ≥ 3).

Stamm	IC ₅₀ CuCl ₂ [µM]
AE104	615 ± 68
DN861 ($\Delta gshA$)	322 ± 24,3
DN902 ($gshA_{Disr.}$)	450 ± 36,4
DN903 ($\Delta cop gshA_{Disr.}$)	161 ± 24,4
DN904 ($\Delta cup gshA_{Disr.}$)	13,2 ± 2,5
DN905 ($\Delta cus gshA_{Disr.}$)	612 ± 32,4
DN906 ($\Delta gig gshA_{Disr.}$)	458 ± 42,9
DN907 ($\Delta cop \Delta cup gshA_{Disr.}$)	0,4 ± 0,1
DN908 ($\Delta cop \Delta cus gshA_{Disr.}$)	26,4 ± 2,9
DN909 ($\Delta cop \Delta gig gshA_{Disr.}$)	110 ± 9,4
DN910 ($\Delta gig \Delta cus gshA_{Disr.}$)	472 ± 48,7
DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$)	6,2 ± 1
DN912 ($\Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$)	3,8 ± 1,4
DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$)	0,5 ± 0,1
DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$)	29 ± 4,4
DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$)	0,461 ± 0,1
DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$)	0,481 ± 0,1
DN917 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$)	0,436 ± 0,2

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm mit Kanamycin als Selektionsmarker schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin als Selektionsmarker angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Kulturen 10 % in 200 µl TMM ohne Kanamycin in 96-well-Platten mit flachem Boden mit Kupferchlorid angeimpft. Nach 20 h Inkubation in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS 4 Thermo Schüttler bei 30 °C und 1300 rpm wurde die Absorption bei 500 nm gemessen und für die Berechnung der IC₅₀-Werte herangezogen. Die IC₅₀-Werte wurden aus konzentrationsabhängigen Kurven ermittelt. Dabei wurde für jeden Stamm eine eigene Kurve erstellt und diese über mehrere Experimente gemittelt. Der IC₅₀ Mittelwert des Stammes AE104 wurde aus Tabelle 4 übernommen.

Eine Disruption von *gshA* im Stamm AE104 (Tab. 5) bewirkt eine Verringerung der Kupferresistenz um ca. 27 % von 615 ± 68 µM auf 450 ± 36,4 µM. Eine vollständige Deletion des Gens bewirkt eine Verminderung um fast 50 % auf 322 ± 24,3 µM. Eine Disruption in *gshA* führt in fast allen anderen Stämmen zu einer niedrigeren Kupferresistenz. Im Stamm DN904 ($\Delta cup gshA_{Disr.}$) konnte durch die Disruption keine geringere IC₅₀ im Vergleich zu DN656 (Δcup) (Tab. 4) gezeigt werden. Außerdem konnte keine Abnahme bei drei Stämmen festgestellt werden, die bereits ohne Disruption eine IC₅₀ von ca. 0,5 µM aufwiesen. Auffällig war eine deutliche Abnahme der Resistenz in fünf Stämmen, die eine *cop*-Deletion tragen. In der Einzelmutante DN686 (Δcop) (Tab. 4) verringerte sich die Resistenz durch die Disruption in *gshA* um den Faktor 2,4. Im Stamm DN907 ($\Delta cop \Delta cup gshA_{Disr.}$) und DN908 ($\Delta cop \Delta cus gshA_{Disr.}$) sogar um den Faktor 8,1 bzw. 7,5. Im Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) wurde

die Resistenz um den Faktor 5,4 gesenkt, im Stamm DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$) um den Faktor 1,7. Waren nur noch *cop* und *gshA* vorhanden, konnte im Stamm DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) eine IC_{50} von $2,2 \pm 0,1 \mu M$ gemessen werden (Tab. 4). Wurde zusätzlich ein System entfernt, war die IC_{50} stets am Minimum von ca. $0,5 \mu M$. Dies könnte auf eine positive kooperative Wirkung von *cop* und *gshA* in der Kupferresistenz hindeuten, da sie zusammen eine IC_{50} oberhalb des Minimalwertes vermitteln. Im Vergleich zum Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) (Tab. 4) konnte *gshA* die Resistenz im Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) um den Faktor 5 steigern. Im Vergleich zu den Dreifachmutanten DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) und DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) (Tab. 4) konnte kein Unterschied der IC_{50} -Werte zu den Vierfachmutanten DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) und DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$), die eine zusätzliche Disruption von *gshA* enthielten ermittelt werden. Zusammen mit *gig* und *cus* zeigte *gshA* eine Wirkung auf die Resistenz. Dies zeigte sich am Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) (Tab. 4), der einen IC_{50} -Wert über dem Minimum von ca. $0,5 \mu M$ hatte. Fehlte eines der Systeme (*cus*, *gig*, *gshA*), war der IC_{50} -Wert im Vergleich zum Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) (Tab. 4) stets minimal. Die Steigerung im betreffenden Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) war mit $3,4 \pm 0,6 \mu M$ (Tab. 4) allerdings gering. Die einzige Komponente, die als einzig verbleibende eine Resistenz oberhalb der niedrigsten gemessenen Werte hervorrief, war *cup*. War diese Determinante noch vorhanden, betrug die IC_{50} im Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) $29 \pm 4,4 \mu M$. Bei allen anderen Stämmen mit lediglich einer vorhandenen Determinante lag diese bei ca. $0,5 \mu M$. Unter allen untersuchten Systemen war das Cus-System das einzige andere Kupferexportsystem. Eine Substitution von *cup* durch *cus* schien in diesem Versuch nicht möglich, da der betreffende Stamm DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$), der nur noch das Cus-System enthielt, eine IC_{50} von $0,461 \pm 0,1 \mu M$ zeigte. Waren sowohl *cup* als auch *cop* noch vorhanden, betrug die IC_{50} $472 \pm 48,7 \mu M$ im Stamm DN910 ($\Delta gig \Delta cus gshA_{Disr.}$). Cup allein konnte damit zwar eine gewisse Resistenz in der Zelle aufrechterhalten (Faktor 66 über der geringsten IC_{50}), diese lag aber um den Faktor 30 niedriger als AE104 ($615 \pm 68 \mu M$). Waren sowohl Cup als auch Cop vorhanden, lag sie nur noch um den Faktor 1,3 niedriger als in AE104. Um auf das Niveau von AE104 zu kommen, reicht *cup* allein nicht aus. Gleichzeitig zeigt der Stamm DN656 (Δcup) (Tab. 4) die höchste Abnahme aller Einzeldelensionsstämmen. Cop allein sorgte für keine Resistenz gegen Kupfer über den Minimalwert hinaus. In Kombination mit einem der anderen Systeme konnte diese jedoch erhöht werden. Zusammen mit *gshA* um den Faktor 4, mit *gig* um den Faktor 8, mit *cus* um den Faktor 12 und mit *cup* um den Faktor 944 über die IC_{50} von DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.} = 0,5 \mu M$).

Eine *cus*-Deletion hatte im Stamm AE104 keinen Effekt auf die Resistenz (Tab. 4). Ebenso konnte Cus allein keine Resistenz oberhalb des Minimalwertes aufbauen. Cus konnte in Mutanten, die noch *cop* oder *cup* enthielten, die Resistenz steigern. Im Vergleich zum Stamm DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) von $0,5 \pm 0,1 \mu M$ Stamm auf $6,2 \pm 1 \mu M$ im Stamm DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) und von $29 \pm 4,4 \mu M$ im Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) auf $110 \pm 9,4 \mu M$ im Stamm DN909 ($\Delta cop \Delta gig gshA_{Disr.}$).

Eine *gig*-Deletion hatte im Stamm AE104 keinen Effekt auf den IC_{50} -Wert (Tab. 4). Ebenso in Stämmen mit vorhandener Einzeldelation in einem der anderen vier Systeme. Der Effekt von *gig* zeigte sich vor allem im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) (Tab. 4) und DN912 ($\Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$), deren IC_{50} um

rund den Faktor 8 auf unter 0,5 μM sank. Im Stamm DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) (Tab. 4) konnte eine *gig*-Deletion die Resistenz leicht beeinflussen, jedoch nicht im Stamm DN908 ($\Delta cop \Delta cus gshA_{Disr.}$).

Es zeigte sich, dass eine *gshA*-Disruption in Stämmen mit einer vorhandenen *cop*-Deletion zu verringerten IC_{50} -Werten führt. Von allen Vierfachmutanten kann DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) eine IC_{50} über dem Minimalwert aufrechterhalten. In dieser Mutante ist nur noch *cup* vorhanden. Für die volle Resistenz gegen Kupfer braucht *cup* aber andere Systeme. Die Systeme *cus*, *gig* und *gshA* können nur zusammen eine Resistenz über dem Minimalwert hervorrufen. Eine Inaktivierung aller drei Systeme hat nur eine geringe Auswirkung auf die Kupferresistenz.

3.3 Bakterien werden auch bei geringen Kupferkonzentrationen abgetötet

Um den Effekt der Resistenzsysteme auf das Überleben der Zellen zu testen, wurden die Deletionsmutanten mit und ohne Disruption in *gshA* auf TMM mit der IC_{50} entsprechenden CuCl_2 -Konzentration für 20 Stunden angezogen. Das Ziel hierbei war ähnliche Bedingungen wie in den Wachstumsendpunktbestimmungen zu schaffen, um Rückschlüsse auf den prozentualen Anteil lebender und toter Zellen in einer mit Kupfer versetzten Kultur zu erhalten. Obwohl die Zellen nachweislich bei diesen Konzentrationen geringeres Wachstum in Wachstumsendpunktbestimmungen zeigten, war nicht klar, ob es auch einen bakterioziden Effekt gab. Die Kupferkonzentration entsprach immer der zuvor ermittelten IC_{50} -Konzentration (Tab. 4 und 5). Die Zellen wurden gleichzeitig mit zwei DNA-interkalierenden Farbstoffen angefärbt (*Live/Dead*-Färbung). DNA lebender Zellen konnten mit dem Farbstoff Syto 9 angefärbt werden. Dieser kann die Zellmembran passieren und färbt so alle Zellen an. Propidiumiodid kann die Membran nicht durchdringen und so nur DNA in Zellen mit geschädigter Membran anfärben. Durch den Einsatz geeigneter Filter (λ_{Ex} 450-490/546 nm, λ_{Em} 520/590 nm) konnten tote und lebende Zellen getrennt visualisiert werden. Als Negativkontrolle für den Farbstoff Propidiumiodid wurden Kulturen mit Isopropanol abgetötet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Tabelle 6 sind zunächst die Ergebnisse der *Live/Dead*-Färbung der Stämme ohne zusätzliche Disruption in *gshA*, mit und ohne zusätzliches Kupfer dargestellt. Beispiele für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind im Anhang aufgeführt (Abb. 24-27).

Tabelle 6. Prozentualer Anteil toter Zellen in 15 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen in *Live/Dead*-Färbungsexperimenten nach Inkubation mit ihrer entsprechenden IC₅₀ (n ≥ 4).

Stamm	Anteil toter Zellen in Kulturen ohne zusätzliches Kupfer [%]	Anteil toter Zellen in Kulturen mit Kupfer entsprechend der IC ₅₀ -Konzentration [%]
AE104	4,9 ± 2,4	9,1 ± 6
DN686 (Δcop)	2,9 ± 1,6	9,7 ± 5,7
DN656 (Δcup)	2,4 ± 2,8	8,6 ± 6,3
DN729 (Δcus)	2,8 ± 2,7	9,6 ± 6,9
DN657 (Δgig)	3,5 ± 0,7	5,7 ± 2,7
DN845 ($\Delta cop \Delta cup$)	4 ± 2	10,5 ± 4,9
DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)	3,6 ± 2,1	16,5 ± 3,7
DN847 ($\Delta cop \Delta gig$)	2,5 ± 2,3	6,2 ± 3,7
DN848 ($\Delta gig \Delta cus$)	3,4 ± 3,9	7,5 ± 1,8
DN849 ($\Delta cup \Delta gig$)	4,5 ± 2,2	4,7 ± 4,5
DN850 ($\Delta cup \Delta cus$)	4,4 ± 3,2	2,6 ± 2,6
DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	5,1 ± 2,4	3,8 ± 2,4
DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$)	5,5 ± 3,1	17,1 ± 6,1
DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$)	2,5 ± 1	2,8 ± 4
DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$)	4,5 ± 1,4	3 ± 1,7
DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	3,9 ± 3,2	5,5 ± 3,9

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen in Medium mit und ohne Kupfer 10 % angeimpft und für 20 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für den Versuch vorbereitet, mit beiden Farbstoffen angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Der Anteil toter Zellen in Kulturen von AE104 betrug 4,9 ± 2,4 %. Der prozentuale Anteil toter Zellen in Kulturen ohne Kupfer betrug minimal 2,4 ± 2,8 % für DN656 (Δcup) bis maximal 5,5 ± 3,1 % für DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$). Der durchschnittliche Anteil toter Zellen in allen Kulturen ohne Kupfer betrug ca. 4 %. Eine höhere Zahl deletierter Operons korrelierte nicht mit einer höheren Zahl toter Zellen in der Kultur. Somit hatte die Anzahl der Mutationen keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen, wenn kein zusätzliches Kupfer im Medium war. Wurde Kupfer in entsprechenden Konzentrationen hinzugegeben, erhöhte sich der durchschnittliche Anteil toter Zellen auf etwa 7 %, allerdings mit größeren Standardabweichungen. Beim Vergleich des Anteils zwischen Kulturen desselben Stammes mit und ohne Kupfer veränderte sich der Anteil toter Zellen selten. Die einzigen Ausnahmen bildeten die Stämme DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) dessen Anteil von 3,6 ± 2,1 % auf 16,5 ± 3,7 % anstieg und DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) dessen Anteil von 5,5 ± 3,1 % auf 17,1 ± 6,1 % anstieg. Die IC₅₀-Werte waren bei beiden Stämmen ähnlich (Tab. 4). Beide Stämme tragen sowohl eine *cop* als auch eine *cus*-Deletion. In keiner der beiden Einzelmutanten DN686 (Δcop) oder DN729 (Δcus) konnte ein deutlicher Anstieg toter Zellen beobachtet werden (Tab. 6). Allerdings sind die Mittelwerte beider

ERGEBNISSE

Stämme in Kulturen mit Kupfer deutlich erhöht. Ebenso wenig konnte dies im Stamm DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) gezeigt werden. Dieser Stamm trug zusätzlich zu den Mutationen im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) eine *cup*-Deletion, zeigte aber dennoch keinen höheren Anteil toter Zellen. Die prozentualen Anteile toter Zellen der Stämme mit zusätzlicher Disruption in *gshA* sind in Tabelle 7 zu sehen.

Tabelle 7. Prozentualer Anteil toter Zellen in 17 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen sowie mit Disruption im Gen *gshA* in Live/Dead-Färbungsexperimenten nach Inkubation mit ihrer entsprechenden IC_{50} ($n \geq 4$).

Stamm	Anteil toter Zellen in Kulturen ohne Kupfer [%]	Anteil toter Zellen in Kulturen mit Kupfer entsprechend der IC_{50} - Konzentration [%]
AE104	4,9 ± 2,4	9,1 ± 6
DN861 ($\Delta gshA$)	2,4 ± 1	9,7 ± 7,6
DN902 (<i>gshA</i> _{Disr.})	2,8 ± 1,8	5,5 ± 3,2
DN903 (Δcop <i>gshA</i> _{Disr.})	2,7 ± 3	4,7 ± 3,3
DN904 (Δcup <i>gshA</i> _{Disr.})	1,2 ± 0,6	4,9 ± 2,8
DN905 (Δcus <i>gshA</i> _{Disr.})	1,3 ± 0,6	7 ± 4,4
DN906 (Δgig <i>gshA</i> _{Disr.})	2,5 ± 1,9	4,1 ± 2,4
DN907 ($\Delta cop \Delta cup$ <i>gshA</i> _{Disr.})	9,5 ± 5,7	9,4 ± 3,6
DN908 ($\Delta cop \Delta cus$ <i>gshA</i> _{Disr.})	2,8 ± 1,9	13,7 ± 5,6
DN909 ($\Delta cop \Delta gig$ <i>gshA</i> _{Disr.})	4,5 ± 0,4	30,7 ± 10
DN910 ($\Delta gig \Delta cus$ <i>gshA</i> _{Disr.})	2,2 ± 0,4	3,6 ± 2,1
DN911 ($\Delta cup \Delta gig$ <i>gshA</i> _{Disr.})	4,3 ± 1,4	10,6 ± 1,9
DN912 ($\Delta cup \Delta cus$ <i>gshA</i> _{Disr.})	4,2 ± 2,2	20 ± 3,5
DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$ <i>gshA</i> _{Disr.})	3,9 ± 3,6	2,8 ± 2,8
DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$ <i>gshA</i> _{Disr.})	6,5 ± 4,1	26,1 ± 12,6
DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$ <i>gshA</i> _{Disr.})	1,4 ± 0,6	7,8 ± 4
DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$ <i>gshA</i> _{Disr.})	4,1 ± 2,4	7,3 ± 3,7
DN917 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$ <i>gshA</i> _{Disr.})	5,9 ± 2,9	10 ± 2

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h in TMM mit Kanamycin im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen in Medium ohne Kanamycin mit und ohne Kupfer 10 % angeimpft und für 20 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für den Versuch vorbereitet, mit beiden Farbstoffen angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Werte des Stammes AE104 wurden aus der vorherigen Tabelle übernommen.

Eine Disruption von *gshA* im Stamm AE104 zeigte keine Änderung des Anteils toter Zellen in der Kultur, wenn diese kein zusätzliches Kupfer enthielt. Der Anteil der Disruptionsmutante DN902 (*gshA*_{Disr.}) lag bei 2,8 ± 1,8 %, während der Anteil in der Kultur des Stamms AE104 ohne Disruption bei 4,9 ± 2,4 % lag. Ebenso verhielt es sich bei der markerlosen Deletionsmutante DN861 ($\Delta gshA$), deren Anteil bei 2,4 ± 1 % lag. Der prozentuale Anteil toter Zellen der Disruptionsstämmen in *gshA* lag bei 1,2 ± 0,6 % für DN904 (Δcup *gshA*_{Disr.}) bis 9,5 ± 5,7 % für DN907 ($\Delta cop \Delta cup$ *gshA*_{Disr.}). Der durchschnittliche Anteil toter Zellen lag bei 3 % in allen Stämmen. In Stämmen mit Disruption betrug dieser rund 10%. Höhere

Anteile toter Zellen nach Inkubation mit Kupfer gab es bei DN904 ($\Delta cup gshA_{Disr.}$) mit $1,2 \pm 0,6$ % ohne Kupfer und $4,9 \pm 2,8$ % mit Kupfer. Im Stamm DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$), der neben einer *cup*-Deletion eine zusätzliche *gig*-Deletion enthielt, stieg der Anteil von $4,3 \pm 1,4$ % auf $10,6 \pm 1,9$ %. Im Stamm DN912 ($\Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$) erhöhte sich der Anteil von $4,2 \pm 2,2$ % auf $20 \pm 3,5$ %. Im Stamm DN905 ($\Delta cus gshA_{Disr.}$) wurde der Anteil toter Zellen von $1,3 \pm 0,6$ % auf $7 \pm 4,4$ % durch Zugabe von Kupfer gesteigert. Im Stamm DN908 ($\Delta cop \Delta cus gshA_{Disr.}$) erhöhte sich der Anteil von $2,8 \pm 1,9$ % auf $13,7 \pm 5,6$ %, im Stamm DN909 ($\Delta cop \Delta gig gshA_{Disr.}$) von $4,5 \pm 0,4$ % auf $30,7 \pm 10$ %. Eine Einzeldelation der Determinanten hatte keine Auswirkung auf die Überlebensfähigkeit der Zellen.

Erst die Kombination verschiedener Deletionen hatte einen Unterschied zur Folge. Der Anteil toter Zellen in einer Kultur von DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) konnte durch eine *gshA*-Disruption von $1,4 \pm 0,6$ % auf $7,8 \pm 4$ % erhöht werden. Die IC_{50} von DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) entsprach dem Minimalwert und zeigte, dass selbst bei dieser geringen Konzentration noch Zellen abgetötet werden konnten. Jedoch bestand im Stamm DN907 ($\Delta cop \Delta cup gshA_{Disr.}$), der keine *gig*-Deletion enthielt, kein Unterschied zwischen den Bedingungen. Der Anteil toter Zellen lag hier mit $9,5 \pm 5,7$ % ohne Kupfer jedoch bereits 3 % über dem Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) mit $6,5 \pm 4,1$ %, der durch Zugabe von Kupfer einen höheren Anteil toter Zellen ($26,1 \pm 12,6$ %) aufwies. Als einzige verbleibende Determinante konnte *cup* einen Anstieg toter Zellen damit nicht verhindern. Eine *cup*-Deletion, die in Wachstumsexperimenten noch eine stark gesunkene Resistenz zur Folge hatte, schien für das Überleben bei IC_{50} entsprechenden Kupferkonzentrationen keine Rolle zu spielen, wenn Glutathion in den Zellen vorhanden war. Eine Kombination aus *Gig* und *GSH* konnte im Stamm DN656 (Δcup) (Tab. 6) vor dem Abtöten schützen, da erst im Stamm DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) ein höherer Anteil toter Zellen gemessen werden konnte (Tab.7). Im Stamm DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) unterschieden sich die Anteile toter Zellen mit und ohne Kupfer nicht. Die verbleibende Determinante *cop* konnte damit gegen die toxische Wirkung von Kupfer am Minimalwert von ca. $0,5 \mu M CuCl_2$ schützen. Zusammen mit *gshA* konnte im Stamm DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) eine vierfach höhere Kupferkonzentration toleriert werden, wobei der Anteil toter Zellen gleichblieb. Die Experimente zeigen, dass *cop* eher vor dem Abtöten der Zellen schützt als *cup*. Beide Determinanten waren in *dose response* Experimenten wichtige Faktoren zur Aufrechterhaltung der Kupferresistenz (Tab. 4 und 5). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Zellen auch bei geringen Kupferkonzentrationen bei Zugabe von $0,5 \mu M CuCl_2$ noch effektiv abgetötet werden konnten.

3.4 Eine *cop*-Deletion trägt zur Akkumulation von Kupfer bei

Die Kulturen wurden bis zu einer OD von 150 Klett angezogen und geerntet. Im Gegensatz zum üblichen Verfahren der Probennahme, bei der Kulturen in hohen Konzentrationen Metall zugegeben wird und die Kulturen nur über einen relativ kurzen Zeitraum mit Kupferionen in Berührung kommen, wurde hier Kupferchlorid bereits zu Beginn der Inkubation hinzugefügt. Aufgrund der hohen Toxizität für einige Stämme konnten keine Konzentrationen gewählt werden, die ein Wachstum der Kulturen stark negativ beeinflusst hätten. Dies bedeutet, dass sich die Zellen schon während des Wachstums auf die verwendete Kupferkonzentration physiologisch eingestellt haben. Zusätzlich musste darauf

ERGEBNISSE

geachtet werden, dass die Ergebnisse untereinander vergleichbar waren, weswegen nicht für alle Stämme individuelle Konzentrationen zugegeben wurde.

Die verwendeten Stämme wurden in drei Gruppen eingeteilt. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Stämme mit und ohne Disruption von *gshA* basierte die Einteilung auf der Resistenz der Stämme mit einer *gshA*-Disruption, da diese in der Regel niedriger war. Beispielsweise besaß DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) eine IC_{50} von 3,4 μM , sein in *gshA* disruptiertes Gegenstück eine IC_{50} von ca. 0,4 μM . Deshalb wurden diese Stämme in Gruppe drei eingeteilt und in beiden Fällen mit 20 nM zusätzlichem Kupfer inkubiert. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Kupferbestimmung für die Deletionsstämme ohne zusätzliche Disruption von *gshA* gezeigt. Die berechnete Kupferkonzentration durch Zusatz von Nährsalzen ($CuCl_2$ in SL6) betrug 6 nM. Durch weitere Kontaminationen des verwendeten Wassers und der verwendeten Chemikalien lag die tatsächliche Konzentration aber bei 50 ± 15 nM.

Tabelle 8. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 15 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit und ohne Zugabe der angegebenen Kupferkonzentrationen (20 nM, 1 μM , 25 μM) ($n \geq 3$).

Stamm	Cu-Atome/Zelle $\times 10^3$	
	- Cu	+ Cu
		25 μM
AE104	6,9 \pm 1,8	33,6 \pm 6,8
DN686 (Δcop)	7,8 \pm 3,2	52,4 \pm 8,4
DN729 (Δcus)	7,6 \pm 2,6	49,6 \pm 12,9
DN657 (Δgig)	7, \pm 1,2	26,2 \pm 2,7
DN847 ($\Delta cop \Delta gig$)	5,7 \pm 1,1	36,3 \pm 7,5
DN848 ($\Delta gig \Delta cus$)	7,3 \pm 2	28,1 \pm 3
		1 μM
AE104	6,9 \pm 1,8	20,5 \pm 3,9
DN656 (Δcup)	9 \pm 3,4	19,9 \pm 6,1
DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)	7,1 \pm 1,3	26 \pm 3,2
DN849 ($\Delta cup \Delta gig$)	6,6 \pm 2,29	20,6 \pm 7
DN850 ($\Delta cup \Delta cus$)	5,2 \pm 1,2	20,3 \pm 3,5
DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$)	6,7 \pm 2,2	30,6 \pm 8,4
		20 nM
AE104	6,9 \pm 1,8	10,8 \pm 0,8
DN845 ($\Delta cop \Delta cup$)	6,5 \pm 2,2	8 \pm 1
DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	6,1 \pm 2,1	9,7 \pm 0,3
DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$)	5,9 \pm 1	7,4 \pm 2,6
DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$)	8 \pm 3,8	8,3 \pm 3,2
DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	6,3 \pm 1,9	9,2 \pm 0,3

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in TMM angeimpft. Nach einer Inkubation für 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden Kulturen angeimpft und für ca. 20 h mit den angegebenen Kupferkonzentrationen inkubiert. Beim Erreichen von 150 Klett wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die Pellets eingefroren. Für die ICP-MS-Messung wurden die Pellets aufgetaut und mit Salpetersäure versetzt. Nach Inkubation bei 70 °C über Nacht wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und vermessen.

Die durchschnittliche Zahl an Kupferatomen pro Zelle in Kulturen, denen kein zusätzliches Kupfer zugesetzt wurde, lag um $6-8 \times 10^3$ Atome pro Zelle. Die niedrigste Konzentration lag hier bei Stamm DN850 ($\Delta cup \Delta cus$) vor, der $5,22 \pm 1,16 \times 10^3$ Atome pro Zelle enthielt. Die höchste Konzentration konnte mit $9 \pm 3,4 \times 10^3$ Atomen pro Zelle im Stamm DN656 (Δcup) gemessen werden. Im Stamm AE104 erhöhte sich der Kupfergehalt bei 20 nM zusätzlichem Kupfer auf $10,8 \pm 0,8 \times 10^3$ Atome pro Zelle. Bei steigenden Kupferkonzentrationen erhöhte er sich weiter auf $20,5 \pm 3,9 \times 10^3$ Atome pro Zelle bei einer Zugabe von 1 μ M Kupfer und weiter auf $33,6 \pm 6,8 \times 10^3$ Atome pro Zelle bei einer Zugabe von 25 μ M Kupfer (Tab. 8). Dies zeigte, dass in AE104 bereits 20 nM zusätzliches Kupfer für eine Erhöhung des zellulären Kupfergehalts ausreichend waren. Außerdem konnte eine Steigerung bei höheren Kupferkonzentrationen im Medium festgestellt werden.

Wurde den Kulturen 20 nM Kupfer hinzugegeben, stiegen deren durchschnittliche Kupfergehalte nicht über den von AE104 an. Mit 1 μ M zusätzlichem Kupfer im Medium, zeigten alle Stämme höhere Kupfergehalte als solche, die mit 20 nM Kupfer versetzt wurden. Diese lagen zwischen $19,9 \pm 6,1 \times 10^3$ Atomen pro Zelle im Stamm DN656 (Δcup) und $30,6 \pm 8,4 \times 10^3$ Atomen pro Zelle im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) (Tab. 8). Allerdings waren diese ebenfalls im Vergleich zu AE104 nicht erhöht. Obwohl drei dieser Stämme eine *cup*-Deletion tragen und damit keine funktionale P-Typ ATPase zum Export cytoplasmatischen Kupfers besitzen, unterschieden sich die Kupfergehalte nicht von den Stämmen DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) und DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$), die diese Mutation nicht tragen. Damit scheint *cup* nicht wesentlich zur Minderung des zellulären Kupfers unter Zugabe von 1 μ M Cu(II) beizutragen. Deletionsstämmen, denen zusätzlich 25 μ M Kupfer ins Medium zugegeben wurden, zeigten erhöhte Kupfergehalte. Die Werte lagen zwischen $26,2 \pm 2,7 \times 10^3$ Atome pro Zelle im Stamm DN657 (Δgig) und $52,4 \pm 8,4 \times 10^3$ Atome pro Zelle im Stamm DN686 (Δcop) (Tab. 8). Damit war DN686 (Δcop) der einzige Stamm, der bei 25 μ M einen Unterschied zu AE104 zeigte. DN729 (Δcus) zeigte zwar einen Gehalt von $49,6 \pm 12,9 \times 10^3$ Atomen pro Zelle, dies stellte aufgrund der hohen Standardabweichung keinen Unterschied zum Stamm AE104 dar. In Tabelle 9 sind die Kupfergehalte der Stämme mit Disruption in *gshA* gezeigt.

Tabelle 9. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 17 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit zusätzlicher Disruption des Gens *gshA* mit und ohne Zugabe der angegebenen Kupferkonzentrationen (20 nM, 1 µM, 25 µM). (n ≥ 3).

Stamm	Cu-Atome/Zelle × 10 ³	
	- Cu	+ Cu
		25 µM
AE104	6,9 ± 1,8	33,6 ± 6,8
DN861 ($\Delta gshA$)	5,2 ± 1	23,4 ± 0,7
DN902 (<i>gshA_{Disr.}</i>)	6,1 ± 1,4	23 ± 2,5
DN903 (Δcop <i>gshA_{Disr.}</i>)	4,6 ± 0,7	125 ± 25
DN905 (Δcus <i>gshA_{Disr.}</i>)	5,1 ± 0,2	36,3 ± 5,7
DN906 (Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	5 ± 0,5	24,4 ± 3,5
DN909 (Δcop Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	6,7 ± 0,4	253 ± 17
DN910 (Δgig Δcus <i>gshA_{Disr.}</i>)	6,6 ± 0,7	25,3 ± 1,3
		1 µM
AE104	6,9 ± 1,8	20,5 ± 3,9
DN904 (Δcup <i>gshA_{Disr.}</i>)	5,5 ± 0,9	19,1 ± 2,6
DN908 (Δcop Δcus <i>gshA_{Disr.}</i>)	5 ± 0,5	45,5 ± 20,3
DN911 (Δcup Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	6 ± 0,8	17,5 ± 0,8
DN912 (Δcup Δcus <i>gshA_{Disr.}</i>)	5,1 ± 0,4	19,6 ± 1,1
DN914 (Δcop Δcus Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	4,7 ± 0,6	33,3 ± 12,4
		20 nM
AE104	6,9 ± 1,8	10,8 ± 0,8
DN907 (Δcop Δcup <i>gshA_{Disr.}</i>)	6 ± 0,6	13,6 ± 4
DN913 (Δcup Δcus Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	3,3 ± 1	8 ± 1,3
DN915 (Δcop Δcup Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	3,7 ± 0,7	11,5 ± 1,2
DN916 (Δcop Δcup Δcus <i>gshA_{Disr.}</i>)	5,6 ± 0,4	9,8 ± 0,8
DN917 (Δcop Δcup Δcus Δgig <i>gshA_{Disr.}</i>)	5,8 ± 1,1	12 ± 1,4

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation für 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden Kulturen in TMM ohne Kanamycin angeimpft und für ca. 20 h mit den angegebenen Kupferkonzentrationen inkubiert. Beim Erreichen von 150 Klett wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die Pellets eingefroren. Für die ICP-MS-Messung wurden die Pellets aufgetaut und mit Salpetersäure versetzt. Nach Inkubation bei 70 °C über Nacht wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und vermessen. Die Werte des Stammes AE104 wurden aus der vorherigen Tabelle übernommen.

Eine einzelne Disruption bzw. Deletion von *gshA* sorgte für einen niedrigeren Kupfergehalt in AE104 bei einer Zugabe von 25 µM CuCl₂. In AE104 lag er bei 33,6 ± 6,8 × 10³ Atomen pro Zelle und in den Mutanten DN861 ($\Delta gshA$) und DN902 (*gshA_{Disr.}*) bei 23,4 ± 0,7 bzw. 23 ± 2,5 × 10³ Atomen pro Zelle. Wurde zusätzlich zu einer Mutation in *gshA* eine Deletion von *cop* eingefügt, erhöhte sich der Kupfergehalt auf 125 ± 25 × 10³ Atome pro Zelle. Eine Deletion von *cop* (Tab. 8) zeigte damit den gegenteiligen Effekt zu *gshA*, aber in Kombination mit einer *cop*-Deletion steigerte eine Disruption von *gshA* den akkumulierenden Effekt. Im Stamm DN903 (Δcop *gshA_{Disr.}*) erhöhte sich die Anzahl der

Kupferatome von $4,6 \pm 0,7 \times 10^3$ Atomen pro Zelle ohne Zugabe von Kupfer auf $125 \pm 25 \times 10^3$ Atome pro Zelle bei Zugabe von $25 \mu\text{M}$ Kupfer zum Medium. Im Stamm DN908 ($\Delta cop \Delta cus gshA_{Disr.}$) lag der Kupfergehalt bei einer Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Kupfer bei $45,5 \pm 20,3 \times 10^3$ Atomen pro Zelle und damit etwa um den Faktor 2 höher als in AE104 ($20,5 \pm 3,9 \times 10^3$ Atome pro Zelle). Im Stamm DN905 ($\Delta cus gshA_{Disr.}$), dem die *cop*-Deletion fehlte, konnten bei einer Zugabe von $25 \mu\text{M}$ zusätzlichem Kupfer $36,3 \pm 5,7 \times 10^3$ Atome pro Zelle gemessen werden. Dies war kein Unterschied zum Stamm AE104 ($33,6 \pm 6,8 \times 10^3$ Atome pro Zelle). DN909 ($\Delta cop \Delta gig gshA_{Disr.}$) zeigte mit $253 \pm 17 \times 10^3$ Atomen pro Zelle von allen Stämmen die höchste Kupferakkumulation. Damit erhöhte eine *gig*-Deletion im Stamm DN903 ($\Delta cop gshA_{Disr.}$) den Gehalt um den Faktor 2. Ein Effekt durch eine *gig*-Deletion konnte weder im Stamm DN657 (*Δgig*) (Tab. 8) noch im Stamm DN906 ($\Delta gig gshA_{Disr.}$) beobachtet werden, deren Kupfergehalte bei rund 25×10^3 Kupferatomen pro Zelle lagen.

Neben der Kupferionenkonzentration in den Zellen wurden auch die Gehalte anderer Metallionen bestimmt, um Auswirkungen des zusätzlichen Kupfers auf die Metallhomöostase in den Zellen zu untersuchen. AE104 zeigte eine Zinkkonzentration von $5,6 \pm 0,77 \times 10^4$ Atomen pro Zelle. Im Stamm DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) ($2,5 \pm 0,82 \times 10^4$ Atome pro Zelle), DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) ($3,5 \pm 0,2 \times 10^4$ Atome pro Zelle) und DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) ($3,3 \pm 0,87 \times 10^4$ Atome pro Zelle) war der Zinkgehalt im Vergleich zu AE104 leicht gesenkt. Diese Mutanten enthalten alle eine $\Delta gig gshA_{Disr.}$ Mutation. Der Stamm AE104 zeigte einen Magnesiumgehalt von etwa $8,5 \pm 1,5 \times 10^6$ Atomen pro Zelle. Ohne Zugabe von Kupfer hatten die Stämme DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) ($1,3 \pm 0,3 \times 10^7$ Atome pro Zelle), DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) ($1,5 \pm 0,3 \times 10^7$ Atome pro Zelle), DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) ($1,3 \pm 0,2 \times 10^7$ Atome pro Zelle), DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) ($1,3 \pm 0,2 \times 10^7$ Atome pro Zelle), DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) ($1,7 \pm 0,3 \times 10^7$ Atome pro Zelle) und DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) ($1,9 \pm 0,7 \times 10^7$ Atome pro Zelle) einen erhöhten Magnesiumgehalt. Diese waren ebenso nach Zugabe von Kupfer erhöht. Mit Disruption in *gshA* war dies im Stamm DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$) nicht mehr der Fall. Der Stamm trägt immer noch *gig*, bei allen anderen Mutanten fehlte diese Determinante. Der Eisengehalt im Stamm AE104 lag bei etwa 6×10^5 Atomen pro Zelle. Die Eisengehalte waren in *gshA*-Deletionsstämmen nach Zugabe von Kupfer tendenziell niedriger. Die Eisengehalte unterschieden sich zwischen den Stämmen nicht (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine *cop*-Deletion zur Akkumulation von Kupfer in der Zelle beiträgt. Durch eine Disruption in *gshA* konnte dieser Effekt in *cop*-Deletionsstämmen verstärkt werden, wenn $25 \mu\text{M}$ Kupfer zugegeben wurde.

3.5 Die Zugabe von Kupfer hat keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt

Die Proben für die Bestimmung des Glutathiongehaltes wurden parallel den Kulturen wie für die Bestimmung der Metallgehalte entnommen. Der Glutathiongehalt wurde enzymatisch bestimmt (Tab. 10). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt. In Stämmen mit einer Disruption von *gshA* konnte kein GSH detektiert werden. DN861 ($\Delta gshA$) und DN902 ($gshA_{Disr.}$) sind in dieser Tabelle als Kontrolle aufgeführt, die restlichen Daten der Stämme mit Disruption in *gshA* sind nicht gezeigt. Im diesem

ERGEBNISSE

Versuch wurde der Gesamtglutathiongehalt bestimmt und nicht zwischen der oxidierten und reduzierten Form unterschieden.

Tabelle 10. Enzymatisch bestimmter Glutathiongehalt in 17 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen in *C. metallidurans* mit und ohne Zugabe der angegebenen Kupferkonzentrationen. (20 nM, 1 μ M, 25 μ M)

Stamm	Glutathion-Gehalt [nmol Glutathion/mg Protein]	
	- Cu	+ Cu
		25 μ M
AE104	593 \pm 18	535 \pm 73
DN861 (Δ <i>gshA</i>)	n. b.	n. b.
DN902 (<i>gshA</i> _{Disr.})	n. b.	n. b.
DN686 (Δ <i>cop</i>)	668 \pm 45	553 \pm 45
DN729 (Δ <i>cus</i>)	120 \pm 38	136 \pm 42
DN657 (Δ <i>gig</i>)	603 \pm 2	540 \pm 63
DN847 (Δ <i>cop</i> Δ <i>gig</i>)	593 \pm 158	418 \pm 88
DN848 (Δ <i>gig</i> Δ <i>cus</i>)	536 \pm 13	533 \pm 73
		1 μ M
AE104	593 \pm 18	505 \pm 78
DN656 (Δ <i>cup</i>)	587 \pm 14	576 \pm 73
DN846 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cus</i>)	608 \pm 119	650 \pm 81
DN849 (Δ <i>cup</i> Δ <i>gig</i>)	422 \pm 112	662 \pm 110
DN850 (Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i>)	487 \pm 79	585 \pm 77
DN852 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig</i>)	501 \pm 38	366 \pm 19
		20 nM
AE104	593 \pm 18	671 \pm 83
DN845 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i>)	654 \pm 182	552 \pm 42
DN851 (Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig</i>)	498 \pm 45	460 \pm 45
DN853 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>gig</i>)	557 \pm 98	630 \pm 108
DN854 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i>)	448 \pm 80	548 \pm 60
DN855 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig</i>)	403 \pm 71	544 \pm 82

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen in Medium mit und ohne Kupfer angeimpft. Nach 20 h wurden die Zellen geerntet, in TMM gewaschen und der Protein- und der Glutathiongehalt bestimmt.

Der Glutathiongehalt im Stamm AE104 lag ohne Zugabe von Kupfer bei 593 \pm 18 nmol Glutathion/mg Protein. Durch Zugabe von Kupfer wurde der Gehalt nicht beeinflusst. Im Vergleich zu AE104 war der Gehalt im Stamm DN729 (Δ *cus*) ohne (120 \pm 38 nmol Glutathion/mg Protein) und mit Zugabe von Kupfer (136 \pm 42 nmol Glutathion/mg Protein) geringer. Dies war für keine andere Mutante mit einer *cus*-Deletion der Fall. Im Stamm DN849 (Δ *cup* Δ *gig*) war der Glutathiongehalt ohne Zugabe von Kupfer gemindert (422 \pm 112 nmol Glutathion/mg Protein) aber mit Zugabe von Kupfer erhöhte er sich auf

662 ± 110 nmol Glutathion/mg Protein. Dies entspricht dem Gehalt des Stammes AE104. Im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) konnte dagegen eine Verringerung von 501 ± 38 nmol Glutathion/mg Protein auf 366 ± 19 nmol Glutathion/mg Protein gemessen werden. Alle anderen Stämme zeigten keine Änderungen des Glutathiongehaltes. Da zwischen den Stämmen DN849 ($\Delta cup \Delta gig$) und DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) nur eine gemeinsame *gig*-Deletion vorhanden war und in der Einzeldelentionsmutante DN657 (Δgig) kein Unterschied im Glutathiongehalt gemessen werden konnte, wurde den Ergebnissen keine Bedeutung zugemessen. Insgesamt hatte die Zugabe von Kupfer keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt.

3.6 Die Zugabe von Kupfer führt zur Induktion des *gig*- und *cus*-Operons

Um die Expression des *gig*- und *cus*-Operons zu untersuchen, wurden mittels der Vektoren pECD1667 bzw. pECD1386 transkriptionelle Reportergernefusion hergestellt. Die Fusionen befinden sich jeweils stromabwärts der Gene *gigT* bzw. *cusF*. Die Stämme wurden mit steigenden Kupferkonzentrationen inkubiert und die Aktivitätsbestimmung an geernteten Zellpellets durchgeführt (Abb. 4 und 5).

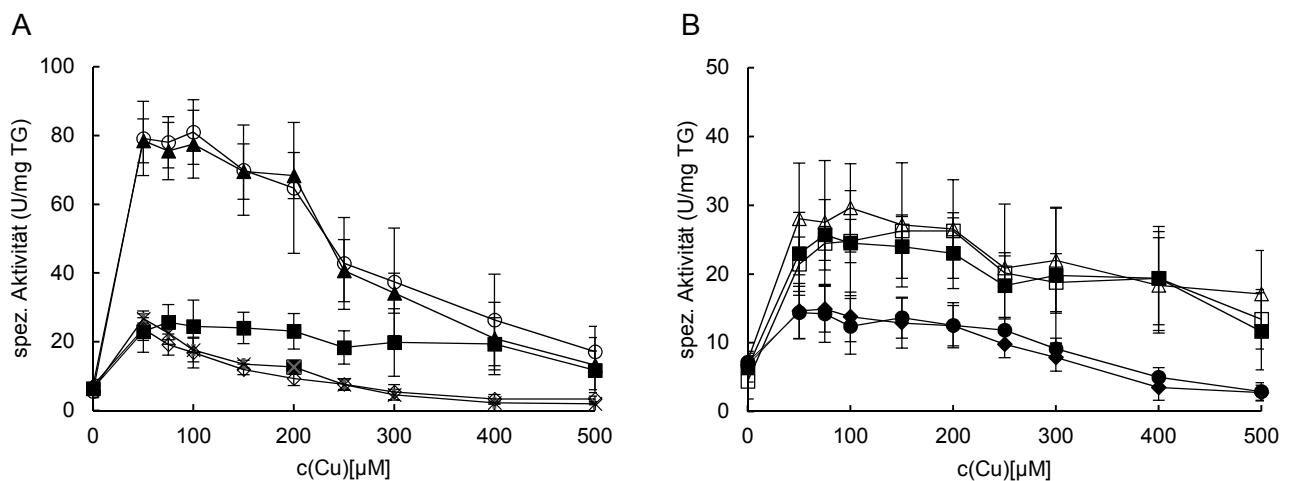


Abbildung 4. β -Gal-Assay mit *cusF-lacZ* Fusionsstämmen unter Zugabe von Kupferchlorid.

A: Deletionsstämme mit *cop*-Deletion und Stamm AE104 mit $CuCl_2$ inkubiert. AE104($\phi cusF-lacZ$) (■), Δcop ($\phi cusF-lacZ$) (○), $\Delta cop \Delta gig$ ($\phi cusF-lacZ$) (▲), $\Delta cop \Delta cup$ ($\phi cusF-lacZ$) (◇), $\Delta cop \Delta cup \Delta gig$ ($\phi cusF-lacZ$) (×) B: Deletionsstämme ohne *cop*-Deletion und Stamm AE104 mit $CuCl_2$ inkubiert. AE104($\phi cusF-lacZ$) (■), Δcup ($\phi cusF-lacZ$) (◆), Δgig ($\phi cusF-lacZ$) (△), $\Delta gshA$ ($\phi cusF-lacZ$) (□), $\Delta cup \Delta gig$ ($\phi cusF-lacZ$) (●), n ≥ 3.

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen 1 % in 20 ml TMM angeimpft und bis 100 Klett angezogen. Die Zellen wurden in 96-*well*-Platten mit rundem Boden in TMM mit Kupferchlorid drei Stunden bei 1300 rpm in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS4 inkubiert, geerntet und die Pellets eingefroren und für den β -Gal-Assay verwendet. Für diesen wurden die Pellets aufgetaut, mit Puffer Z und Substratlösung versetzt und die Reaktion bei einer Gelbfärbung mit Stopplösung abgestoppt. Die Proben wurden bei 420 nm und 550 nm im Tecan MNano vermessen und die spezifische Aktivität berechnet.

Aus den Daten ließ sich erkennen, dass Kupfer das *cus*-Operon im Stamm AE104 induzierte. Die Basisaktivität lag wie bei allen Stämmen bei ca. 5 U/mg Trockengewicht und stieg bei 50 μM $CuCl_2$ auf circa 25 U/mg an. Diese Aktivität konnte bis 400 μM beobachtet werden, bei 500 μM sank die Aktivität auf etwa 15 U/mg ab. Eine besonders hohe Expression konnte in den Stämmen DN686 (Δcop) und DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) gemessen werden. Die Aktivität lag bei Zugabe von 50 μM $CuCl_2$ bei circa 80 U/mg,

blieb bis 100 μM konstant und sank kontinuierlich auf 20 U/mg ab. Die *cop*-Produkte vermindern damit die Induktion von *cus* durch Cu.

In den Δcup -Stämmen Stämmen DN845 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup}$) und DN853 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup } \Delta\text{gig}$) zeigten bei 50 μM die gleiche Aktivität wie AE104. Bei höheren Konzentrationen nahm die Aktivität jedoch stetig ab und fiel unter die Basisaktivität. Die Aktivität war ab einer Konzentration von 150 μM niedriger als im Stamm AE104. Die Stämme DN656 (Δcup) und DN849 ($\Delta\text{cup } \Delta\text{gig}$) zeigten einen ähnlichen Verlauf wie DN845 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup}$) und DN853 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup } \Delta\text{gig}$) (Abb. 4B). Die Aktivität blieb zwischen 50 und 300 μM unterhalb von AE104 um 15 U/mg und fiel danach ab. Sowohl DN657 (Δgig) als auch DN861 (ΔgshA) zeigten ein ähnliches Verhalten wie AE104. Damit hatten diese Mutationen keine Auswirkung auf die Expression von *cus*. Eine *cop*-Deletion erhöhte damit die Induktion von *cus*, wohingegen *cup* für die volle Induktion von *cus* benötigt wurde.

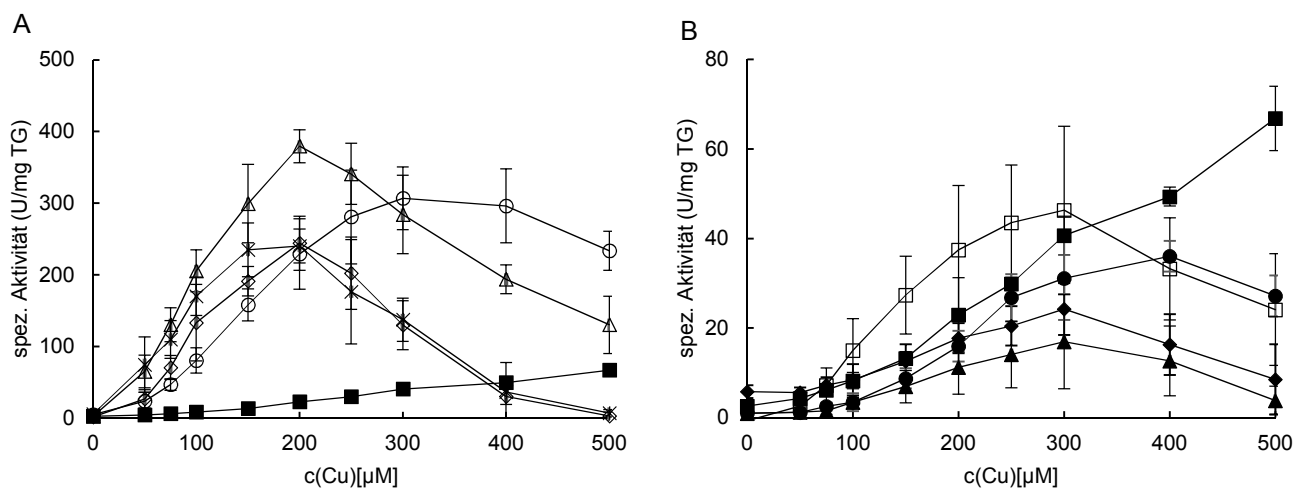


Abbildung 5. β -Gal-Assay mit *gigT-lacZ* Fusionsstämmen unter Zugabe von Kupferchlorid.

A: Deletionsstämmen mit *cop*-Deletion und Stamm AE104 mit CuCl_2 inkubiert. AE104($\phi\text{gigT-lacZ}$) (■), $\Delta\text{cop}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (○), $\Delta\text{cop } \Delta\text{cup}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (◇), $\Delta\text{cop } \Delta\text{cus}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (△), $\Delta\text{cop } \Delta\text{cup } \Delta\text{cus}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (×)
 B: Deletionsstämmen ohne *cop*-Deletion und Stamm AE104 mit CuCl_2 inkubiert. Zu beachten sind die verschiedenen Skalierungen der y-Achsen. AE104($\phi\text{gigT-lacZ}$) (■), $\Delta\text{cup}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (◆), $\Delta\text{cus}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (●), $\Delta\text{gshA}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (□), $\Delta\text{cup } \Delta\text{cus}(\phi\text{gigT-lacZ})$ (▲), $n \geq 3$.

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen 1 % in 20 ml TMM angeimpft und bis 100 Klett angezogen. Die Zellen wurden in 96-well-Platten mit rundem Boden in TMM mit Kupferchlorid drei Stunden bei 1300 rpm in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS4 inkubiert, geerntet und die Pellets eingefroren und für den β -Gal-Assay verwendet. Für diesen wurden die Pellets aufgetaut, mit Puffer Z und Substratlösung versetzt und die Reaktion bei einer Gelbfärbung mit Stopplösung abgestoppt. Die Proben wurden bei 420 nm und 550 nm im Tecan MNano vermessen und die spezifische Aktivität berechnet.

Bei der Aktivität der *gigT-lacZ* Fusion lag die Basisaktivität im Stamm AE104 bei $2,5 \pm 1,2$ U/mg und konnte kontinuierlich bis zu 67 ± 7 U/mg bei einer Konzentration von 500 μM CuCl_2 gesteigert werden (Abb. 5). Die Basisaktivitäten aller Stämme betragen weniger als 6 U/mg. Die Aktivität im Stamm DN686 (Δcop) lag bei einer Konzentration von 300 μM Cu-Ionen am höchsten und betrug ca. 300 U/mg. Im Stamm DN845 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup}$) und DN854 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup } \Delta\text{cus}$) hatte die Aktivität ihr Maximum von ca. 230 U/mg bei etwa 200 μM Kupferionen erreicht, darüber nahm die Aktivität aber ab und lag ab einer Konzentration von 400 μM niedriger als in AE104. Die höchste Aktivität zeigte DN846 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cus}$) mit 380 ± 23 U/mg bei 200 μM , der Aktivitätsabfall war allerdings schneller als im Stamm DN686 (Δcop)

und die Aktivität war bei hohen Kupferchloridkonzentrationen geringer. Damit zeigte sich, dass *gig* am stärksten im Stamm DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) exprimiert wurde. Die Stämme DN656 (Δcup), DN850 ($\Delta cup \Delta cus$) und DN729 (Δcus) zeigten bis 300 μM eine Aktivität von ca. 25 U/mg, 17 U/mg bzw. 31 U/mg. Bei höheren Konzentrationen stieg die Aktivität im Stamm DN729 (Δcus) an, während sie bei DN656 (Δcup) und DN850 ($\Delta cup \Delta cus$) abfiel. Im Stamm DN861 ($\Delta gshA$) stieg die Aktivität bis auf ca. 46 U/mg bei einer Zugabe von 300 μM Kupferchlorid an, danach fiel sie ab. Die Deletion von *cop* hatte in allen Stämmen eine erhöhte Aktivität zur Folge. Diese Stämme unterschieden sich in der Höhe der Maxima und den Konzentrationen an zusätzlichem Kupferchlorid. Die Aktivitäten in Stämmen ohne *cop*-Deletion waren deutlich geringer und lagen bei maximal 46 U/mg im Fall von DN861 ($\Delta gshA$). Durch die Zugabe von Kupferionen konnte *gig* induziert werden. Die Anwesenheit von *cop* verringert die Induktion, die Anwesenheit von *cus* verringert die Induktion bei niedrigen Kupferkonzentrationen. Die Anwesenheit von *cup* ist in *cop*-Deletionsstämmen Voraussetzung für die Induktion bei hohen Kupferkonzentrationen.

3.7 Eine *cup*-Deletion verringert den Einfluss der synergistischen Toxizität von Gold und Kupfer

In Vorgängerarbeiten konnte bereits die Resistenz gegenüber Goldionen gemessen werden. Es zeigte sich, dass die auch hier verwendete neue Goldlösung sehr toxisch für die Bakterien war. Eine Abnahme der OD trat bereits bei Zugabe von ca. 5 μM AuHCl_4 auf (GERLACH 2017). Aufgrund des Befundes der kooperativen Toxizität von Gold- und Kupferionen (WIESEMANN *et al.* 2017) wurde die Resistenz gegen Goldionen indirekt durch Inkubation der Stämme auf gold- und kupferhaltigem Medium untersucht. Die Endkonzentration der eingesetzten Goldionen betrug stets 2,5 μM und das Wachstum wurde in Abhängigkeit variabler Kupferchloridkonzentrationen bestimmt und so der synergistisch toxische Effekt von Goldionen untersucht. Durch die geringe Goldkonzentration wurde eine Verringerung des Zellwachstums durch zu viel AuHCl_4 im Medium minimiert. Für die folgenden Experimente wurden die Resistenz für alle 15 Deletionsmutanten (Tab. 11) sowie deren in *gshA* disruptierten Varianten (Tab. 12) erneut auf kupferhaltigem Medium ohne Zusatz von Goldionen bestimmt.

Tabelle 11. IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen der *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme von *C. metallidurans* AE104 auf gold- und kupferhaltigen Medien (n≥3).

Stamm	IC ₅₀ Kupfer [µM]	IC ₅₀ Kupfer [µM] + 2,5 µM HAuCl ₄
AE104	648 ± 48,1	406 ± 50,4
DN686 (Δcop)	370 ± 51,8	337 ± 21,4
DN656 (Δcup)	16,4 ± 2,7	16,2 ± 3,7
DN729 (Δcus)	820 ± 35,9	705 ± 30,4
DN657 (Δgig)	635 ± 26,1	509 ± 72,2
DN845 ($\Delta cop \Delta cup$)	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,5
DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)	203 ± 22,9	174 ± 16,4
DN847 ($\Delta cop \Delta gig$)	498 ± 34,9	367 ± 42,9
DN848 ($\Delta gig \Delta cus$)	638 ± 29,1	527 ± 46,2
DN849 ($\Delta cup \Delta gig$)	9,2 ± 3	14,1 ± 3,7
DN850 ($\Delta cup \Delta cus$)	4,4 ± 0,7	5,7 ± 1,5
DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	3,6 ± 0,7	5,1 ± 0,9
DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$)	190 ± 15	145 ± 4,9
DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$)	1,6 ± 0,5	2,9 ± 0,5
DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$)	1,7 ± 0,5	2,2 ± 0,3
DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,2

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Kulturen 10 % in 200 µl TMM in 96-well-Platten mit flachem Boden mit Kupferchlorid und AuHCl₄ angeimpft. Nach 20 h Inkubation in einem Neolab DTS 2 bzw. DTS 4 Thermo Schüttler bei 30 °C und 1300 rpm wurde die Absorption bei 500 nm gemessen und für die Berechnung der IC₅₀-Werte herangezogen.

Durch Zugabe von HAuCl₄ zu Kulturen des Stammes AE104 konnte die Kupferresistenz um knapp 40 % von 648 µM auf 406 µM verringert werden. Damit konnte die synergistische Toxizität auf die Kupferresistenz im Elternstamm reproduziert werden. Dies war mit einem Faktor von rund 1,6 unter allen Stämmen die größte Minderung. Dieser negative Effekt auf das Wachstum durch die Zugabe von AuHCl₄ konnte ebenso für alle Stämme, die keine *cup* Deletion enthielten, beobachtet werden. In den Stämmen DN686 (Δcop) und DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die IC₅₀ im Stamm DN686 (Δcop) lag ohne Zugabe von Goldionen bei 370 ± 51,8 µM, nach Zugabe bei 337 ± 21,4 µM (Tab. 11). Im Stamm DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) veränderte sie sich von 203 ± 22,9 µM auf 174 ± 16,4 µM. In der Einzelmutante DN729 (Δcus) nahm die Kupferresistenz durch Zugabe von Gold hingegen ab. Ohne Zugabe von HAuCl₄ lag die IC₅₀ bei 820 ± 35,9 µM und war damit im Vergleich zum Stamm AE104 erhöht. Durch Zugabe von HAuCl₄ wurde die IC₅₀ auf 705 ± 30,4 µM gesenkt. Auffällig war, dass in keinem Stamm, der eine *cup* Deletion enthielt, die Resistenz gegen Kupfer vermindert war. Die Mittelwerte waren in fast allen Fällen nach Zugabe von Gold tendenziell erhöht. Beispielsweise betrug der Mittelwert der IC₅₀ gegen Kupferchlorid im Stamm DN850 ($\Delta cup \Delta cus$) 4,4 ± 0,7 µM, nach Zugabe von Goldionen lag dieser bei 5,7 ± 1,5 µM (Tab. 11). Dieser Trend konnte auch in den Stämmen

ERGEBNISSE

DN849 ($\Delta cup \Delta gig$), DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$), DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) und DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) beobachtet werden. Der Stamm DN657 (Δgig), dessen Kupferresistenz ohne Zugabe von $H AuCl_4$ sich mit $635 \pm 26,1 \mu M$ nicht von AE104 unterschied, hatte mit $509 \pm 72,2 \mu M$ eine verminderte Kupferresistenz, wenn $H AuCl_4$ im Medium war. Die Stämme DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) und DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) hatten eine um den Faktor 1,35 bzw. 1,3 verminderte Resistenz gegen Kupfer, wenn $H AuCl_4$ im Medium war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kupferresistenz in Stämmen mit einer *cup*-Deletion nicht geringer war. Stämme, die eine *gig*-Deletion trugen (aber keine *cup*-Deletion), hatten immer eine verminderte Kupferresistenz, wenn zusätzlich Goldionen hinzugegeben wurden.

Tabelle 12. IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen der *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme von *C. metallidurans* AE104 auf gold- und kupferhaltigen Medien mit zusätzlicher Disruption in *gshA* (n≥3).

Stamm	IC ₅₀ Kupfer [μM]	IC ₅₀ Kupfer [μM] + 2,5 μM $H AuCl_4$
AE104	648 ± 48,1	406 ± 50,4
DN861 ($\Delta gshA$)	339 ± 32,1	264 ± 46,1
DN902 ($gshA_{Disr.}$)	478 ± 37	269 ± 34,1
DN903 ($\Delta cop gshA_{Disr.}$)	235 ± 58,8	101 ± 14,5
DN904 ($\Delta cup gshA_{Disr.}$)	5,6 ± 1,7	4,6 ± 0,5
DN905 ($\Delta cus gshA_{Disr.}$)	729 ± 83,6	480 ± 24,4
DN906 ($\Delta gig gshA_{Disr.}$)	457 ± 43,6	172 ± 38,6
DN907 ($\Delta cop \Delta cup gshA_{Disr.}$)	0,5 ± 0,1	0,38 ± 0,04
DN908 ($\Delta cop \Delta cus gshA_{Disr.}$)	25,8 ± 1,1	18,7 ± 2,1
DN909 ($\Delta cop \Delta gig gshA_{Disr.}$)	124 ± 15,6	82,9 ± 5,6
DN910 ($\Delta gig \Delta cus gshA_{Disr.}$)	446 ± 47,9	268 ± 60,4
DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$)	4,4 ± 0,9	8,9 ± 2
DN912 ($\Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$)	5,5 ± 1,6	8,7 ± 3,4
DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$)	0,7 ± 0,2	1,8 ± 0,4
DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$)	23,1 ± 1,8	16,5 ± 0,7
DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$)	0,58 ± 0,1	0,52 ± 0,1
DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$)	0,46 ± 0,1	0,57 ± 0,01
DN917 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$)	0,56 ± 0,03	0,49 ± 0,1

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm mit Kanamycin als Selektionsmarker schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin als Selektionsmarker angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Kulturen 10 % in 200 μl TMM ohne Kanamycin in 96-well-Platten mit flachem Boden mit Kupferchlorid und $AuHCl_4$ angeimpft. Nach 20 h Inkubation in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS 4 Thermo Schüttler bei 30 °C und 1300 rpm wurde die Absorption bei 500 nm gemessen und für die Berechnung der IC₅₀-Werte herangezogen. Die Werte für AE104 wurden aus der vorherigen Tabelle übernommen.

Wurde zusätzlich eine Disruption in *gshA* eingeführt (Tab. 12), waren die Unterschiede zwischen Kulturen ohne und mit Zugabe von Gold insgesamt größer. Der Stamm DN902 ($gshA_{Disr.}$) zeigte eine Minderung der Kupferresistenz von $478 \pm 37 \mu M$ ohne Zugabe von Goldionen auf $269 \pm 34,1 \mu M$ mit

Zugabe von Goldionen (Faktor 1,8) und damit etwas höher als im Stamm AE104 (Faktor 1,6). Der Stamm DN861 ($\Delta gshA$) zeigte eine geringere Resistenz gegen Kupferchlorid als der Stamm DN902 ($gshA_{Disr.}$), wenn kein Gold zusätzlich hinzugegeben wurde ($IC_{50} = 339 \pm 32,1$), die IC_{50} war bei beiden Stämmen jedoch nach Zugabe von Goldionen gleich. Stämme, deren IC_{50} schon vor Zugabe von Gold sehr niedrig war (um $0,5 \mu M$), zeigten keine Verringerung durch Zugabe von $HAuCl_4$. Im Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$), der nur noch *cup* enthielt, senkte sich die IC_{50} von $23,1 \pm 1,8 \mu M$ auf $16,5 \pm 0,7 \mu M$.

Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass Stämme mit einer *cup*-Deletion durch die Zugabe von Gold nicht negativ beeinflusst waren. Teilweise erhöhte sich die Resistenz gegen Kupfer in diesen Stämmen. Ein großer Unterschied konnte nur im Stamm DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) beobachtet werden, dessen Kupferresistenz von $4,4 \pm 0,9 \mu M$ auf $8,9 \pm 2 \mu M$ anstieg. Es zeigte sich, dass sich die Resistenz gegen Kupfer in Stämmen mit *gshA*-Disruption durch Zugabe von Gold noch stärker negativ beeinflussen lässt als ohne Disruption von *gshA*. Eine Einzeldelation von *gshA* in AE104 konnte die Resistenz gegen Gold mindern, wenn nur Gold eingesetzt wurde (siehe Anhang, Abb. 14).

3.8 Eine *cop*-Deletion führt zu erhöhter Kupferakkumulation

Um die zellulären Metallgehalte zu bestimmen, wurden Mutantenstämme der Kupferhomöostase während der exponentiellen Wachstumsphase die entsprechenden Mengen Metalle zugesetzt und diese damit inkubiert, bevor sie geerntet und für die Messung mittels ICP-MS vorbereitet wurden. Die Vermessung der Proben erfolgte durch Dr. Martin Herzberg und Diana Galea. Die Zellen wurden im Gegensatz zur vorherigen Bestimmung nur für etwa zwei bis drei Stunden mit Metallen inkubiert. In dieser Zeit sollten sich die optische Dichte von etwa 100 Klett auf 150 Klett erhöhen. Durch die kurze Inkubationszeit konnten alle Stämme mit der gleichen Konzentration der Metalle inkubiert werden und so langfristig toxische Effekte auf die Zellen vermindert werden. Hier wurden $2,5 \mu M$ Gold und $10 \mu M$ $CuCl_2$ eingesetzt (Tab. 13).

ERGEBNISSE

Tabelle 13. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 15 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen.

Stamm	Cu-Atome/Zelle × 10 ³	Cu-Atome/Zelle × 10 ³	Cu-Atome/Zelle × 10 ³
		+ 2,5 μM AuHCl ₄	+ 2,5 μM AuHCl ₄ , + 10 μM CuCl ₂
AE104	11 ± 3,46	7,93 ± 3,88	74,2 ± 6,38
DN686 (Δcop)	6,25 ± 1,78	7,05 ± 2,41	296 ± 117
DN656 (Δcup)	6,84 ± 3,84	5,95 ± 3,11	111 ± 26,1
DN729 (Δcus)	8,8 ± 2,97	7,58 ± 3,66	96,8 ± 29,7
DN657 (Δgig)	7,46 ± 2,48	8,81 ± 3,7	87,7 ± 8,02
DN845 ($\Delta cop \Delta cup$)	7,65 ± 3,56	9,39 ± 5,64	309 ± 88,9
DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)	6,01 ± 3,95	7,94 ± 2,52	322 ± 60
DN847 ($\Delta cop \Delta gig$)	6,83 ± 2,37	8,14 ± 3,42	255 ± 77,6
DN848 ($\Delta gig \Delta cus$)	8,81 ± 4,19	10 ± 4,07	89,4 ± 9
DN849 ($\Delta cup \Delta gig$)	5,57 ± 2,47	9,21 ± 2,91	112 ± 22,7
DN850 ($\Delta cup \Delta cus$)	5,23 ± 2,7	7,85 ± 2,99	102 ± 23,8
DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	7,82 ± 4,66	7,76 ± 4,44	104 ± 15,6
DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$)	7,25 ± 2,56	8,04 ± 2,27	280 ± 52,4
DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$)	6,91 ± 3,24	10,7 ± 3,64	286 ± 40,5
DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$)	6,91 ± 4	10,1 ± 2,79	315 ± 54,3
DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	5,8 ± 2,84	8,17 ± 2,47	384 ± 130

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen erneut bis zu einer OD von 100 Klett angezogen und anschließend Metallionen zugegeben. Nachdem die Kulturen eine OD von 150 Klett erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet, mit Puffer gewaschen und die Pellets eingefroren. Für die ICP-MS-Messung wurden die Pellets aufgetaut und mit konzentrierter Salpetersäure versetzt. Nach Inkubation bei 70 °C über Nacht wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und vermessen.

Die Bestimmung des Kupfergehaltes für Deletionsstämme in der Kupferhomöostase ergab, dass eine Erhöhung ohne zusätzliche Zugabe von Kupfer nicht auftrat. Im Stamm AE104 konnte durch Zugabe von 10 μM CuCl_2 und 2,5 μM HAuCl_4 eine Erhöhung des Kupfergehaltes um den Faktor 9 auf $74,2 \pm 6,38 \times 10^3$ Atome pro Zelle im Vergleich zu Kulturen, die nur 2,5 μM HAuCl_4 enthielten, gemessen werden. Die größten Unterschiede traten mit Erhöhungen um den Faktor 25 bis 50 in acht Stämmen mit einer *cop*-Deletion auf. Der Kupfergehalt lag bei all diesen Stämmen bei ca. 3×10^5 Kupferatomen pro Zelle. Stämme ohne eine *cop*-Deletion zeigten geringere Faktoren und hatten im Fall von DN849 ($\Delta\text{cup} \Delta\text{gig}$) maximal $112 \pm 22,7 \times 10^3$ Kupferatome pro Zelle. Durch eine Zugabe von Goldionen veränderte sich der Kupfergehalt der Zellen in keinem Stamm, wenn kein zusätzliches Kupfer im Medium war. Wurden die Auswirkungen der Mutationen im Vergleich zum Stamm AE104 auf den Kupfergehalt analysiert, zeigte sich auch hier, dass eine *cop*-Deletion einen sehr großen Effekt auf die Akkumulation von Kupfer in den Zellen hatte. Im Stamm DN656 (Δcup) konnte eine Erhöhung um den Faktor 1,5 beobachtet werden ($111 \pm 26,1 \times 10^3$ Atome pro Zelle), ebenso im Stamm DN849 ($\Delta\text{cup} \Delta\text{gig}$) ($112 \pm 22,7 \times 10^3$ Atome pro Zelle). Allerdings nicht in der Doppelmutante DN850 ($\Delta\text{cup} \Delta\text{cus}$) ($102 \pm 23,8 \times 10^3$ Atome pro Zelle). Hier war aufgrund der hohen Standardabweichung kein Unterschied zu AE104 zu beobachten. Ebenso war der Kupfergehalt in den Stämmen DN729 (Δcus) ($96,8 \pm 29,7 \times 10^3$ Atome pro Zelle), DN657 (Δgig) ($87,7 \pm 8,02 \times 10^3$ Atome pro Zelle) und DN848 ($\Delta\text{gig} \Delta\text{cus}$) ($89,4 \pm 9 \times 10^3$ Atome pro Zelle) (Tab. 13) nicht erhöht. Eine Einzeldelation von *cus* und *gig* allein oder in Kombination schienen damit keinen Effekt auf den Kupfergehalt zu haben. Eine Deletion von *cup* schien damit, wenn auch weit weniger als eine *cop*-Deletion, eine Erhöhung des Kupfergehaltes zu begünstigen. Die Deletion von *cus* schien diesem Effekt entgegenzuwirken.

Um einen Effekt von Glutathion in den Zellen zu ermitteln, wurde in den in *gshA* disruptierten Derivaten ebenfalls der Metallgehalt bestimmt (Tabelle 14). Zusätzlich wurden in allen Stämmen Komplementationen mit dem Vektor pECD1663 (pBBR-MCS3::*gshA*), bzw. mit dem Vektor pBBR1-MCS3, hergestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 14. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 17 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit zusätzlicher Disruption in *gshA*.

Stamm	Cu-Atome/Zelle × 10 ³	Cu-Atome/Zelle × 10 ³	
		+ 2,5 µM AuHCl ₄	+ 2,5 µM AuHCl ₄ , + 10 µM CuCl ₂
AE104	11 ± 3,46	7,93 ± 3,88	74,2 ± 6,38
DN902 (<i>gshA</i> _{Disr.})	4,45 ± 0,57	7,48 ± 2,89	40,4 ± 4,72
DN903 (Δ <i>cop gshA</i> _{Disr.})	5,14 ± 1,31	10,3 ± 2,33	204 ± 23,4
DN904 (Δ <i>cup gshA</i> _{Disr.})	5,5 ± 1,06	6,41 ± 1,81	49,5 ± 4,68
DN905 (Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.})	5,22 ± 1,52	10,7 ± 4,79	59 ± 12,1
DN906 (Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	5,67 ± 0,82	9,68 ± 3,57	45,7 ± 9,6
DN907 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup gshA</i> _{Disr.})	4,21 ± 1	6,28 ± 1,31	165 ± 22,6
DN908 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.})	4,94 ± 1,21	11,8 ± 5,24	427 ± 47,5
DN909 (Δ <i>cop</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	5,79 ± 0,55	5,97 ± 1,11	267 ± 32,7
DN910 (Δ <i>gig</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.})	4,79 ± 0,5	6,72 ± 1,5	42,8 ± 3,81
DN911 (Δ <i>cup</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	4,25 ± 0,9	6,55 ± 2,3	52,6 ± 10,3
DN912 (Δ <i>cup</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.})	4,37 ± 1	5,38 ± 1,1	56,1 ± 5,58
DN913 (Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	4,44 ± 1,29	9,01 ± 4,1	54,7 ± 3,91
DN914 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	4,21 ± 1,07	9,44 ± 5,21	333 ± 103
DN915 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	5,49 ± 2,56	6,42 ± 1,46	153 ± 6,78
DN916 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.})	7,56 ± 4,85	9,7 ± 6,44	368 ± 42,2
DN917 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	6,72 ± 2,51	7,24 ± 3,54	451 ± 50,1
DN861 (Δ <i>gshA</i>)	5,79 ± 1,45	8,68 ± 2,4	75,4 ± 7,07

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen erneut bis zu einer OD von 100 Klett in TMM ohne Kanamycin angezogen und anschließend AuHCl₄ und CuCl₂ zugegeben. Nachdem die Kulturen eine OD von 150 Klett erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet, mit Puffer gewaschen und die Pellets eingefroren. Für die ICP-MS-Messung wurden die Pellets aufgetaut und mit konzentrierter Salpetersäure versetzt. Nach Inkubation bei 70 °C über Nacht wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und vermessen. Die Werte für AE104 wurden aus der vorherigen Tabelle übernommen.

In den in *gshA* disruptierten Stämmen veränderte sich der Kupfergehalt durch Zugabe von Goldionen nur im Fall von DN903 ($\Delta cop\ gshA_{Disr.}$). Der Gehalt stieg hier von $5,14 \pm 1,31 \times 10^3$ Atomen pro Zelle auf $10,3 \pm 2,33 \times 10^3$ Atome pro Zelle. Wurden Gold- und Kupferionen zugegeben, stieg der Kupfergehalt in allen Stämmen an. Der Anstieg in Stämmen mit einer *cop*-Deletion war abermals höher als in Stämmen ohne diese Deletion. In manchen Stämmen sank der Kupfergehalt im Vergleich zu Stämmen ohne Disruption in *gshA*. Im Stamm DN845 ($\Delta cop\ \Delta cup$) von $309 \pm 88,9 \times 10^3$ Atomen pro Zelle (Tab. 13) auf $165 \pm 22,6 \times 10^3$ Atome pro Zelle im Stamm DN907 ($\Delta cop\ \Delta cup\ gshA_{Disr.}$) (Tab. 14) und im Stamm DN853 ($\Delta cop\ \Delta cup\ \Delta gig$) von $286 \pm 40,5 \times 10^3$ Atomen pro Zelle auf $153 \pm 6,78 \times 10^3$ Atome pro Zelle im Stamm DN915 ($\Delta cop\ \Delta cup\ \Delta gig\ gshA_{Disr.}$). In anderen Stämmen mit einer *cop*- und *cup*-Deletion konnte keine Änderung beobachtet werden. Neben einigen Verringerungen im Kupfergehalt konnten auch erhöhte Gehalte gemessen werden. Beispielsweise zeigte der Stamm DN846 ($\Delta cop\ \Delta cus$) nach Disruption eine Erhöhung von $322 \pm 60 \times 10^3$ Atome pro Zelle auf $427 \pm 47,5 \times 10^3$ Atome pro Zelle. Durch die Disruption in *gshA* gibt es damit innerhalb der Δcop -Stämme eine Differenzierung des Kupfergehaltes. Ein genereller Trend auf die Δcop -Stämme konnte nicht beobachtet werden.

In den Stämmen DN904 ($\Delta cup\ gshA_{Disr.}$), DN905 ($\Delta cus\ gshA_{Disr.}$), DN906 ($\Delta gig\ gshA_{Disr.}$), DN910 ($\Delta gig\ \Delta cus\ gshA_{Disr.}$), DN911 ($\Delta cup\ \Delta gig\ gshA_{Disr.}$), DN912 ($\Delta cup\ \Delta cus\ gshA_{Disr.}$) und DN913 ($\Delta cup\ \Delta cus\ \Delta gig\ gshA_{Disr.}$) verringerte sich der Kupfergehalt nach Disruption in *gshA* von ca. $85-115 \times 10^3$ Atomen pro Zelle auf ca. $40 - 60 \times 10^3$ Atome pro Zelle (Tab. 14). Der Einfluss von *gig* schien von geringer Bedeutung zu sein.

Nach Komplementation mit *gshA* konnte nur im Fall von DNA8 ($\Delta cop\ \Delta cus\ gshA_{Disr.}\ pBBR::gshA$) eine Veränderung des Kupfergehaltes von $322 \pm 60 \times 10^3$ Atomen pro Zelle auf $574 \pm 181 \times 10^3$ Atome pro Zelle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Alle anderen Stämme zeigten keinen Unterschied zwischen ihrer Variante ohne Disruption in *gshA* und einer Variante nach Disruption in *gshA* und anschließender Komplementation. Eine Komplementation von *gshA* führte in den Stämmen DN904 ($\Delta cup\ gshA_{Disr.}$), DN906 ($\Delta gig\ gshA_{Disr.}$), DN907 ($\Delta cop\ \Delta cup\ gshA_{Disr.}$), DN910 ($\Delta gig\ \Delta cus\ gshA_{Disr.}$), DN911 ($\Delta cup\ \Delta gig\ gshA_{Disr.}$), DN912 ($\Delta cup\ \Delta cus\ gshA_{Disr.}$), DN913 ($\Delta cup\ \Delta cus\ \Delta gig\ gshA_{Disr.}$) zu einer Erhöhung des Kupfergehaltes. Im Fall von DN917 ($\Delta cop\ \Delta cup\ \Delta cus\ \Delta gig\ gshA_{Disr.}$) zu einer Verringerung von $451 \pm 50 \times 10^3$ Atomen pro Zelle auf $349 \pm 30,9 \times 10^3$ Atome pro Zelle. Solche Veränderungen traten in sieben Stämmen auch nach Einführung des Leervektors auf.

ERGEBNISSE

Tabelle 15. Durch ICP-MS bestimmter Kupfergehalt in 15 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen.

Stamm	Au-Atome/Zelle × 10 ⁵	Au-Atome/Zelle × 10 ⁵	Au-Atome/Zelle × 10 ⁵
		+ 2,5 μM AuHCl ₄	+ 2,5 μM AuHCl ₄ , + 10 μM CuCl ₂
AE104	n. b.	9,83 ± 2,63	15,3 ± 1,99
DN686 (<i>Δcop</i>)	n. b.	9,44 ± 2,09	17,1 ± 2,86
DN656 (<i>Δcup</i>)	n. b.	9,44 ± 1,45	15,9 ± 2
DN729 (<i>Δcus</i>)	n. b.	7,41 ± 2,08	12,6 ± 0,99
DN657 (<i>Δgig</i>)	n. b.	10,1 ± 2,76	16,6 ± 1,59
DN845 (<i>Δcop Δcup</i>)	n. b.	10,7 ± 4,27	16 ± 2,25
DN846 (<i>Δcop Δcus</i>)	n. b.	10 ± 1,71	18,7 ± 3,08
DN847 (<i>Δcop Δgig</i>)	n. b.	9,28 ± 2,16	17 ± 2,01
DN848 (<i>Δgig Δcus</i>)	n. b.	10,5 ± 2,11	16,4 ± 2,51
DN849 (<i>Δcup Δgig</i>)	n. b.	9,68 ± 2,38	15,9 ± 2,32
DN850 (<i>Δcup Δcus</i>)	n. b.	9,41 ± 2,25	16,2 ± 2,77
DN851 (<i>Δcup Δcus Δgig</i>)	n. b.	10,2 ± 2,16	16 ± 1,91
DN852 (<i>Δcop Δcus Δgig</i>)	n. b.	10,8 ± 2,37	16,5 ± 1,69
DN853 (<i>Δcop Δcup Δgig</i>)	n. b.	9,74 ± 2,52	15,3 ± 1,49
DN854 (<i>Δcop Δcup Δcus</i>)	n. b.	8,93 ± 2,58	14,6 ± 1,85
DN855 (<i>Δcop Δcup Δcus Δgig</i>)	n. b.	9,32 ± 2,45	14 ± 1,6

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen erneut bis zu einer OD von 100 Klett in TMM angezogen und anschließend AuHCl₄ und CuCl₂ zugegeben. Nachdem die Kulturen eine OD von 150 Klett erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet, mit Puffer gewaschen und die Pellets eingefroren. Für die ICP-MS-Messung wurden die Pellets aufgetaut und mit konzentrierter Salpetersäure versetzt. Nach Inkubation bei 70 °C über Nacht wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und vermessen. n. b.: nicht bestimmbar, da unterhalb des Detektionslimits.

Wurde kein Gold zugegeben, waren die bestimmten Mengen Gold unterhalb des Detektionslimits. Die Bestimmung des Goldgehalts nach Zugabe der Goldlösung ergab, dass alle Stämme unabhängig von ihren Deletionen den gleichen Goldgehalt von etwa $10^6 \pm 2 \times 10^5$ Goldatomen pro Zelle hatten. Damit stand fest, dass keine der untersuchten Determinanten *cop*, *cup*, *cus* und *gig* einen unmittelbaren Einfluss auf den Goldgehalt in der Zelle hatte. Aus Wachstumsendpunktbestimmungen ging hervor, dass die Mutationen im Vergleich zu AE104 keinen Einfluss auf die Resistenz der Zellen gegen Gold hatten (Ergebnisse nicht gezeigt). Wurde zusätzlich zu 2,5 μM Gold noch 10 μM CuCl_2 ins Medium gegeben, erhöhte sich der Goldgehalt aller Stämme um einen Faktor von etwa 1,5. Ausnahme hiervon war der Stamm DN845 ($\Delta\text{cop} \Delta\text{cup}$), dessen Goldgehalt von $10,7 \pm 4,27 \times 10^5$ Goldatomen pro Zelle auf $16 \pm 2,25 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle nicht wesentlich gesteigert werden konnte, was an der hohen Standardabweichung des Gehaltes ohne Zusatz von Kupferchlorid lag. Ein Unterschied im Goldgehalt zwischen den Stämmen, der durch Mutationen hervorgerufen worden sein könnte, konnte damit nicht beobachtet werden. In Tabelle 16 folgen die Ergebnisse der Goldgehaltsbestimmung für Deletionsstämmen mit zusätzlicher Disruption in *gshA*.

ERGEBNISSE

Tabelle 16. Goldgehalt in Deletionsstämmen der Kupferhomöostase mit zusätzlicher Disruption in *gshA*.

Stamm	Au-Atome/Zelle × 10 ⁵	Au-Atome/Zelle × 10 ⁵	Au-Atome/Zelle × 10 ⁵
		+ 2,5 µM AuHCl ₄	+ 2,5 µM AuHCl ₄ , + 10 µM CuCl ₂
AE104	n. b.	9,83 ± 2,63	15,3 ± 1,99
DN902 (<i>gshA</i> _{Disr.})	n. b.	10,3 ± 2,28	9,13 ± 0,98
DN903 (Δ <i>cop gshA</i> _{Disr.})	n. b.	10,9 ± 1,9	12,5 ± 1,57
DN904 (Δ <i>cup gshA</i> _{Disr.})	n. b.	9,93 ± 2,65	9,68 ± 2,13
DN905 (Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.})	n. b.	9 ± 5,32	8,12 ± 2,21
DN906 (Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	10,3 ± 2,84	11,3 ± 2,08
DN907 (Δ <i>cop Δcup gshA</i> _{Disr.})	n. b.	8,28 ± 3,85	8,94 ± 1,05
DN908 (Δ <i>cop Δcus gshA</i> _{Disr.})	n. b.	12,4 ± 4,42	11,5 ± 2,42
DN909 (Δ <i>cop Δgig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	11,1 ± 2,62	12,1 ± 2,47
DN910 (Δ <i>gig Δcus gshA</i> _{Disr.})	n. b.	12,7 ± 3,33	10,5 ± 0,48
DN911 (Δ <i>cup Δgig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	12,3 ± 5,28	10,3 ± 1,24
DN912 (Δ <i>cup Δcus gshA</i> _{Disr.})	n. b.	12 ± 1,35	11 ± 2,47
DN913 (Δ <i>cup Δcus Δgig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	9,58 ± 2,66	9,51 ± 1,38
DN914 (Δ <i>cop Δcus Δgig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	12,4 ± 4,41	10,9 ± 2,31
DN915 (Δ <i>cop Δcup Δgig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	9,62 ± 3,49	7,95 ± 1,92
DN916 (Δ <i>cop Δcup Δcus gshA</i> _{Disr.})	n. b.	9,1 ± 1,46	11,8 ± 1,16
DN917 (Δ <i>cop Δcup Δcus Δgig gshA</i> _{Disr.})	n. b.	9,11 ± 1,8	12,8 ± 0,97
DN861 (Δ <i>gshA</i>)	n. b.	13,2 ± 1,48	18,7 ± 2,79

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen erneut bis zu einer OD von 100 Klett in TMM ohne Kanamycin angezogen und anschließend AuHCl₄ und CuCl₂ zugegeben. Nachdem die Kulturen eine OD von 150 Klett erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet, mit Puffer gewaschen und die Pellets eingefroren. Für die ICP-MS-Messung wurden die Pellets aufgetaut und mit konzentrierter Salpetersäure versetzt. Nach Inkubation bei 70 °C über Nacht wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und vermessen. Die Werte für AE104 wurden aus der vorherigen Tabelle übernommen. n. b.: nicht bestimmbar, da unterhalb des Detektionslimits.

Wurde zusätzlich eine Disruption in *gshA* eingeführt, konnte auf einem Medium, das nur Gold enthielt, keine Erhöhung des Goldgehaltes im Vergleich zu Stämmen ohne Disruption festgestellt werden. Damit war eine Disruption in *gshA* nicht unmittelbar für eine Erhöhung oder Verminderung des Goldgehaltes im zeitlichen Rahmen des Experimentes verantwortlich. Wurden die Zellen auf Gold und Kupfer inkubiert, konnte die zuvor festgestellte Erhöhung des Goldgehaltes in Zellen ohne Disruption nicht mehr beobachtet werden. Im Stamm DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) konnte mit $7,95 \pm 1,92 \times 10^5$ Goldatomen pro Zelle der niedrigste Goldgehalt festgestellt werden. Da eine Veränderung des Goldgehalts sowohl im Stamm DN917 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) mit einer zusätzlichen *cus*-Deletion als auch den Stämmen DN909 ($\Delta cop \Delta gig gshA_{Disr.}$) ($12,1 \pm 2,47 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle), DN911 ($\Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) ($10,3 \pm 1,24 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle) oder DN907 ($\Delta cop \Delta cup gshA_{Disr.}$) ($8,94 \pm 1,05 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle) nicht beobachtet werden konnte, wurde dieses Ergebnis nicht weiter gewertet. Im Stamm DN861 ($\Delta gshA$) wurde bei Zugabe von Gold- und Kupferionen zum Medium ein Goldgehalt von $18,7 \pm 2,79 \times 10^5$ Goldatomen pro Zelle gemessen. Dies war höher als in Stämmen mit einer Disruption in *gshA* jedoch nicht höher als im Stamm AE104 ($15,3 \pm 1,99 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle).

Die Kontrollen bestehend aus Stämmen mit dem Vektor pBBR1 MCS3 und dem rekombinanten Vektor pECD1663 (pBBR-MCS3::*gshA*), die als Leervektorkontrolle bzw. zur Komplementation der Disruption dienten, lieferten keine klaren Ergebnisse (nicht gezeigt). Stämme, die mit *gshA* komplementiert wurden, zeigten mit zwei Ausnahmen keine Veränderung ihres Goldgehaltes. Im Stamm DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) konnte der Goldgehalt durch die Komplementation von $9,51 \pm 1,38 \times 10^5$ Goldatomen pro Zelle auf $16,5 \pm 2,97 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle und im Stamm DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) von $7,95 \pm 1,92 \times 10^5$ Goldatomen pro Zelle auf $16,4 \pm 1,53 \times 10^5$ Goldatome pro Zelle gesteigert werden. In Stämmen, die den Leervektor enthielten, konnte keine Änderung des Goldgehaltes im Vergleich zu den in *gshA* disruptierten Stämmen beobachtet werden.

Neben den Gold- und Kupferkonzentrationen wurden auch die Eisen-, Zink- und Magnesiumkonzentrationen in den Zellen untersucht. Die Werte für Eisen und Zink unterschieden sich nicht und lagen im Bereich um etwa 6×10^5 bzw. 7×10^4 Atome pro Zelle. In den Stämmen DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$), DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$), DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$), DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) und DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) sowie deren in *gshA* disruptierte Gegenstücke außer DN916 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$) konnte eine Erhöhung des Magnesiumgehaltes im Vergleich zu AE104 festgestellt werden. Die Werte lagen hier um $2-3 \times 10^7$ im Gegensatz zu einem Wert von um 10^7 in AE104. Dies deckte sich mit den Messungen aus 3.4. Damit schien dieser Befund unabhängig von der Inkubationszeit und Konzentrationen von Metallen zu sein.

3.9 Goldionen haben keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt

Parallel zu den Proben aus dem vorherigen Versuch wurden Proben für die Bestimmung des Glutathiongehaltes genommen und wie beschrieben enzymatisch bestimmt. Bei Stämmen mit Disruption bzw. Deletion in *gshA* sowie den Stämmen mit Leervektor konnte kein Glutathiongehalt gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 17. Enzymatisch bestimmter Glutathiongehalt in 15 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen in *C. metallidurans*.

Stamm	Glutathion-Gehalt [nmol Glutathion/mg Protein]	Glutathion-Gehalt [nmol Glutathion/mg Protein] + 2,5 μM AuHCl ₄	Glutathion-Gehalt [nmol Glutathion/mg Protein] + 2,5 μM AuHCl ₄ , + 10 μM CuCl ₂
AE104	962 ± 109	795 ± 39	709 ± 55
DN686 (Δcop)	978 ± 122	894 ± 91	834 ± 56
DN656 (Δcup)	894 ± 50	772 ± 99	679 ± 107
DN729 (Δcus)	373 ± 46	262 ± 45	286 ± 52
DN657 (Δgig)	883 ± 133	863 ± 77	796 ± 67
DN845 ($\Delta cop \Delta cup$)	1041 ± 169	905 ± 113	697 ± 55
DN846 ($\Delta cop \Delta cus$)	1034 ± 118	801 ± 39	597 ± 104
DN847 ($\Delta cop \Delta gig$)	956 ± 139	889 ± 61	839 ± 107
DN848 ($\Delta gig \Delta cus$)	957 ± 66	799 ± 82	665 ± 103
DN849 ($\Delta cup \Delta gig$)	857 ± 166	796 ± 51	721 ± 8
DN850 ($\Delta cup \Delta cus$)	805 ± 163	742 ± 69	610 ± 114
DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	738 ± 175	739 ± 60	578 ± 14
DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$)	746 ± 160	785 ± 81	357 ± 87
DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$)	735 ± 186	780 ± 122	361 ± 142
DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$)	823 ± 237	777 ± 164	312 ± 89
DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$)	721 ± 124	729 ± 225	280 ± 63

Die Kulturen wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen bis zu einer OD von 100 Klett in TMM angezogen und anschließend AuHCl₄ und CuCl₂ zugegeben. Nachdem die Kulturen eine OD von 150 Klett erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet, in TMM gewaschen und der Protein- und der Glutathiongehalt bestimmt.

Im Vergleich zum Versuch unter 3.4 wurden die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit Metallen induziert und die Inkubationszeit betrug auch hier nur wenige Stunden. Der Glutathiongehalt erhöhte sich im Gegensatz zum vorherigen Versuch (Tab. 10) um etwa die Hälfte von 600 nmol/mg Protein auf etwa 1000 nmol/mg Protein im Stamm AE104. Die Deletionsstämme zeigten keine von AE104 abweichenden Messwerte. Ausnahme bildete hier wie zuvor beschrieben der Stamm DN729 (Δcus) mit einem Messwert von 373 ± 46 nmol/mg Protein zu 962 ± 109 nmol/mg Protein im Stamm AE104 (Tab. 17). Der Glutathiongehalt lag auch im Stamm DN729 (Δcus) über dem zuvor gemessenen Wert von 120 ± 38 nmol/mg Protein (Tab. 10).

Wurde den Kulturen Gold hinzugegeben, so verringerte sich der Glutathiongehalt in den Stämmen AE104, DN729 (Δcus), DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) und DN848 ($\Delta gig \Delta cus$). Im Stamm AE104 von 962 ± 109 nmol/mg Protein auf 795 ± 39 nmol/mg Protein, im Stamm DN729 (Δcus) von 373 ± 46 nmol/mg Protein auf 262 ± 45 nmol/mg Protein, im Stamm DN846 ($\Delta cop \Delta cus$) von 1034 ± 118 nmol/mg Protein auf 801 ± 39 nmol/mg Protein und im Stamm DN848 ($\Delta gig \Delta cus$) von 957 ± 66 nmol/mg Protein auf 799 ± 82 nmol/mg Protein. Die Minderung beträgt zwischen 17 % und 30 %, wobei DN729 (Δcus) bereits einen geringeren Glutathiongehalt aufwies. Da die Verringerung in den erwähnten Stämmen allerdings keinen Unterschied zum gemessenen Wert nach Zugabe von Goldionen im Stamm AE104 darstellte, wurde diesem Effekt keine Bedeutung beigemessen.

Wurden die Stämme mit Gold und Kupfer inkubiert, so wurde der Glutathiongehalt in den meisten Stämmen mit einer *cop*-Deletion geringer. Im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$), DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$), DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) und DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) sogar um mindestens Faktor 2. Allerdings trat dieser Effekt nicht im Stamm DN686 (Δcop) und DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) auf. Die Gehalte betragen im Fall von DN686 (Δcop) 894 ± 91 nmol/mg Protein ohne Zugabe von Metallionen und 834 ± 56 nmol/mg Protein nach Zugabe von Metallionen. Im Fall von DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) 889 ± 61 nmol/mg Protein vor Zugabe von Metallionen und 839 ± 107 nmol/mg Protein nach Zugabe von Metallionen. Damit wurde der Glutathiongehalt in Stämmen mit drei und vier Deletionen stark von der Zugabe von Kupferionen beeinflusst aber nicht durch die Zugabe von Gold.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Stämme mit Disruption in *gshA*, die durch den Vektor pECD1663 funktional komplementiert wurde, gezeigt.

ERGEBNISSE

Tabelle 18. Enzymatisch bestimmter Glutathiongehalt in 17 *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämmen mit komplementierter Disruption in *gshA*.

Stamm	Glutathion-Gehalt [nmol	Glutathion-Gehalt [nmol	Glutathion-Gehalt [nmol
	Glutathion/mg Protein]	Glutathion/mg Protein]	Glutathion/mg Protein]
		+ 2,5 μM AuHCl ₄	+ 2,5 μM AuHCl ₄ , + 10 μM CuCl ₂
AE104	962 ± 109	795 ± 39	709 ± 55
DN921 (AE104 pBBR:: <i>gshA</i>)	822 ± 157	669 ± 105	683 ± 60
DN929 (<i>gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	258 ± 88	360 ± 55	366 ± 89
DNA4 (Δ <i>cop gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	475 ± 141	501 ± 66	518 ± 82
DNA5 (Δ <i>cup gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	377 ± 57	498 ± 46	484 ± 65
DNA6 (Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	499 ± 71	524 ± 101	506 ± 90
DNA7 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	518 ± 66	720 ± 138	450 ± 50
DNA8 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	349 ± 103	407 ± 123	231 ± 42
DNA9 (Δ <i>cop</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	568 ± 134	695 ± 150	738 ± 67
DNA10 (Δ <i>gig</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	382 ± 84	511 ± 112	504 ± 98
DNA11 (Δ <i>cup</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	384 ± 28	477 ± 76	536 ± 94
DNA12 (Δ <i>cup</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	386 ± 68	489 ± 83	521 ± 89
DN923 (Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	349 ± 44	340 ± 56	325 ± 28
DN925 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	482 ± 45	530 ± 63	296 ± 43
DN926 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	499 ± 65	540 ± 98	416 ± 69
DN927 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>cus gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	375 ± 35	344 ± 23	221 ± 32
DN928 (Δ <i>cop</i> Δ <i>cup</i> Δ <i>cus</i> Δ <i>gig gshA</i> _{Disr.} pBBR:: <i>gshA</i>)	617 ± 26	696 ± 116	155 ± 39
DN919 (Δ <i>gshA</i> pBBR:: <i>gshA</i>)	1077 ± 165	1019 ± 165	1135 ± 178

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Tetracyclin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Tetracyclin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen bis zu einer OD von 100 Klett in TMM ohne Tetracyclin angezogen und anschließend AuHCl₄ und CuCl₂ zugegeben. Nachdem die Kulturen eine OD von 150 Klett erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet, in TMM gewaschen und der Protein- und der Glutathiongehalt bestimmt. Die Werte für AE104 wurden aus der vorherigen Tabelle übernommen.

Es konnte gezeigt werden, dass in allen Stämmen nach Komplementation Glutathion nachgewiesen werden konnte. Im Stamm DN921 (AE104 pBBR::*gshA*), der das Gen *gshA* sowohl auf seinem Chromosom als auch auf dem eingebrachten Vektor trug und damit über zwei Kopien des Gens *gshA* verfügte, konnte kein erhöhter Glutathiongehalt gemessen werden als im Stamm AE104, der das Gen nur einmal trug. Die doppelte Kopienzahl korrelierte also nicht mit einem erhöhten Glutathionspiegel. Im Stamm DN919 (Δ *gshA* pBBR::*gshA*), der eine Deletion in *gshA* trug, konnte durch Komplementation der Glutathiongehalt auf das Niveau des Elternstamms AE104 angehoben werden. In Stämmen mit einer Disruption konnte der Glutathiongehalt bestimmt werden, in allen Fällen war dieser niedriger als der des Elternstammes AE104. Im Stamm DNA5 (Δ *cup gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) konnte eine Erhöhung von 377 ± 57 nmol/mg Protein ohne Zugabe von Metallionen auf 498 ± 46 nmol/mg Protein nach Zugabe von Goldionen beobachtet werden. Die beiden Mittelwerte zeigten allerdings keine Abweichung zu anderen Stämmen unter gleichen Bedingungen, sodass dem Ergebnis keine Bedeutung zugemessen wurde. Ebenso verhielt es sich beim Stamm DNA7 (Δ *cop Δ cup gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) dessen Glutathiongehalt von 518 ± 66 nmol/mg Protein ohne Zugabe von Metallionen auf 720 ± 138 nmol/mg Protein nach Zugabe von Gold anstieg. Der Glutathiongehalt sank durch die Zugabe von Gold- und Kupferionen auf 450 ± 50 nmol/mg Protein. In den Stämmen DN925 (Δ *cop Δ cus Δ gig gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*), DN927 (Δ *cop Δ cup Δ cus gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) und DN928 (Δ *cop Δ cup Δ cus Δ gig gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) konnte im Vergleich zu den Werten, wenn nur AuHCl₄ im Medium war ein verringerter Glutathiongehalt nachgewiesen werden, wenn zusätzlich CuCl₂ im Medium war. Im Stamm DN925 (Δ *cop Δ cus Δ gig gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) von 530 ± 63 nmol/mg Protein auf 296 ± 43 nmol/mg Protein, im Stamm DN927 (Δ *cop Δ cup Δ cus gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) von 344 ± 23 nmol/mg Protein auf 221 ± 32 nmol/mg Protein und im Stamm DN928 (Δ *cop Δ cup Δ cus Δ gig gshA*_{Disr.} pBBR::*gshA*) von 696 ± 116 nmol/mg Protein auf 155 ± 39 nmol/mg Protein. Diese Verringerung ist damit auf die Zugabe von Kupferionen zurückzuführen. Die Disruption bzw. Deletion des Gens *gshA* konnte durch den Vektor pBBR::*gshA* komplementiert werden. Goldionen schienen keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt in den Zellen zu haben.

3.10 Das *gig*- und *cus*-Operon wurden durch Gold induziert

In vorangegangenen Studien konnte am Stamm AE104 gezeigt werden, dass das *gig*-Operon durch Zugabe von AuHCl₄ induziert werden kann (REITH *et al.* 2009). Dies wurde hier für alle möglichen *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Einzel- und Mehrfachdeletionsstämme wiederholt bzw. erweitert.

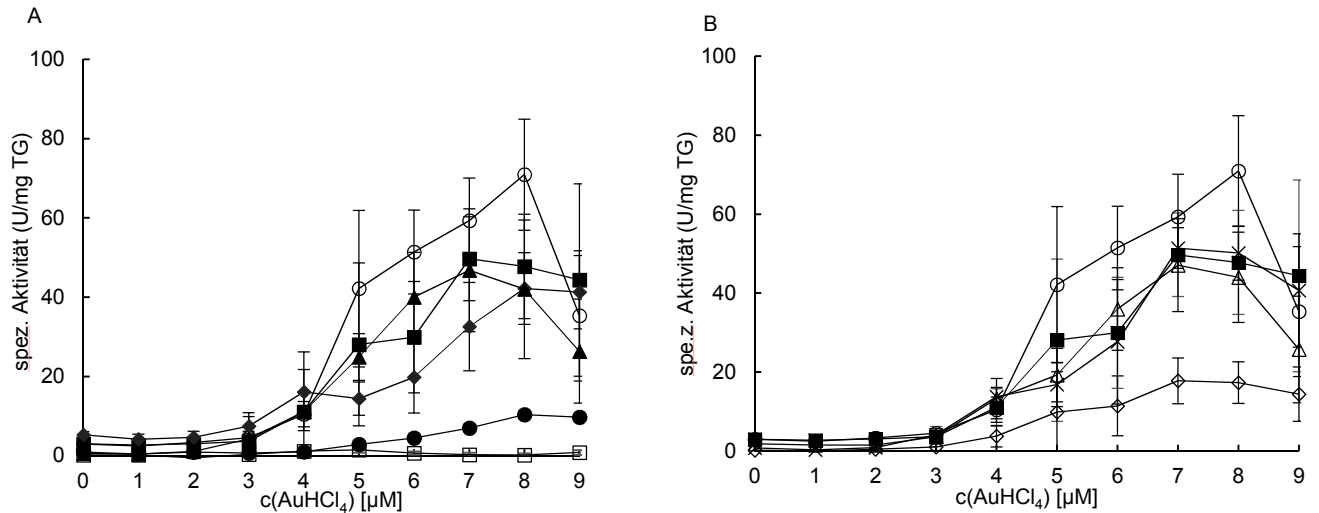


Abbildung 6. β -Gal-Assay mit *gigT-lacZ* Fusionsstämmen unter Zugabe von AuHCl_4 . A: Einzeldelentionsstämmen inklusive $\Delta cup \Delta cus$ mit Gold inkubiert. AE104($\phi g i g T-l a c Z$) (■), $\Delta cop(\phi g i g T-l a c Z)$ (○), $\Delta cus(\phi g i g T-l a c Z)$ (●), $\Delta g s h A(\phi g i g T-l a c Z)$ (□), $\Delta cup(\phi g i g T-l a c Z)$ (◆) B: Δcop Einzeldelentionsstamm sowie alle Mehrfachdelentionsstämmen mit *cop*-Deletion mit Gold inkubiert. AE104($\phi g i g T-l a c Z$) (■), $\Delta cop(\phi g i g T-l a c Z)$ (○), $\Delta cop \Delta cup(\phi g i g T-l a c Z)$ (◇), $\Delta cop \Delta cus(\phi g i g T-l a c Z)$ (△), $\Delta cop \Delta cup \Delta cus(\phi g i g T-l a c Z)$ (×), $n \geq 3$. Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen 1 % in 20 ml TMM angeimpft und bis 100 Klett angezogen. Die Zellen wurden in 96-well-Platten mit rundem Boden in TMM mit AuHCl_4 drei Stunden bei 1300 rpm in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS4 inkubiert, geerntet und die Pellets eingefroren und für den β -Gal-Assay verwendet. Für diesen wurden die Pellets aufgetaut, mit Puffer Z und Substratlösung versetzt und die Reaktion bei einer Gelbfärbung mit Stopplösung abgestoppt. Die Proben wurden bei 420 nm und 550 nm im Tecan MNano vermessen und die spezifische Aktivität berechnet.

Das *gig*-Operon wurde durch Zugabe von Gold im Stamm AE104 induziert (Abb. 6). Die Basisaktivität lag hier bei $3 \pm 0,9$ U/mg und konnte durch Zugabe von HAuCl_4 um fast das 17-fache auf bis zu $49,7 \pm 10,6$ U/mg bei einer Konzentration von 7 μM gesteigert werden. Die Aktivität blieb danach konstant. Die Aktivität im Stamm DN729 (Δcus) konnte von einer Basisaktivität von 1 ± 1 U/mg auf bis zu $10,3 \pm 3,4$ U/mg bei einer Konzentration von 8 μM gesteigert werden. Im Stamm DN861 ($\Delta gshA$) betrug die Basisaktivität $0,15 \pm 0,5$ U/mg und konnte auch nicht über 2 U/mg gesteigert werden (Abb. 6A). Eine ebenfalls verminderte Induktion konnte im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) gezeigt werden (Abb. 6B). Eine *cup*-Deletion im Stamm DN686 (Δcop) führte damit zu einer niedrigeren Induktion, eine Einzeldelention von *cup* hatte keinen Effekt auf die Induktion. Weiterhin hatte eine Deletion von *cus* im Stamm DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) eine Erhöhung der Induktion im Vergleich zu DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) zur Folge. Diese lag wieder auf Niveau des Elternstamms AE104. Die Induktion von *gig* war damit scheinbar abhängig von *gshA* bzw. vom Glutathiongehalt in den Zellen. Einzeldelention von *cop* und *cup* hatten allenfalls minimale Effekte.

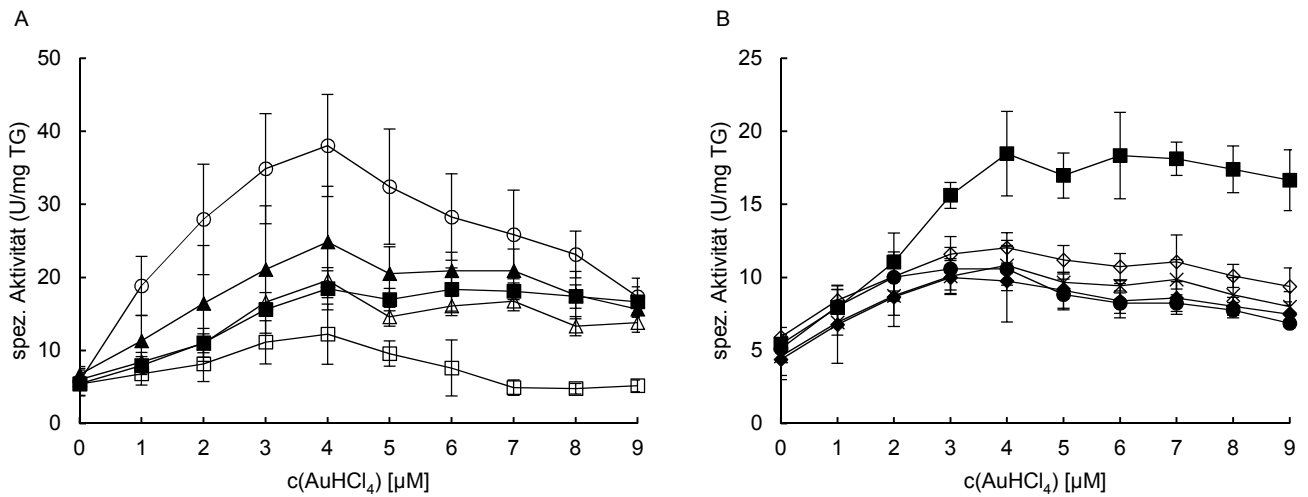


Abbildung 7. β-Gal-Assay mit *cusF-lacZ* Fusionsstämmen unter Zugabe von AuHCl₄. A: Einzeldelentionsstämmen mit Gold inkubiert. AE104(*φcusF-lacZ*) (■), Δ*cop*(*φcusF-lacZ*) (○), Δ*gig*(*φcusF-lacZ*) (△), Δ*gshA*(*φcusF-lacZ*) (□). B: Δ*cup* Einzeldelentionsstamm sowie alle Mehrfachdelentionsstämmen mit *cup*-Deletion mit Gold inkubiert. Δ*cup*(*φcusF-lacZ*) (◆), Δ*cup* Δ*gig*(*φcusF-lacZ*) (●), Δ*cop* Δ*cup*(*φcusF-lacZ*) (◇), Δ*cop* Δ*gig*(*φcusF-lacZ*) (▲), Δ*cop* Δ*cup* Δ*gig*(*φcusF-lacZ*) (×), n ≥ 3.

Die Kulturen wurden 18 h in TMM mit Kanamycin bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM mit Kanamycin angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen 1 % in 20 ml TMM angeimpft und bis 100 Klett angezogen. Die Zellen wurden in 96-*well*-Platten mit rundem Boden in TMM mit AuHCl₄ drei Stunden bei 1300 rpm in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS4 inkubiert, geerntet und die Pellets eingefroren und für den β-Gal-Assay verwendet. Für diesen wurden die Pellets aufgetaut, mit Puffer Z und Substratlösung versetzt und die Reaktion bei einer Gelbfärbung mit Stopplösung abgestoppt. Die Proben wurden bei 420 nm und 550 nm im Tecan MNano vermessen und die spezifische Aktivität berechnet.

Die Basisaktivität des Reporterenzym β-Galaktosidase lag bei allen Stämmen um 5 U/mg TG. Im Elternstamm AE104 ließ sich diese bei einer Goldkonzentration von 4 µM auf bis zu 18,5 ± 2,9 U/mg steigern. Bei steigenden Goldkonzentrationen blieb die Aktivität gleich. Im Stamm DN686 (Δ*cop*) konnte die Aktivität auf bis zu 38 ± 7 U/mg bei 4 µM gesteigert werden und lag damit über der des Elternstamms (Abb. 7A). Bei höheren Goldkonzentrationen fiel die Aktivität wieder auf das Niveau des Stamms AE104 ab. Im Stamm DN847 (Δ*cop* Δ*gig*) konnte diese starke Erhöhung der Aktivität nicht beobachtet werden. In dieser Mutante konnte die Aktivität auf 25 ± 7,6 U/mg bei 4 µM gesteigert werden, dies stellte aber keinen Unterschied zum Stamm AE104 dar. Ebenso verhielt es sich bei einer Δ*gig* Einzelmutante, die ebenfalls keine Änderung der Aktivität zum Stamm AE104 hatte. Im Stamm DN861 (Δ*gshA*) konnte die Aktivität auf bis zu 12,2 ± 4,1 U/mg bei 4 µM gesteigert werden, was geringer als im Stamm AE104 bei gleicher Konzentration war (Abb. 7A). Die Aktivität fiel bei steigenden Konzentrationen ab und lag ab 7 µM wieder auf dem Niveau der Basisaktivität von ca. 5 U/mg. Damit hatte die Deletion von *gshA* keinen Einfluss auf die Induktion. Die Stämme DN656 (Δ*cup*), DN845 (Δ*cop* Δ*cup*), DN849 (Δ*cup* Δ*gig*) und DN853 (Δ*cop* Δ*cup* Δ*gig*) zeigten alle bereits ab 3 µM verringerte Induktion des Reportergens im Vergleich zum Stamm AE104 (Abb. 7B). Allen gemein ist eine Deletion von *cup*.

3.11 Untersuchungen der Goldnanopartikelbildung

Da *C. metallidurans* kein bekanntes System zur direkten Entgiftung von Gold, beispielsweise durch ein Exportsystem, besitzt, werden lösliche Goldkomplexe zu metallischem Gold in Form von Nanopartikeln reduziert. Diese sammeln sich vorwiegend im Periplasma der Zelle an (WIESEMANN *et al.* 2017). Im Zuge dieser Arbeit sollten diese Ergebnisse zunächst unter Verwendung einer neuen Goldlösung

wiederholt werden. Weiterhin sollten die Auswirkungen von Mutationen auf die Nanopartikelbildung untersucht werden.

Da die neue Goldlösung anders auf die Zellen wirkte und einen negativen Effekt auf das Wachstum bei geringeren Konzentrationen hervorrief, musste für die Untersuchungen ein neues Protokoll für die Anzucht etabliert werden. Wichtige Parameter für die Anzucht zur Nanopartikelbildung waren die Wachstumsphase, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Inkubation mit Gold befanden, die Konzentration des Goldes und die Inkubationszeit. Konzentrationen von über 20 μM Gold über 72 Stunden hatten das Absterben der gering angeimpften Kultur zur Folge. Bei 2,5-10 μM Gold im Medium konnte Wachstum verzeichnet werden, allerdings starben die Zellen der Kontrollkultur ohne Goldzugabe ab, woraus gefolgert wurde, dass die Inkubationszeit von 72 Stunden zu lang bemessen war (Ergebnisse nicht gezeigt). Zellen, die mit Gold inkubiert wurden, zeigten hingegen wenig bis kein Zellwachstum. Deshalb wurde die Inkubationszeit herabgesetzt und die Goldkonzentration erhöht, um eine kurzfristige Anreicherung zu ermöglichen. Den Zellen wurde Gold erst während der mittleren Exponentialphase (ca. 180 Klett) zusätzlich zugegeben, um das Wachstum der Zellen nicht schon früh zu beeinträchtigen. Inkubationszeiten mit 50 μM Gold im Medium über einen Zeitraum von mehr als drei Stunden führten zu disruptierten Zellen. Die Inkubationszeit in goldhaltigem Medium wurde im Folgenden auf 30 min verringert. Zelldisruptionen traten hier nach einer Regenerationszeit von 20 Stunden in goldfreiem Medium nicht auf. Die Aufnahmen wurden durch elektronenmikroskopische Techniken von Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger vom Biozentrum der Universität Halle erstellt. Ein Beispiel einer solchen Aufnahme einer Kultur, die mit 50 μM Gold über 30 min und einer Regenerationszeit von 20 Stunden ist in Abbildung 8 gezeigt. Die Proben wurden hauptsächlich auf das Vorhandensein von möglichen Goldnanopartikeln untersucht, die als elektronendichte Struktur sichtbar waren.

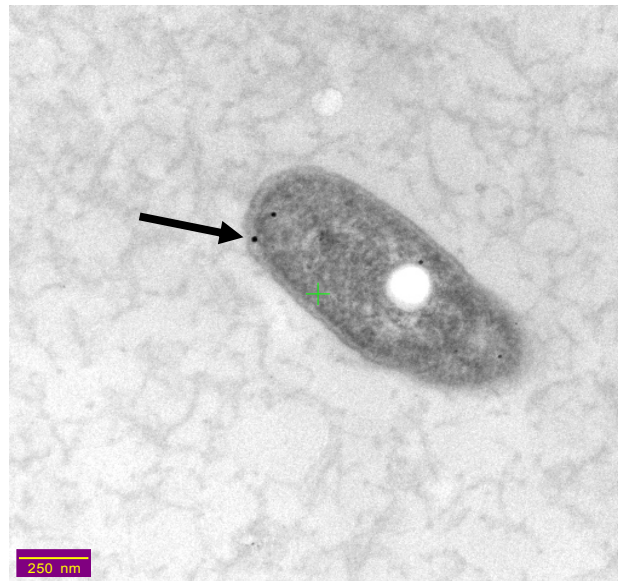


Abbildung 8. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit Gold inkubierten Zelle des Stammes AE104. Die Zelle wurde in Kultur für 30 min mit einer Endkonzentration von 50 μM Gold inkubiert, danach geerntet, einmal in TMM gewaschen und in goldfreiem TMM für 20 Stunden inkubiert, um sich zu regenerieren. Die Aufnahme wurde von Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gemacht. Dabei wurde ein EM900 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV verwendet. Ein möglicher Nanopartikel ist mit einem Pfeil markiert.

In den Aufnahmen der Zellen konnten wenige elektronendichte Partikel identifiziert werden. Zellen enthielten teilweise auch keine Partikel. Diese lagen im periplasmatischen Teil der Zelle oder nahe der Cytoplasmamembran. Die Partikel waren kreisrund und hatten einen Durchmesser von ca. 10-20 nm. Um zu verifizieren, dass die elektronendichten Partikel tatsächlich Gold enthalten, wurden in Kooperation mit Lutz Berthold vom Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (IMWS) in Halle elektronenmikroskopische Aufnahmen und Elementanalysen durchgeführt. Dies wurde durch EDX-Messungen mit dem Titan³ G2 60-300 (FEI Company, Oregon, USA) realisiert. Hierbei handelt es sich um ein STEM, das in Kombination mit einem HAADF-Detektor, besonders gut schwere Elemente nachweisen kann. Der Elektronenstrahl des EM wird ausgenutzt, um Elektronen in den Atomen anzuregen und so aus dem Verbund zu lösen. Die entstehende Lücke wird durch Elektronen, die weiter vom Atomkern entfernt sind und damit mehr Energie besitzen, geschlossen. Es wird Röntgenstrahlung frei, deren Intensität je nach Kernladungszahl des Atoms und Übergang der Energieniveaus durch die Elektronen, spezifisch für jedes Element ist. Dabei erzeugt jedes Element ein spezifisches Spektrum an Röntgenstrahlung. Ein Beispiel für ein Bild, das von diesem STEM generiert wurde, ist in Abbildung 9 zu sehen. Zu beachten ist, dass aufgrund der technischen Apparatur elektronendichte Strukturen hier hell erscheinen.

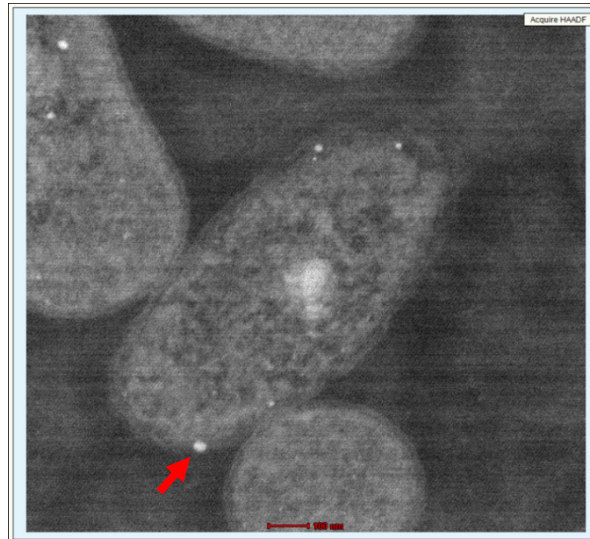


Abbildung 9. STEM-Aufnahme einer mit Gold inkubierten Zelle des Stamms AE104. Die Position wurde zuvor von Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger ausgesucht. Die Aufnahme des Bildes erfolgte durch Lutz Berthold mit dem Titan³ G2 60-300 am IMWS Halle. Ein potenzieller Goldnanopartikel, der für die Messung des EDX-Spektrums verwendet wurde, ist mit einem Pfeil markiert. Die Vergrößerung beträgt 40.000, die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV.

Der markierte Partikel wurde für die Messung eines EDX-Spektrums verwendet. Dazu wurde die Vergrößerung auf einen Faktor von 225.000 erhöht, um den Elektronenstrahl weiter zu fokussieren. Der Detektor kann dabei unabhängig vom Fokus des EM arbeiten. Durch die Messung konnte im Fokus des STEM bzw. im ausgewählten Bereich der Detektion die Zusammensetzung des Partikels analysiert werden. Der Elektronenstrahl sorgt dafür, dass Elektronen aus ihren jeweiligen Orbitalen gelöst werden. Elektronen, die in höheren Energieniveaus liegen (größere Entfernung vom Kern), ersetzen diese. Bei diesem Übergang wird Röntgenstrahlung frei, da die Elektronen beim Übergang von einem energetisch angeregteren Zustand in einen weniger angeregten Zustand fallen. Die Energie der Strahlung ist dabei für jedes Element und für jeden Übergang spezifisch. Dadurch ergibt sich für jedes Element ein charakteristisches Spektrum. Das Spektrum für den markierten Partikel aus Abbildung 9 ist in Abbildung 10 gezeigt ist.

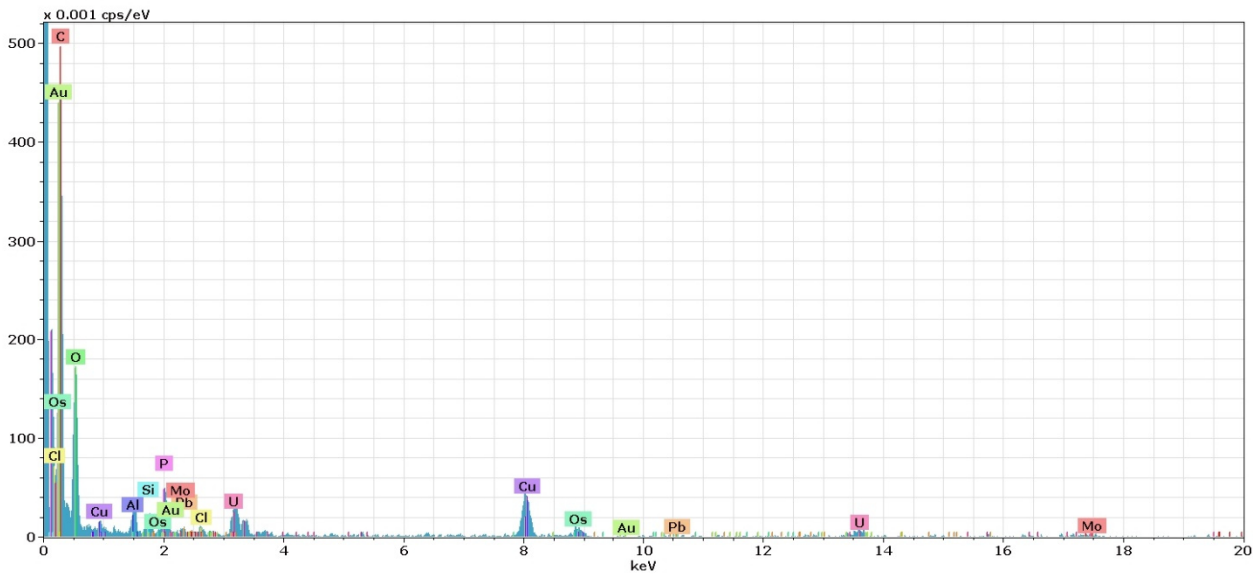


Abbildung 10. EDX-Spektrum der Elementanalyse des markierten Partikels aus Abbildung 9. Die Messung erfolgte durch Lutz Berthold vom IMWS Halle mit dem Titan³ G2 60-300. Im Spektrum sind alle möglichen Stellen für auftretende Signale der jeweiligen Elemente markiert. Eine Markierung bedeutet nicht, dass dieses Element tatsächlich in der Probe detektiert wurde.

Die Elementanalyse ergab, dass der Partikel neben den zu erwartenden biologischen Bestandteilen wie Kohlenstoff und Sauerstoff viel Phosphor enthielt (Abb. 10 und Anhang Abb. 23 A). Gold konnte im untersuchten Partikel nur vereinzelt festgestellt werden, der Partikel besteht aber nicht aus Gold (siehe Anhang Abb. 23 B). Peaks für schwere Elemente wie Osmium, Blei, und Molybdän stammten vermutlich aus Streustrahlung der Bauteile, die im Detektor verbaut sind. Kupfer stammte vermutlich aus dem Material des Trägernetzes. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen des Stamms AE104 nicht in der Lage waren unter Verwendung der kommerziellen Goldlösung Goldnanopartikel zu bilden.

4. Diskussion

4.1 Die Goldhomöostase in *C. metallidurans*

4.1.1 Die Zusammensetzung der Goldlösungen und ihre Wirkung auf *C. metallidurans*

Ein wichtiger Aspekt beim Arbeiten mit Gold in Lösung ist der Oxidationszustand der Ionen. Gold liegt entweder als Au(III) oder Au(I) vor. Als Au(III) bildet es Komplexe mit Ionen wie Chlorid oder organischen Verbindungen (RADISAVLJEVIĆ UND PETROVIĆ 2020). Aus diesen Komplexen wurden Antikrebsmittel gewonnen (PATEL *et al.* 2013). Als Au(I) kann es auch an Thiole wie Glutathion binden und so Komplexe eingehen (ALIAKBAR TEHRANI *et al.* 2012). Durch die Ähnlichkeit von Au(I) zu Kaliumionen könnte dieses auch besser in die Zelle aufgenommen werden als Au(III), ähnlich wie es mit Cu(I) und Natriumionen der Fall sein könnte. Die Frage, die von elementarer Bedeutung in dieser Arbeit ist: mit welcher Goldspezies wurde gearbeitet. Bis 2015 wurde von Wiesemann eine Goldlösung verwendet, die von einer Arbeitsgruppe von der University of Adelaide bezogen wurde. Diese Lösung wurde von F. Reith hergestellt. Eine entscheidende Frage hierbei ist, wie diese Lösung hergestellt wurde, denn daraus ergeben sich je nach chemischer Beschaffenheit des gelösten Goldes, unterschiedliche physiologische Auswirkungen auf die Zellen. In den betreffenden Publikationen ist keine Methode zur Herstellung der Lösung zu finden (REITH *et al.* 2009). Auch die Herkunft des Goldes ist nicht exakt geklärt. Zwei mögliche Bezugsquellen kommen in Frage. Entweder wurde das Gold kommerziell erworben, durch F. Reith von Minenbesitzern gekauft oder von F. Reith selbst geschürft. Wahrscheinlich ist der Erwerb von Goldnuggets durch F. Reith und das anschließende Lösen der Nuggets in Königswasser. Es kann jedoch nicht genau gesagt werden, wie hoch der Anteil von Gold in bezogenen Nuggets ohne Prüfung wirklich ist. Auch die Verunreinigung mit anderen Metallen kann nicht ausgeschlossen werden. Im Fall von kommerziell erhältlichem Gold kann zumindest von einem definierten Reinheitsgehalt ausgegangen werden.

Zur Herstellung von Goldlösungen gibt es mehrere Methoden. Zum einen kann man metallisches Gold mit Hilfe von Königswasser auflösen. Dabei entstehen Au(III)-Komplexe mit Chloridionen. Alternativ lässt sich Gold(III)-Chlorid in Salzsäure lösen, um das gleiche Ergebnis zu erzielen. Eine andere Methode, um metallisches Gold aufzulösen, ist die Reaktion mit Chlorgas bei Zufuhr von Hitze. Dabei entsteht ebenfalls Gold(III)-Chlorid. Dies ist eine Methode, um die Reaktion wasserfrei und im industriellen Maßstab durchzuführen und so keinen Verlust durch das Ausfällen der Goldverbindungen zu haben. Die Reaktion unterliegt aber einem Gleichgewicht, wodurch dieses bei Entzug des giftigen Chlorgases zugunsten von AuCl verschoben wird. Damit würde das Gold aus dieser Reaktion Au(I) produzieren. In Wasser ist diese Verbindung über einen längeren Zeitraum nicht stabil und zerfällt langsam zu metallischem Gold und Au(III)-Chlorid. Durch Zufuhr von Hitze und Licht beschleunigt sich dieser Prozess. Das Gleichgewicht kann durch Zugabe von Chlorid-Ionen (z.B. durch Salzsäure) in Richtung Au(I) verschoben werden. Das Verhältnis zwischen Au(I) und Au(III) ist aber auch von der Goldkonzentration der Lösung abhängig (GAMMONS *et al.* 1997). Bei der in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Lösung von Sigma Aldrich ist dieser Prozess zur Herstellung sehr viel naheliegender als das Lösen von Goldnuggets in Königswasser. Weiterhin ist die Lösung als Standard für die

Massenspektrometrie geeignet, was bedeutet, dass das Gold vermutlich zunächst elektrolytisch aufbereitet worden ist und anschließend aus dem hochreinen Zustand gelöst worden ist, da sich sonst zu viele durch den Schürfprozess entstandene Kontaminationen in der Lösung befunden hätten. Nach dieser Betrachtung schien es plausibel, dass die Lösung, die Frank Reith und auch Nicole Wiesemann für ihre Versuche verwendeten Au(III)-Komplexe enthielten, die hier verwendete Lösung könnte hingegen ebenso Au(I)-Komplexe enthalten. Dies ist dem Herstellungsprozess geschuldet. Da Goldkomplexe in Wasser zur Instabilität neigen, ist außerdem nicht gesichert in welchem Zustand die Lösung von Frank Reith war, als sie von Nicole Wiesemann verwendet wurde bzw. wie stabil diese Lösung über die Zeit war. Wie schnell und wie stark sich die gelösten Komplexe zersetzt haben, kann nicht geklärt werden. Dass Goldkomplexe in Wasser nicht stabil bleiben, ist thermodynamisch aufgrund der Standardpotentiale zwischen Goldionen und Wasser naheliegend. Die Firma Sigma gibt für die Stabilität ihrer Lösung einen Zeitraum bis März 2023 an, dieser wurde für die experimentellen Arbeiten eingehalten.

Da nicht bekannt ist, ob die Goldresistenz von *C. metallidurans* auf einem detoxifizierendem System wie etwa einem Exporter beruht, sollten im Zuge dieser Arbeit die bekannten Kupferresistenzsysteme Cop, Cup, Cus sowie die Rolle von Glutathion und des Gig-Systems, das durch Gold induziert werden kann, näher auf eine mögliche Rolle in der Goldhomöostase untersucht werden. Die Goldlösung, die für diese Arbeit verwendet wurde, unterscheidet sich von der aus vorherigen Arbeiten. Sie wurde bereits in einer Masterarbeit von Gerlach (2017) verwendet wurde. Um Effekte durch die über die Jahre vorkommende Veränderung des komplexierten Goldes auszuschließen, wurde die gleiche Lösung vom Hersteller (Sigma Aldrich) gekauft. Durch Wachstumsendpunktbestimmungen konnte kein Unterschied zwischen den Lösungen festgestellt werden (GERLACH 2017). Dennoch wurde die neu gekaufte Lösung für alle weiteren Versuche verwendet. Vergleiche zwischen diesen Versuchen und denen aus der Dissertation von Wiesemann (2015) lassen sich nur schwer ziehen, da nicht genau geklärt ist, wie sich die Herstellung und chemischen Eigenschaften (beispielsweise der Oxidationszustand der Ionen oder die zeitabhängige Stabilität) der von F. Reith hergestellten und der kommerziellen Goldlösung unterscheiden. Dies wird vor allem am Verhalten des Stammes AE104 deutlich. Die Resistenz bei Verwendung der kommerziellen Lösung lag um etwa einen Faktor von 10 niedriger als dies in der Arbeit von Wiesemann (2015) der Fall war (siehe Anhang Abb. 14).

4.1.2 Nachweis der Goldnanopartikelbildung

Die Nanopartikelbildung in goldhaltigen Lösungen wurde in *C. metallidurans* bereits nachvollzogen (REITH *et al.* 2009; WIESEMANN *et al.* 2017). Die Zellen bilden im Periplasma und nahe der Cytoplasmamembran Partikel, um sich gegen die Folgen durch das Metall wie oxidativen Stress zu schützen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich nach Behandlung mit Gold elektronendichte Partikel im Periplasma der Zellen gebildet haben (Abb. 8 und 9). Durch Messung mittels EDX konnte allerdings ermittelt werden, dass es sich hierbei nicht um goldhaltige Partikel handelt, sondern um phosphorreiche Ablagerungen (Abb. 10). Durch den möglicherweise höheren Anteil von toxischem Au(I) auch über einen kurzen Zeitraum von wenigen Minuten könnten die Zellen so weit geschädigt worden sein. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Au(I)-Thiosulfate nicht

als Substrat für die Bildung von Partikeln geeignet sind (BÜTOF *et al.* 2018). Aufgrund der Befunde der physiologischen Experimente und der Analysen der Nanopartikel konnte geschlussfolgert werden, dass die kommerzielle Goldlösung vermutlich nicht als Substrat für die Synthese geeignet ist. Die Experimente zeigten durch Variierung der Inkubationszeiten und Konzentrationen, dass bereits kurzfristige Inkubationen mit hohen Konzentrationen zum Absterben der Kulturen führten, was die unmittelbare Toxizität der Goldlösung bestätigte. Ebenso konnte die bakteriozide Wirkung bei geringen Konzentrationen von unter 20 μM über einen längeren Zeitraum gezeigt werden. Die IC_{50} -Werte sind deutlich geringer als die in früheren Experimenten verwendeten Konzentrationen (WIESEMANN *et al.* 2013). Als Reaktion auf die toxische Wirkung von Gold schienen die Zellen zudem phosphorhaltige Einschlüsse zu bilden. Es könnte sich hierbei um Phosphorspeicherkomplexe, ähnlich wie Acidocalcisomen handeln, die typischerweise elektronendicht sind und viel Phosphor in Form von Polyphosphaten enthalten (DOCAMPO *et al.* 2005; LENGELER *et al.* 2009; ACHBERGEROVÁ UND NAHÁLKA 2011).

4.1.3 Die Goldresistenz in *C. metallidurans*

Au(I) könnte wie Cu(I) über andere Transporter ins Cytoplasma gelangen und sich so einfacher in der Zelle ansammeln. Gold- und Kaliumionen haben in der Valenz +I einen Ionenradius von 137 bzw. 138 pm (SHANNON 1976). Damit bestünde die Möglichkeit, dass Au(I) über Kaliumimporteure in die Zelle aufgenommen wird. In der Valenz +III gibt es kein Element, dessen Importeur auch Au(III) transportieren könnte, da der Unterschied der Ionenradii zu groß wäre. Das nächstgelegene biologisch relevante Element mit gleicher Valenz wäre Fe(III) mit einem Ionenradius von 55 pm gegenüber dem Radius von Au(III) mit 68 pm. Allerdings wird Fe(III) von Bakterien in der Regel außerhalb der Zelle über Siderophore komplexiert und danach erst aufgenommen, wobei hier ABC-Transporter zum Einsatz kommen (CLARKE *et al.* 2001). Daher wäre der Import von Au(I) deutlicher leichter zu leisten als von Au(III) und eine Akkumulation im Cytoplasma wäre die Folge. Eine im Vergleich zu den Daten aus der Dissertationsschrift von Wiesemann (2015) erhöhte Menge an Goldatomen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, was durch die möglicherweise unterschiedliche Goldzusammensetzung der beiden Lösungen erklärt werden kann. Bei Wiesemann (2015) lag die Menge an Goldatomen im Stamm AE104 bei circa 5×10^4 Atomen pro Zelle, in dieser Arbeit bei etwa 1×10^6 Atomen pro Zelle (Tab. 15). Der erhöhte Goldgehalt würde dafürsprechen, dass die in dieser Arbeit verwendete Goldlösung mehr Gold(I) als in der Arbeit von Wiesemann (2015) enthielt. In beiden Arbeiten wurde die gleiche Konzentration an Gold eingesetzt und die Kulturen ähnlich lang inkubiert. Dies würde auch die veränderten Resistenzwerte erklären, die sowohl in dieser Arbeit als auch in der Masterarbeit von Gerlach (2017) auftraten, in der ebenfalls die kommerzielle Goldlösung verwendet wurde. Durch den effektiveren Import von Au(I) kann mehr Gold innerhalb des Cytoplasmas akkumulieren. Daraus ergibt sich eine erhöhte Toxizität der kommerziellen Goldlösung, die in Experimenten von Gerlach (2017) beobachtet wurde.

Die toxische Wirkung von Gold auf Organismen beruht auf der Interaktion von Gold bzw. seiner gebildeten Komplexe mit Biomolekülen wie Proteinen oder DNA (RADISAVLJEVIĆ UND PETROVIĆ 2020).

Auch chemisch inerte Formen wie Goldnanopartikel können in menschlichen Zellen sowie Mitochondrien Schäden auslösen. Diese Effekte können durch den Einsatz von Glutathion entschärft werden (PAN *et al.* 2009). Da Goldionen aufgrund ihres hohen Redoxpotentials selbst gute Oxidationsmittel sind, liegt der grundlegende toxische Effekt von Gold vermutlich auf seiner hoch oxidierenden Wirkung von biologischen Molekülen oder durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid begründet. *C. metallidurans* reagiert darauf mit der Expression entsprechender Gencluster, die zur Entgiftung beitragen (REITH *et al.* 2009). Eines dieser Gencluster ist *gig*. In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine goldabhängige Expression des *gig*-Clusters im Stamm AE104 gezeigt werden (Abb. 6). Dabei wurde mit steigender Goldkonzentration eine höhere Expression gezeigt. Bei Konzentrationen ab 7 μM stellte sich vermutlich ein zunehmend toxischer Effekt auf das Wachstum der Zellen ein, wodurch die Expression abnahm. Die Expression von *gig* im Stamm AE104 konnte für fast alle anderen Stämme ebenso gezeigt werden. Eine Ausnahme bildete hier der Stamm DN845 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup}$), der eine geringere Expression von *gig* zeigte, wobei weder in den Einzelmutanten noch in der Dreifachmutante DN854 ($\Delta\text{cop } \Delta\text{cup } \Delta\text{cus}$) eine Verringerung der Expression stattfand (Abb. 6).

Auffällig war die Abhängigkeit der *gig*-Expression von Glutathion. Im Stamm DN861 (ΔgshA) wurde die Glutathionsynthese unterbunden und *gig* nicht exprimiert (Abb. 6). Ebenso konnte ein geringerer Glutathiongehalt die Expression von *gig* im Stamm DN729 (Δcus) verringern. Ein Zusammenhang zwischen dem Glutathiongehalt der Zelle und der Expression von *gig* ist damit gegeben. Eine Verknüpfung zwischen Glutathion und *Gig* besteht auch in der Kupferhomöostase. Werden Zellen von *C. metallidurans* mit Gold inkubiert, so finden sich in ihnen an Gold gebundene Schwefelspezies (REITH *et al.* 2009). Dabei könnte es sich um Glutathion handeln. Wie Kupfer wird auch Gold beim Eintritt ins Cytoplasma durch Glutathion gebunden und so reduziert (YANGYUORU *et al.* 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Gold zwar eine Tendenz zur Verringerung des zellulären Glutathiongehalts stattfand, allerdings war dies im Vergleich zum Elternstamm AE104 nicht unterschiedlich und diese Tendenz zeigte sich in allen untersuchten Stämmen unabhängig von eingeführten Mutationen. Qualitativ wurden diese Beobachtungen schon gemacht (WIESEMANN 2015). Überschlägt man die Menge an Glutathion in der Zelle erhielte man für eine gemessene Konzentration von etwa 600-1000 nmol Glutathion/mg Protein, einem gemessenen Proteingehalt von 1-1,5 mg/ml, 5 mg Trockengewicht oder 12 ml geernteter Kultur, einer Lebendzellzahl von etwa 10^9 Zellen pro ml und einem Volumen von 0,57 fl pro Zelle (GORIS *et al.* 2001) etwa 30 – 50 Millionen Glutathion-Moleküle pro Zelle oder etwa 1 – 1,5 mM. Bei dieser Konzentration könnte jedes Goldatom an Glutathion gebunden werden, ohne die Zelle zu gefährden. Nicht eingerechnet wären Reaktionen von Gold mit anderen Molekülen, die wiederum zu oxidativem Stress an Proteinen oder der Membran und damit möglicherweise zu einem erhöhten Umsatz von Glutathion, etwa durch Glutaredoxine, führen. Anhand der Messergebnisse könnte aber davon ausgegangen werden, dass diese Reaktionen begrenzt stattfinden und die Bindung von Gold an Glutathion zügig stattfindet. Unter Berücksichtigung von Proteom-Analysen durch Zammit (2016) kann vermutet werden, dass die Menge an Glutathion in der Zelle ausreicht, um die toxische Wirkung von Gold abzufedern. Ansonsten wäre die Produktion von

Enzymen wie GshA oder GshB nachzuweisen gewesen. Dies war nicht der Fall. Stattdessen konnten Glutathion-Peroxidasen und Glutathion-S-Transferasen nachgewiesen werden (ZAMMIT *et al.* 2016). Diese entgiften Wasserstoffperoxid bzw. fördern die Bindung von toxischen Molekülen an Glutathion. Das bedeutet, dass Gold in der Zelle effektiv an Glutathion gebunden und die Wirkung durch oxidativen Stress induziert wird. Dies verhindert in der Zelle größere Schäden.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Aufnahme von Gold sehr schnell von statten geht. Über einen Zeitraum von etwa 2-3 Stunden konnten sich etwa 10^6 Goldatome pro Zelle akkumulieren (Tab. 15). Durch die Zugabe von Kupfer lässt sich dieser Wert noch weiter auf etwa $1,5 \times 10^6$ Atome pro Zelle steigern. Dadurch ergibt sich neben der schon bekannten kooperativen Toxizität von Kupfer und Gold durch Inhibition von CopA durch Gold ein weiterer Aspekt. Durch Zugabe von Gold kann nicht nur zusätzliches Kupfer im Cytoplasma akkumuliert werden, sondern auch andersherum. Durch Analysen auf Proteinebene kann dies allerdings noch nicht belegt werden, da bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte, wie die Goldnanopartikelbildung im Periplasma funktioniert und damit der Fluss von Goldionen über die innere Membranen. Ein Beweis für ein Exportsystem für Goldionen oder Goldkomplexe aus dem Cytoplasma steht bisher noch aus. Der Anstieg von Gold durch Zugabe von Kupfer ist von Mutationen in Determinanten der Kupferhomöostase (*cop*, *cup*, *cus*, *gig*) sowie dem Kupfergehalt in den Zellen unabhängig. Ein stark erhöhter Kupfergehalt, wie er in Stämmen mit einer *cop*-Deletion zu beobachten war, führt nicht automatisch zu einem höheren Goldgehalt in den Zellen (Tab. 15). Der einzige Faktor, der zu einer Veränderung führt, ist der Glutathiongehalt in den Zellen. Fehlt Glutathion in den Zellen, ist auch der Goldgehalt niedriger. Dies bedeutet, dass Glutathion über den kurzen Inkubationszeitraum von etwa 3 Stunden am Verbleib von Gold in den Zellen beteiligt ist und Gold an Glutathion gebunden vorliegen könnte. Wie sich der Goldgehalt über einen längeren Zeitraum entwickelt und wie sich die Zellen an die veränderten Bedingungen anpassen, wurde hier nicht ermittelt. Durch die Unabhängigkeit des Goldgehaltes von den untersuchten spezifischen Determinanten der Kupferhomöostase wächst die Bedeutung des Thiols Glutathion in der Goldhomöostase. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CopA in der Lage ist *in vitro* Au(I) zu Au(III) zu oxidieren (BÜTOF *et al.* 2018). Dabei ist die Funktion von Kupfer abhängig, aber die gleichzeitige Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) ($E_0' = 0,52$ V) aufgrund des zu geringen Potentials nicht mit der Oxidation von Au(I) zu Au(III) ($E_0' = 1,36$ V) gekoppelt (BARD 1985). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Au(I)-Thiosulfat kein geeignetes Substrat für die Bildung von Nanopartikeln ist. Diese Tatsache erklärt warum sich mit der kommerziellen Goldlösung keine Partikel in den Zellen gebildet haben könnten. Vermutlich ist der Komplex über die Au-S-Bindung zu stabil, sodass er von CopA nicht oxidiert werden kann. Dies würde auch erklären, warum die verwendete Goldlösung nicht zur Untersuchung der Partikelbildung geeignet war. Au(I) würde im Cytoplasma durch Thiole wie Glutathion zu schnell komplexiert und stabilisiert. Damit könnte CopA eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Goldionen und späteren Bildung der Nanopartikel spielen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass CopA wichtig für die Bildung stabiler Nanopartikel ist, indem es Au(III) weiter die Bildung ermöglicht (BÜTOF *et al.* 2018). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Wiesemann. Diese zeigten, dass eine

Deletion des *cop*-Operons im Stamm AE104 die Bildung von Nanopartikeln nicht unterbinden kann (WIESEMANN *et al.* 2017).

In dieser Arbeit konnte auf physiologischer Ebene kein wesentlicher Einfluss einer *cop*-Deletion auf die Goldhomöostase festgestellt werden. Wie schon gezeigt, nimmt die Kupferresistenz durch die Deletion ab, bei kooperativem Einfluss von Gold und Kupfer blieb diese aber unverändert. Dies könnte auf den drastischen Einstrom von Gold zurückzuführen sein, der aus den Messungen des Goldgehaltes ersichtlich wurde. In sehr kurzer Zeit gelangte Gold ins Periplasma und auch vermehrt ins Cytoplasma der Zelle. CopA konnte Au(I) durch die schnelle Aufnahme ins Cytoplasma nicht so schnell zu Au(III) oxidieren, was zu einer Überforderung führte. Damit kam die Wirkung von CopA nicht zum Tragen und die Oxidase spielte keine bedeutende Rolle in diesem kurzen Zeitraum von nur einigen Stunden. Auch über einen längeren Zeitraum würde dies der Fall sein. Die Bildung von Nanopartikeln dauert unter Umständen mehrere Tage (REITH *et al.* 2009). Dies bedeutet, dass der Export von Gold aus dem Cytoplasma langsam von statten geht und die oxidierende Wirkung von CopA erst nach einem längeren Zeitraum, als in den *dose response* Experimenten erfasst worden ist, zum Tragen kommt. Deshalb konnte CopA seine Wirkung auf die Goldhomöostase auch hier nicht entfalten und so wurde keine unmittelbare Beteiligung von CopA in den Experimenten ersichtlich.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die P-Typ ATPase CupA durch Gold gehemmt wird (WIESEMANN *et al.* 2017). Ein Export von Goldionen durch dieses Protein konnte deshalb schon ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zusätzliches Gold im Medium die Kupferresistenz herabsetzte. Ausnahmen bildeten die Stämme DN686 (Δcop), DN729 (Δcus) und DN846 ($\Delta cop \Delta cus$), sowie alle Stämme mit einer *cup*-Deletion (Tab. 11). Durch Deletion von *cup* kann CupA kein Kupfer aus dem Cytoplasma exportieren und ebenso nicht durch Gold gehemmt werden. Die Hemmung durch Gold wird dadurch irrelevant. Eine vollständige Hemmung von CupA konnte *in vivo* in keinem Fall beobachtet werden, was sich beispielsweise durch den Abfall der Kupferresistenz auf das Niveau von DN656 (Δcup) im Stamm AE104 gezeigt hätte. Dies könnte ein weiterer Beweis dafür sein, dass die Goldionen, die ins Cytoplasma importiert werden, sehr schnell komplexiert werden und so *in vivo* nur eine geringe hemmende Wirkung auf CupA haben. Obwohl Gold eine hemmende Wirkung auf die ATPase *in vitro* hat, konnte unter Einfluss von Gold eine höhere Expression nachgewiesen werden (WIESEMANN 2015). Dies liegt an der hohen Affinität des Regulators CupR zu Gold, die sogar um den Faktor 10^{18} höher als die zu Kupfer ist (JIAN *et al.* 2009).

CupR aus *C. metallidurans* ist ein orthologes Protein zu CueR aus *E. coli*. Hier reguliert CueR die Expression der Multikupferoxidase CueO und der ATPase CopA. In CupR aus *C. metallidurans* findet sich ein C-terminales CHH-Motiv, das für die Bindung von Au(I), aber nicht für Cu(I) wichtig ist. Ebenso zwei Cysteine an den Positionen 112 und 120 (JIAN *et al.* 2009). Die Bindung von Gold zu CupR könnte damit eine biologische Relevanz in *C. metallidurans* abseits der Regulation von *cupA* haben, da die ATPase selbst durch Gold gehemmt wird. Die naheliegende Frage wäre, warum ein spezifischer Regulator wie CupR, der durch Bindung von Gold aktiviert wird, für die Expression eines durch Gold inhibierten Proteins verantwortlich ist. Da *C. metallidurans* und *E. coli* in sehr unterschiedlichen Habitaten zu finden sind, ist dieser Unterschied jedoch nicht verwunderlich. Andererseits besitzt *S.*

enterica sv. Typhimurium, ein Bakterium, das nicht in goldhaltigen Standorten zu finden ist, Exportsysteme, die dieses Metall transportieren können (CHECA *et al.* 2007; PONTEL *et al.* 2007). Dies bedeutet, dass sich diese Systeme auch in Vertretern der Ordnung *Enterobacterales* entwickelt haben, die in ihrer natürlichen Umgebung nicht mit großen Mengen Gold in Kontakt kommen sollten. Selbst nahe Verwandte wie *E. coli* haben zwar eine P-Typ ATPase (CopA), diese transportiert allerdings nur Cu(I) und Ag(I) aber vermutlich kein Au(I) (STOYANOV *et al.* 2003). Obwohl diese Metallionen chemisch gesehen ähnlich sind, reicht die Selektivität der ATPase aus, um zwischen ihnen zu unterscheiden. Dafür sind vermutlich wenige Änderung von Aminosäuren ausreichend (AXELSEN UND PALMGREN 1998).

In Proteomanalysen unter Einfluss von Gold konnte ebenfalls das Metallchaperon CupC nachgewiesen werden. Dieses Protein bindet neben Kupfer auch Gold und war das einzige goldbindende Protein, mit einer Metallbindedomäne (ZAMMIT *et al.* 2016). Es zeigte sich, dass die Antwort auf den durch Gold ausgelösten Stress eher allgemein war und darauf abzielte, den Metabolismus der Zellen aufrechtzuerhalten. Beispielsweise wurden Glutathion-Peroxidasen gefunden, die eine Rolle bei der Entgiftung von Peroxiden spielen oder Proteine, die zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität wichtig sind (ZAMMIT *et al.* 2016). Im γ -Proteobakterium *Serratia proteamaculans*, das an goldhaltigen Standorten zu finden ist, konnte durch Wachstumsexperimente auf Gold gezeigt werden, dass auch hier metallbindende Proteine wie CopC gebildet werden. Die Antwort auf den durch Gold ausgelösten Stress ist auch hier wenig spezifisch und umfasst hauptsächlich Proteine zur Abwehr von oxidativem Stress, Aufrechterhalten des zellulären Metabolismus und des Schwefelstoffwechsels (SANYAL *et al.* 2023). CopC aus *S. proteamaculans* hat nach BLAST-Analysen keine Ähnlichkeit zu Proteinen aus *C. metallidurans*. Die Interaktion von CupC aus *C. metallidurans* mit anderen ATPasen wie CadA oder ZntA kann nicht ausgeschlossen werden.

Für das Cus-System aus *E. coli* konnte der Transport von Cu(I) und Ag(I) gezeigt werden (LOFTIN *et al.* 2007; LOK *et al.* 2008; XUE *et al.* 2008). Ein spezifischer Transport von Gold konnte weder in *E. coli* noch *C. metallidurans* gezeigt werden. Obwohl alle drei Elemente als einwertige Ionen vorkommen können, unterscheiden sie sich in ihrer Ionengröße. Jedoch sind sich Au(I) und Ag(I) in ihren Radii ähnlicher (137 pm bzw. 115 pm) als Cu(I) und Ag(I) (77 pm bzw. 115 pm) (SHANNON 1976). Allerdings ist die Koordination der Ionen ein gewichtiger Faktor. Im Falle von Au(I) werden diese im Chaperon CusF von zwei Methionin-, einem Histidinrest und einem Tryptophanrest als Abschirmung koordiniert (LOFTIN *et al.* 2007). Inwieweit Kupfer- bzw. Silberbindestellen auch von Au(I) besetzt werden könnten, ist nicht bekannt.

Durch die geringe biologische Relevanz sind Goldbindestellen in Proteinen fast nicht untersucht. Ein Gegenbeispiel ist die bereits erwähnte Koordination von Au(I) in CupR. Hier sind es Cystein- bzw. Histidinreste, die eine dreifache Koordination erlauben (JIAN *et al.* 2009). Methionine kommen bei der Bindung von Metallen im Periplasma häufiger vor als Cysteine, da die Umgebung oxidierender als im Cytoplasma ist (ARNESANO *et al.* 2002; ARNESANO *et al.* 2003; ZHANG *et al.* 2006). Inwieweit die Methionine der Cus-Proteine Goldionen im Periplasma binden können, ist nicht bekannt. Der Transportmechanismus von Kupfer durch CusA wird vermutlich durch drei Methioninreste im periplasmatischen Teil des Proteins, sowie vier weiterer Methioninpaare in der Transmembrandomäne

bzw. der periplasmatischen Domäne, bewerkstelligt (LONG *et al.* 2010). Methionin konnte in humanen Zellen mit der Koordination von Gold in Verbindung gebracht werden (MADEIRA *et al.* 2014). Ein durch CusA geleisteter Transport von Goldionen über Methioninreste scheint daher möglich. In dieser Arbeit konnte die Kupferresistenz durch Zugabe von Gold zwar beeinflusst werden, jedoch erhöhte sich die Kupferresistenz durch die Deletion von *cus* im Gegensatz zum Parentalstamm AE104 (Tab. 11). Die Kupferresistenz sank durch Zugabe von Gold auf das Niveau des Stamms AE104 ohne Zugabe von Gold. Damit gleicht die Zugabe von Gold zum Stamm DN729 (Δcus) den Effekt der Deletion (in Relation zum Stamm AE104) wieder aus. Ein Effekt der Deletion auf die Goldresistenz konnte in Experimenten, in denen nur Gold verwendet wurde, nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Damit zeigte eine Deletion in *cus* über einen längeren Inkubationszeitraum mit Gold im Zusammenspiel mit Kupfer durchaus einen Effekt auf die Kupferresistenz. Im Stamm AE104 konnte das *cus*-Operon mit Gold induziert werden, was auf eine Rolle in der Goldhomöostase hindeutet (Abb. 7). Diese Induktion war im Stamm DN686 (Δcop) erhöht und könnte wie bei Kupfer auf eine Stimulation des *cus*-Clusters durch periplasmatische Goldionen hindeuten. Dabei könnte es sich um Au(I) handeln, das im Stamm DN686 (Δcop) aufgrund der fehlenden Oxidation zu Au(III) vermehrt auftreten sollte. Aufgrund des schnellen Einstroms von Au(I) ins Cytoplasma und der daraus resultierenden geringen Wirkung von CopA auf die Goldhomöostase, könnte geschlussfolgert werden, dass die Expression von *cus* weitaus sensitiver erfolgt als es für Kupfer der Fall ist. Dies deutete sich bereits aufgrund der verwendeten Konzentrationen an, die im Fall von Kupfer deutlich geringer war als Gold. In beiden Fällen erhöhte sich die Induktion im Vergleich zur Basisinduktion um den Faktor 3-4. Allerdings lag die Induktion im Stamm DN686 (Δcop) bei Kupfer um ein Vielfaches höher. Die unveränderte Goldkonzentration innerhalb der Stämme mit *cus*-Deletion in Zusammenhang mit einer nur mäßigen Induktion durch Gold innerhalb des gleichen Zeitraums von circa drei Stunden zeigte, dass Gold schnell in die Zelle aufgenommen wurde und der CusCBA-Komplex nur wenig Gold über die äußere Membran translozieren konnte, wenn er dazu überhaupt in der Lage sein sollte. Eine stark erhöhte Induktion des *cus*-Clusters im Stamm AE104 bei geringen Metallmengen wie unter Einfluss von Kupfer im Stamm DN686 (Δcop) und DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4). Das *cus*-Cluster scheint daher keine unmittelbare Antwort der Zelle zu vermitteln, sondern eher eine nachrangige Rolle zu spielen, vor allem wenn *cop* deletiert wurde. Dies scheint zum einen mit den Beobachtungen unter Kupferstress vereinbar, bei denen die Hauptantwort der Zelle darin bestand periplasmatisches Cu(I) aus dem Cytoplasma fernzuhalten. Dies geschah hauptsächlich durch CopA und nicht CusCBA wie durch die *dose response* Versuche und Metallgehaltbestimmungen ersichtlich, bei denen die Deletion von *cop* einen deutlich negativeren Effekt auf das Wachstum unter Kupferstress hatte als eine *cus*-Deletion (Tab. 4). Eine der verwunderlichsten Beobachtungen war, dass *cus* unter Goldstress zwar induziert wurde aber in *cup*-Mutanten (ebenso wie unter Einfluss von Kupferstress) reprimiert wurde (Abb. 7). Unter Kupferstress kann man sich diese Tatsache durch einen geringeren Kupfergehalt im Periplasma und eine geringere Induktion von *cus* erklären. Da CupA aber nicht in der Lage ist Gold über die innere Membran zu transportieren, könnte die geringere Induktion von *cus* nicht über einen verminderten Transport von Goldionen in Einklang gebracht werden. Die Interaktion zwischen Cup und Cus müsste daher

zumindest unter Goldstress über die Verteilung im Cytoplasma und Periplasma hinausgehen. Auf Regulationsebene könnte ein Zusammenspiel aber nicht funktionieren, da beide Faktoren in unterschiedlichen Kompartimenten zu finden sind und eine Koregulation auch unter dem Gesichtspunkt des Kupferstress nicht sinnvoll wäre.

Im Gegensatz zu Kupferstress, bei dem eine *gig*-Deletion im Stamm AE104 keinen Effekt zeigte, zeigte die Deletion von *gig* bei der kooperativ toxischen Wirkung von Kupfer und Gold einen Nachteil. Bei allen Stämmen, die keine zusätzliche *cup*-Deletion enthielten, konnte *gig* einen positiven Effekt erzielen (Tab. 11 und 12). Da die Expression von *gig* vermutlich von einem Reiz aus dem Periplasma abhängt, wie unter dem Einfluss von Kupfer gezeigt, führte eine Verringerung periplasmatischen Kupfers durch eine *cup*-Deletion zu geringerer Expression. Unter Einfluss von Gold wurde *gig* stärker exprimiert und diese Expression war von Glutathion abhängig (Abb. 6). Unter dem Einfluss von Kupfer war dies nicht der Fall. Dies würde bedeuten, dass die Expression von *gig* von einem periplasmatischen Reiz durch Glutathion und Gold abhängt oder eine Regulation vom Redoxzustand der Zelle.

Der ECF-Sigmafaktor RpoQ und sein Antisigmafaktor RsqA werden durch Gene in der unmittelbaren Umgebung von *gig* codiert und könnten die Expression des Operons regulieren. Eine Störung der Redox- bzw. Thiolhomöostase, vor allem Glutathion, ist hier ein wichtiger Faktor (WIESEMANN 2015; GROßE *et al.* 2019). Diese Abhängigkeit der *gig*-Expression von Glutathion zeigt, dass die Redoxhomöostase ein Bestandteil der Funktion von Gig sein könnte. Wie schon von Wiesemann (2015) gezeigt wurde, hatte eine Deletion des Gens, das für den Sigmafaktor RpoQ codiert, eine konstitutive Expression des *gig*-Clusters zur Folge. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Funktion von RpoQ in der Thiolhomöostase und der Funktion von Gig, insbesondere GigT, darin. Durch das Fehlen eines spezifischen Systems zur Entgiftung von Gold in *C. metallidurans* nimmt Glutathion in der Goldhomöostase einen höheren Stellenwert ein als in der Kupferhomöostase. Die thermodynamisch bedingte höhere Bereitschaft von Gold als Oxidationsmittel zu fungieren, sorgt für eine günstigere Oxidation der Komponenten der Atmungskette und diese wird durch GigT ausgeglichen, indem Glutathion oxidiert und die Elektronen in die Atmungskette integriert werden könnten.

Glutathion ist das häufigste Thiol in Zellen und schützt durch seine Reduktionswirkung die Zelle vor Schäden durch beispielsweise Oxidation in Folge von Reaktionen durch redoxaktive Metalle wie Cu(II) oder Au(III). Diese Ionen können durch Reaktion mit Glutathion zu Cu(I) bzw. Au(I) reduziert werden (SPEISKY *et al.* 2009; MIRONOV UND KHARLAMOVA 2023). Im Fall von Gold bilden sich stabile, lineare Thiolatkomplexe, wobei Glutathion selbst oxidiert wird (JIANG *et al.* 2023). Die Anfälligkeit von Thiolen könnte sie zu einem primären Ziel für Oxidationsreaktionen mit Gold machen und könnte in Zellen zu Disulfidbrückenbildung führen. Im Gegensatz zu Kupfer sind nach der Komplexbildung von Glutathion mit Goldspezies keine Reaktionen bekannt, die zur Oxidation von Au(I) oder direkt zu weiteren Produkten wie reaktiven Sauerstoffspezies führen. Es kann jedoch zur Inhibierung von Enzymen kommen, die an der Bekämpfung von oxidativem Stress beteiligt sind (CHAUDIERE UND L. TAPPEL 1984). Das bedeutet, dass eine Reduktion zu Au(I) über Komplexbildung von Reduktionsmitteln wie Glutathion, thermodynamisch nur durch die vollständige Reduktion zu Au(0) abgeschlossen werden könnte. Dem stehen Oxidasen wie CopA entgegen, die zumindest *in vitro* eine Rolle bei der Reduktion zu

Goldnanopartikeln eine Rolle spielen könnten (BÜTOF *et al.* 2018). Durch die hohe Stabilität und geringe Reaktivität der Gold-Thiolat-Komplexe könnten Redoxzyklen, wie sie bei korrespondierenden Kupfer-Komplexen auftreten, unterbunden werden. Dieses Verhalten wurde in dieser Arbeit deutlich. Unter Einwirkung von Gold konnte der Glutathiongehalt der Zelle nur minimal beeinflusst werden, was auf die Stabilität der gebildeten Komplexe zurückzuführen sein könnte (Tab. 17). Das Verhältnis von Glutathion zu Gold beträgt hier grob geschätzt 30 bis 50:1, wodurch Gold nahezu vollständig, abgesehen von der Bindung an andere Thiole wie Cystein, von Glutathion gebunden werden sollte. Im Falle des Einflusses von Kupfer könnte in der Zelle die Glutamat-Synthese gestört sein. Dies könnte durch die Verdrängung von Eisenionen in der Glutamatsynthese begründet sein (DJOKO *et al.* 2017). Glutaminsäure ist eine der drei Aminosäuren, die für die Synthese von Glutathion benötigt werden. Anhand der bestimmten Glutathiongehalte lässt sich vermuten, dass hier nur eine Störung und keine vollkommene Inhibierung der Synthese vorliegt (Tab. 17).

In *E. coli* liegt das Gen *ybaS*, das für eine putative Glutaminase codiert, zwischen der ATPase CopA und dem Regulator CueR. Dies zeigt eine starke Verbindung zwischen dem Glutamin- bzw. Glutamatstoffwechsel und der Kupferhomöostase (DJOKO *et al.* 2017). Außerdem zeigte sich eine höhere Bereitschaft von Kupferionen Redoxreaktionen mit Glutathion bzw. mit Glutathion-Komplexen einzugehen. Da die Reaktion zur enzymatischen Bestimmung des zellulären Gehalts von Glutathion auf der Reaktion von GSH mit DTNB beruht, könnte geschlossen werden, dass ein höherer Anteil von oxidiertem Glutathion (GSSG) vorlag. Dieser Anteil müsste zunächst durch die zugegebene Glutathion-Reduktase reduziert werden und steht so der Reaktion nicht zur Verfügung. Ein niedrigerer Glutathiongehalt und möglicherweise ein höherer Anteil von GSSG konnte nur unter Zugabe von Kupfer verzeichnet werden, insbesondere wenn durch Mutation Resistenzdeterminanten nicht mehr vorhanden waren (Tab. 17 und 18). Beispielsweise verfügte der Stamm DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) noch über eine Glutathionkonzentration von 280 ± 63 nmol/mg Protein. Dies entspricht einer Menge von ca. 15 Millionen Glutathionmolekülen pro Zelle. Damit dürfte dieser Stamm selbst bei erhöhtem Aufkommen von oxidativem Stress durch Kupfer noch genug Glutathion besitzen, um die gemessene Menge Goldatome effektiv binden zu können. Ein möglicherweise höherer Anteil von GSSG in den Zellen bietet aufgrund der experimentellen Durchführung jedoch keine ausreichende Erklärung, da vorhandenes GSSG vor der Messung bereits zu GSH reduziert würde. Die Störung der Glutaminsäuresynthese stellt gegenwärtig den deutlich schwerwiegenderen Faktor dar, da hier Glutathion erst gar nicht synthetisiert würde. Dies würde somit eine gute Erklärung für den geringeren Glutathiongehalt in Mehrfachdeletionsstämmen mit gestörter Kupferhomöostase liefern. Bemerkenswert ist jedoch der nicht eindeutige Zusammenhang zwischen einem hohen Kupfergehalt in Δcop -Stämmen und einer möglichen gestörten Glutathionsynthese. Selbst im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$), der einen Kupfergehalt von $309 \pm 88,9 \times 10^3$ Atomen aufwies (Tab. 13), ist der Glutathiongehalt im Vergleich zum Stamm AE104 nicht beeinflusst (Tab. 17). Es scheint einen Zusammenhang zwischen der toxischen Wirkung von Kupfer auf Enzyme mit Eisen-Schwefel-Zentren und einem möglichen Einfluss auf die Glutathionsynthese zu geben. Ein geringerer Glutathiongehalt zeigte sich ebenfalls in mit *gshA* komplementierten Disruptionsmutanten. In diesen Mutanten waren die

DISKUSSION

Glutathionkonzentrationen allerdings oftmals nicht auf ihrem ursprünglichen Niveau, bezogen auf Stämme vor der Disruption im Gen *gshA*. Eine deutlich verringertes Glutathiongehalt unter Kupferstress ließ sich aber auch im Stamm DN928 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr}$. pBBR::*gshA*) zeigen, der von 617 ± 26 nmol/mg Protein auf 155 ± 39 nmol/mg Protein abfiel (Tab. 18). Auffällig an den Ergebnissen ist, dass eine vollständige Deletion des Gens *gshA* im Stamm AE104 mit anschließender Komplementation im Stamm DN919 ($\Delta gshA$ pBBR::*gshA*) zu einem ähnlichen Glutathiongehalt führt wie im Elternstamm AE104 (Tab. 18). Dies bedeutet, dass eine Komplementation der Deletion im Gegensatz zu einer Komplementation der Disruption wieder den Anstieg auf den ursprünglichen Glutathiongehalt hervorruft. Eine vollständige Deletion von *gshA* war nur im Stamm AE104 möglich. Warum dies nicht in anderen Stämmen funktioniert hat, ist unbekannt.

Wenn Glutathion-Gold-Komplexe im Cytoplasma vorliegen, Goldnanopartikel aber vor allem im Periplasma gefunden wurden, müssen diese Komplexe vor der vollständigen Reduktion aus dem Cytoplasma transportiert werden (PITTMAN *et al.* 2005). Aussichtsreiche Zielgene (*atmA*, *rmet_0705*), deren Produkte eine hohe Ähnlichkeit zum Glutathion-Exporter CydDC aus *E. coli* haben, wurden deletiert und in einer Bachelorarbeit auf ihre Rolle in der Goldhomöostase durch Untersuchung in *dose response* Experimenten untersucht. Ein eindeutiger Effekt der Deletion auf die Goldhomöostase konnte dabei nicht belegt werden (LUTZE 2022). Der aussichtreichste Kandidat war der ABC-Transporter *AtmA*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass er eine Rolle in der Cobalt- und Nickelresistenz spielt (MIKOLAY UND NIES 2009). *AtmA* aus *C. metallidurans* gehört zu den *Atm1*-Transportern. Diese sind in Mitochondrien für die Translokation von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich (LI *et al.* 2022a). Für diese Transporter konnte bereits gezeigt werden, dass sie in der Lage sind an Glutathion gebundene Metalle zu transportieren (LEE *et al.* 2014). Durch die Komplexierung von Gold im Cytoplasma durch GSH reichern sich hier Gold-Glutathion-Komplexe an. Da Nanopartikel in *C. metallidurans* vor allem im Periplasma gefunden wurden, muss es einen Mechanismus zum Export der Komplexe aus dem Cytoplasma geben. Export-Systeme wie das Ges-System und die gold-exportierende ATPase *GoIT* aus *S. enterica* sv. *Typhimurium* zeigen, dass sich spezifische Proteine zum Export von Gold entwickelt haben, diese finden sich aber nicht in *C. metallidurans*. Ungewöhnlich ist das Vorhandensein solcher Systeme im nicht an metallhaltigen Standorten vorkommenden Enterobakterium *S. enterica*, wohingegen sich diese Proteine nicht in *C. metallidurans*, einem Bakterium, das an goldhaltigen Standorten vorkommt, entwickelt zu haben scheinen (PONTEL *et al.* 2007; REITH *et al.* 2009; CHECA UND SONCINI 2011). Dass sich diese Systeme hier (noch) nicht entwickelt haben oder durch horizontalen Gentransfer aus anderen Organismen ihren Weg in dieses Bakterium gefunden haben, ist bemerkenswert.

Als Modell zur Goldhomöostase (Abb. 12) von *C. metallidurans* wird folgendes vorgeschlagen: Au(I) könnte über Kaliumimportsysteme in die Zelle aufgenommen werden. Dabei dürfte aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften wie Ladung und Atomradius zwischen Au(I) und Au(III) unterschieden werden. Wie und ob Au(III) in die Zelle gelangt ist nicht geklärt. Im Cytoplasma bindet Gold an Glutathion und wird im Fall von Au(III) reduziert. Hier entfaltet Gold seine toxischen Eigenschaften, die hauptsächlich aus der Oxidation von Proteinen, DNA und Membranlipiden besteht.

DISKUSSION

Die kupferexportierende ATPase CupA wird durch Gold gehemmt, was unter Kupfereinfluss zur Akkumulation von Kupfer führen kann. Die Induktion von *cup* wird durch die Bindung an den Regulator CupR verstärkt, der neben dem Chaperon CupC in der Lage ist Gold zu binden. GigT könnte Thiole wie Glutathion oxidieren und so für die Aufrechterhaltung der Elektronentransportkette in der inneren Membran sorgen. GigA und GigB könnten als DNA-bindende Proteine für den Schutz der DNA wichtig sein. An Glutathion gebundene Goldkomplexe werden über einen unbekanntem Transporter ins Periplasma transportiert und dort zu Nanopartikeln reduziert. Die Oxidase CopA ist in der Lage Au(I) zu Au(III) zu oxidieren. Au(III) scheint ein besseres Substrat für die Bildung der Partikel zu sein als Au(I). Ob CusCBA am Export von Gold beteiligt ist, ist nicht klar.

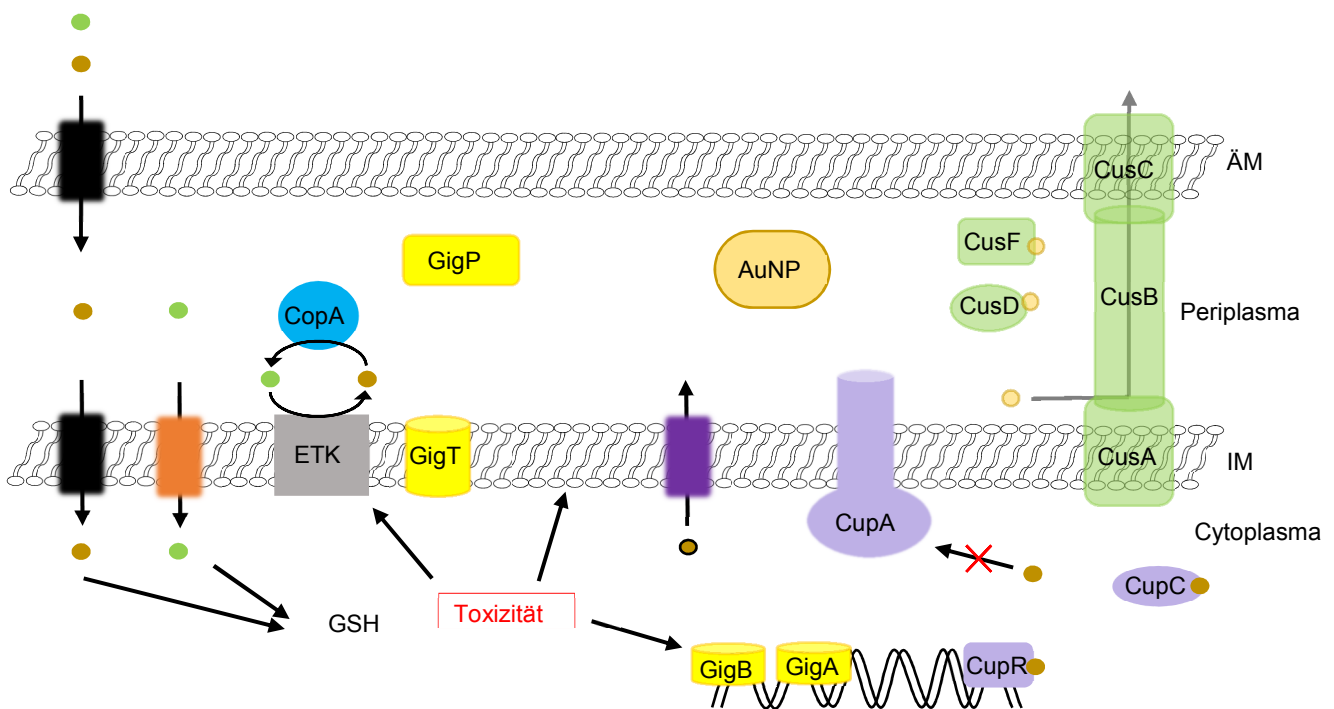


Abbildung 11. Goldhomöostase in *C. metallidurans*. Au(I) (gelbe Kugeln) und Au(III) (grüne Kugeln) gelangen über unbekannte Porine (schwarzer Kasten) ins Periplasma und werden über unbekannte Transporter ins Cytoplasma transportiert (schwarzer und orangefarbener Kasten). Dort entfaltet Gold eine toxische Wirkung auf die DNA, Proteine und Membranlipide. Die Gig-Proteine können bei Schutz der DNA mitwirken. Die ATPase CupA wird durch Gold gehemmt. CopA kann Au(I) zu Au(III) oxidieren. An Glutathion gebunden wird Gold (gelbe Kugel mit dunklem Rand) über einen unbekanntem Exporter (lila Kasten) ins Periplasma transportiert und dort zu Au(0) in Form von Nanopartikeln (AuNP) reduziert. Die Beteiligung des Cus-Komplexes an der Goldhomöostase ist nicht gesichert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zellen unabhängig von genetischen Modifikationen bei einer Zugabe von 2,5 μM Gold über einen Zeitraum von etwa zwei bis drei Stunden 10^6 Goldatome pro Zelle akkumulieren. Diese Zahl stieg in Stämmen, die Glutathion synthetisieren können auf etwa $1,5 \times 10^6$ Atome an. In Stämmen, in denen die Synthese durch Disruption des Gens *gshA* nicht mehr möglich war, blieb diese Zahl unverändert. Dies zeigte, dass es im Cytoplasma zu einer Komplexierung von Gold durch Glutathion kam, wodurch Gold im Cytoplasma gehalten wurde. In Arbeiten von Bhabak (2011) konnte auch die Komplexierung durch Cystein oder Selenocystein-haltige Proteine nachgewiesen werden (BHABAK *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die zusätzlich zu Gold mit Kupfer inkubiert wurden, mehr Gold aufnahmen, wenn sie Glutathion enthielten. Durch die

hohen Unterschiede der Kupfergehalte zwischen etwa 70-400.000 Atomen pro Zelle, der aber trotzdem konstanten Goldgehalte zwischen den Stämmen, konnte die Akkumulation von Gold nicht von der Menge an Kupfer in den Zellen abhängen. Ebenso konnte ein geringerer Glutathiongehalt, beispielsweise in Stämmen mit einer stark verringerten Kupferresistenz, keine unmittelbare Wirkung auf den Goldgehalt nach sich ziehen. Die in diesen beeinträchtigten Stämmen DN852($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$), DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$), DN854 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus$) und DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) verbleibende Menge an Glutathion musste daher ausreichen, um das akkumulierte Gold in den Zellen zu komplexieren. Da es sich hier um Experimente handelt, die den unmittelbaren Schock durch Metalle auf die Zellen berücksichtigen und nicht die langfristige Wirkung auf den Metall- bzw. Glutathiongehalt, könnte sich nach der Einstellung eines physiologischen Gleichgewichts ein anderes Bild ergeben.

4.2 Die Kupferresistenz in *C. metallidurans* verlangt das Zusammenspiel mehrerer Resistenzsysteme

In der Bekämpfung des durch Kupfer induzierten oxidativen Stresses spielt die Entgiftung des Cytoplasmas eine entscheidende Rolle, da hier der zentrale zelluläre Metabolismus lokalisiert ist und Schäden an Proteinen oder dem Erbmateriale erhebliche Folgen für die Zelle haben können (MACOMBER *et al.* 2007). Aus der Umwelt aufgenommene Kupferionen liegen meist in der oxidierten Form Cu(II) vor. Durch Wechselwirkung mit Chinonen oder der NADH-Dehydrogenase der Atmungskette an der inneren Cytoplasmamembran oder eines Cystein-Cystin-Shuttles kann Cu(II) zu Cu(I) reduziert werden (OHTSU *et al.* 2010; VOLENTINI *et al.* 2011). Cu(I) wird dann leichter von der Zelle aufgenommen und kann, beispielsweise durch Haber-Weiss- oder Fenton-ähnliche Reaktionen, durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies Schäden in der Zelle auslösen (HALLIWELL UND GUTTERIDGE 1984; NIES UND SILVER 2007). Deswegen ist es von entscheidender Bedeutung diese Kupferionen schnellstmöglich wieder aus dem Cytoplasma zu exportieren. In *C. metallidurans* kommt der P_{B1}-Typ ATPase, die vom Gen *cupA* codiert wird, eine wichtige Rolle zu. Wie hier nachgewiesen, zeigte diese Determinante unter allen untersuchten den größten Einfluss auf die Kupferresistenz (Tab. 4).

Neben CupA gibt es in *C. metallidurans* noch weitere kupfertransportierende ATPasen. CopF wird auf dem Plasmid pMOL30 codiert und ist deshalb für den plasmidfreien Stamm AE104, mit dem in dieser Arbeit gearbeitet wurde, nicht relevant. Im plasmidhaltigen Wildtypstamm CH34 hatte eine *copF*-Deletion keine Auswirkung auf die Resistenz (WIESEMANN *et al.* 2013). Die Proteine RdxI und CtpA1 sind ebenfalls kupferexportierende ATPasen. Sie werden von chromosomalen Genen codiert, welche sich aber nicht in der Nähe annotierter Kupferresistenzcluster befinden, sondern von Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten. Diese Proteine sind nicht an der Kupferresistenz beteiligt, sondern erfüllen Funktionen im zellulären Metabolismus. Eine Wirkung auf die Resistenz durch die Deletion der Gene *rdxI* und *ctpA1* konnte erst im Stamm DN656 (Δcup) gezeigt werden, in dem *cupA* bereits deletiert war. Der Stamm DN656 (Δcup) zeigte hier eine höhere Resistenz gegenüber Kupfer als es in dieser Arbeit der Fall war (PREISIG *et al.* 1996; HASSANI *et al.* 2010; WIESEMANN *et al.* 2013). Eine Analyse des Metallgehaltes ergab, dass in früher verwendeten Medien eine höhere Zinkkonzentration vorlag als in

derzeit verwendeten Medien, die die Zellen schützen könnte. Dadurch sind Resistenzen aus früheren Arbeiten teilweise höher und können nur bedingt verglichen werden (WIESEMANN *et al.* 2013).

Eine Deletion in *cup* bewirkte in dieser Arbeit einen Abfall der IC_{50} und damit der Kupferresistenz um den Faktor 46 (DN656 (Δcup) = $13,5 \pm 1,2 \mu M$; AE104 = $615 \pm 68 \mu M$), sodass die restlichen vorhandenen Systeme (*cop*, *cus*, *gig* und *gshA*) Kupferresistenz vermitteln konnten, aber auf einem niedrigeren Niveau (Tab. 4). Eine multiple Deletionsmutante, die nur noch *cup* enthielt, hatte eine IC_{50} von $29 \pm 4,4 \mu M$ (Tab. 5). Dies zeigte auch, dass die Präsenz der anderen Systeme keine Voraussetzung für die Funktion von CupA war. Da durch CupA der Export aus dem Cytoplasma gewährleistet wird und dieser anhand der Daten für eine volle Kupferresistenz nicht ausreicht, muss ein Teil der Resistenz von anderen Komponenten stammen. Die Regulation von *cupA* erfolgt über den MerR-ähnlichen Regulator CupR. Dieser ist in einer Transkriptionseinheit mit *cupA*. CupR kann Kupfer mit einer hohen Affinität binden ($K_d = 6,3 \times 10^{-19} M$) und die Transkription durch Bindung an die DNA ermöglichen (JIAN *et al.* 2009). Das Chaperon CupC befindet sich im Cytoplasma und könnte Cu(I)-Ionen an einem Kupferbindemotiv (MXCXXC) aus M76, C78 und C81 binden, um sie CupA zur Verfügung zu stellen. Dieses Motiv wurde schon auf seine kupferbindenden Eigenschaften untersucht (ROUSSELOT-PAILLEY *et al.* 2006). In *E. coli* wird das orthologe Protein (CopZ) auf demselben Transkript codiert wie die ATPase CopA, allerdings kommt es bei der Translation von CopZ durch eine Verschiebung des Leserahmens zu einem vorzeitigen Translationsstopp, wodurch CopA nicht mehr translatiert wird (MEYDAN *et al.* 2017). Die betroffene Sequenz auf der mRNA in *E. coli* (CACCCAAAGGCUAAA), die ein wichtiger Faktor beim vorzeitigen Abbruch der Translation ist, ist in *C. metallidurans* nicht vorhanden, wodurch das Vorkommen eines zweiten Chaperons neben CupC unwahrscheinlich ist. Andere orthologe Proteine wie CopZ aus *Bacillus subtilis* oder CopZ aus *Enterococcus hirae* sind bereits charakterisiert worden (COBINE *et al.* 1999; BANCÌ *et al.* 2001).

RND-Systeme wie CusCBA sind für die Entgiftung des Periplasmas durch Export von Cu(I)-Ionen verantwortlich (FRANKE *et al.* 2003; NIES 2003). Das RND-System CusCBA aus *C. metallidurans* konnte ebenfalls durch Deletion der Gene *cusDCBAF* entfernt werden. Eine Deletion des Clusters führte zu keiner Veränderung der Kupferresistenz im Stamm AE104. Im Gegensatz zu CupA war dieses System nicht in der Lage allein eine Resistenz oberhalb des Minimalwertes aufrecht zu erhalten (DN915 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig gshA_{Disr.}$) = $0,461 \pm 0,1 \mu M$) (Tab. 5). Damit wurde gezeigt, dass das Cus-System nicht in der Lage sein kann, Kupfer über beide Membranen zu translozieren und damit das Cytoplasma effektiv zu entgiften (HIRTH *et al.* 2023). In *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass es eine Interaktion zwischen der P-Typ ATPase CopA und dem Chaperon CusF gibt (PADILLA-BENAVIDES *et al.* 2014). Eine solche Interaktion ist auch für *C. metallidurans* denkbar. Damit würden Kupferionen über das Chaperon CupC, die P-Typ ATPase CupA, das Chaperon CusF und das RND-System CusCBA aus der Zelle exportiert. CusF aus *E. coli* hat nur eine geringe Ähnlichkeit mit CusF aus *C. metallidurans* (20 % Identität; 30 % Ähnlichkeit), jedoch besitzt das letztere Methionin-reiche Teilstücke, die in der Lage sein könnten Kupfer zu binden. Am Protein in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren H36, M47 und M49 konserviert sind und an der Bindung von Kupfer beteiligt sind. In NMR-Analysen zeigte sich eine Konformationsänderung, wenn CusF mit Cu(I) inkubiert wurde (LOFTIN *et al.* 2005) Diese Aminosäuren

sind in CusF aus *C. metallidurans* an den Positionen H73, M84 und M86 vorhanden. CusF aus *C. metallidurans* könnte freie Kupferionen aus dem Periplasma auch über das im *cus*-Operon codierte Protein CusD erhalten. Dieses besitzt mehrere Metallbindemotive (MXMXXMDEHXXMEXXMXCXDM, CMXHC, HXDH, HXXXHCC), sowie ein ATCUN-Motiv, was zur Vermutung passt, dass es sich um ein Cu(I)-Bindeprotein handelt (HARFORD UND SARKAR 1997; NIES 2022; HIRTH *et al.* 2023). Denkbar wäre auch die Übertragung von Kupferionen durch CusD an den CusCBA-Komplex. Allerdings gibt es hierzu keine Daten. Durch Proteinsequenzvergleiche mit BLAST konnte kein zu CusD ähnliches Protein in *E. coli* gefunden werden, jedoch in vielen *Cupriavidus*-Spezies (ALTSCHUL *et al.* 1990).

Die Regulation des *cus*-Clusters in *E. coli* erfolgt über das Zweikomponentensystem CusRS (MUNSON *et al.* 2000). Dieses hat Ähnlichkeit zu PcoRS, einem System für die Regulation von *pcoE*, das als Chelator für Cu(I) dienen könnte (ZIMMERMANN *et al.* 2012). Über die Regulation des *cus*-Clusters in *C. metallidurans* ist nichts bekannt. Ein Zweikomponentensystem wie in *E. coli* wurde bisher nicht gefunden. Es gab Vermutungen über eine potenzielle Regulation von *cusDCBAF* durch CopRS, einem Zweikomponentensystem, diese wurden jedoch durch die Ergebnisse einer Bachelorarbeit verworfen (PREUßNER 2023). Eine weitere Vermutung war die Beteiligung von CupR an der Regulation des *cus*-Operons. Eine Einzeldelation in *cupR* war im Zuge der Bachelorarbeit nicht erfolgreich. Ein MerR-ähnlicher Regulator wie CupR wäre hier allerdings nicht funktional. Erstens würde es für die Regulation eines periplasmatischen Systems wie CusCBA nicht von Vorteil, wenn es durch Signale aus dem Cytoplasma reguliert würde. Zwar könnte man hier anführen, dass es einen effektiven Transport aus dem Cytoplasma durch die Interaktion von CupA und CusF geben könnte, dann wäre die Expression von *cusDCBAF* dennoch an die Anwesenheit von Cu(I)-Ionen im Cytoplasma gekoppelt. CusCBA kann die Ionen auch direkt aus dem Periplasma exportieren und der Umweg über die Sensierung von Kupferionen im Cytoplasma wäre somit ineffektiv. Zweitens würde es gegen die gängige Vorstellung der Funktionsweise von MerR-ähnlichen Proteinen sprechen (BROWN *et al.* 2003). Im Falle des *cup*-Operons würde der Genabschnitt *cupAR* frei vorliegen und Genexpression fände statt. Läge der Repressor CupR in hoher Anzahl vor, reprimierte er seine eigene Transkription. Dies geschähe durch Bindung und anschließende Konformationsänderung der DNA, die zur sterischen Hinderung der RNA-Polymerase führt. Bände nun Kupfer an den Repressor, änderte der Repressor seine Konformation und die DNA würde entwunden und so für die RNA-Polymerase freigegeben. Durch das Fehlen des Regulators müsste somit die DNA für die RNA-Polymerase frei zugänglich sein und somit die Expression von *cus* in einer *cup*-Deletionsmutante höher sein als im Stamm AE104, da eine Repression durch CupR nicht möglich wäre. In allen Stämmen mit einer *cup*-Deletion war die Reporterenzymaktivität bei Zugabe von Kupferionen jedoch geringer (Abb. 4). Dies spräche gegen die Theorie einer Regulation von *cus* durch CupR. Die Reporter-genversuche mit *cusF-lacZ* Fusionsstämmen aus dieser Arbeit zeigten außerdem, dass sich durch eine *cop*-Deletion die Expression von *cus* sowohl im Stamm DN686 (Δcop) als auch im Stamm DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) deutlich über die Expression des Stammes AE104 steigern ließ (Abb. 4). In diesen Deletionsstämmen müssten mehr Cu(I)-Ionen im Periplasma vorhanden sein, da die Multikupferoxidase CopA nicht mehr aktiv ist. Dies macht die mögliche Regulation von *cus* durch periplasmatische Kupferionen wahrscheinlicher.

DISKUSSION

Durch die vorhandenen Daten wird diese Theorie unterstützt, da ebenso durch das Fehlen von *cup* weniger Cu(I) Ionen im Periplasma vorhanden sein müssten. In *cup*-Deletionsstämmen mit *cusF-lacZ* Fusion war die spezifische Aktivität verringert (Abb. 4).

Die periplasmatische Kupferoxidase CopA verhindert eine Akkumulation des schädlichen Cu(I) im Periplasma durch die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) in diesem Kompartiment. Cu(I) kann die Cytoplasmamembran möglicherweise über Importer für einwertige Ionen der ersten Hauptgruppe passieren, da es Ähnlichkeit zu diesen hat (OUTTEN *et al.* 2001). Dadurch kann Cu(I) stärker im Cytoplasma angereichert werden als Cu(II). CopA verhindert so durch Oxidation von Cu(I) den zu starken Einstrom des Ions ins Cytoplasma und so die Überlastung der ATPase CupA. Der Effekt wird anhand des hohen Kupfergehalts in *cop*-Mutanten deutlich (Tab. 9). Damit ist sowohl der Fluss der Kupferionen zwischen der ATPase CupA und dem RND-Efflux-System CusCBA wichtig, sondern auch zwischen der ATPase und der Multikupferoxidase CopA. Die Reduktion von Cu(II) an der Atmungskette der inneren Membran, Import ins Cytoplasma, Export durch CupA und Oxidation durch CopA bilden einen Kreislauf, in dem sich über die Zeit ein Gleichgewicht einstellt, das die Zelle vor Kupfer schützt. Der Export von Cu(I) aus dem Periplasma durch CusCBA durchbricht den Kreislauf. Anhand der Resistenzen ließ sich erkennen, dass CupA den größten Einfluss auf die Kupferresistenz hatte und dass die Oxidase CopA und die ATPase CupA in Kombination den größten Anstieg der Resistenz ermöglichten (DN910 ($\Delta gig \Delta cus gshA_{Disr.}$) = $471,9 \pm 48,7 \mu\text{M}$), eine Minderung um den Faktor 1,3 gegenüber dem Stamm AE104 (Tab. 4). Gleichzeitig führte deren Deletion zum größten Abfall der Kupferresistenz aller Stämme mit zwei Mutationen führte (DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) = $3,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$), ein Abfall um den Faktor 181 (Tab. 4). Damit würden die verbleibenden Komponenten *gig*, *cus* und *gshA* in Kombination nur einen sehr geringen Teil der Kupferresistenz ausmachen. Für das Überleben der Zelle scheint es wichtig zu sein, dass möglichst wenig Kupfer aus dem Cytoplasma exportiert bzw. gar nicht erst importiert wird. Der Verbleib von Kupferionen im Periplasma scheint erstmal nicht schädlich zu sein, solange sie von CopA in der weniger schädlichen Form Cu(II) gehalten werden können. Die Funktion von CopA zeigt sich auch an den durchgeführten Zellviabilitätsexperimenten. Hier konnte CopA ein tendenziell höheres Überleben der Zellen gewährleisten, da eine Deletion oft zu einer höheren Sterblichkeit der Zellen führte (Tab. 6). Durch das Fehlen von CopA in Deletionsstämmen könnte die Menge an Cu(I) in der Zelle höher sein. Cu(I) kann die Eisenionen in Eisen-Schwefel-Clustern ersetzen und so die Funktion von Proteinen beeinträchtigen (MACOMBER UND IMLAY 2009).

Die dominierende Rolle von CopA gegenüber CusCBA wird vor allem daran deutlich, dass eine Deletion von *cus* zu keiner Verringerung der Resistenz im Stamm AE104 führte (Tab. 4). Erst als weitere Systeme deletiert wurden, konnten die Rolle von CusCBA beleuchtet werden. Beispielsweise verringerte sich die Resistenz von DN849 ($\Delta cup \Delta gig$) durch eine zusätzliche *cus*-Deletion im Stamm DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) um den Faktor 5 (von $11 \pm 2,1 \mu\text{M}$ auf $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Ebenso im Stamm DN847 ($\Delta cop \Delta gig$) von $492,3 \pm 50,3 \mu\text{M}$ um den Faktor 3 auf $157,7 \pm 15,7 \mu\text{M}$ im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) (Tab. 4). Dahingegen konnten *cop*-Deletionen immer eine Verringerung der Kupferresistenz hervorrufen.

Im *cop*-Operon auf dem Chromosom von *C. metallidurans* befinden sich neben *copA* die Gene *copBCD*. CopB ist ein Protein in der äußeren Membran und könnte einen β -Fass-Kanal formen. Dies konnte an Experimenten an PcoB aus *Caulobacter crescentus* abgeleitet werden (HENNAUX *et al.* 2022). Obwohl die Ähnlichkeit zwischen CopB und PcoB nur etwa 40 % beträgt, legte eine Strukturvorhersage durch AlphaFold 2 eine ähnliche Struktur der beiden Proteine nahe (siehe Anhang Abb. 21 und 22). Dieses Protein wurde in Zusammenhang mit der Aufnahme von Kupfer gebracht. Die Präsenz des Proteins in *E. coli* erhöht die Sensitivität gegenüber Kupfer (LI *et al.* 2022b). Es besitzt ein ähnliches Cu(II)-Bindemotiv, das man auch in PcoC aus *E. coli* oder *Pseudomonas fluorescens* findet (DREW *et al.* 2008; WIJEKON *et al.* 2015). Damit stellt CopB einen alternativen Weg zur Aufnahme von benötigtem Kupfer in *C. metallidurans* dar. In Studien in *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass CopA in nicht vollständig gefalteter Form über das TAT-System exportiert und im Periplasma seine finale Konformation einnimmt, nachdem es in diesem Kompartiment Kupfer gebunden hat. Die Bindung von Kupfer im Periplasma ist an das Vorhandensein von Kupferstress geknüpft. Eine Bindung von Kupfer im Cytoplasma konnte dagegen nicht festgestellt werden, ist aber nicht auszuschließen. CopA kann also auch in seiner Apo-Form über die Cytoplasmamembran transportiert werden, ohne vorher mit Kupfer in Berührung gekommen zu sein (STOLLE *et al.* 2016). Zudem ist die Assemblierung von CopA von Chaperonen wie DnaK abhängig (GRAUBNER *et al.* 2007). Zusammen mit dem periplasmatischen Protein CopC und dem in der inneren Membran lokalisierten Protein CopD bilden CopBCD ein System für die Aufnahme von Kupfer aus der Umgebung. CopD könnte hier zum Import der Kupferionen ins Cytoplasma dienen (CHA UND COOKSEY 1993; HADLEY *et al.* 2022). Die Rolle von CopD in *C. metallidurans* könnte darin bestehen, CopA im Cytoplasma mit Kupfer zu versorgen, ohne erst auf die Bindung im Periplasma warten zu müssen. Dies würde die Zeit bis zur vollständigen Faltung des Proteins im Periplasma verkürzen. Eine Regulation von *cop* durch Kupfer konnte in *C. metallidurans* bisher nicht gezeigt werden (WIESEMANN 2015; PREUßNER 2023). Eine höhere Expression würde in Anbetracht, dass es sich bei CopB und CopD um Kupferimporteure handeln könnte auch negative Folgen für die Zelle haben, da erhöhter Kupferstress im Zellinneren die Folge wäre.

Die Rolle des *gig*-Operons wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Dieses Operon besteht aus den Genen *gigPABT*. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion in *gig* zu keiner Veränderung der Kupferresistenz im Stamm AE104 führte (Tab. 4). Ein negativer Effekt stellte sich erst in Kombination mit anderen Deletionen ein. Beispielsweise konnte die IC_{50} durch zusätzliche Deletion von *gig* im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) von $3,4 \pm 0,6 \mu M$ auf $0,433 \pm 0,2 \mu M$ im Stamm DN853 ($\Delta cop \Delta cup \Delta gig$) gesenkt werden (Tab. 4). Dies war unter allen Mutanten der stärkste gemessene Effekt. Einzelmutanten der *cop*, *cup* und *cus* Systeme, die zusätzliche *gig*-Deletionen enthielten, zeigten keine Unterschiede. Auch auf das Überleben der Zellen oder den Kupfergehalt hatte *gig* keinen Einfluss (Tab. 6 und 7). Während der Bestimmung des Magnesiumgehaltes fiel auf, dass eine Mutante, die nur noch *Gig* enthielt, keinen erhöhten Magnesiumgehalt enthielt. Alle anderen Vierfachmutanten mit einer verbleibenden Determinante zeigten um etwa Faktor 2 bis 3 erhöhte Magnesiumgehalte. Der nicht erhöhte Magnesiumgehalt könnte auf eine erhöhte Stabilität der DNA oder der Ribosomen durch das Vorhandensein von *Gig*-Proteinen hindeuten (LEE *et al.* 2019). Eine Induktion von *gig* unter

Kupfereinfluss konnte im Stamm AE104 beobachtet werden (Abb. 5). Die Induktion konnte in allen *cup*-Deletionsstämmen zum Stamm AE104 verstärkt werden. Eine *cup*-Deletion konnte diesem Effekt entgegenwirken. Eine Rolle von Gig bei der Rolle von Stress durch Cu(I) im Periplasma ist wahrscheinlich.

GigP wird vermutlich durch das Sec-System ins Periplasma entlassen. Ein entsprechendes Sec-Signalpeptid wurde durch SignalP 6.0 vorhergesagt (TEUFEL *et al.* 2022). Die ersten 22 Aminosäuren werden zwischen A22 und Q23 entfernt (siehe Anhang Abb. 20). Im Rest des Proteins gibt es 4 Cysteine und 5 Methionine, die an der Bindung von Kupfer beteiligt sein könnten, sie liegen allerdings nicht in einem Cluster, sondern sind stark verteilt. Sequenzanalysen mit InterProScan ergaben ein N-terminales Signalpeptid und eine nicht-cytoplasmatische Domäne (JONES *et al.* 2014). Für GigA wurde kein Signalpeptid vorhergesagt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es nach der Translation im Cytoplasma verbleibt. Die vorhergesagte Struktur und Histidin-reiche Regionen deuten auf die Bindung von Zink in einer Endonuklease IV aus *E. coli* ähnlichen Struktur hin, die an der Reparatur von oxidativem Stress an der DNA beteiligt sind (MOL *et al.* 2000; JUMPER *et al.* 2021). Anhand dieser vorhergesagten Struktur könnten H32, H59, H203 sowie E30, E93 und E201 Zink bzw. Wasser koordinieren, da sie in der mittig liegenden Bindetasche des Proteins liegen. GigB ist ein cytoplasmatisches Protein. Es besitzt eine putative DNA-Bindedomäne und eine Thioredoxindomäne (siehe Anhang Abb. 17). Die Funktion als Thioredoxin konnte bereits in einer Masterarbeit widerlegt werden (STEGELICH 2014). Damit könnte GigB zusammen mit GigA eine Funktion in der Stabilität der DNA unter Einfluss von kupferinduziertem Stress haben.

GigT ist ein DoxX-ähnliches Protein mit einer großen Ähnlichkeit zu einer Untereinheit der Thiosulfat:Chinon Oxidoreduktase aus *Acidianus ambivalens*, einem thermoacidophilen Archaeon (MÜLLER *et al.* 2004). Es besitzt Transmembrandomänen, sowie eine cytoplasmatische und eine periplasmatische Domäne, was für eine Lokalisation in der Cytoplasmamembran spricht (siehe Anhang Abb. 19). Das archaeelle Protein ist in der Lage Thiosulfat zu oxidieren, die Elektronen auf Chinon zu übertragen und Sauerstoff zu reduzieren. Es erfüllt damit die Funktion als Chinon-Oxidase. Die Funktion im Schwefelstoffwechsel könnte auf eine Verbindung zu Glutathion hindeuten. DoxX-Proteine wurden ebenfalls in *Mycobacterium tuberculosis* gefunden und sorgen dort für die Reduktion von Mycothiol, einem zu Glutathion funktional ähnlichem Thiol, um so die Mycothiolkonzentration in der Zelle hochzuhalten (NAMBI *et al.* 2015). DoxX spielte hier eine wichtige Rolle. Ein weiterer Partner in Mycobakterien ist das Protein SseA, das bei diesem Vorgang mit DoxX zusammen vorliegen muss (FAHEY 2001; NAMBI *et al.* 2015). Ein Sequenzvergleich in *C. metallidurans* ergab, dass GigT am ehesten einer Schwefeltransferase entspricht, wobei die Ähnlichkeit mit rund 30 % sehr niedrig ist. In *C. metallidurans* könnte dies bedeuten, dass GigT Glutathion oder an Glutathion gebundenes Kupfer oxidiert und die Elektronen in die Atmungskette einbringt. Falls GigT Glutathion in einem Komplex aus Cu(I) und Glutathion reduziert, verringert es somit die Möglichkeit der Reduktion von molekularem Sauerstoff und verhindert so die Entstehung von Superoxidanionen beziehungsweise im weiteren Verlauf auch Wasserstoffperoxid, die im Cytoplasma Schaden an der DNA verursachen könnten. Die Elektronen würden so weggefangen und direkt in die Atmungskette integriert. Sie lieferten zudem einen

Beitrag zum Aufbau des Protonengradienten, der wiederum für die Funktion von CusCBA wichtig ist. Damit wäre auch die Resistenz gegen Kupfer über dem Minimalwert erklärt, die im Stamm DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) zu beobachten war und warum eine Mutation in *cus*, *gig* oder *gshA* zu einer geringeren Resistenz führt (Tab. 5). Außerdem konnte *gig* zusammen mit *cop* eine Resistenz oberhalb des Minimalwertes gewährleisten (DN912 ($\Delta cup \Delta cus gshA_{Disr.}$) = $3,8 \pm 1,4 \mu M$) (Tab. 5). Bei Deletion von *gig* sank die Resistenz auf den Minimalwert ab (DN913 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$) = $0,5 \pm 0,1 \mu M$). Dies könnte auf ein Zusammenspiel zwischen Gig und Cop hindeuten, insbesondere CopA und GigP, da beide periplasmatische Proteine sind. GigP könnte Kupferionen binden und CopA zuführen, um so dessen Effektivität zu steigern. Allerdings ist die Präsenz von GigP keine Voraussetzung für die Funktion von CopA wie aus den Daten hervorgeht. Dies geht daraus hervor, dass eine einzelne *gig*-Deletion zu keiner verringerten Resistenz führt wie das bei einer *cop*-Deletion zu erwarten wäre (Tab. 4).

Zunächst konnte das Gen *gshA* vollständig im Stamm *C. metallidurans* AE104 deletiert werden. In allen anderen Stämmen war dies nicht möglich, die Gründe hierfür konnten nicht geklärt werden. Der Verlust des Gens *gshA* durch Disruption bzw. Deletion und damit der Verlust des Thiols Glutathion führte in *C. metallidurans* zu einer Verringerung der Resistenz gegenüber Kupfer. Die Ausnahme bildete der Stamm DN656 (Δcup). Hier führte eine *gshA*-Disruption zu keiner Erhöhung der Sensitivität. Im Stamm DN914 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig gshA_{Disr.}$), der nur noch *cup* enthielt, konnte *gshA* die Resistenz von $29 \pm 4,4 \mu M$ auf $157,7 \pm 15,7 \mu M$ im Stamm DN852 ($\Delta cop \Delta cus \Delta gig$) steigern, wohingegen *gshA* allein keine Resistenz aufrechterhalten konnte (DN855 ($\Delta cop \Delta cup \Delta cus \Delta gig$) = $0,469 \pm 0,1 \mu M$) (Tab. 4). Eine Erhöhung konnte sonst nur in Kombination mit *cus* und *gig* bzw. mit *cop* gemessen werden (DN845 ($\Delta cop \Delta cup$) = $3,4 \pm 0,6 \mu M$; DN851 ($\Delta cup \Delta cus \Delta gig$) = $2,2 \pm 0,1 \mu M$) (Tab. 4), was auf eine Verbindung von Glutathion und Cu(I) hindeutet, da sowohl Cus als auch Cop zur Entgiftung von Cu(I) dienen.

Im Periplasma kann Kupfer dazu beitragen eine oxidierende Wirkung auf Peptide oder Proteine auszuüben und so an Cysteinresten Disulfidbrücken zu bilden (HINIKER *et al.* 2005; LIPPA UND GOULIAN 2012). Dort wo Disulfidbrücken in periplasmatischen Proteinen benötigt werden, wird die Formation durch die Proteine DsbA, DsbB, DsbC und DsbG gewährleistet (BARDWELL *et al.* 1993; INABA 2009). Allerdings gibt es wenige reduzierte Thiolreste, die durch Proteine geschützt werden (DEPUYDT *et al.* 2009). Ebenso könnte auch Glutathion in seiner oxidierten Form (GSSG) vorliegen, das wiederum einen oxidierenden Effekt auf den Zustand des Periplasmas hat (ESER *et al.* 2009). Durch diese Mechanismen würde die oxidierte Form der Thiolreste bevorzugt im Periplasma aufrechterhalten. Die Elektronentransportkette stellte damit die größere Quelle reduzierten Kupfers dar und weniger die möglicherweise reduzierenden Thiolreste von Peptiden oder Proteinen im Periplasma. Migriert reduziertes Cu(I) ins Cytoplasma, könnte es dort mit reduzierten Thiolen oder Thiolresten reagieren.

In vitro konnte gezeigt werden, dass reduziertes Glutathion (GSH) in der Lage ist Cu(I) zu binden und durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff Superoxidationen zu bilden (SPEISKY *et al.* 2009). Dabei wird Kupfer oxidiert. Der entstehende Cu(II)-Glutathion-Komplex reagiert mit GSH zu einem Cu(I)-Glutathion-Komplex und GSSG (ALIAGA *et al.* 2012). Damit könnte diese Reaktion eine Quelle für

Superoxidanionen sein und so für oxidativen Stress in der Zelle verantwortlich sein, der beispielsweise zur Bildung von Proteinaggregaten oder Oxidation von Metallkofaktoren führt. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Oxidation von komplexiertem Kupfer und die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff ein langsamer Prozess ist und dass die gebildete Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid ist (SPEISKY *et al.* 2009; EBEN UND IMLAY 2023). Beide Versuche wurden nicht an lebenden Zellen unternommen. Im ersten Fall wurde sich auf die Reaktion im speziellen mit Glutathion fokussiert, im zweiten Fall durch den Einsatz von N-Acetylcystein auf die Reaktion mit Proteinen. Die Entstehung beider Befunde könnte auf die unterschiedlichen Chemikalien und deren Eigenschaften auf die Reaktivität der Thiole zurückzuführen sein. Je nachdem wie stabil und reaktiv komplexiertes Kupfer ist, können verschiedene Produkte entstehen und vor allem die Kinetik der Reaktion beeinflussen (SMITH *et al.* 1994). Wie sich diese Reaktionen in *C. metallidurans* abspielen, bleibt ungewiss. Fest steht allerdings, dass Cu(I)-GSH-Komplexe sehr stabil sind (WALSH UND AHNER 2013). Die Oxidation durch Sauerstoff scheint daher möglich, spielt aber tendenziell eine geringere Rolle. Eine andere Möglichkeit ist die Entstehung von Wasserstoffperoxid und anschließende Entgiftung durch Glutathion-Peroxidasen, bzw. die Entstehung von Schäden an Proteinen durch Oxidation von Thiolresten und anschließende Reduktion durch Glutaredoxine. Beide Wege würden je nach Stressintensität, beispielsweise hoher intrazellulärer Kupferkonzentration, Glutathion verbrauchen, was in der Zelle zu einem geringeren Glutathiongehalt führt.

In Zellen, die durch Kupfer oder Gold gestresst werden, konnte die Expression von *gshB* nicht gesteigert werden (WIESEMANN 2015). Ob die Aktivität der Glutathion-Reduktase durch Metallzugabe gesteigert werden kann, ist in *C. metallidurans* nicht untersucht. In den hier durchgeführten Experimenten sollten sich die Zellen nach einer Inkubation von etwa 20 Stunden an den erhöhten Kupfergehalt im Medium angepasst haben. Daher ist es nicht verwunderlich, dass der Glutathiongehalt in allen Stämmen etwa gleich ist (Tab. 10). Kupfersensitive Stämme wurden mit 1 μ M bzw. 20 nM Kupfer inkubiert. Hier waren weder die Kupfer- noch die Glutathiongehalte erhöht, was das Vorhandensein eines Gleichgewichts in den Zellen nach 20 Stunden indizieren könnte. In diesem Zustand sollte Glutathion in der Lage sein, im Cytoplasma Komplexe mit Kupfer zu bilden und so die toxische Wirkung von Kupfer zu unterbinden. Selbst wenn man im schlimmsten Fall von etwa 2×10^5 bis 3×10^5 Kupferatomen pro Zelle ausgeht, steht dies einer internen Konzentration von Glutathion im millimolaren Bereich gegenüber (FAHEY *et al.* 1978). Das heißt, geht man von einem chemischen freien Gleichgewicht der Komponenten Kupfer und Glutathion aus, so müsste Kupfer im Cytoplasma vollständig an Glutathion gebunden sein, da in der Zelle deutlich mehr Glutathion vorhanden ist als Kupfer. Wäre dies der Fall, so dürfte die oxidative Wirkung von Glutathion-Kupfer-Komplexen im Cytoplasma keine Rolle spielen, da die vorhandene Menge an Glutathion in der Zelle ausreichen müsste, um auch die oxidierende Wirkung zu negieren und es dürfte keine Minderung der Resistenz zu beobachten sein, vor allem wenn man bedenkt, dass im Stamm DN656 (Δcup) das einzige für die Resistenz relevante Exportsystem aus dem Cytoplasma nicht mehr vorhanden ist. Vorhandenes Glutathion kann in diesem Stamm, wie auch in anderen Stämmen mit dieser Deletion, die Folgen der Deletion jedoch nicht ausgleichen (Tab. 4). Daraus folgt, dass Glutathion nicht in der Lage sein kann

einen Pool aus komplexiertem Kupfer zu bilden, der, ohne Schaden in der Zelle anzurichten, im Cytoplasma verbleibt. Dies würde allerdings der gängigen Vorstellung in der Literatur widersprechen. Es liegt also entweder kein Pool aus Glutathion-Kupfer-Komplexen vor oder der Schaden, den diese Komplexe in Zellen, beispielsweise durch Reaktionen mit Sauerstoff, hervorrufen können, wird stark unterschätzt.

Alternative Bindungspartner für Kupfer im Cytoplasma sind Chaperone wie CupC. In den Stämmen DN902 (*gshA_{Disr.}*) und DN861 (Δ *gshA*) konnte eine Verringerung der Kupferkonzentration auf etwa 23×10^3 Atome pro Zelle von $33,6 \times 10^3$ Atomen pro Zelle im Stamm AE104 gemessen werden, was für eine Bindung von Kupfer an Glutathion und einen Verbleib eines Komplexes im Cytoplasma spricht. Im Stamm DN903 (Δ *cop gshA_{Disr.}*) und DN909 (Δ *cop* Δ *gig gshA_{Disr.}*) konnte der Effekt nicht beobachtet werden (Tab. 9). Hier erhöhte sich die Konzentration von Kupfer in der Zelle sogar um das 2,5- bzw. 7-fache im Gegensatz zu Stämmen ohne Disruption in *gshA*. Entweder bildet Kupfer in der Zelle keinen Komplex mit Glutathion oder es gibt weitere physiologische Interaktionen zwischen Glutathion und Cop bzw. Gig, die sich eventuell auch im Cytoplasma, wo ein Großteil des Glutathions zu finden ist, abspielen könnten. Das Vorhandensein von $\text{Cu}_4(\text{SH})_6$ -Komplexen und deren Auswirkung auf die Reaktivität und Stabilität gebundenen Kupfers ist ein Aspekt, der zu beachten ist, da sich hier eine andere Stöchiometrie zwischen Glutathion und Kupferionen ergibt (MORGAN *et al.* 2017). Die Reaktionen unter Bedingungen mit mehr physiologischer Relevanz sind bisher nur wenig verstanden, insbesondere im Zusammenspiel mit anderen Thiolen wie Cystein oder organischen Reduktionsmitteln (FALCONE *et al.* 2023). Dies stellt das aktuelle Modell dar.

Eine erhöhte Kupferionenkonzentration im umliegenden Milieu führt zu erhöhtem Einstrom von Kupfer in die Zelle. Dies geschieht beispielsweise über Porine in der äußeren Membran. Im Periplasma kann Cu(II) durch Reaktion mit Komponenten der Atmungskette zu Cu(I) reduziert werden. Der Import von Kupfer ins Cytoplasma erfolgt eher unspezifisch über Transporter der ZIP-Familie wie ZupT oder Importer einwertiger Ionen (OUTTEN *et al.* 2001; GRASS *et al.* 2005). Cu(I) könnte daher aufgrund der Ähnlichkeit zu Natriumionen so besser ins Cytoplasma aufgenommen werden als Cu(II). Im Periplasma wird Cu(I) durch die Multikupferoxidase CopA zu Cu(II) oxidiert. Dieses Protein besitzt selbst Kupferzentren, die für die Katalyse wichtig sind (DJOKO *et al.* 2010). Das Kupfer, das dafür benötigt wird, könnte über das in der äußeren Membran befindliche Protein CopB zunächst ins Periplasma importiert werden und von dort über Natriumimporter, falls es bereits reduziert wurde, ins Cytoplasma gelangen. Alternativ könnte es über CopD aufgenommen werden wie das für PcoD in *E. coli* der Fall ist (RENSING UND GRASS 2003). In *C. metallidurans* ist jedoch nicht bekannt, ob Cu(I) oder Cu(II) das Substrat für CopD ist. Der Einbau der Ionen in CopA erfolgt im Periplasma, wobei Kupferstress durch hohe Kupferkonzentration im extrazellulären Medium vorliegen muss. Der Export aus dem Cytoplasma erfolgt über das TAT-System (STOLLE *et al.* 2016). Der Export von Kupfer aus dem Cytoplasma erfolgt über CupA, einer P_{B1} -Typ ATPase. Das Chaperon CupC könnte Kupfer im Cytoplasma binden und CupA zur Verfügung stellen. Die Regulation erfolgt über den cytoplasmatischen MerR-Typ Regulator CupR, der Kupfer bindet (JIAN *et al.* 2009). Der Export aus dem Periplasma erfolgt über das RND-System CusCBA, das den Protonengradienten über die innere Membran nutzt, um Energie

DISKUSSION

bereitzustellen. Die Kupferbindeproteine CusD und CusF unterstützen dabei. CusF und CupA könnten zur Steigerung der Effizienz des Exports und Eindämmung freien Kupfers miteinander interagieren wie in *E. coli* bereits gezeigt (PADILLA-BENAVIDES *et al.* 2014). GigP bindet Kupfer im Periplasma und könnte mit CopA interagieren, um so Kupfer zur Verfügung zu stellen und die Aktivierung der Oxidase zu beschleunigen. GigT könnte als Oxidase dienen und so Elektronen von Thiolen oder an Thiole gebundenes Kupfer in die Elektronentransportkette speisen, die zuvor bei der Reduktion von Cu(II) verloren gingen. GigA und GigB befinden sich im Cytoplasma, könnten an die DNA binden und so Schäden durch oxidativen Stress mindern. GSH bindet im Cytoplasma Cu(I) oder Cu(II) und formt einen Komplex. Bei der Reaktion mit Sauerstoff können hier Superoxidanionen entstehen, die Schäden im Cytoplasma verursachen (SPEISKY *et al.* 2009). Ebenso kann Wasserstoffperoxid entstehen, das in der Zelle oxidativen Stress erzeugt (EBEN UND IMLAY 2023). Wasserstoffperoxid kann unter Einsatz von Glutathion über Glutathion-Peroxidasen entgiftet werden. In Abbildung 11 ist das vorgeschlagene Modell der Kupferhomöostase in *C. metallidurans* gezeigt.

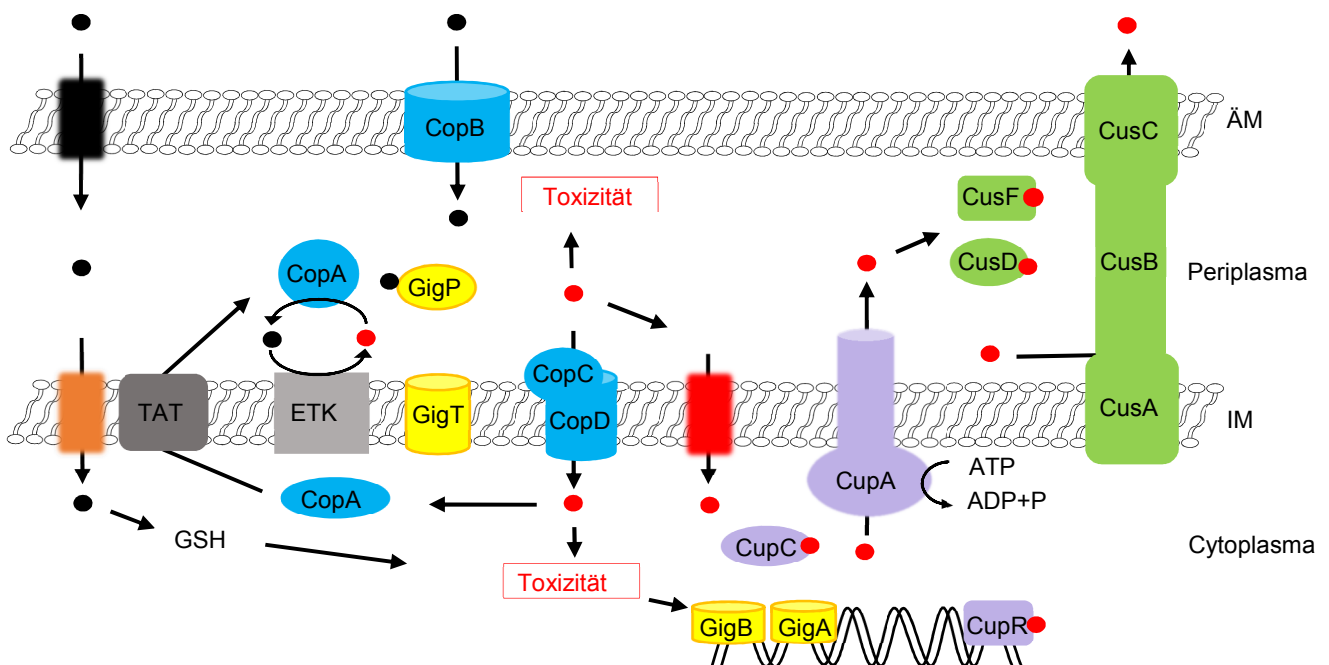


Abbildung 12. Modell der Kupferhomöostase in *C. metallidurans*. Cu(II) (schwarze Kugeln) migriert durch Porine (schwarzer Kasten) ins Periplasma. Durch Komponenten der Elektronentransportkette (ETK) kann Cu(II) zu Cu(I) (rote Kugeln) reduziert werden und so leichter über unbekannte Transporter (oranger Kasten) ins Cytoplasma migrieren (OUTTEN *et al.* 2001). Dort reagiert es mit Glutathion und bildet Komplexe. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die wiederum toxische Effekte in der Zelle auslösen. Kupferionen selbst tragen zur Toxizität in der Zelle bei. Die wichtigsten Komponenten der Kupferhomöostase sind CopA (periplasmatische Kupferoxidase), CupA (P-Typ ATPase), CusCBA (RND-Exportsystem) und die Gig-Proteine, sowie Glutathion (nach HIRTH *et al.* 2023).

Die Kupferhomöostase in *C. metallidurans* beruht auf dem Zusammenwirken verschiedener Systeme. Der Export aus dem Cytoplasma durch die P-Typ ATPase CupA ist einzeln betrachtet die wichtigste Komponente der Resistenz gegen Kupferionen. Dennoch braucht es für die volle Kupferresistenz weitere Systeme.

4.3 Ausblick

Die Rolle der Kupferresistenzsysteme *cop*, *cup*, *cus* und *gig* sowie Glutathion in der Gold- und Kupferhomöostase von *C. metallidurans* konnte in dieser Arbeit näher aufgeklärt werden. Anhand der Daten konnte beispielsweise die glutathionabhängige Expression von *gig* bei der Zugabe von Gold aufgezeigt werden. Die biochemischen Vorgänge hinter der Biomineralisierung zu Goldnanopartikeln sind bisher nur in Grundzügen verstanden. Glutathion spielt hier eine wichtige Rolle. Der Transport von Glutathion-Gold-Komplexen, die als Ausgangspunkt für die Biomineralisierung dienen könnten, konnte noch nicht nachvollzogen werden. Die Identifizierung eines möglichen Transporters steht noch aus.

Die Funktion verschiedener Proteine in der Kupferhomöostase wurde über Mutantenstudien nachvollzogen und konnte ein Bild vermitteln, das sich mit den Vorgängen in anderen Organismen wie *E. coli* in wesentlichen Komponenten stark ähnelt. Lücken ergeben sich vor allem in der Physiologie der Cus-Proteine aus *C. metallidurans* beispielsweise ihre Spezifität gegenüber Gold- oder Silberionen. Hierzu sollten weitere Transportstudien an Proteoliposomen bzw. durchgeführt werden. Die Bindefähigkeit verschiedener Metalle an CusF und CusD wurde bisher nicht untersucht und könnte durch ITC-Experimente erfolgen. Ein Regulationssystem für dieses Cluster wurde bisher nicht identifiziert. In dieser Arbeit konnte dazu ein Beitrag geleistet werden, indem eine *cop*-Deletion die *cus*-Expression erhöhte. Ebenso konnte die Expression von *gig* durch eine *cop*-Deletion gesteigert werden. Über die Gig-Proteine ist sehr wenig bekannt. Bei GigB handelt es sich nicht um ein Thioredoxin, obwohl es eine Thioredoxin-ähnliche Faltung enthält. Zu GigT, GigA und GigP gibt es keine biochemischen Daten. Die mögliche Bindung von GigA und GigB an DNA sollte überprüft werden.

Ein weiterer wichtiger Fortschritt im Verständnis der Metallhomöostase könnte in der kurz- und langfristigen Wirkung der Metalle auf *C. metallidurans* liegen. Wie verändert sich die physiologische Antwort der Zelle in den ersten Minuten, Stunden bis hin zur langfristigen Antwort nach dem Einstellen eines Gleichgewichts innerhalb der Zelle? Hierfür müssten Metallgehaltbestimmungen per ICP-MS durchgeführt werden. Die Probennahme müsste in regelmäßigen Abständen innerhalb der ersten Stunden nach Zugabe von Metallen erfolgen. Dadurch könnte ein genaueres Bild der Rollen der einzelnen Determinanten entstehen. Zusätzlich könnte die Akkumulation von Metallionen und deren Fluss innerhalb der Zelle verfolgt werden. Dazu könnten die Metallgehalte des Periplasmas und des Cytoplasmas getrennt durch ICP-MS analysiert werden und durch die Lokalisierung der Ionen per Röntgenfluoreszenzspektrometrie unterstützt werden. Ebenso könnten Proben zur RNA-Sequenzierung genommen werden, um die Expression verschiedener Cluster unter Einfluss von Gold, Kupfer und beider Metalle zusammen zu analysieren. Dabei könnten weitere Determinanten, die an der jeweiligen Homöostase beteiligt sind, identifiziert werden und so möglicherweise das Spektrum der bekannten Resistenzdeterminanten zusätzlich erweitert werden.

V. Zusammenfassung

Die Rolle der Resistenzsysteme *cop*, *cup*, *cus*, *gig* und von Glutathion in der Gold- und Kupferhomöostase wurden in *C. metallidurans* untersucht.

1. Unter Einfluss von Kupfer plus Gold verringerte sich die Resistenz gegenüber Kupfer, wenn *gig* deletiert wurde. In Stämmen mit einer *cup*-Deletion hatte Gold keinen Einfluss auf die Kupferresistenz.

2. Eine *cop*-Deletion hatte den größten Einfluss auf den Kupfergehalt in *C. metallidurans*. Der Goldgehalt der Zellen war unabhängig von Determinanten der Kupferhomöostase. Der Goldgehalt war unabhängig vom Glutathiongehalt der Zellen. Lediglich bei fehlendem Glutathion war der Goldgehalt reduziert.

3. Der Glutathiongehalt der Zellen wurde durch Gold nicht beeinflusst. Ein erhöhter Kupfergehalt in den Zellen korrelierte nicht mit einem geringen Glutathiongehalt. Eine Mutante mit Deletionen in *cop*, *cup*, *cus* und *gig* zeigte einen stark reduzierten Glutathiongehalt, wenn Kupfer im Medium zugegeben wurde.

4. Durch *in trans* Komplementation konnte *gshA* funktionell wieder hergestellt werden. Die Komplementation ermöglichte die Synthese von Glutathion in einer geringeren Menge als vor der Disruption.

5. *Gig* konnte durch Gold induziert werden. Das Fehlen von Glutathion verhinderte die Expression der Determinante. *Cus* konnte durch Gold induziert werden. Eine Deletion von *cup* führte zu verringerter Expression.

6. In *C. metallidurans* konnten unter Verwendung der kommerziellen Goldlösung keine goldhaltigen Partikel nachgewiesen werden.

7. Die Deletion von fünf Kupferresistenzdeterminanten verringerte die IC_{50} in *C. metallidurans* auf ca. 0,5 μ M. Eine Deletion des *cup*-Operons, das unter anderem für die kupferexportierende ATPase CupA codiert, hatte die größte Auswirkung auf die Kupferresistenz in *C. metallidurans*. *Cup* konnte in einer Mehrfachmutante eine IC_{50} über dem Minimalwert hervorrufen. *Cop*- und *cus*-Deletionen hatten den größten Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *C. metallidurans* unter Kupfereinfluss.

8. Über 20 h führte eine *cop*-Deletion zu einem höheren Kupfergehalt, wenn den Kulturen 25 μ M Kupferchlorid zugegeben werden. Eine zusätzliche *gshA*-Disruption erhöhte die Menge an Kupfer in den Zellen. Deletionen der Kupferresistenzdeterminanten hatten nur im Stamm DN729 (Δcus) Auswirkung auf den Glutathiongehalt.

9. Das *cus*-Operon war durch Kupfer induzierbar. Eine Deletion des *cop*-Clusters verstärkte die Expression. Eine Deletion von *cup* wirkte diesem Effekt entgegen. *Gig* ließ sich durch Kupfer induzieren. Eine Deletion des *cop*-Clusters hatte ebenfalls eine Steigerung der Induktion zur Folge.

VI. Literaturverzeichnis

- Abràmoff MD, Magalhães PJ und Ram SJ, (2004).** Image processing with ImageJ. *Biophot Int* 11: 36-42.
- Achbergerová L und Nahálka J, (2011).** Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial Cell Factories* 10: 63.
- Aliaga ME, López-Alarcón C, García-Río L, Martín-Pastor M und Speisky H, (2012).** Redox-changes associated with the glutathione-dependent ability of the Cu(II)–GSSG complex to generate superoxide. *Bioorg Med Chem* 20: 2869-2876.
- Aliakbar Tehrani Z, Jamshidi Z, Jebeli Javan M und Fattahi A, (2012).** Interactions of glutathione tripeptide with gold cluster: influence of intramolecular hydrogen bond on complexation behavior. *J Phys Chem* 116: 4338-4347.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ, (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Andrei A, Öztürk Y, Khalfaoui-Hassani B, Rauch J, Marckmann D, Trasnea P-I, Daldal F und Koch H-G, (2020).** Cu homeostasis in bacteria: The ins and outs. *Membranes* 10: 242.
- Anes J, McCusker MP, Fanning S und Martins M, (2015).** The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 6: 587.
- Antoine R, Rivera-Millot A, Roy G und Jacob-Dubuisson F, (2019).** Relationships between copper-related proteomes and lifestyles in β proteobacteria. *Front Microbiol* 10: 2217.
- Argüello JM, (2003).** Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* 195: 93-108.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Mangani S und Thompsett AR, (2003).** A redox switch in CopC: An intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites. *Proc Natl Acad Sci* 100: 3814-3819.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I und Thompsett AR, (2002).** Solution structure of CopC: a cupredoxin-like protein involved in copper homeostasis. *Structure* 10: 1337-1347.
- Axelsen KB und Palmgren MG, (1998).** Evolution of substrate specificities in the P-Type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46: 84-101.
- Banci L, Bertini I und Del Conte R, (2003).** Solution structure of apo CopZ from *Bacillus subtilis*: further analysis of the changes associated with the presence of copper. *Biochemistry* 42: 13422-13428.
- Banci L, Bertini I, Del Conte R, Markey J und Ruiz-Dueñas FJ, (2001).** Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry* 40: 15660-15668.
- Bardwell JC, Lee JO, Jander G, Martin N, Belin D und Beckwith J, (1993).** A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1038-1042.
- Berkmen M, (2012).** Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Prot Expr Pur* 82: 240-251.
- Bhabak KP, Bhuyan BJ und Mughesh G, (2011).** Bioinorganic and medicinal chemistry: aspects of gold(I)-protein complexes. *Dalt Trans* 40: 2099-2111.

- Brandes N, Rinck A, Leichert LI und Jakob U, (2007).** Nitrosative stress treatment of *E. coli* targets distinct set of thiol-containing proteins. *Mol Microbiol* 66: 901-914.
- Brooks AN, Turkarslan S, Beer KD, Yin Lo F und Baliga NS, (2011).** Adaptation of cells to new environments. *Wire Sys Biol Med* 3: 544-561.
- Brown K, Tegoni M, Prudêncio M, Pereira AS, Besson S, Moura JJ, Moura I und Cambillau C, (2000).** A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol* 7: 191-195.
- Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT und Rouch DA, (1995).** Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol* 17: 1153-1166.
- Brown NL, Rouch DA und Lee BT, (1992).** Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27: 41-51.
- Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP und Hobman JL, (2003).** The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27: 145-163.
- Bullock WO, (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-378.
- Bütöf L, Wiesemann N, Herzberg M, Altschner M, Holleitner A, Reith F und Nies DH, (2018).** Synergistic gold–copper detoxification at the core of gold biomineralisation in *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* 10: 278-286.
- Cerminati S, Giri GF, Mendoza JI, Soncini FC und Checa SK, (2017).** The CpxR/CpxA system contributes to *Salmonella* gold-resistance by controlling the GolS-dependent *gesABC* transcription. *Environ Microbiol* 19: 4035-4044.
- Cha J und Cooksey D, (1993).** Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1671-1674.
- Chang IJ und Hahn SH, (2017).** The genetics of Wilson disease. *Handb Clin Neurol* 142: 19-34.
- Chaudiere J und L. Tappel A, (1984).** Interaction of gold(I) with the active site of selenium-glutathione peroxidase. *J Inorg Biochem* 20: 313-325.
- Checa SK, Espariz M, Audero ME, Botta PE, Spinelli SV und Soncini FC, (2007).** Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Mol Microbiol* 63: 1307-1318.
- Checa SK und Soncini FC, (2011).** Bacterial gold sensing and resistance. *Biometals* 24: 419-427.
- Choi DW, Bandow NL, McEllistrem MT, Semrau JD, Antholine WE, Hartsel SC, Gallagher W, Zea CJ, Pohl NL, Zahn JA und DiSpirito AA, (2010).** Spectral and thermodynamic properties of methanobactin from γ -proteobacterial methane oxidizing bacteria: A case for copper competition on a molecular level. *J Inorg Biochem* 104: 1240-1247.
- Clarke TE, Tari LW und Vogel HJ, (2001).** Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem* 1: 7-30.

- Claus H, (2003).** Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* 179: 145-150.
- Cobine P, Wickramasinghe WA, Harrison MD, Weber T, Solioz M und Dameron CT, (1999).** The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Letters* 445: 27-30.
- Cohen J, (1992).** Statistical Power Analysis. *Curr Dir Psycho Sci* 1: 98-101.
- Cooksey DA, (1993).** Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 7: 1-5.
- Cruz LF, Cobine PA und De La Fuente L, (2012).** Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation, and twitching motility. *Appl Environ Microbiol* 78: 1321-1331.
- De Hertogh B, Lantin AC, Baret PV und Goffeau A, (2004).** The archaeal P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 36: 135-142.
- Depuydt M, Leonard SE, Vertommen D, Denoncin K, Morsomme P, Wahni K, Messens J, Carroll KS und Collet JF, (2009).** A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science* 326: 1109-1111.
- Djoko KY, Chong LX, Wedd AG und Xiao Z, (2010).** Reaction mechanisms of the multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase. *J Am Chem Soc* 132: 2005-2015.
- Djoko KY, Phan MD, Peters KM, Walker MJ, Schembri MA und McEwan AG, (2017).** Interplay between tolerance mechanisms to copper and acid stress in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 6818-6823.
- Djoko KY, Xiao Z und Wedd AG, (2008).** Copper resistance in *E. coli*: The multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in CuI-CuII-PcoC. *ChemBioChem* 9: 1579-1582.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P und Moreno SN, (2005).** Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3: 251-261.
- Dominguez DC, (2004).** Calcium signalling in bacteria. *Mol Microbiol* 54: 291-297.
- Dorel C, Lejeune P und Rodrigue A, (2006).** The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol* 157: 306-314.
- Drees SL, Klinkert B, Helling S, Beyer DF, Marcus K, Narberhaus F und Lübben M, (2017).** One gene, two proteins: coordinated production of a copper chaperone by differential transcript formation and translational frameshifting in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 106: 635-645.
- Drew SC, Djoko KY, Zhang L, Koay M, Boas JF, Pilbrow JR, Xiao Z, Barnham KJ und Wedd AG, (2008).** Electron paramagnetic resonance characterization of the copper-resistance protein PcoC from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* 13: 899-907.
- Đurović MD, Bugarčić ŽD und van Eldik R, (2017).** Stability and reactivity of gold compounds – From fundamental aspects to applications. *Coor Chem Rev* 338: 186-206.
- Eben SS und Imlay JA, (2023).** Excess copper catalyzes protein disulfide bond formation in the bacterial periplasm but not in the cytoplasm. *Mol Microbiol* 119: 423-438.
- Einsle O, Messerschmidt A, Stach P, Bourenkov GP, Bartunik HD, Huber R und Kroneck PM, (1999).** Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature* 400: 476-480.

- El Ghazouani A, Baslé A, Firbank SJ, Knapp CW, Gray J, Graham DW und Dennison C, (2011).** Copper-binding properties and structures of methanobactins from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Inorg Chem* 50: 1378-1391.
- Epstein W, (1986).** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 2: 73-78.
- Eser M, Masip L, Kadokura H, Georgiou G und Beckwith J, (2009).** Disulfide bond formation by exported glutaredoxin indicates glutathione's presence in the *E. coli* periplasm. *Proc Natl Acad Sci* 106: 1572-1577.
- Fahey RC, (2001).** Novel thiols of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* 55: 333-356.
- Fahey RC, Brown WC, Adams WB und Worsham MB, (1978).** Occurrence of glutathione in bacteria. *J Bacteriol* 133: 1126-1129.
- Falcone E, Stellato F, Vileno B, Bouraguba M, Lebrun V, Ilbert M, Morante S und Faller P, (2023).** Revisiting the pro-oxidant activity of copper: interplay of ascorbate, cysteine, and glutathione. *Metallomics* 15.
- Fenton HJH, (1876).** On a new reaction of tartaric acid. *Chem. News* 33: 190- 190.
- Fernando DM und Kumar A, (2013).** Resistance-Nodulation-Division multidrug efflux pumps in Gram-Negative bacteria: role in virulence. *Antibiotics (Basel)* 2: 163-181.
- Franke S, Grass G und Nies DH, (2001).** The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiol* 147: 965-972.
- Franke S, Grass G, Rensing C und Nies DH, (2003).** Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 3804-3812.
- Gammons CH, Yu Y und Williams-Jones AE, (1997).** The disproportionation of gold(I) chloride complexes at 25 to 200°C. *Geochim Cosmochim Acta* 61: 1971-1983.
- García-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J und Gennis RB, (1994).** The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* 176: 5587-5600.
- Gerlach MS (2017).** Einfluss von Mehrfachdeletionen der *cop*-, *cup*-, *cus*- und *gig*-Determinanten auf die Kupfer- und Goldresistenz von *Cupriavidus metallidurans* AE104. Masterarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gomori G, (1955).** Histochemistry of human esterases. *J Histochem Cytochem* 3: 479-484.
- Goris J, De Vos P, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Brim H, Diels L, Mergeay M, Kersters K und Vandamme P, (2001).** Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1773-1782.
- Gort AS, Ferber DM und Imlay JA, (1999).** The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32: 179-191.
- Grass G, Franke S, Taudte N, Nies DH, Kucharski LM, Maguire ME und Rensing C, (2005).** The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* 187: 1604-1611.

- Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL und Rensing C, (2002).** ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 864-866.
- Graubner W, Schierhorn A und Brüser T, (2007).** DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J Biol Chem* 282: 7116-7124.
- Große C, Poehlein A, Blank K, Schwarzenberger C, Schleuder G, Herzberg M und Nies DH, (2019).** The third pillar of metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* CH34: preferences are controlled by extracytoplasmic function sigma factors. *Metallomics* 11: 291-316.
- Große C, Scherer J, Schleuder G und Nies DH, (2023).** Interplay between two-component regulatory systems is involved in control of *Cupriavidus metallidurans* metal resistance genes. *J Bacteriol* 205: e00343-00322.
- Gu W, Farhan UI Haque M, Baral BS, Turpin EA, Bandow NL, Kremmer E, Flatley A, Zischka H, DiSpirito AA und Semrau JD, (2016).** A TonB-dependent zransporter is responsible for methanobactin uptake by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol* 82: 1917-1923.
- Haber F und Weiss J, (1932).** Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwiss* 51: 948-950.
- Hadley RC, Zhitnitsky D, Livnat-Levanon N, Masrati G, Vigonsky E, Rose J, Ben-Tal N, Rosenzweig AC und Lewinson O, (2022).** The copper-linked *Escherichia coli* AZY operon: Structure, metal binding, and a possible physiological role in copper delivery. *J Biol Chem* 298: 101445.
- Hakemian AS, Tinberg CE, Kondapalli KC, Telser J, Hoffman BM, Stemmler TL und Rosenzweig AC, (2005).** The copper chelator methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b Binds Copper(I). *J Am Chem Soc* 127: 17142-17143.
- Halliwell B und Gutteridge JM, (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
- Hamada M, Toyofuku M, Miyano T und Nomura N, (2014).** cbb3-type cytochrome c oxidases, aerobic respiratory enzymes, impact the anaerobic life of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 196: 3881-3889.
- Harford C und Sarkar B, (1997).** Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal binding, DNA cleavage, and other properties. *Acc Chem Res* 30: 123-130.
- Hassani BK, Astier C, Nitschke W und Ouchane S, (2010).** CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. *J Biol Chem* 285: 19330-19337.
- Hatahet F, Boyd D und Beckwith J, (2014).** Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim Biophys Acta* 1844: 1402-1414.
- Hellgren M, Sandberg L und Edholm O, (2006).** A comparison between two prokaryotic potassium channels (KirBac1.1 and KcsA) in a molecular dynamics (MD) simulation study. *Biophys Chem* 120: 1-9.

- Hennaux L, Kohchtali A, Bâlon H, Matroule JY, Michaux C und Perpète EA, (2022).** Refolding and biophysical characterization of the *Caulobacter crescentus* copper resistance protein, PcoB: an outer membrane protein containing an intrinsically disordered domain. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1864: 184038.
- Hiniker A, Collet JF und Bardwell JC, (2005).** Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem* 280: 33785-33791.
- Hirth N, Gerlach MS, Wiesemann N, Herzberg M, Große C und Nies DH, (2023).** Full copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* requires the interplay of many resistance systems. *Appl Environ Microbiol* 89: e0056723.
- Huffman DL, Huyett J, Outten FW, Doan PE, Finney LA, Hoffman BM und O'Halloran TV, (2002).** Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli* pco copper resistance operon. *Biochemistry* 41: 10046-10055.
- Imlay JA, (2014).** The mismetallation of enzymes during oxidative stress. *J Biol Chem* 289: 28121-28128.
- Imlay JA und Linn S, (1988).** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309.
- Inaba K, (2009).** Disulfide Bond Formation System in *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry* 146: 591-597.
- Irving H und Williams RJP, (1953).** 637. The stability of transition-metal complexes. *J Chem Soc*: 3192-3210.
- Jian X, Wasinger EC, Lockard JV, Chen LX und He C, (2009).** Highly sensitive and selective gold(I) recognition by a metalloregulator in *Ralstonia metallidurans*. *J Am Chem Soc* 131: 10869-10871.
- Jiang J, Xiong X und Zou T, (2023).** Modulating the chemical reactivity of gold complexes in Living Systems: from concept to biomedical applications. *Acc Chem Res* 56: 1043-1056.
- Johnson KS, (2006).** Manganese Redox Chemistry Revisited. *Science* 313: 1896-1897.
- Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong SY, Lopez R und Hunter S, (2014).** InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30: 1236-1240.
- Jordan IK, Natale DA, Koonin EV und Galperin MY, (2001).** Independent evolution of heavy metal-associated domains in copper chaperones and copper-transporting ATPases. *J Mol Evol* 53: 622-633.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P und Hassabis D, (2021).** Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583-589.

- Karthikeyan S und Beveridge TJ, (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms react with and precipitate toxic soluble gold. *Environ Microbiol* 4: 667-675.
- Kashefi K, Tor JM, Nevin KP und Lovley DR, (2001).** Reductive precipitation of gold by dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria and archaea. *Appl Environ Microbiol* 67: 3275-3279.
- Keasling JD, (1997).** Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann N Y Acad Sci* 829: 242-249.
- Keasling JD und Hupf GA, (1996).** Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62: 743-746.
- Keyer K und Imlay JA, (1996).** Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13635-13640.
- Khalifaoui-Hassani B, Wu H, Blaby-Haas CE, Zhang Y, Sandri F, Verissimo AF, Koch HG und Daldal F, (2018).** Widespread Distribution and Functional specificity of the copper importer CcoA: Distinct Cu uptake routes for bacterial Cytochrome c Oxidases. *mBio* 9.
- King MM, Kayastha BB, Franklin MJ und Patrauchan MA, (2020).** Calcium regulation of bacterial virulence. *Adv Exp Med Biol* 1131: 827-855.
- Klug A, (2010).** The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 79: 213-231.
- Koh EI, Robinson AE, Bandara N, Rogers BE und Henderson JP, (2017).** Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat Chem Biol* 13: 1016-1021.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd und Peterson KM, (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Kroll JS, Langford PR, Wilks KE und Keil AD, (1995).** Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiol* 141 (Pt 9): 2271-2279.
- Ladomersky E, Khan A, Shanbhag V, Cavet JS, Chan J, Weisman GA und Petris MJ, (2017).** Host and pathogen copper-transporting P-Type ATPases function antagonistically during *Salmonella* infection. *Infec Immun* 85: 10.1128/iai.00351-00317.
- Leblanc SK, Oates CW und Raivio TL, (2011).** Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193: 3367-3375.
- Lee DD, Galera-Laporta L, Bialecka-Fornal M, Moon EC, Shen Z, Briggs SP, Garcia-Ojalvo J und Süel GM, (2019).** Magnesium flux modulates ribosomes to increase bacterial survival. *Cell* 177: 352-360.e313.
- Lee JY, Yang JG, Zhitnitsky D, Lewinson O und Rees DC, (2014).** Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science* 343: 1133-1136.
- Legatzki A, Grass G, Anton A, Rensing C und Nies DH, (2003).** Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol* 185: 4354-4361.

- Lei H-T, Bolla JR, Bishop NR, Su C-C und Yu EW, (2014).** Crystal structures of CusC review conformational changes accompanying folding and transmembrane channel formation. *J Mol Biol* 426: 403-411.
- Lengeler JW, Drews G und Schlegel HG, (2009).** Biology of the prokaryotes.
- Lengke M und Southam G, (2006).** Bioaccumulation of gold by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of gold(I)-thiosulfate complex. *Geochim Cosmochim Acta* 70: 3646-3661.
- Lengke MF, Ravel B, Fleet ME, Wanger G, Gordon RA und Southam G, (2006).** Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold(III)-chloride complex. *Environ Sci Technol* 40: 6304-6309.
- Lenz O, Schwartz E, Dervede J, Eitinger M und Friedrich B, (1994).** The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* 176: 4385-4393.
- Levchenko LA, Kulakovskaya SI, Kulikov AV, Sadkov AP und Shilov AE, (2000).** Electrochemical and ESR studies of Au-protein from *Micrococcus luteus*. *Appl Biochem Biotechnol* 88: 201-210.
- Levchenko LA, Sadkov AP, Lariontseva NV, Koldasheva EM, Shilova AK und Shilov AE, (2001).** Methane oxidation catalyzed by the Au-protein from *Micrococcus luteus*. *Dokl Biochem Biophys* 377: 123-124.
- Levchenko LA, Sadkov AP, Lariontseva NV, Koldasheva EM, Shilova AK und Shilov AE, (2002).** Gold helps bacteria to oxidize methane. *J Inorg Biochem* 88: 251-253.
- Li P, Hendricks AL, Wang Y, Villones RLE, Lindkvist-Petersson K, Meloni G, Cowan JA, Wang K und Gourdon P, (2022a).** Structures of Atm1 provide insight into [2Fe-2S] cluster export from mitochondria. *Nat Comm* 13: 4339.
- Li P, Nayeri N, Górecki K, Becares ER, Wang K, Mahato DR, Andersson M, Abeyrathna SS, Lindkvist-Petersson K, Meloni G, Missel JW und Gourdon P, (2022b).** PcoB is a defense outer membrane protein that facilitates cellular uptake of copper. *Prot Sci* 31: e4364.
- Liesegang H, Lemke K, Siddiqui RA und Schlegel HG, (1993).** Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* 175: 767-778.
- Lippa AM und Goulian M, (2012).** Perturbation of the oxidizing environment of the periplasm stimulates the PhoQ/PhoP system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194: 1457-1463.
- Loftin IR, Franke S, Blackburn NJ und McEvoy MM, (2007).** Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of *Escherichia coli* CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorption spectroscopy. *Prot Sci* 16: 2287-2293.
- Loftin IR, Franke S, Roberts SA, Weichsel A, Héroux A, Montfort WR, Rensing C und McEvoy MM, (2005).** A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* 44: 10533-10540.
- Lok CN, Ho CM, Chen R, Tam PK, Chiu JF und Che CM, (2008).** Proteomic identification of the Cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. *J Proteome Res* 7: 2351-2356.

- Long F, Su C-C, Zimmermann MT, Boyken SE, Rajashankar KR, Jernigan RL und Yu EW, (2010).** Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature* 467: 484-488.
- Lutze S (2022).** Einfluss von AtmA-ähnlichen ABC-Transportern auf die Kupfer- und Goldhomöostase in *Cupriavidus metallidurans*. Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Macomber L und Imlay JA, (2009).** The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 106: 8344-8349.
- Macomber L, Rensing C und Imlay JA, (2007).** Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 1616-1626.
- Madeira A, de Almeida A, de Graaf C, Camps M, Zorzano A, Moura TF, Casini A und Soveral G, (2014).** A gold coordination compound as a chemical probe to unravel aquaporin-7 function. *ChemBioChem* 15: 1487-1494.
- Mana-Capelli S, Mandal AK und Argüello JM, (2003).** *Archaeoglobus fulgidus* CopB is a thermophilic Cu²⁺-ATPase: functional role of its histidine-rich-N-terminal metal binding domain. *J Biol Chem* 278: 40534-40541.
- Mandel M und Higa A, (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53: 159-162.
- Marx CJ und Lidstrom ME, (2002).** Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques* 33: 1062-1067.
- Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H und Sugiyama M, (2006).** Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J Biol Chem* 281: 8981-8990.
- Mellano MA und Cooksey DA, (1988).** Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J Bacteriol* 170: 2879-2883.
- Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR und Sung JH, (1962).** A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 29: 764-779.
- Menon S und Ragsdale SW, (1998).** Role of the [4Fe-4S] cluster in reductive activation of the cobalt center of the corrinoid iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* during acetate biosynthesis. *Biochemistry* 37: 5689-5698.
- Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P und Van Gijsegem F, (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* 162: 328-334.
- Messerschmidt A, Luecke H und Huber R, (1993).** X-ray structures and mechanistic implications of three functional derivatives of ascorbate oxidase from zucchini. Reduced, peroxide and azide forms. *J Mol Biol* 230: 997-1014.

- Meydan S, Klepacki D, Karthikeyan S, Margus T, Thomas P, Jones JE, Khan Y, Briggs J, Dinman JD, Vázquez-Laslop N und Mankin AS, (2017).** Programmed ribosomal frameshifting generates a copper transporter and a copper chaperone from the same gene. *Mol Cell* 65: 207-219.
- Mikolay A und Nies DH, (2009).** The ABC-transporter AtmA is involved in nickel and cobalt resistance of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96: 183-191.
- Miller RE und Stadtman ER, (1972).** Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. *J Biol Chem* 247: 7407-7419.
- Mironov IV und Kharlamova VY, (2020).** On the complexation of Gold(I) with glutathione in aqueous solutions. *J Sol Chem* 49: 583-597.
- Mironov IV und Kharlamova VY, (2023).** On redox processes of Gold(III) complexes with biologically important thiols: cysteine, glutathione, thiomalate. *Chem Sel* 8: e202301337.
- Mol CD, Hosfield DJ und Tainer JA, (2000).** Abasic site recognition by two apurinic/aprimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mut Res DNA Rep* 460: 211-229.
- Monchy S, Benotmane MA, Wattiez R, van Aelst S, Auquier V, Borremans B, Mergeay M, Taghavi S, van der Lelie D und Vallaeyts T, (2006).** Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiol* 152: 1765-1776.
- Morgan MT, Nguyen LAH, Hancock HL und Fahrni CJ, (2017).** Glutathione limits aquacopper(I) to sub-femtomolar concentrations through cooperative assembly of a tetranuclear cluster. *J Biol Chem* 292: 21558-21567.
- Müller FH, Bandejas TM, Urich T, Teixeira M, Gomes CM und Kletzin A, (2004).** Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* 53: 1147-1160.
- Munson GP, Lam DL, Outten FW und O'Halloran TV, (2000).** Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 182: 5864-5871.
- Nambi S, Long JE, Mishra BB, Baker R, Murphy KC, Olive AJ, Nguyen HP, Shaffer SA und Sassetti CM, (2015).** The oxidative stress network of *Mycobacterium tuberculosis* reveals coordination between radical detoxification systems. *Cell Host Microbe* 17: 829-837.
- Nardon C, Boscutti G und Fregona D, (2014).** Beyond platinum: gold complexes as anticancer agents. *Anticancer Res* 34: 487-492.
- Ngamchuea K, Batchelor-McAuley C und Compton RG, (2016).** The Copper(II)-catalyzed oxidation of glutathione. *Chemistry – A European Journal* 22: 15937-15944.
- Nies D, Mergeay M, Friedrich B und Schlegel HG, (1987).** Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* 169: 4865-4868.

- Nies DH, (1992).** CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 174: 8102-8110.
- Nies DH, (2003).** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 313-339.
- Nies DH, (2022).** How is a zinc ion correctly allocated to a zinc-dependent Protein?, pp. 579-660 in *Microbial Metabolism of Metals and Metalloids*.
- Nies DH und Silver S, (2007).** Molecular microbiology of heavy metals.
- Nishino K, Nikaido E und Yamaguchi A, (2007).** Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 189: 9066-9075.
- Ohtsu I, Wiriyanawudhiwong N, Morigasaki S, Nakatani T, Kadokura H und Takagi H, (2010).** The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 285: 17479-17487.
- Outten FW, Huffman DL, Hale JA und O'Halloran TV, (2001).** The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 30670-30677.
- Padilla-Benavides T, George Thompson AM, McEvoy MM und Argüello JM, (2014).** Mechanism of ATPase-mediated Cu⁺ export and delivery to periplasmic chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. *J Biol Chem* 289: 20492-20501.
- Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U und Jahnen-Dechent W, (2009).** Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5: 2067-2076.
- Patel MN, Bhatt BS und Dosi PA, (2013).** Synthesis and evaluation of gold(III) complexes as efficient DNA binders and cytotoxic agents. *Spec Acta Mol Biomol Spec* 110: 20-27.
- Pfennig N, (1974).** *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Archives of Microbiology* 100: 197-206.
- Pitcher RS und Watmough NJ, (2004).** The bacterial cytochrome cbb3 oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1655: 388-399.
- Pittman MS, Robinson HC und Poole RK, (2005).** A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CysDC) exports reductant to the periplasm. *J Biol Chem* 280: 32254-32261.
- Pontel LB, Audero ME, Espariz M, Checa SK und Soncini FC, (2007).** GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of *Salmonella*-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. *Mol Microbiol* 66: 814-825.
- Preisig O, Zufferey R und Hennecke H, (1996).** The *Bradyrhizobium japonicum* fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase. *Arch Microbiol* 165: 297-305.
- Preußner K (2023).** Studien zur Regulation des *cus*-Operons in *Cupriavidus metallidurans*. Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Prindle A, Liu J, Asally M, Ly S, Garcia-Ojalvo J und Süel GM, (2015).** Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* 527: 59-63.
- Radisavljević S und Petrović B, (2020).** Gold(III) complexes: an overview on their kinetics, interactions with DNA/BSA, cytotoxic activity and computational calculations. *Front Chem* 8.
- Reith F, Brugger J, Zammit CM, Nies DH und Southam G, (2013).** Geobiological cycling of gold: from fundamental process understanding to exploration solutions. *Minerals* 3: 367-394.
- Reith F, Etschmann B, Grosse C, Moors H, Benotmane MA, Monsieurs P, Grass G, Doonan C, Vogt S, Lai B, Martinez-Criado G, George GN, Nies DH, Mergeay M, Pring A, Southam G und Brugger J, (2009).** Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc Natl Acad Sci* 106: 17757-17762.
- Reith F, Lengke MF, Falconer D, Craw D und Southam G, (2007).** The geomicrobiology of gold. *ISME* 1: 567-584.
- Reith F, Rogers SL, McPhail DC und Webb D, (2006).** Biomineralization of gold: biofilms on bacterioform gold. *Science* 313: 233-236.
- Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B und Rosen BP, (2000).** CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 652-656.
- Rensing C und Grass G, (2003).** *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27: 197-213.
- Rietzschel N (2021).** Komplementation einer *gshA*-Disruption in Deletionsmutanten der Kupfer- und Goldhomöostase in *Cupriavidus metallidurans*. Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rigo A, Corazza A, di Paolo ML, Rossetto M, Ugolini R und Scarpa M, (2004).** Interaction of copper with cysteine: stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation. *J Inorg Biochem* 98: 1495-1501.
- Rismondo J, Große C und Nies DH, (2023).** The sensory histidine kinase CusS of *Escherichia coli* senses periplasmic copper ions. *Microbiol Spectr* 11: e0029123.
- Roane TM und Kellogg ST, (1996).** Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can J Microbiol* 42: 593-603.
- Robinson H, Ang MC, Gao Y-G, Hay MT, Lu Y und Wang AHJ, (1999).** Structural basis of electron transfer modulation in the purple CuA center. *Biochemistry* 38: 5677-5683.
- Rouch DA und Brown NL, (1997).** Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiology* 143: 1191-1202.
- Rousselot-Pailley P, Sénèque O, Lebrun C, Crouzy S, Boturyn D, Dumy P, Ferrand M und Delangle P, (2006).** Model peptides based on the binding loop of the copper metallochaperone Atx1: selectivity of the consensus sequence MxCxxC for metal ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II). *Inorg Chem* 45: 5510-5520.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T, (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.

- Sanyal SK, Pukala T, Mittal P, Reith F, Brugger J, Etschmann B und Shuster J, (2023).** From biomolecules to biogeochemistry: exploring the interaction of an indigenous bacterium with gold. *Chemosphere* 339: 139657.
- Schulz V, Schmidt-Vogler C, Strohmeyer P, Weber S, Kleemann D, Nies DH und Herzberg M, (2021).** Behind the shield of Czc: ZntR controls expression of the gene for the zinc-exporting P-Type ATPase ZntA in *Cupriavidus metallidurans*. *J Bacteriol* 203: 10.1128/jb.00052-00021.
- Shannon R, (1976).** Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystall* 32: 751-767.
- Shi N, Ye S, Alam A, Chen L und Jiang Y, (2006).** Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel. *Nature* 440: 570-574.
- Simon R, Prierer U und Pühler A, (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784 - 791.
- Smith RC, Reed VD und Hill WE, (1994).** Oxidation of thiols by copper(II). *P S Si Rel Elem* 90: 147-154.
- Solomon EI, Sundaram UM und Machonkin TE, (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96: 2563-2606.
- Soulimane T, Buse G, Bourenkov GP, Bartunik HD, Huber R und Than ME, (2000).** Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*. *Embo j* 19: 1766-1776.
- Sousa FL, Alves RJ, Ribeiro MA, Pereira-Leal JB, Teixeira M und Pereira MM, (2012).** The superfamily of heme–copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations. *Biochim et Biophys Acta - Bioenergetics* 1817: 629-637.
- Southern EM, (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Speisky H, Gómez M, Burgos-Bravo F, López-Alarcón C, Jullian C, Olea-Azar C und Aliaga ME, (2009).** Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg Med Chem* 17: 1803-1810.
- Speno H, Taheri MR, Sieburth D und Martin CT, (1995).** Identification of essential amino acids within the proposed CuA binding site in subunit II of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 270: 25363-25369.
- Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG und Sweet MJ, (2013).** Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep* 33.
- Steglich A (2014).** Charakterisierung des *gig*-Clusters aus *Cupriavidus metallidurans*. Masterarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Stewart LJ, Ong C-IY, Zhang MM, Brouwer S, McIntyre L, Davies MR, Walker MJ, McEwan AG, Waldron KJ und Djoko KY, (2020).** Role of glutathione in buffering excess intracellular copper in *Streptococcus pyogenes*. *mBio* 11: 10.1128/mbio.02804-02820.

- Stohs SJ und Bagchi D, (1995).** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321-336.
- Stolle P, Hou B und Brüser T, (2016).** The Tat substrate CueO is transported in an incomplete folding state. *J Biol Chem* 291: 13520-13528.
- Stoyanov JV, Hobman JL und Brown NL, (2001).** CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39: 502-511.
- Stoyanov JV, Magnani D und Solioz M, (2003).** Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 546: 391-394.
- Stratford JP, Edwards CLA, Ghanshyam MJ, Malyshev D, Delise MA, Hayashi Y und Asally M, (2019).** Electrically induced bacterial membrane-potential dynamics correspond to cellular proliferation capacity. *Proc Natl Acad Sci* 116: 9552-9557.
- Su C-C, Long F, Zimmermann MT, Rajashankar KR, Jernigan RL und Yu EW, (2011).** Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature* 470: 558-562.
- Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, Winther O, Brunak S, von Heijne G und Nielsen H, (2022).** SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnol* 40: 1023-1025.
- Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A und Saier MH, Jr., (1999).** The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 107-125.
- Tumlirsch T, Sznajder A und Jendrossek D, (2015).** Formation of polyphosphate by polyphosphate kinases and its relationship to poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Appl Environ Microbiol* 81: 8277-8293.
- Vita N, Platsaki S, Baslé A, Allen SJ, Paterson NG, Crombie AT, Murrell JC, Waldron KJ und Dennison C, (2015).** A four-helix bundle stores copper for methane oxidation. *Nature* 525: 140-143.
- Volentini SI, Farías RN, Rodríguez-Montelongo L und Rapisarda VA, (2011).** Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *BioMetals* 24: 827-835.
- Walsh MJ und Ahner BA, (2013).** Determination of stability constants of Cu(I), Cd(II) & Zn(II) complexes with thiols using fluorescent probes. *J Inorg Biochem* 128: 112-123.
- Weast RC, Astle MJ und Beyer WHe, (1983).** CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Boca Raton.
- White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K und Petris MJ, (2009).** A Role for the ATP7A Copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* 284: 33949-33956.
- Wiesemann N (2015).** Mechanismus der Goldresistenz in *Cupriavidus metallidurans*. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Wiesemann N, Bütof L, Herzberg M, Hause G, Berthold L, Etschmann B, Brugger J, Martinez-Criado G, Dobritsch D, Baginsky S, Reith F und Nies DH, (2017).** Synergistic toxicity of copper and gold compounds in *Cupriavidus metallidurans*. *Appl Environ Microbiol* 83: e01679-01617.
- Wiesemann N, Mohr J, Grosse C, Herzberg M, Hause G, Reith F und Nies DH, (2013).** Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Bacteriol* 195: 2298-2308.
- Wijekoon CJK, Young TR, Wedd AG und Xiao Z, (2015).** CopC protein from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 features a conserved novel high-affinity Cu(II) binding site. *Inorg Chem* 54: 2950-2959.
- Wilmot CM, Murray JM, Alton G, Parsons MR, Convery MA, Blakeley V, Corner AS, Palcic MM, Knowles PF, McPherson MJ und Phillips SEV, (1997).** Catalytic mechanism of the quinoenzyme amine oxidase from *Escherichia coli*: exploring the reductive half-reaction. *Biochemistry* 36: 1608-1620.
- Witkiewicz PL und Shaw CF, (1981).** Oxidative cleavage of peptide and protein disulphide bonds by gold(III): a mechanism for gold toxicity. *J Chem Soc*: 1111-1114.
- Xue Y, Davis AV, Balakrishnan G, Stasser JP, Staehlin BM, Focia P, Spiro TG, Penner-Hahn JE und O'Halloran TV, (2008).** Cu(I) recognition via cation- π and methionine interactions in CusF. *Nat Chem Biol* 4: 107-109.
- Yang L, Arora K, Beard WA, Wilson SH und Schlick T, (2004).** Critical role of magnesium ions in DNA polymerase β 's closing and active site assembly. *J Am Chem Soc* 126: 8441-8453.
- Yanguoru PM, Webb JW und Shaw CF, (2008).** Glutathionato-S-Gold(III) complexes formed as intermediates in the reduction of auricyanide by glutathione. *J Inorg Biochem* 102: 584-593.
- Zammit CM, Weiland F, Brugger J, Wade B, Winderbaum LJ, Nies DH, Southam G, Hoffmann P und Reith F, (2016).** Proteomic responses to gold(III)-toxicity in the bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* 8: 1204-1216.
- Zhang L, Koay M, Maher MJ, Xiao Z und Wedd AG, (2006).** Intermolecular Transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded CuI/CuII forms. *J Am Chem Soc* 128: 5834-5850.
- Zimmermann M, Udagedara SR, Sze CM, Ryan TM, Howlett GJ, Xiao Z und Wedd AG, (2012).** PcoE--a metal sponge expressed to the periplasm of copper resistance *Escherichia coli*. Implication of its function role in copper resistance. *J Inorg Biochem* 115: 186-197.
- Zuily L, Lahrach N, Fassler R, Genest O, Faller P, Sénèque O, Denis Y, Castanié-Cornet MP, Genevaux P, Jakob U, Reichmann D, Giudici-Ortoni MT und Ilbert M, (2022).** Copper induces protein aggregation, a toxic process compensated by molecular chaperones. *mBio* 13: e0325121.
- Zumft WG, (2005).** Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem* 99: 194-215.

VII. Anhang

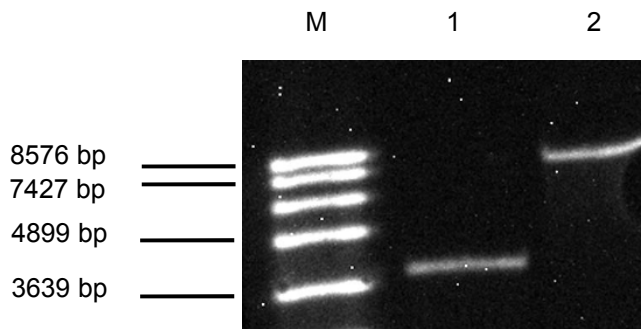


Abbildung 13. Nachweis der Deletion des Gens *gshA* im Stamm AE104 durch DNA::DNA-Hybridisierung. Genomische DNA wurde mit dem Enzym *AafI* verdaut, auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die Sonde zur Detektion wurde mit den Primern Rm *gshA crelox BglII* und Rm Δ *gshA*-RM OR *MunI* amplifiziert. M: Größenstandard DNA-Molekülmassenmarker VII, DIG-markiert (Roche, Mannheim). 1: DNA aus *C. metallidurans* Stamm AE104. 2: DNA einer potenziellen *gshA*-Deletionsmutante im Stamm AE104. Für den Stamm AE104 wurde eine Fragmentgröße von 3812 bp erwartet, für eine *gshA*-Deletionsmutante wurde eine Größe von 7729 bp erwartet.

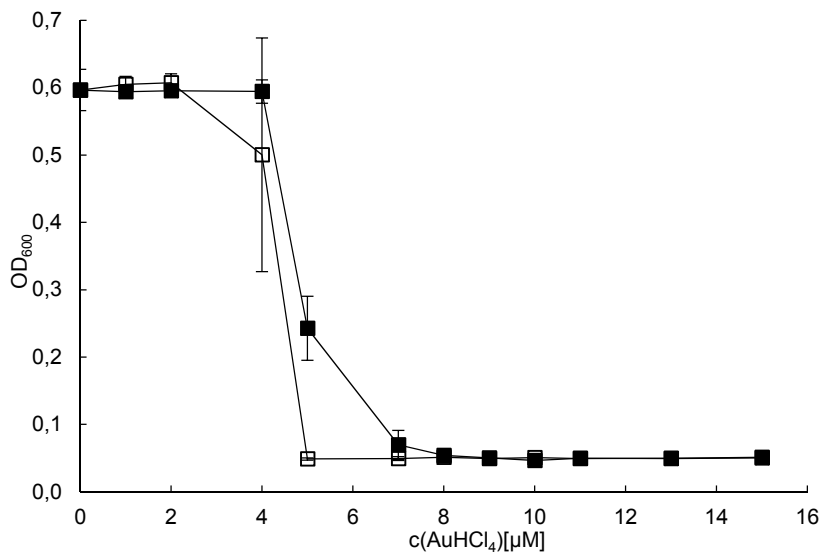
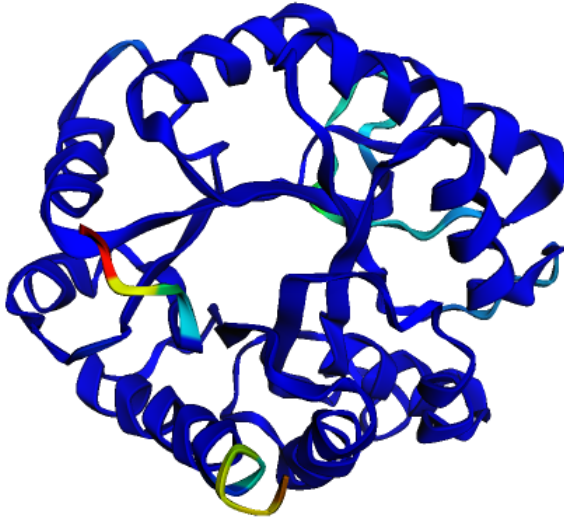
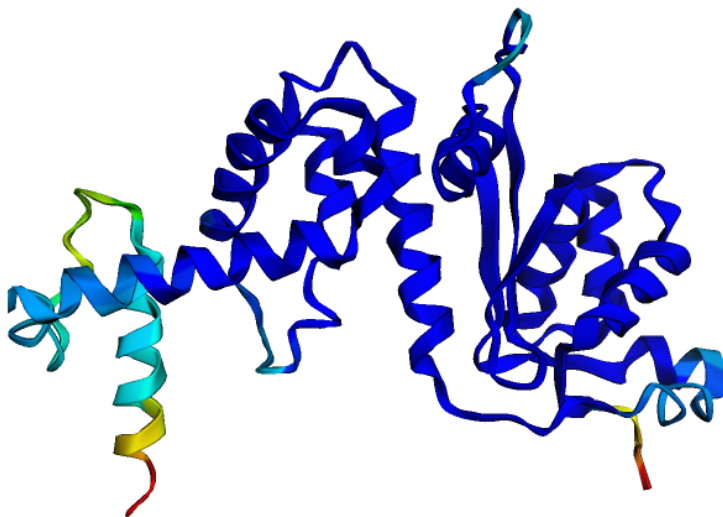


Abbildung 14. Wachstumskurve der Stämme AE104 und DN861 auf goldhaltigem Medium. Die Kulturen aus AE104 (■) und DN861 (□) wurden 18 h in TMM bei 30 °C und 200 rpm schüttelnd angezogen und 5 % in frisches TMM angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 h im Rotationsschüttler bei 30 °C und 200 rpm wurden die Kulturen 10 % in 200 µl TMM in 96-well-Platten mit flachem Boden mit AuHCl₄ angeimpft. Nach 20 h Inkubation in einem NeoLab DTS 2 bzw. DTS 4 Thermo Schüttler bei 30 °C und 1300 rpm wurde die Absorption bei 600 nm gemessen (n ≥ 3).



pLDDT: ■ Very low (<50) ■ Low (60) ■ OK (70) ■ Confident (80) ■ Very high (>90)

Abbildung 15. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von GigA aus *C. metallidurans*. Ein pLDDT (*predicted local distance difference test*) mit einer Punktzahl über 80 zeigt eine hohe Zuverlässigkeit der Vorhersage.



pLDDT: ■ Very low (<50) ■ Low (60) ■ OK (70) ■ Confident (80) ■ Very high (>90)

Abbildung 16. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von GigB aus *C. metallidurans*. Ein pLDDT (*predicted local distance difference test*) mit einer Punktzahl über 80 zeigt eine hohe Zuverlässigkeit der Vorhersage.

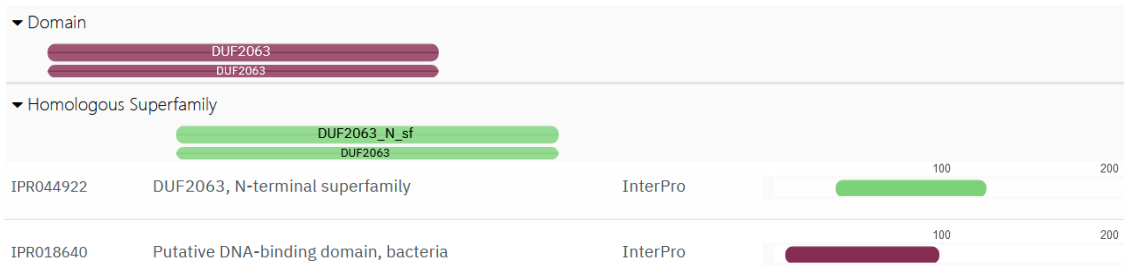
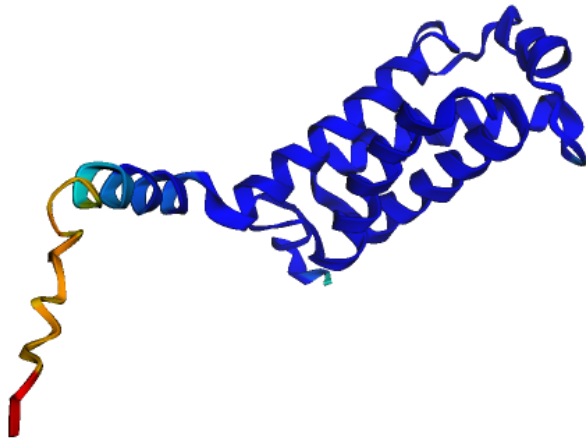


Abbildung 17. Analyse der Domänen des Proteins GigB aus *C. metallidurans* mit InterProScan. GigB zeigt eine vorhergesagte DNA-Bindedomäne.



pLDDT: ■ Very low (<50) ■ Low (60) ■ OK (70) ■ Confident (80) ■ Very high (>90)

Abbildung 18. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von GigT aus *C. metallidurans*. Ein pLDDT (predicted local distance difference test) mit einer Punktzahl über 80 zeigt eine hohe Zuverlässigkeit der Vorhersage.

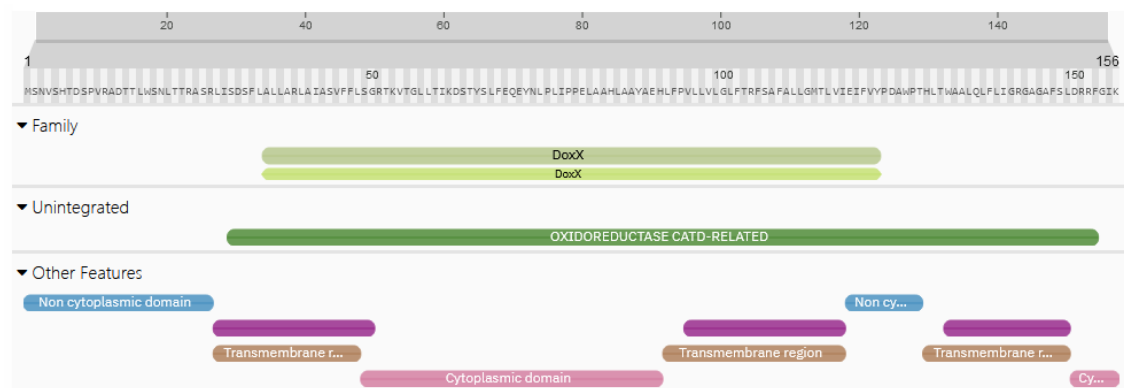


Abbildung 19. Analyse der Domänen des Proteins GigT aus *C. metallidurans* mit InterProScan. GigT zeigt eine vorhergesagte Oxidoreduktase-Domäne mit mehreren Transmembran-Domänen.

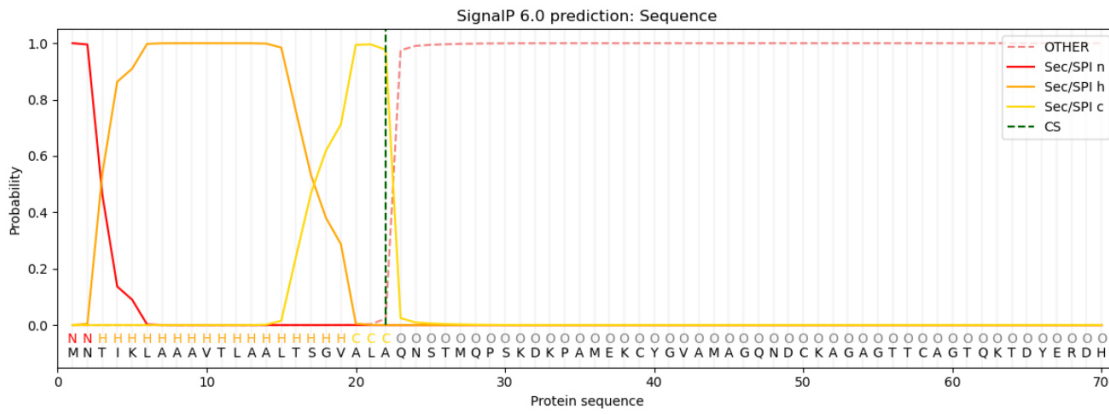
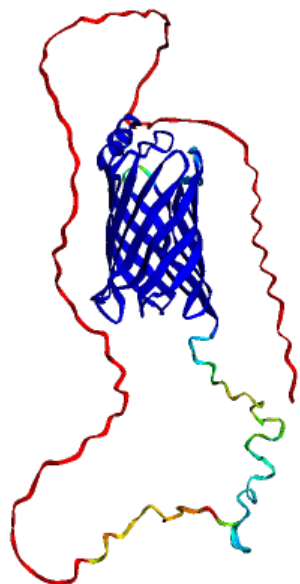
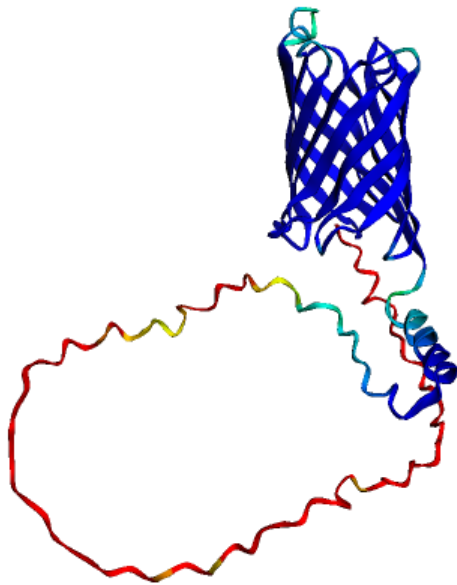


Abbildung 20. Analyse der N-terminalen Signalpeptidesequenz von GigP aus *C. metallidurans* durch SignalP 6.0. GigP besitzt ein vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid, das zwischen A22 und Q23 abgespalten wird



pLDDT: ■ Very low (<50) ■ Low (60) ■ OK (70) ■ Confident (80) ■ Very high (>90)

Abbildung 21. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von CopB aus *C. metallidurans*. Ein pLDDT (*predicted local distance difference test*) mit einer Punktzahl über 80 zeigt eine hohe Zuverlässigkeit der Vorhersage.



pLDDT: ■ Very low (<50) ■ Low (60) ■ OK (70) ■ Confident (80) ■ Very high (>90)

Abbildung 22. Durch AlphaFold 2 vorhergesagte Struktur von PcoB aus *Caulobacter crescentus*. Ein pLDDT (*predicted local distance difference test*) mit einer Punktzahl über 80 zeigt eine hohe Zuverlässigkeit der Vorhersage.

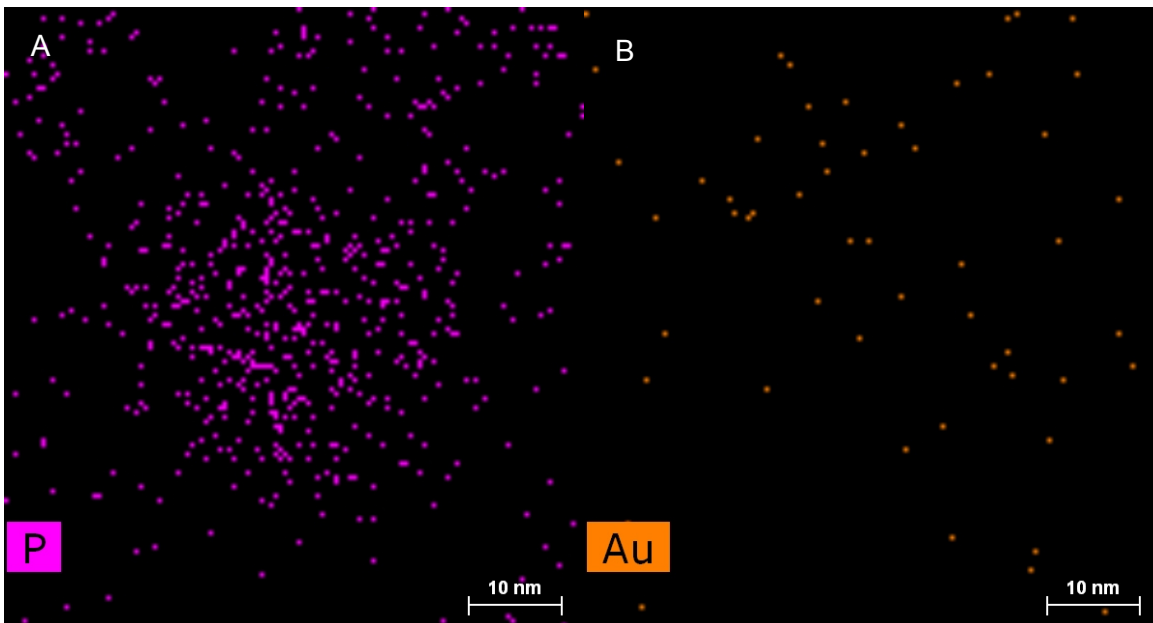


Abbildung 23. Kombinierte HAADF/STEM-Aufnahme mit EDX-Analyse eines potenziellen Goldnanopartikels im Stamm AE104. A: EDX-Aufnahme eines potenziellen Goldnanopartikels im Phosphorkanal. B: EDX-Aufnahme eines potenziellen Goldnanopartikels im Goldkanal. Durch EDX-Analyse konnte gezeigt werden, dass im EM sichtbare Partikel zu großen Teilen aus Phosphor bestehen aber wenig bis kein Gold enthalten. Die Aufnahme des Bildes erfolgte durch Lutz Berthold mit dem Titan³ G2 60-300 am IMWS Halle.

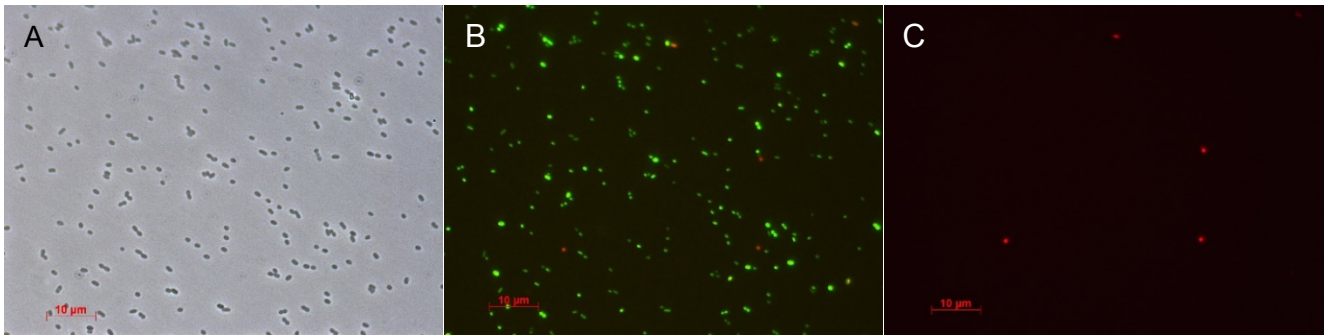


Abbildung 24. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 ohne Zugabe von Kupfer. A: im Phasenkontrast, B: mit Fluoreszenzfilter 2, C: mit Fluoreszenzfilter 3.

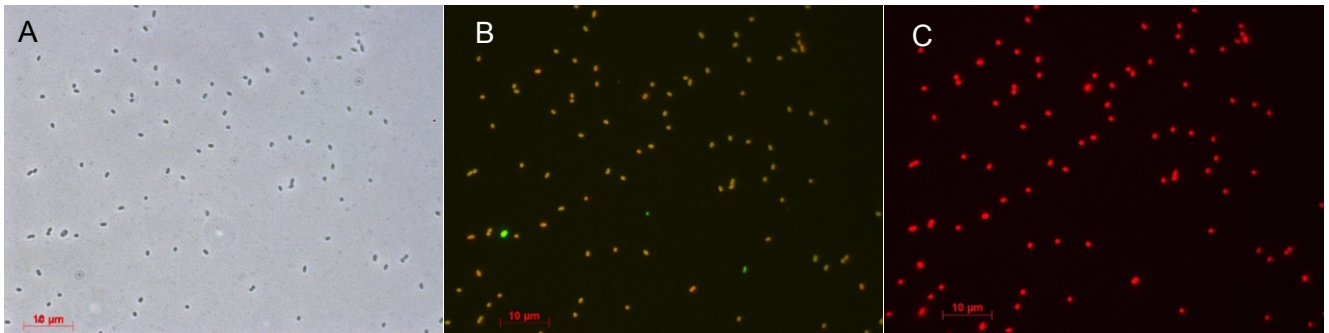


Abbildung 25. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 ohne Zugabe von Kupfer nach dem Abtöten mit Propanol. A: im Phasenkontrast, B: mit Fluoreszenzfilter 2, C: mit Fluoreszenzfilter 3.

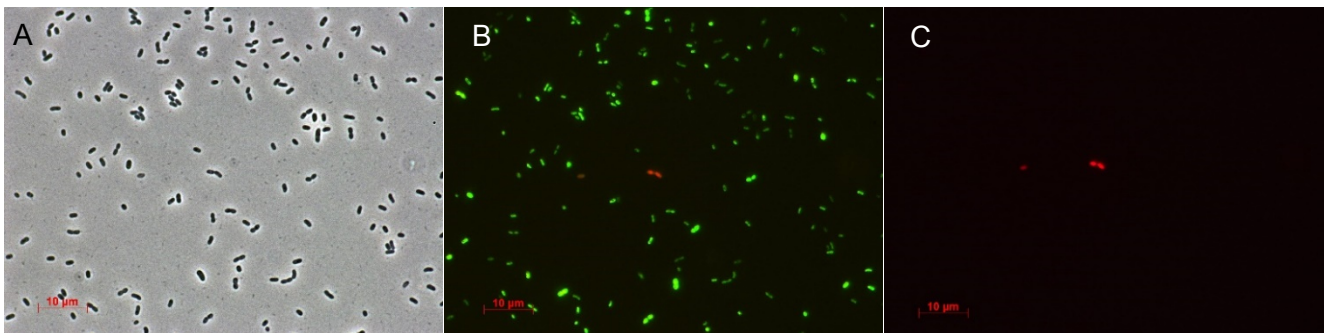


Abbildung 26. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 mit Zugabe von Kupfer. A: im Phasenkontrast, B: mit Fluoreszenzfilter 2, C: mit Fluoreszenzfilter 3.

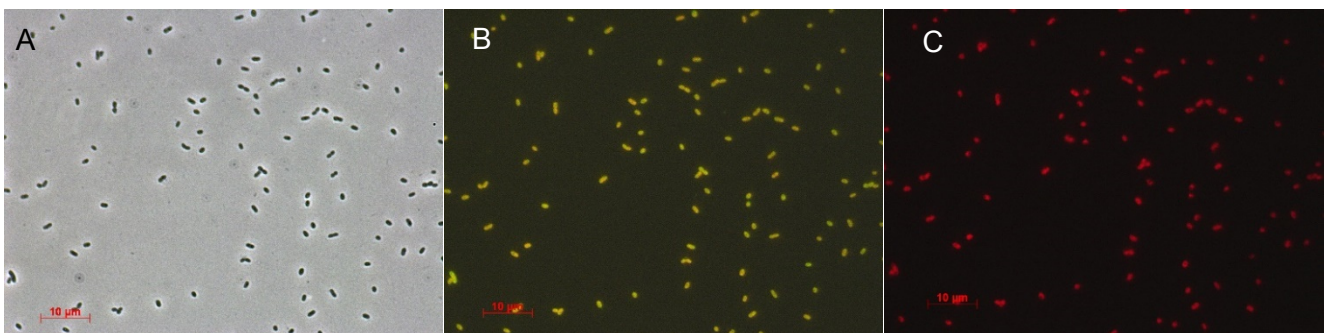


Abbildung 27. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen des Stamms DN913 mit Zugabe von Kupfer nach dem Abtöten mit Propanol. A: im Phasenkontrast, B: mit Fluoreszenzfilter 2, C: mit Fluoreszenzfilter 3.

VIII. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. D. H. Nies für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die vertrauensvolle Betreuung dieses Projekts bedanken. Besonders möchte ich mich dabei für die hohe Diskussionsbereitschaft, konstruktiven Vorschläge und die Freiheit beim Durchführen und Gestalten der Arbeit bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. K. Humbeck und PD Dr. G. Grass für die Übernahme der weiteren Gutachten bedanken.

Dank geht an Dr. Conny Große für die Betreuung im Labor und beim Gestalten der Experimente. Ihre bestimmenden und sehr hilfreichen Hinweise haben mich unterstützt bei der Laborarbeit unterstützt und mit harter Hand hat sie mich immer wieder auf den richtigen Weg gebracht wenn ich davon mal etwas abkam.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Labormitbewohnerin Grit, die mir vor allem in der Anfangszeit in der neuen Umgebung ein kleiner Nordstern war. Auf Grit kann man sich verlassen, vor allem wenn es um das Aufwecken von Stämmen oder kleine und große Tricks bei Klonierungen geht.

Bei Martin möchte ich mich für die hilfreichen Hinweise während unserer Seminare und die Messung der zahlreichen ICP-Proben bedanken.

Dank geht an Vlada und Diana, die mir als Gesprächspartner für Themen außerhalb des Labors und das Messen meiner zahlreichen ICP-Proben immer wieder zur Seite standen und so auch einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Stephanie Krüger sowie den weiteren Mitgliedern der Gruppe möchte ich mich für die konstruktive und langfristige Zusammenarbeit beim Erstellen und Vermessen der elektronenmikroskopischen Bilder bedanken.

Bei Lutz Berthold vom IMWS möchte ich für die kurzfristige und unkomplizierte Durchführung der EDX-Messungen bedanken.

Danke auch an die Mitglieder der Gruppe von Prof. Sawers für die hilfsbereite und konstruktive Zusammenarbeit. Vor allem Doro und Michelle möchte ich für die netten Gespräche und das Interesse während des Schreibens dieser Arbeit danken.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während dieser Zeit. Auf meine Familie konnte ich mich verlassen. Auch wenn wir uns zeitweise nicht sehen konnten, waren sie immer da. Meine Eltern hatten immer Interesse am Fortgang meiner Arbeit, auch wenn ich manchmal wenig erzählt habe.

Lea möchte ich für die Korrektur meiner Arbeit danken. Sie hat mich im letzten Jahr stetig bestärkt und mir auch manchmal den Kopf gewaschen, wenn meine Organisation etwas nachlässig war. Ich bin dankbar, dass ich dich habe.

IX. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Doktorarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), Juni 2024

Niklas Hirth

X. Publikationsliste

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht

Hirth N, Gerlach MS, Wiesemann N, Herzberg M, Große C und Nies DH, (2023). Full copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* requires the interplay of many resistance systems. *Appl Environ Microbiol* 89: e0056723.

Hirth N, Wiesemann N, Krüger S, Gerlach MS, Preußner K, Galea D, Herzberg M, Große C und Nies DH, (2024). A gold speciation that adds a second layer to synergistic gold-copper toxicity in *Cupriavidus metallidurans*. *Appl Environ Microbiol* 90: e0014624.

XI. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Niklas Hirth

Promotion

03/2019 – 06/2024: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Institut für Biologie, Institut für Mikrobiologie, in der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie von Prof. Dr. D. H. Nies der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Universitäre Bildung

10/2015 - 09/2017: Studium Master Molekulare Biowissenschaften an der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main mit Schwerpunkt Mikrobiologie und Molekularbiologie

Masterarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. V. Müller, Thema der Arbeit: Die Rolle des Oberflächenproteins PilY1 bei der Adhäsion von *Acinetobacter baumannii*

Abschluss Master of Science

10/2012 - 09/2015: Studium Bachelor Biowissenschaften an J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main mit Schwerpunkt Mikrobiologie und Genetik

Bachelorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. V. Müller, Thema der Arbeit: Die Rolle von Mannitol bei der Trockenstressantwort in *Acinetobacter baylii*

Abschluss Bachelor of Science

Schulische Bildung

08/2009 – 07/2012: Oberstufe Friedrich- Dessauer Gymnasium Frankfurt-Höchst

08/2003 – 07/2009: Mittelstufe Leibnizschule Frankfurt-Höchst

09/1998 – 07/2003: Grundschule Albert-Schweitzer Okriftel

Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen:

03/2020: Posterpräsentation VAAM 2020 in Leipzig zum Thema „The *cup* determinant is crucial for the resistance to copper in *Cupriavidus metallidurans*“

07/2020: Kurzpräsentation Biometals 2020 zum Thema „The *cup* determinant is crucial for the resistance to copper in *Cupriavidus metallidurans*“ (Online Tagung)

09/2022: Posterpräsentation Copper 2022 in Sorrento/Italien zum Thema: „Role of glutathione in copper and gold homeostasis of *Cupriavidus metallidurans*“

Praktika:

06/2011: zweiwöchiges Praktikum in der Arbeitsgruppe von Dr. Pamela Greenwell an der University of Westminster, London zum Thema Infektionen von *Trichomonas vaginalis*

02/2008: dreiwöchiges Betriebspraktikum bei Clariant GmbH, Abteilung Additive und Farben im Industriepark Frankfurt-Höchst

Halle (Saale), Juni 2024

Niklas Hirth