

Mechanismus der Goldresistenz in
Cupriavidus metallidurans

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Nicole Wiesemann

geb. am 31.10.1985 in Stendal

Gutachter:

1. Prof. Dr. D.H. Nies
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. M. Solioz

Tag der Verteidigung: 21.07.2015

Für meine Eltern, meine Schwester und Thomas.

In der Schule haben wir gelernt, dass Lehrerwissen absolutes Wissen ist. Doch Wissenschaft kann niemals absolut sein. Sie ist die Kunst der Annäherung. Sie definiert nicht, sondern kreist ein, zieht keine Trennlinien, sondern schafft Übergänge, kennt keine Dogmen, sondern Entwicklungen. Sie kann nichts verifizieren, sondern nur durch Wegstreichen von Variablen ein möglichst klares Bild entwerfen.

Frank Schätzing

Nachrichten aus einem unbekanntem Universum: Eine Zeitreise durch die Meere

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	VI
III. Tabellenverzeichnis	VIII
IV. Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung von Kupfer und Gold für Bakterien	1
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	13
2.2 Kultivierungsbedingungen.....	17
2.2.1 Nährmedien und Zusätze für Bakterien.....	17
2.2.2 Anzucht, Induktion und Zellernte.....	19
2.2.3 Stammhaltung.....	21
2.3 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA.....	21
2.3.1 Isolierung von DNA	21
2.3.1.1 Isolation genomischer DNA mittels <i>Spin</i> Säule (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)	22
2.3.1.2 Plasmidisolierung mittels <i>Spin</i> Säule (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).....	22
2.3.2 DNA-Techniken	22
2.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	22
2.3.2.2 DNA-Größenstandard	23
2.3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	23
2.3.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	23
2.3.2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	23
2.3.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	24
2.3.3.1 Auswahl der Primer.....	24
2.3.3.2 Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.3.3.3 Reinigung von PCR-Produkten	30
2.3.4 DNA-Sequenzierung	30
2.3.4.1 Sequenzierung durch kommerzielle Anbieter	31
2.3.4.2 Auswertung der Sequenzdaten	31

2.3.5	DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone	31
2.3.5.1	Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode	31
2.3.5.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)	32
2.3.5.3	Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	33
2.3.5.4	Plasmidtransfer in <i>C. metallidurans</i> durch Konjugation	33
2.3.5.5	Selektion von <i>single cross</i> -Rekombinanten	33
2.3.5.6	Konstruktion von Deletionsmutanten mittels <i>cre-lox</i> System	33
2.3.6	Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	35
2.3.6.1	Herstellung der Sonden (DIG DNA LABELING Kit, Roche, Mannheim)	35
2.3.6.2	Digoxigenin-markierte Längenstandards	35
2.3.6.3	DNA:DNA-Hybridisierung (Southern, 1975)	35
2.3.6.4	Chemilumineszenz-Nachweis (DIG-Luminescent Detection Kit, Roche Mannheim)	37
2.4	Molekulargenetische Arbeiten mit RNA	37
2.4.1	Gesamt-RNA-Isolation	37
2.4.2	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA	38
2.4.3	DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA	39
2.4.4	Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	39
2.4.5	<i>Reverse transcriptase</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	39
2.5	Zellwachstumsversuche	41
2.5.1	Wachstumsversuche in Flüssigmedien	41
2.5.1.1	Messung der Zelltrübung	41
2.5.1.2	Zellanzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen	41
2.5.1.3	Zellanzucht von <i>C. metallidurans</i> -Stämmen in Wachstumsversuchen	42
2.5.2	Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration gegen Schwermetallsalze	42
2.6	Enzymologische Methoden	43
2.6.1	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	43
2.6.1.1	Zellwachstum, Induktion und Zellernte der <i>C. metallidurans</i> -Stämme	43
2.6.1.2	Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität (Miller, 1972; Miller, 1992; Griffith und Wolf, 2002)	43
2.6.2	Bestimmung des Glutathiongehaltes der Zelle	44
2.6.2.1	Messung des Glutathiongehaltes	44
2.7	Proteinbiochemische Methoden	45
2.7.1	Protein-Expression und -Reinigung über das <i>Strep-tag</i> ®II <i>Protein Purification</i> <i>System</i>	45

Inhaltsverzeichnis

2.7.1.1	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	46
2.7.1.2	Aufschlussmethoden	46
2.7.1.3	Membranpräparation und Solubilisierung.....	46
2.7.1.4	Native Proteinreinigung mittels <i>StrepTactin</i> -Chromatographie.....	47
2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	47
2.7.2.1	BCA-Test (<i>Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit</i> ; Sigma GmbH, Osterode).....	47
2.7.2.2	Bradford-Proteinbestimmung	47
2.7.2.3	Lowry Proteinbestimmung (Lowry <i>et al.</i> , 1951).....	48
2.7.2.4	Direkte Bestimmung am NanoDrop®ND-1000 Spektrometer	48
2.7.3	Konzentrieren von Proteinlösungen	48
2.7.3.1	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen.....	48
2.7.4	Elektrophoretische Methoden.....	49
2.7.4.1	Probenvorbereitung	49
2.7.4.2	Proteinmarker	49
2.7.4.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.7.4.4	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)	50
2.7.4.5	<i>Strep-tag</i> ®II-Detektionssystem.....	51
2.7.4.6	Proteinfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau	51
2.8	Rekonstitution von Membranproteinen	52
2.8.1	Herstellung von unilamellaren Vesikeln	52
2.8.2	Rekonstitution von Membranproteinen mit Hilfe von Biobeads.....	53
2.8.3	ATPase-Aktivitätstest (Lanzetta <i>et al.</i> , 1979)	53
2.9	Analytische Methoden	54
2.9.1	Analytische Elektronenmikroskopie-EDX	54
2.9.1.1	Transmissionselektronenmikroskopie	54
2.9.1.2	EDX-Analyse	55
2.9.2	<i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> (ICP-MS).....	56
2.9.2.1	Zellanzucht von <i>C. metallidurans</i>	56
2.9.2.2	Probenvorbereitung und ICP-MS Messung.....	57
2.9.2.3	Ermittlung des Metallgehaltes ganzer Zellen	57
3	Ergebnisse	58
3.1	Keine Beteiligung von Staphyloferrin B an der Goldresistenz	58
3.2	Die Megaplasmide sind nicht an der Goldresistenz und der Biomineralisierung beteiligt	59
3.3	Interferenz der Gold- und Kupferresistenz.....	63

3.3.1	Die Kupferinkubation erhöht die Goldsensitivität.....	63
3.3.2	Veränderung der Gold- und Kupfergehalte durch Metallinkubation	70
3.3.3	Die ATPase-Aktivität der Cu(I)-P-Typ ATPase CupA wird durch AuHCl ₄ gehemmt	72
3.4	Welchen Einfluss haben die Kupferresistenzsysteme auf die Gold-Kupfer- Interferenz?	78
3.4.1	Der Beitrag der periplasmatischen Kupferresistenzsysteme an der Gold-Kupfer- Interferenz.....	79
3.4.2	Der Beitrag des cytoplasmatischen Kupferresistenzsystems an der Gold-Kupfer- Interferenz.....	83
3.5	Das goldinduzierte Cluster (<i>gig</i> -Cluster).....	88
3.5.1	Der Beitrag des <i>Gig</i> -Systems an der Gold-Kupfer-Interferenz	88
3.5.2	Untersuchung der Expression der Gene des <i>gig</i> -Clusters auf RNA-Ebene.....	90
3.5.3	Untersuchung der Expression der Gene des <i>gig</i> -Clusters auf physiologischer Ebene	91
3.5.4	Einfluss der Deletion von <i>rpoQ</i> auf die Expression der Gene des <i>gig</i> -Clusters...	94
3.6	Beteiligung der Metallaufnahmesysteme von <i>C. metallidurans</i> an der Goldresistenz	94
3.7	Der Einfluss von Glutathion auf die Metallresistenz von <i>C. metallidurans</i>	97
3.7.1	Der Einfluss der <i>gshA</i> -Deletion auf die Goldresistenz und den Goldgehalt	97
3.7.2	Die γ -Glutamylcysteinsynthetase-Deletionsmutante ist sensitiver gegenüber oxidativen Stress als der Wildtypstamm AE104	99
3.7.3	Wo ist das vermehrte Gold in der <i>gshA</i> -Deletionsmutante lokalisiert?.....	100
3.7.4	Der Einfluss von Glutathion auf die Biomineralisierung von Gold	101
4	Diskussion	103
4.1	Orthologe Goldresistenzsysteme von <i>D. acidovorans</i> und <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium haben keinen Einfluss auf die Goldhomöostase.....	103
4.1.1	Die Beteiligung von Siderophoren an der Goldresistenz und Goldbiomineralisierung	103
4.1.2	Das Cup-System von <i>C. metallidurans</i> ist kein Goldresistenzsystem.....	104
4.2	<i>C. metallidurans</i> und sein Vorkommen an goldhaltigen Standorten	109
4.3	Indirekter Weg der Metallentgiftung in <i>C. metallidurans</i>	111
4.3.1	Die Goldresistenz und Nanopartikelbildung im Periplasma	119
4.4	Glutathion scheint eine wichtige Komponente in der Goldhomöostase zu sein	127

4.5	Das Gig-System mit einer unbekanntem Funktion.....	131
4.6	Ausblick.....	134
5	Zusammenfassung.....	136
6	Literaturverzeichnis	138
7	Anhang	159

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das <i>gol</i> -Regulon von <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium LT2 (modifiziert nach Checa <i>et al.</i> , 2011, Pontel <i>et al.</i> , 2007).	9
Abb. 2: <i>D. acidovorans</i> verwendet Delftibactin A um Au(III)-ionen im extrazellulären Raum zu elementaren Au(0) zu reduzieren (Johnston <i>et al.</i> , 2013).	10
Abb. 3: Goldresistenz der Sigmafaktor-Deletionsmutanten.	58
Abb. 4: Die Plasmide pMOL28 und pMOL30 von <i>C. metallidurans</i> haben keinen Einfluss auf die Resistenz von AuHCl ₄ und Au(S ₂ O ₃) ₂	60
Abb. 5: Bildung von Goldnanopartikeln durch <i>C. metallidurans</i>	61
Abb. 6: Transmissionselektronenmikroskopie eines <i>C. metallidurans</i> Dünnschnittes mit EDX-Analyse.	62
Abb. 7: Inkubation von AE104 mit AuHCl ₄	63
Abb. 8: Die Abhängigkeit der Goldtoxizität von der Vorinkubation mit Schwermetallkationen.	64
Abb. 9: Einfluss einer Kupfervorinkubation auf die Kupfer- und Goldresistenz von CH34 (A.,C.) und AE104 (B., D.).	65
Abb. 10: Einfluss einer Goldvorinkubation auf die Gold- und Kupferresistenz von CH34 (A.,C.) und AE104 (B., D.).	67
Abb. 11: Einfluss der Goldresistenz des <i>E. coli</i> Stammes W3110 durch Vorinkubation mit CuCl ₂	68
Abb. 12: Einfluss der Goldresistenz von CH34 (A.) und AE104 (B.) durch 200 µM CuCl ₂	69
Abb. 13: Einfluss der Kupferresistenz von CH34 (A.) und AE104 (B.) durch 2,5 µM AuHCl ₄	69
Abb. 14: Minimale Inhibitor Konzentration von AuCl ₄ und CuCl ₂ in Gegenwart des jeweilig anderen Metalls.	70
Abb. 15: Konstruktion einer Gendeletion in <i>C. metallidurans</i> mittels <i>cre-lox</i> System am Beispiel von <i>rdxI</i> (verändert nach Marx & Lidstrom, 2002).	74
Abb. 16: Aufreinigung von CupA als <i>Strep</i> -tag®II-Fusionsprotein und Rekonstitution in Liposomen.	77
Abb. 17: ATPase-Aktivität von CupA im rekonstituierten System.	78
Abb. 18: Induktion einer <i>cusF-lacZ</i> und <i>copD-lacZ</i> -Fusion durch CuCl ₂ und AuHCl ₄ in verschiedenen <i>C. metallidurans</i> Stämmen.	80
Abb. 19: Nachweis der Operonstruktur der Gene <i>gigPABT</i> des <i>gig</i> -Clusters.	90
Abb. 20: Induktion einer <i>gigT-lacZ</i> -Fusion in AE104, DN686(Δ <i>copABCD</i>), DN729(Δ <i>cusCFBA</i>) und DN656(Δ <i>cupCAR</i>).	91
Abb. 21: Induktion einer <i>gigT-lacZ</i> -Fusion in AE104 und DN710(Δ <i>gshA</i>).	92
Abb. 22: Einfluss des <i>gig</i> -Clusters auf den Glutathiongehalt.	93
Abb. 23: Einfluss der <i>rpoQ</i> -Deletion auf die Induktion einer <i>gigT-lacZ</i> -Fusion durch CuCl ₂ und AuHCl ₄	94

Abb. 24: Kupfer- und Goldresistenz des Stammes AE104 und der Derivate, die Deletionen in den Metallaufnahmesystemen tragen.	95
Abb. 25: Regulation der <i>cupA-lacZ</i> -Fusion in Gegenwart und Abwesenheit der Metallaufnahmesysteme.	96
Abb. 26: Kupfer- und Goldresistenz der Stämme AE104 und DN710($\Delta gshA$).	98
Abb. 27: Resistenz der <i>gshA</i> -Deletionsmutante gegen H ₂ O ₂ und Paraquat.	100
Abb. 28: Induktion einer <i>cupA-lacZ</i> -Fusion durch AuHCl ₄ in AE104 und DN710($\Delta gshA$).	101
Abb. 29: TEM-Aufnahmen von DN710($\Delta gshA$) und DN710($\Delta gshA$, pECD1231).	102
Abb. 30: Schematische Darstellung der genetischen Organisation <i>gol</i> -ähnlicher Loci in verschiedenen Organismen.	104
Abb. 31: Gold und Kupfergehalt in der Umgebung der Goldminen in Australien (Reith <i>et al.</i> , 2012).	113
Abb. 32: Topologiemodell der Cpx-Typ ATPase CupA.	117
Abb. 33: Phylogenetischer Stammbaum der Kupfer-P-Typ ATPasen verschiedener Organismen.	118
Abb. 34: Vergleich der Goldnanopartikel in den <i>C. metallidurans</i> -Zellen AE104 und DN686($\Delta copABCD$).	122
Abb. 35: Detoxifizierung und Biomineralisierung von Gold in <i>C. metallidurans</i>	125
Abb. 36: Transmissionselektronenmikroskopie eines <i>C. metallidurans</i> Dünnschnittes mit EDX-Analyse.	159
Abb. 37: Inkubation von AE104 mit AuHCl ₄	159
Abb. 38: Zeitabhängiges Wachstumsverhalten von CH34 zeigte den Einfluss einer Vorinkubation mit CuCl ₂ auf die Goldresistenz.	160
Abb. 39: Zeitabhängiges Wachstumsverhalten von CH34 zeigte keinen Einfluss einer Vorinkubation mit AuHCl ₄ auf die Kupferresistenz.	160
Abb. 40: Einfluss einer Kobaltvorinkubation auf die Kobalt- und Goldresistenz von CH34 (A.,C.) und AE104 (B., D.).	161
Abb. 41: Einfluss einer Goldvorinkubation auf die Kobaltresistenz von CH34 (A.) und AE104 (B.).	162
Abb. 42: Induktion einer <i>cusF-lacZ</i> - und <i>copD-lacZ</i> -Fusion durch CuCl ₂ in verschiedenen <i>C. metallidurans</i> -Stämmen.	162
Abb. 43: Goldresistenz der <i>C. metallidurans</i> $\Delta copABCD$ -Deletionsmutanten.	163
Abb. 44: Schwermetallresistenz der Stämme AE104 und DN710($\Delta gshA$).	163
Abb. 45: Induktion einer <i>gshB-lacZ</i> -Fusion durch CuCl ₂ und AuHCl ₄	164
Abb. 46: Nachweis von GshA in dem Komplementationsstamm DN710($\Delta gshA$, pECD1231).	164
Abb. 47: Schwermetallresistenz der Reduktase-Disruptionsmutanten.	165

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide.	13
Tab. 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen im Medium.	19
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Primer.	25
Tab. 4: Bestimmung der MIC von CH34 und AE104 (n=3).	59
Tab. 5: Kupfer- und Goldgehalt von CH34 und AE104 bei unterschiedlichen Wachstums- bedingungen (n>4).	71
Tab. 6: Resistenz von CH34, AE104 und den Derivaten gegenüber AuHCl ₄ und CuCl ₂ (n>6).	75
Tab. 7: Gold- und Kupferresistenz von AE104 und den Derivaten DN729($\Delta cusCFBA$) und DN686($\Delta copABCD$) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>6).	81
Tab. 8: Gold- und Kupferresistenz von AE104 und DN656($\Delta cupCAR$) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>5).	84
Tab. 9: Kupfer- und Goldgehalt von AE104 und den Deletionsmutanten DN729($\Delta cusCFBA$), DN686($\Delta copABCD$), DN656($\Delta cupCAR$) und DN657($\Delta gigPABT$) (n>6).	87
Tab. 10: Gold- und Kupferresistenz von AE104 und dem Derivat DN657($\Delta gigPABT$) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>5).	88
Tab. 11: Kupfer- und Goldgehalt von AE104 und DN515($\Delta zupT$) (n=3).	96
Tab. 12: Kupfer- und Goldgehalt von AE104 und DN710($\Delta gshA$) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>4).	99
Tab. 13: Die Aminosäurereste der Metallbindeschleife sind innerhalb der GolS und CueR-ähnlichen Proteingruppen hochkonserviert (modifiziert nach Checa <i>et al.</i> , 2007; Perez Audero <i>et al.</i> , 2010; Humbert <i>et al.</i> , 2013; Ibanez <i>et al.</i> , 2013).	106
Tab. 14: Analyse der Schwermetallgehalte von 187 Bodenproben und deren Relevanz für die Existenz der Plasmide pMOL28 und pMOL30.	166
Tab. 15: Analyse der Schwermetallgehalte an vier australischen Goldminen und die Relevanz für <i>E. coli</i>	166
Tab. 16: Geochemische Daten der 187 goldhaltigen Bodenproben an vier australischen Goldminen (Reith <i>et al.</i> , 2012).	166

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
amp ^R	Ampicillin ^(Resistenz)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BLAST	<i>Basic Logic Alignment Tool</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
cfu	<i>colony forming unit</i>
cm ^R	Chloramphenicol ^(Resistenz)
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro-{ 1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7] decan}-4-yl) phenyl phosphate
CP	Cytoplasma
C-Terminus	Carboxyterminus
d	<i>downstream</i>
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDX	<i>energy dispersive X-ray analysis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fw	<i>forward</i>

GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HAADF	<i>high-angle annular dark field</i>
HABA	4-Hydroxylbenzen-2-carboxylat
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
km ^R	Kanamycin ^(Resistenz)
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
MKO	Multi-Kupferoxidase
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
MM	Minimalmedium
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
NA	Nähragar
NB	Nährbouillon
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pi	ortho-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOD (Sod)	Superoxid-Dismutase
STEM	<i>scanning transmission electron microscopy</i> (Raster-Transmissionselektronenmikroskop)
sv.	serovar
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tet ^R	Tetracyclin ^(Resistenz)
TG	Trockengewicht
TMH	Transmembranhelix
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u	<i>upstream</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Die Lebensweise von Bakterien erfordert eine ständige Anpassung an sich schnell ändernden Umweltbedingungen, wie pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Kohlenstoffquellen, Ionenkonzentrationen sowie toxischen Substanzen. Die Adaptation umfasst neben Katabolismus, Anabolismus und dem Proteinsyntheseapparat auch die Ausbildung von Schutz- und Resistenzmechanismen.

Es gibt nur wenige natürliche Elemente, die die Toxizität und den Nutzen besser illustrieren, als die Schwermetalle bzw. Übergangsmetalle. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt und daher für die Biochemie des Lebens in allen Organismen unabdingbar. So besitzen sie eine essentielle Bedeutung für die korrekte Faltung von Proteinen und beeinflussen als Kofaktoren maßgebend die Enzymaktivität biochemischer Reaktionen (Finney und O'Halloran, 2003; Andreini *et al.*, 2004; Waldron und Robinson, 2009; Lemire *et al.*, 2013). Am häufigsten kommt Magnesium neben Zink, Eisen, Mangan, Calcium, Kobalt und Kupfer als Kofaktoren vor, während Kalium, Natrium, Nickel und Molybdän eher seltener als Struktur- und Funktionsbildner anzutreffen sind (Andreini *et al.*, 2006; Andreini *et al.*, 2007; Andreini *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2009; Lemire *et al.*, 2013). Schwermetalle bzw. Übergangsmetalle werden daher als Spurenelemente im nanomolaren Bereich von der Zelle benötigt (Outten und O'Halloran, 2001) und können bei höheren Konzentrationen letal für diese sein. Nicht essentielle Metalle, wie Silber, Quecksilber oder Gold können hingegen bereits in geringeren Konzentrationen mikrobizide Wirkungen haben. Einigen Organismen ist es durch die Entwicklung von spezifischen Resistenzmechanismen gelungen, sich an ökologischen Standorten mit erhöhten Schwermetallgehalten anzupassen.

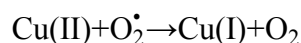
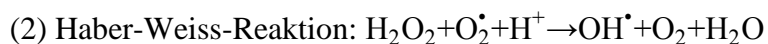
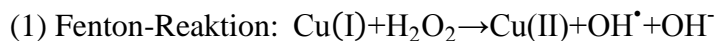
1.1 Die Bedeutung von Kupfer und Gold für Bakterien

Kupfer sowie die Edelmetalle Gold und Silber befinden sich in der Übergangsgruppe 11 des Periodensystems und liegen vorwiegend in den Oxidationsstufen +1 und +2 vor. Die terrestrische Abundanz von Kupfer ist hinreichend untersucht worden, wohingegen Daten zum Vorkommen von Gold und Silber kaum dokumentiert wurden (Kabata-Pendias, 2011). Diese Metalle werden mit dem Fortschreiten der menschlichen Zivilisation verbunden.

Der lateinische Name *cuprum* ist abgeleitet von *ges cyprium* „Erz von der Insel Zypern“, wo im Altertum Kupfer gewonnen wurde (Emsley, 1989; Kabata-Pendias, 2011). Auf Grund seiner Redoxchemie ist Kupfer eines der wichtigsten Spurenelemente. Die meisten Cuproproteine sind im Periplasma oder der Plasmamembran lokalisiert (Argüello *et al.*, 2013). So entgiften Kupfer-

Zink-haltige Superoxiddismutasen (Cu-Zn-SOD) freie Radikale und schützen die Zelle so vor oxidativen Stress (Gort *et al.*, 1999). Die meisten bakteriellen Cu-Zn-SOD sind periplasmatische Proteine. In der Atmungskette ist Kupfer als redoxaktives Zentrum der Cytochrom-Oxidase zu finden (cbb3 Oxidase, Cytochrom ba_3 , caa_3 und aa_3 Oxidase) (Garcia-Horsman *et al.*, 1994; Speno *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1999). Auch viele andere Enzyme, wie die drei Enzyme der bakteriellen Denitrifizierung (Nitritreduktase, Stickstoffmonoxid-Reduktase, Distickstoffmonoxid-Reduktase) (Glockner *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2000; Velasco *et al.*, 2001; Zumft, 2005), Tyrosinasen (Nakamura *et al.*, 2000; Matoba *et al.*, 2006), Lysyloxidasen (Kosonen *et al.*, 1997), Aminoxidasen (Cooper *et al.*, 1992; Wilmot *et al.*, 1997) und Multi-Kupferoxidasen (Huffman *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002; Djoko *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011) enthalten Kupfer in ihren aktiven Zentren. Zu den wenigen Proteinen der cytoplasmatischen Chelatierung zählt beispielsweise das cytoplasmatische Chaperon CopZ aus *Bacillus subtilis* (Banci *et al.*, 2001).

Die Toxizität von Kupfer erklärt sich andererseits durch seine Fähigkeit physiologische Metallionen aus den aktiven Zentren von Enzymen zu verdrängen, wie beispielsweise Eisen aus den verfügbaren Fe-S-Cluster und anderen Eisen-Schwefel-Proteinen (Macomber und Imlay, 2009). Dieser Verdrängungsmechanismus, der mit einer Inhibierung der Enzymfunktion einhergehen kann, konnte auch für andere Metalle, wie Cadmium und Silber gezeigt werden, die eine hohe Affinität zu Thiolgruppen enthalten und über die Bindung an den Cysteinen die Enzyme inaktivieren können (Ouyang und Vogel, 1998; Helbig *et al.*, 2008b). Unter aeroben Bedingungen katalysiert Kupfer die Fenton-Reaktion und die Haber-Weiss-Reaktion, bei denen reaktive Sauerstoffradikale gebildet werden (Halliwell und Gutteridge, 1984; Halliwell und Gutteridge, 1990), die Lipidperoxidation, Proteinoxidation und DNA-Schädigung verursachen können (Imlay und Linn, 1988; Halliwell und Gutteridge, 1990; Stadtman, 1992; Dupont *et al.*, 2011).



Die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies kann jedoch auch indirekt erfolgen. So sind freie Kupferionen in der Lage Sulfhydrylgruppen zu oxidieren, wie Cysteine in Proteinen oder dem zellulären Redoxpuffer Glutathion (Witkiewicz und Shaw, 1981; Stohs und Bagchi, 1995). Zum anderen führt die Degradation des Fe-S-Clusters zur Freilassung von Eisen und damit

einhergehend einem Anstieg an ungebundenen freien Eisen in der Zelle, was zu oxidativen Schäden durch die Eisen-basierte Fentonreaktion führen kann (Keyer und Imlay, 1996). Die Kupferaufnahme in die Zelle muss daher strikt reguliert werden, um die Funktionalität kupferabhängiger Enzyme sicherzustellen, ohne sich dabei zu vergiften. Dies wird durch ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Efflux gewährleistet.

In Eukaryoten sind eine Reihe von hochaffinen Kupfertransportern bekannt, die Cu(I) aktiv in die Zelle translozieren. Dies geschieht z.B. über membrangebundene Aufnahme-Proteine der Ctr1-Familie, die über eine Reihe von methioninreichen Motiven verfügen, die an der Bindung und dem Transport von Cu(I) beteiligt sind (Guo *et al.*, 2004; De Feo *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus der Methionin-gesteuerten Translokation von Cu(I) ist bisher weitestgehend unbekannt. Obwohl der hochaffine Kupfertransport eher im Reich der Eukaryoten anzutreffen ist, sind auch einige Proteine für den Kupferimport in Prokaryoten bekannt. In *Pseudomonas aeruginosa* Q9I147 vermittelt der Transporter HmtA die Aufnahme von Kupfer und Zink, jedoch nicht von Silber, Quecksilber oder Cadmium (Lewinson *et al.*, 2009). An dem aktiven Kupferimport in Prokaryoten können auch P-Typ ATPasen, wie CopA aus *Enterococcus hirae* (Odermatt *et al.*, 1994; Wunderli-Ye und Solioz, 2001) und Cta aus *Synechococcus* 7942 beteiligt sein (Phung *et al.*, 1994).

Da das Metall in hohen Konzentrationen extrem toxisch für die Zellen ist, muss die intrazelluläre Konzentration strikt reguliert werden. Im Laufe der Zeit haben sich daher verschiedene Resistenzmechanismen zum Schutz vor extremen Metallbedingungen entwickelt, wie der Kationenefflux aus dem Periplasma und dem Cytoplasma, die Kationenreduktion, die cytoplasmatische Akkumulation und organische Komplexbildung.

Die erste Barriere für einen Schutzmechanismus vor extremen Kupferkonzentrationen stellt das Periplasma mit den dort lokalisierten Kupferresistenzsystemen (Macomber *et al.*, 2007). Die Multi-Kupferoxidase (MKO) CueO aus *Escherichia coli* ist ein solches periplasmatisches Protein, das Cu(I) mittels Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu Cu(II) oxidiert (Grass und Rensing, 2001b). Damit verliert das Kupfer einen Großteil seines toxischen Potenzials bereits im Periplasma und trägt so maßgebend zur Kupfertoleranz bei. Ob sich die höhere Toxizität der Cu(I)-Spezies (Thieme *et al.*, 2008; Große *et al.*, 2014) in der besseren Membrangängigkeit oder der höheren Reaktivität begründet, ist Gegenstand vieler Diskussion. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Cu(I) im Vergleich zu Cu(II) die weichere Lewis-Säure ist und in Bezug auf die weichen Lewis-Basen, wie Thiolgruppen, reaktiver ist (Grass und Rensing, 2001b). CueO kann desweiteren auch Katechol-enthaltende Liganden wie das Enterobaktin reduzieren. Das Siderophor katalysiert dabei die Reduktion von Cu(II), sodass die Oxidation durch CueO

wesentlich zur Vermeidung der toxischen Cu(I)-ionen beiträgt (Grass *et al.*, 2004). Homologe von CueO mit einem geringen Ähnlichkeitsgrad sind die MKO PcoA aus *E. coli*, CopA aus *Cupriavidus metallidurans*, *Xanthomonas campestris* und aus *Pseudomonas syringae* (Cooksey, 1994; Brown *et al.*, 1995; Djoko *et al.*, 2008). Sie verfügen alle über eine methioninreiche Region (Grass und Rensing, 2001) und sind nicht cytoplasmatisch lokalisiert, sondern werden mittels des *twin arginine translocation systems* (TAT) ins Periplasma transportiert (Outten *et al.*, 2000; Grass und Rensing, 2001b; Bronstein *et al.*, 2005; Frobel *et al.*, 2012). Dieses System transportiert bereits gefaltete Proteine samt ihrer Kofaktoren mittels eines pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran (Sargent, 2007). Die Kupferbeladung dieser Proteine im Cytosol trägt jedoch weniger zur Kupfertoleranz bei, da der Exportmechanismus der ATPasen weitaus effizienter ist und einen wichtigen Beitrag zur cytosolischen Kupferhomöostase leistet (Grass und Rensing, 2001c).

Die Gene *pcoA* und *copA* sind Teil eines plasmidale Kupferresistenz-Operons, *pcoEABCD* in *E. coli* und *copABCD* in *X. campestris* und *P. syringae* (Tetaz und Luke, 1983; Rouch *et al.*, 1985; Cha und Cooksey, 1993; Cooksey, 1993, 1994; Brown *et al.*, 1995; Monchy *et al.*, 2006). Stämme mit dieser genetischen Ausstattung können in kupferreichen Umgebungen überleben, die deutlich über dem Konzentrationsniveau liegen, der von den chromosomal kodierenden Resistenzsystemen toleriert werden kann.

Auf dem Plasmid pRJ1004 von *E. coli* befindet sich die *pco*-Determinante, die für ein Zweikomponenten-Regulationssystem PcoRS, die periplasmatische MKO PcoA, die beiden periplasmatischen Kupferbindeproteine PcoC und PcoE, sowie die membrangebundenen Proteine PcoB (äußere Membran) und PcoD (Cytoplasmamembran) kodiert (Tetaz und Luke, 1983; Rouch *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1995; Rouch und Brown, 1997). PcoC ist ein periplasmatisches Cu(I)-Protein, das an PcoA bindet, das die Kupferoxidation zu dem weniger toxischen Cu(II) katalysiert (Huffman *et al.*, 2002; Djoko *et al.*, 2008). Die *pco*-Determinante zeigt beträchtliche Ähnlichkeit zu dem *cop*-System auf dem Plasmid pPT23D (Cooksey, 1987) von *P. syringae* pv. *tomato* (Mellano und Cooksey, 1988; Mills *et al.*, 1993) und *X. campestris* pv. *juglandis* (Brown *et al.*, 1995) sowie zu äquivalenten Systemen in dem Stamm *C. metallidurans*, die chromosomal oder auf dem Plasmid pMOL30 kodiert sind (Mergeay *et al.*, 2003). Chromosomale Homologe des Plasmid kodierten *cop*-Operons wurden darüberhinaus auch in anderen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien identifiziert und tragen neben der Kupferresistenz auch zur kompetitiven Fitness im Boden bei (Lim und Cooksey, 1993; Yang *et al.*, 1993; Cooksey, 1994; Herzberg *et al.*, 2014). Das *pcoABCD*-System sowie die homologen *cop*-Cluster aus vier strukturellen Genen werden durch einen Kupfer-induzierbaren

Promotor reguliert, der unter der Kontrolle der regulatorischen Gene eines Zweikomponentensystems *pcoR/copR* und *pcoS/copS* steht (Cooksey, 1993; Mills *et al.*, 1993). PcoE, das nur Teil des *pco*-Systems in *E. coli* ist, wird unabhängig von *pcoABCD* transkribiert und hat einen eigenen Kupfer-induzierten Promotor. Die Genprodukte des auf dem Chromosom lokalisierten Zweikomponenten-Regulationssystems CusRS regulieren dabei die Expression des plasmidkodierten *pcoE* (Munson *et al.*, 2000).

In Gegenrichtung zu *cusRS* konnte ein Operon *cusCFBA* identifiziert werden, das für die Proteine eines CBA-Effluxkomplexes kodiert und zur Kupfer- und Silberresistenz (Cu(I), Ag(I)) der *E. coli*-Zellen beiträgt (Franke *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2003). CusA ist ein Vertreter der *resistance nodulation cell division* (RND) *superfamily*, der die Protonentranslokation über die innere Membran an den Export des Substrates koppelt (Saier *et al.*, 1994). CusB, ein Vertreter der *membrane fusion proteins* (MFP) (Saier *et al.*, 1994), stellt die Verbindung zwischen dem in der Cytoplasmamembran lokalisierten RND-Protein CusA und dem *outer membrane factor* (OMF) CusC (Dinh *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2009). Es gibt direkte Hinweise, dass das periplasmatische Kupferbindeprotein CusF mit CusB bzw. CusC interagiert und das Metall so vom Periplasma an den CusCBA-Effluxkomplex transferiert (Franke *et al.*, 2003; Rensing und Grass, 2003; Loftin *et al.*, 2005; Bagai *et al.*, 2008). Bisher ist umstritten, ob der Metalltransfer vom Cytoplasma oder dem Periplasma zum extrazellulären Milieu erfolgt. Studien an divalenten Exporter, wie CzcCBA aus *C. metallidurans* lassen jedoch ein Transport vom Periplasma favorisieren. Dieses RND-System benötigt *cation diffusion facilitators* (CDF-Proteine), wie DmeF oder FieF um divalente Kationen aus dem Cytoplasma ins Periplasma zu transportieren und damit das Substrat für das Czc-System bereitzustellen (Munkelt *et al.*, 2004; Scherer und Nies, 2009). Diese Hypothese wird weiter dahingehend unterstützt, dass ein kupfersensitiver Phänotyp einer Cu(I)-P-Typ ATPasen Deletionsmutante nicht durch das CusCFBA-System ausgeglichen werden kann. Vergleicht man die drei chromosomal oder plasmidalen Kupferresistenzsysteme (PcoEABCD, CusCFBA, CueOCopA) von *E. coli*, so führt die Inaktivierung der Kupfer-P-Typ ATPase CopA zu dem stärksten Verlust der Kupferresistenz (Grass & Rensing, 2001).

P_{IB}-ATPasen transportieren Cu(I)/Cu(II) vom Cytoplasma ins Periplasma und sind daher für Aufrechterhaltung des cytosolischen Kupferlevels essentiell (Rensing *et al.*, 2000; Argüello *et al.*, 2007). Sie sind in allen Lebensformen ubiquitär verbreitet, vom extremophilen Archaea bis hin zum Menschen (Argüello, 2003; Inesi *et al.*, 2014). *Archaeoglobus fulgidis* ist beispielsweise im Besitz von zwei P-Typ ATPasen, die Cu(I) und Cu(II) transportieren können

(Mandal *et al.*, 2002; Argüello *et al.*, 2003; Mana-Capelli *et al.*, 2003), wohingegen *E. coli* nur über CopA, einer Cu(I)-translozierenden P-Typ ATPase verfügt.

Die meisten Bakterien besitzen darüberhinaus über einen geringfügigen Puffer, der Kupfer im Cytosol binden kann, bevor die toxischen Eigenschaften des Metalls den Organismus schädigen können. So scheinen als Kurzzeitpuffer Cu(I)-GSH₂-Komplexe zu existieren, sobald die Zelle einem Übermaß an Kupfer ausgesetzt wird (Osterberg *et al.*, 1979; Ciriolo *et al.*, 1990; Kachur *et al.*, 1998). Diese Komplexe können als Carrier der Cu(I)-ionen beispielsweise die Cu-Zn-SOD von Hepatoma-Zellen mit dem Kofaktor beladen (Freedman *et al.*, 1989; Ciriolo *et al.*, 1990; Ascone *et al.*, 1993) und schützen die Zellen vor Schäden, die sich aus der Bindung freier Kupferionen an essentiellen Biomolekülen und/oder aus der Katalyse freier Radikale bei erhöhten Kupferkonzentrationen ergeben würden (Kadiiska und Mason, 2002; Letelier *et al.*, 2005; Speisky *et al.*, 2009). Zusätzlich können Metall-Chaperone zur Mobilisierung und Speicherung von Spurenelementen beitragen. Für Kupfer-Chaperone konnte von Palumaa (2013) gezeigt werden, dass sie am Efflux und an der Insertion von Kupfer in Cu-Zn-SOD beteiligt sind (Palumaa, 2013). Die Kupferdetoxifizierung des Cytoplasma erfolgt in *Bacillus subtilis* durch das Kupferchaperon CopZ und die ATPase CopA. CopZ bindet Kupferionen und transportiert sie zu CopA, wo es in dessen Folge zur Ausbildung eines Heterodimers kommt. In diesem Konformationszustand werden die Kupferionen von CopZ auf die Metallbindestellen MxCxxC von CopA übertragen und anschließend so aus dem Cytoplasma transportiert (Banci *et al.*, 2001; Banci *et al.*, 2003). Ein ähnlicher CopZ-vermittelter Efflux konnte auch in *A. fulgidis* beschrieben werden (Gonzalez-Guerrero und Argüello, 2008a; Chan *et al.*, 2010; Padilla-Benavides *et al.*, 2013; Padilla-Benavides *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu Kupfer gehört Gold zu den zehn seltenen Elementen der Erdkruste (Allegre *et al.*, 2001). Die durchschnittliche Goldkonzentration in Wasser liegt bei 1-5 ppt oder ng/l und kann mehr als 100 ppb in Böden an goldhaltigen Standorten erreichen (Reith *et al.*, 2007; Williams-Jones *et al.*, 2009). Unter reduzierenden Bedingungen bindet Gold vorzugsweise an organischem Schwefel, wohingegen unter oxidierenden Bedingungen eine Interaktion mit organischen Stickstoff und Kohlenstoff stattfindet (Vlassopoulos *et al.*, 1990). Es bildet keine freien Ionen in wässrigen Lösungen und kommt daher in der Natur hauptsächlich in Form von Au(I)- oder Au(III)-Komplexen vor (Vlassopoulos *et al.*, 1990; Shaw, 1999; Williams-Jones *et al.*, 2009). Gold(I) ist ein Weichmetall mit einem kovalenten Radius von 134 pm und einer Elektronegativität von 1,42 und damit den Eigenschaften von Ag(I) sehr ähnlich, jedoch zu denen von Cu(I) mit einem Radius von 117 pm und einer Elektronegativität von 1,75

verschieden (Emsley, 1989). Gold, Kupfer wie auch Silber besitzen jedoch die gleiche Kernladung mit der Abschirmungskonstante S von 4,20 Slater, weshalb vermutet wird, dass sie sich gegenseitig in der Metallbinderegion nachahmen können (Stoyanov und Brown, 2003a). Es wird angenommen, dass Gold unter reduzierenden Bedingungen, wie sie im Cytoplasma der Zellen vorherrschen, hauptsächlich als Au(I) vorzufinden ist (Checa und Soncini, 2011). Wie die freien Schwermetallionen sind auch die relevanten Au(I)/Au(III)-Komplexe für Mikroorganismen toxisch. Die Toxizität von Gold erklärt sich durch die chemische Modifikation oder das Ersetzen essentieller Metalle in Enzymen (Shaw, 1999; Reith *et al.*, 2007). Als Folge kommt es zur Inhibierung der funktionellen Enzyme, zur Disruption des Redoxgleichgewichtes und zur Erhöhung der Zellpermeabilität, was zum Zelltod führen kann (Witkiewicz und Shaw, 1981; Karthikeyan und Beveridge, 2002; Reith *et al.*, 2009). Ein anderer Grund der Toxizität liegt in der Erzeugung von oxidativen Stress, der mit der Bildung von freien Radikalen einhergeht, die zur Schädigung der zellulären DNA führten (Reith *et al.*, 2013; Wiesemann *et al.*, 2013).

Wie Quecksilber, Blei oder Silber übernimmt auch Gold keine wichtige physiologische Funktion. Das membrangebundene Enzym NADH-Oxidase aus *Micrococcus luteus* ist bisher das einzige Enzym, das Gold für seine funktionelle Rolle während der Oxidation von Methan benötigen könnte (Levchenko *et al.*, 2000; Levchenko *et al.*, 2001, 2002). Der Organismus selbst kommt in Schlick-enthaltenen Sedimenten an Goldminen vor, in denen Methan aus dem anaeroben Prozess der Methanogenese gebildet wird (Levchenko *et al.*, 2002). Methan kann als zusätzliche Energiequelle in dieser Umgebung dienen, in der der Gehalt an schnell verfügbaren organischen Komponenten im Boden limitierend ist. Mit Hilfe der Gaschromatographie konnte gezeigt werden, dass aus Gold-enthaltener Oxidase und Methan zur Hälfte Methanol und andere Oxidationsprodukte wie Formaldehyd entstehen (Levchenko *et al.*, 2001, 2002). Steht dem Bakterium kein Gold im Medium zur Verfügung, d.h. keine Gold-beladene Oxidase ist vorhanden, so kommt es auch nicht zur Veränderung der Methankonzentration (Levchenko *et al.*, 2001, 2002). Diese Daten müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da in keiner der Publikationen die direkte Bindung von Gold an das Protein beispielsweise durch ITC-Messungen oder ein Proteingel des gereinigten Proteins gezeigt worden ist.

Es gibt nun eine Reihe von Bakterien und Archaea, die Gold aus Au(I)/Au(III)-Lösungen präzipitieren können (Lovley, 1993; Lovley *et al.*, 1993; Southam und Beveridge, 1994; Kashefi *et al.*, 2001; Reith *et al.*, 2006; Lengke *et al.*, 2006a; Nangia *et al.*, 2009; Reith *et al.*, 2009; Focsan *et al.*, 2011). Sie verfügen diesbezüglich über unspezifische und spezifische intra- und extrazelluläre Mechanismen. (Checa *et al.*, 2007; Reith *et al.*, 2009). So haben Bakterien

wie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Delftia acidovorans* und *C. metallidurans*, biochemische Antworten entwickelt, um mit hohen toxischen Goldkomplexen umgehen zu können (Reith *et al.*, 2009; Checa und Soncini, 2011; Johnston *et al.*, 2013; Wiesemann *et al.*, 2013).

Salmonella verfügt über Proteine, die ihm erlauben Goldkomplexe in der Umgebung wahrzunehmen und mit einer entsprechenden Resistenzantwort zu reagieren. Das Proteinset besteht aus einer P-Typ ATPase GolT und einem kleinen cytoplasmatischen Metallbindeprotein GolB, deren Expressionen durch ein goldspezifisches MerR-Sensorprotein GolS kontrolliert werden (Checa *et al.*, 2007; Pontel *et al.*, 2007; Checa und Soncini, 2011; Pontel *et al.*, 2014). MerR-Regulatoren können auf vielfältige Stresssignale reagieren, wie auf aromatischen und organischen toxischen Komponenten, Schwermetallen und auf oxidativen Stress (Brown *et al.*, 2003; Hobman *et al.*, 2005). Der *golTSB*-Locus ist auch in anderen *Salmonella* Subspezies gegenwärtig, wie *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*, fehlt jedoch in dieser Anordnung in *Salmonella enterica* serovar Paratyphi oder in Bakterien wie *E. coli* oder *Shigella* (Espariz *et al.*, 2007). Neben der Regulation der P-Typ ATPase GolT und des Metallchaperons GolB kontrolliert der Regulator auch das *gesABC*-Operon, welches für ein CBA-Effluxsystem kodiert. Es wird in entgegengesetzter Richtung zum *golTS*-Operon transkribiert und scheint für die Goldresistenz entscheidend zu sein, indem es Metallionen aus dem Cytoplasma, der inneren Membran oder dem Periplasma in den extrazellulären Raum transportiert (Checa *et al.*, 2007; Perez Audero *et al.*, 2010; Checa und Soncini, 2011). Beide Systeme werden nur durch Gold und nicht durch Kupfer oder Silber induziert. Die transkriptionelle Aktivierung des *gesABC*-Operons unterscheidet sich von den anderen beiden GolS-kontrollierten transkriptionellen Einheiten dahingehend, dass deutlich höhere Goldkonzentrationen für die Aktivierung erforderlich sind (Pontel *et al.*, 2007; Checa und Soncini, 2011). Die Deletion des *gesABC*-Systems oder des gesamten *gol*-Locus führt zu einem goldsensitiven Phänotyp (Checa *et al.*, 2007; Pontel *et al.*, 2007).

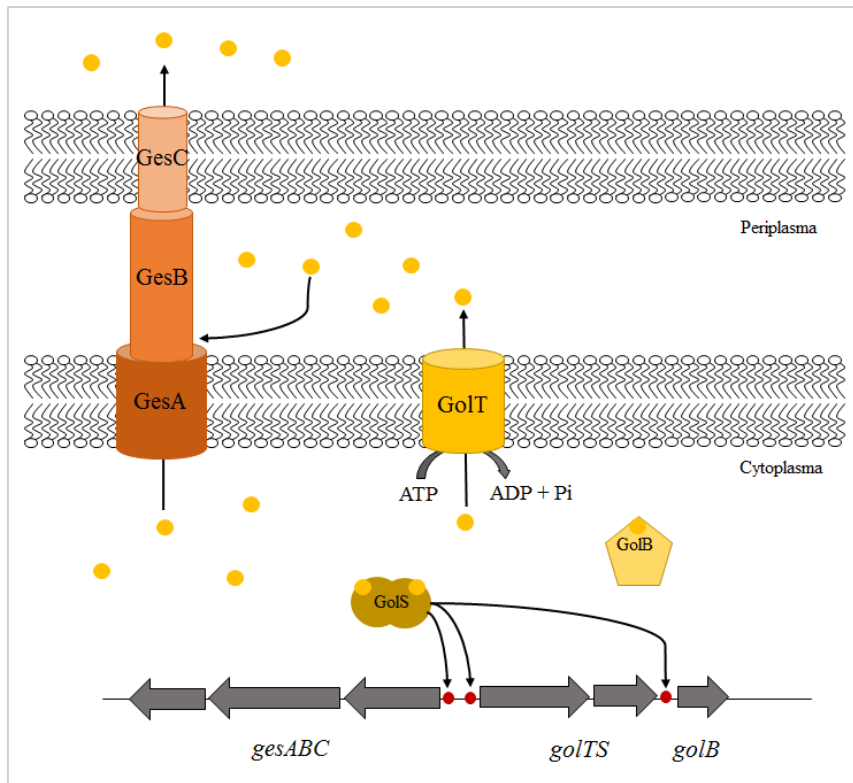


Abb. 1: Das *gol*-Regulon von *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 (modifiziert nach Checa *et al.*, 2011, Pontel *et al.*, 2007). In Gegenwart von mikromolaren Goldkonzentrationen induziert der MerR-Regulator GoS die Transkription seines eigenen Gens sowie der Gene, die für die P-Typ ATPase GoIT und das Metallchaperon GoB kodieren, um freie Goldionen aus dem Cytoplasma zu entfernen. Der Anstieg an GoS und die einhergehende Bindung von Gold tragen zur Reduktion der intrazellulären Konzentration an freien Gold bei. Erst bei längerer Metallexposition oder dem Einsatz höherer Konzentrationen scheint die intrazelluläre Akkumulation von GoS den Schwellenwert zu erreichen, der für die Erkennung des *gesABC*-Operators erforderlich ist und induziert seine Transkription. Das GesABC-System trägt direkt zur Detoxifizierung von Gold aus dem Cytoplasma oder dem Periplasma bei.

Während eine direkte Verbindung von *Salmonella* an goldhaltigen Standorten nicht gezeigt wurde, konnten die β -Proteobakterien *D. acidovorans* und *C. metallidurans* als dominante Organismen der bakteriellen Biofilme auf den Goldnuggets in Australien identifiziert werden (Reith *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2010; Reith *et al.*, 2012). Die Existenz solcher Biofilme und die Entdeckung von bakteriellen Gold lassen eine Beteiligung der Bakterien an der Bildung sekundären Goldes vermuten (Reith *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2007; Reith *et al.*, 2009; Reith *et al.*, 2010).

D. acidovorans sekretiert ein nicht-ribosomales Peptid Delftibactin A um die Au(III)-Toxizität durch die Bildung extrazellulärer Nanopartikel zu reduzieren (Johnston *et al.*, 2013). Es komplexiert Gold und reduziert es durch eine oxidationsempfindliche Aldehydgruppe im Delftibactin A Molekül zu der elementaren Form im extrazellulären Raum. Die Enzyme für die Produktion dieses Siderophors werden auf einem Gencluster kodiert, das als *del*-Cluster bezeichnet wird und aus 21 Genen besteht. Es enthält unter anderem 3 nichtribosomale

Peptidsynthetasen (DelE, DelG, DelH) und eine Polyketidsynthetase (DelF), die für dessen Produktion essentiell sind (Johnston *et al.*, 2013). Das auffälligste Merkmal dieser nicht-ribosomalen Synthetasen ist ihre Fähigkeit weit mehr als 21 allgemeine Aminosäuren in Peptide zu integrieren. Sie nutzen hierfür zahlreiche modifizierte und auch nicht-proteinogene Aminosäuren, um Peptide mit unterschiedlichen Funktionen zusammenzubauen (Caboche *et al.*, 2010; Strieker *et al.*, 2010). Die verbleibenden Enzyme des Delftibactin-Syntheseweges werden für die Reifung oder für die Modifikation nach der Synthese benötigt.

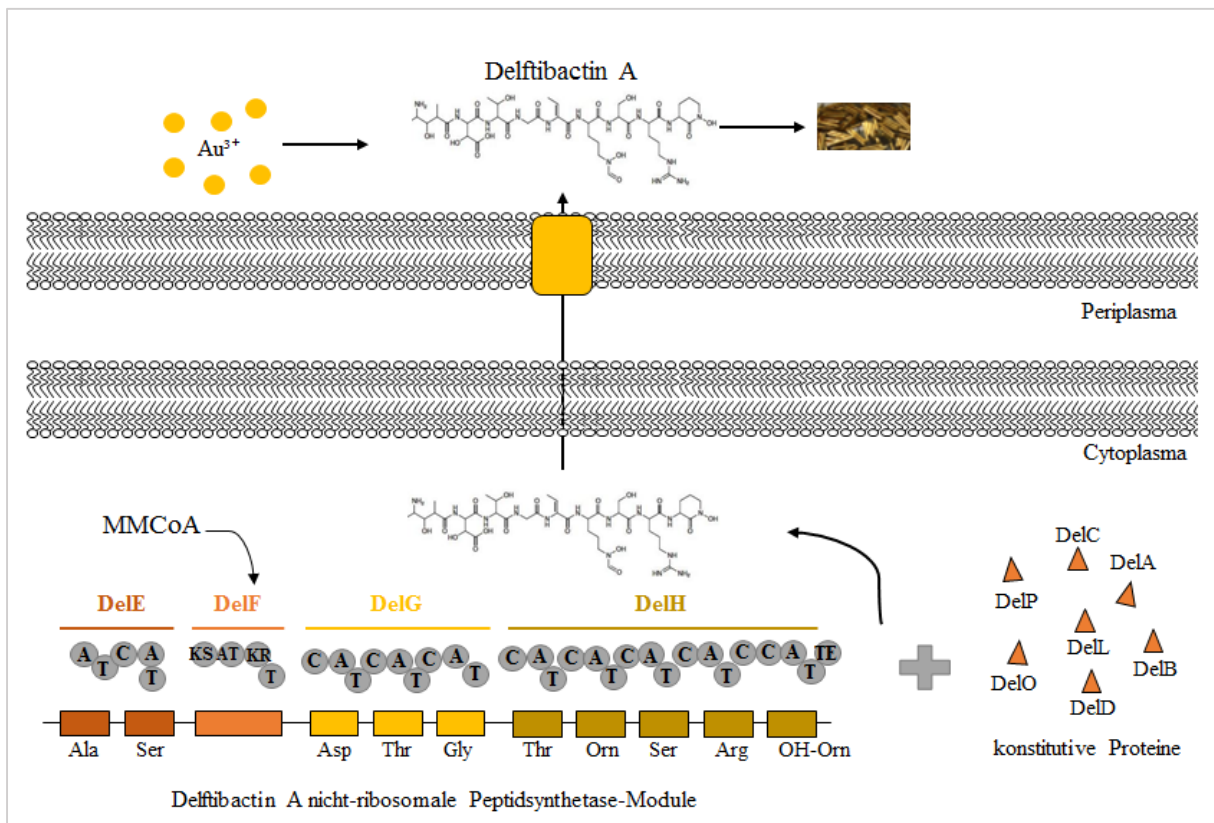


Abb. 2: *D. acidovorans* verwendet Delftibactin A um Au(III)-ionen im extrazellulären Raum zu elementaren Au(0) zu reduzieren (Johnston *et al.*, 2013). Die Proteine DelE, DelG, DelH und DelF fungieren als nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) bzw. Polyketidsynthetase (PKS) und sind für die Delftibactin A-Synthese verantwortlich. NRPs und PKS sind aus Modulen aufgebaut, die aus unterschiedlichen Domänen bestehen: Adenylierungs (A)-, Peptidyl-Carrier-Protein (T)-, Kondensations (C)-, Ketosynthase (KS)-, Acyltransferase (AT)-, Ketoreduktase (KR)- und die Thioesterasedomäne (TE). DelF benötigt Methylmalonyl-CoA als Substrat. Daneben gibt es weitere Enzyme, die für die Synthese, Reifung oder Modifikation verantwortlich sind. DelA: MbtH-ähnliches Protein für die effiziente Delftibactin-Synthese, DelB: Thioesterase, DelC: 4-phosphoanteinyl-Transferase wird für die Reifung der Acyl-Carrier Protein-/Peptidyl-Carrier Protein-Untereinheiten benötigt, DelD: Taurindioxygenase, DelF: Ornithin N-monooxygenase, DelP: N5-hydroxyornithin Formyltransferase.

Das Gram-negative β -Proteobakterium *C. metallidurans* CH34, früher *Wautersia metallidurans*, *Ralstonia metallidurans* und *Alcaligenes eutrophus*, ist angepasst an ein Habitat mit hohen Schwermetallkonzentrationen (Goris *et al.*, 2001; Vandamme und Coenye, 2004; Vaneechoutte *et al.*, 2004) und konnte ebenfalls auf Goldnuggets identifiziert werden (Reith *et*

al., 2006). Die Schwermetallresistenz von *C. metallidurans* CH34 wird durch eine Vielzahl von Resistenzsystemen vermittelt, die auf den beiden Chromosomen sowie den Megaplasmiden pMOL28 und pMOL30 lokalisiert sind (von Rozycki und Nies, 2009; Janssen *et al.*, 2010). Insbesondere vermitteln die auf den Plasmiden kodierenden Systeme eine hohe Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Schwermetallkationen. So befinden sich Resistenzen gegen Co(II), Zn(II) und Cd(II) auf pMOL30 (Nies und Silver, 1989b), gegen Co(II), Ni(II) (Collard *et al.*, 1994; Taghavi *et al.*, 1997; Monchy *et al.*, 2007) und Cr(II) auf pMOL28 (Mergeay *et al.*, 2003). Eine Resistenz gegen Quecksilber wird durch die Transposons *Tn4378* (pMOL28) und *Tn4380* (pMOL30) vermittelt (Diels *et al.*, 1985).

Der Organismus kann Au(I)/Au(III)-Komplexe aus der Lösung innerhalb einer Minute (<1 min) akkumulieren, gefolgt von der Reduktion zu Au(I)-Komplexen, die an Schwefel-enthaltenden Komponenten gebunden sind, und zu elementarem Gold (Reith *et al.*, 2009). Die metabolisch aktiven Zellen reagieren auf die Goldtoxizität durch Hochregulation von Genen, die an oxidativen Stress und an der Metallresistenz beteiligt sind. Ausgehend von diesen Daten wurde postuliert, dass es spezifische Goldsysteme in *C. metallidurans* geben muss, die an der Aufnahme der Goldkomplexe ins Cytoplasma, dem Export der Au(I)-Ionen nach Reduktion ins Periplasma sowie der weiteren chemischen Reduktion zu elementarem Gold im Periplasma beteiligt sein müssen (Reith *et al.*, 2009).

Ziel der Arbeit bestand nun darin, die Resistenzsysteme zu identifizieren, die für die Goldresistenz bzw. die Goldbiomineralisierung benötigt werden. Im Vorfeld einer Diplomarbeit wurden hierzu bereits erste Gene deletiert, die in Microarray Analysen durch Goldinkubationen hochreguliert wurden (*gig*-cluster: *gold-induced gene cluster*; *cupRAC*-Locus mit einer großen Homologie zum *golSTB*-Locus aus *S. enterica* sv. Typhimurium) (Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013).

Die stärkste Induktion zeigte das Gencluster Rmet_4682-4687, das als Divergon aufgebaut ist und als goldinduziertes Cluster bezeichnet ist (Reith *et al.*, 2009, Wiesemann *et al.*, 2013). Da es sich um Gene unbekannter Funktion handelt, finden im Folgenden die Gennamen *gigPABT* nach Wiesemann *et al.*, (2013) Anwendung und die Rmet-Nummern bei Genbezeichnungen sind nicht kursiv dargestellt. In der einen Orientierung befinden sich vier Strukturgene, die für die putative kleine Untereinheit einer Thiosulfat-Quinon-Oxidoreduktase GigT (Rmet_4682), ein Thioredoxin-ähnliches Faltungsprotein GigB (Rmet_4683), sowie zwei hypothetischen Proteinen GigA (Rmet_4684) und GigP (Rmet_4685) kodieren. In entgegengesetzter Orientierung sind die Gene des putativen Sigma-Faktors RpoQ (Rmet_4686), der zu den

extracytoplasmic function (ECF)-Sigmafaktoren zählt (Grosse *et al.*, 2007) und seines putativen Anti-Sigma-Faktors (Rmet_4687) lokalisiert.

Nach Inkubation mit Au(I), Au(III), Cu(II) und Ag(I) konnte eine Induktion der β -Galaktosidaseaktivität der *lacZ*-Reportergenfusionen der Gene des *cup*-Locus, des *gig*-Operons sowie des Sigmafaktors *rpoQ* festgestellt werden (Wiesemann *et al.*, 2013). Die Deletionen dieser hatten jedoch keine Auswirkungen auf das Wachstum unter der Zugabe von Au(I), Au(III) und Ag(I). Jedoch führte die Deletion des *cup*-Clusters sowie die von *rpoQ* und die Doppeldeletion von *rpoQ* und des Anti-Sigmafaktors zu einem Resistenzverlust gegenüber Cu(II).

Im Folgenden sollten weitere hochregulierte Gene deletiert bzw. disruptiert werden, um deren Einfluss auf die Goldresistenz bzw. Goldbiomineralisierung zu analysieren. Desweiteren sollte die Beteiligung der Plasmide (pMOL28, pMOL30) an diesen Mechanismen näher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide.

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Cupriavidus metallidurans</i>			
CH34	pMOL28 pMOL30	<i>cnr, chr</i> <i>czc, mer, cop, pbr</i>	(Mergeay <i>et al.</i> , 1985)
AE104	plasmidfrei		(Mergeay <i>et al.</i> , 1985)
AE126	pMOL28	<i>cnr, chr</i>	(Mergeay <i>et al.</i> , 1985)
AE128	pMOL30	<i>czc, mer, cop, pbr</i>	(Mergeay <i>et al.</i> , 1985)
DN486	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta rpoJ$	(Grosse <i>et al.</i> , 2007)
DN488	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta rpoI$	(Grosse <i>et al.</i> , 2007)
DN490	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta rpoK$	(Grosse <i>et al.</i> , 2007)
DN648	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta cupAR$	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN649	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta cupCAR$	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN653	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta copF$	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN779	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta rdxI$	diese Arbeit
DN654	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta cupCAR \Delta copF$	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN763	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta cupCAR \Delta rdxI$	diese Arbeit
DN764	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta copF \Delta rdxI$	diese Arbeit
DN765	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta cupCAR \Delta copF \Delta rdxI$	diese Arbeit
DN685	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; $\Delta copABCD$	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1:

DN689	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; Disruption <i>merA4::pECD794-1</i>	diese Arbeit
DN691	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; Disruption <i>arsC1::pECD794-1</i>	diese Arbeit
DN693	pMOL28 pMOL30	Derivat von CH34; Disruption <i>arsC2::pECD794-1</i>	diese Arbeit
DN655	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcupAR</i>	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN656	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcupCAR</i>	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN760	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔrdxI</i>	diese Arbeit
DN766	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcupAR ΔrdxI</i>	diese Arbeit
DN767	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcupAR ΔctpA1</i>	diese Arbeit
DN768	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcupAR ΔrdxI ΔctpA1</i>	diese Arbeit
DN657	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔRmet_4682-4685 (ΔgigPABT)</i>	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN658	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔrpoQ</i>	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN659	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔrpoQ</i>	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
DN686	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcopABCD</i>	diese Arbeit
DN729	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcusCFBA</i>	diese Arbeit
DN515	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔzupT</i>	(Kirsten <i>et al.</i> , 2011)
DN681	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcorA1-3 ΔzupT ΔpitA ΔzntB ΔhoxN</i>	Promotionsarbeiten Martin Herzberg
DN687	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔcorA1-3 ΔzupT ΔpitA ΔzntB ΔhoxN ΔcupCAR</i>	diese Arbeit
DN710	plasmidfrei	Derivat von AE104; <i>ΔgshA</i>	diese Arbeit
DN690	plasmidfrei	Derivat von AE104; Disruption <i>merA4::pECD794-1</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1:

DN692	plasmidfrei	Derivat von AE104; Disruption <i>arsC1::pECD794-1</i>	diese Arbeit
DN694	plasmidfrei	Derivat von AE104; Disruption <i>arsC2::pECD794-1</i>	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>			
W3110	plasmidfrei	<i>E. coli</i> Wildtyp	(Mosteller und Goldstein, 1975)
XL1-Blue	plasmidfrei	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac [F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10 (tet^R)]</i>	(Bullock, 1987), Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21	pLysS	<i>F' dcm, omp, hsdS, (r_B⁻ m_B⁻), lon⁻, galλ, DE3, (pLysS, cm^R), Überexpressionsstamm für <i>Strep-tag@II</i>-System</i>	Stratagene GmbH, Heidelberg
S17/1	plasmidfrei	<i>pro, Tra⁺ recA</i>	(Simon, 1984)
ECA483	pECD1003	<i>lacZ, sacB, (km^R, tet^R, amp^R), Derivat von pCM184 (Rekombinationsvektor <i>cre-lox</i>-System) mutierte <i>loxP₆₆</i> & <i>loxP₇₁</i></i>	(Scherer und Nies, 2009)
VS218	pCM157	Expressionsvektor für die <i>Cre</i> -Rekombinase des <i>cre-lox</i> -Systems (tet ^R)	(Marx und Lidstrom, 2002)
VS224	pBBR1-MCS2	RK2 <i>lacZ'</i> Mob ⁺ , km ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
VS585	pECD794-1	pLO2:: <i>lacZ</i> für <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusion in <i>C. metallidurans</i> , km ^R	(Scherer und Nies, 2009)
ECA643	pECD1118	pECD1003-Konstrukt für <i>cupCAR</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
ECA945	pECD1369	pECD1003-Konstrukt für <i>rdxI</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System	diese Arbeit
ECA946	pECD1370	pECD1003-Konstrukt für <i>ctpA1</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System	diese Arbeit
ECA869	pECD1294	pECD1003-Konstrukt für <i>copABCD</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System	diese Arbeit
ECA870	pECD1295	pECD1003-Konstrukt für <i>cusCFBA</i> -Deletion mittels <i>cre-lox</i> -System	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 1:

ECA635	pECD1110	<i>cupA</i> in pECD794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
ECA638	pECD1113	Rmet_4682 in pECD794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
ECA954	pECD1378	<i>gshB</i> in pECD794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion	diese Arbeit
ECA961	pECD1385	<i>copD</i> in pECD794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion	diese Arbeit
ECA962	pECD1386	<i>cusF</i> in pECD794-1 für Operon- <i>lacZ</i> -Fusion	diese Arbeit
ECA807	pECD1232	<i>merA4</i> in pECD794-1, Disruption	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
ECA808	pECD1233	<i>arsC1</i> in pECD794-1, Disruption	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
ECA809	pECD1234	<i>arsC2</i> in pECD794-1, Disruption	(Wiesemann <i>et al.</i> , 2013)
	pASK-IBA3plus	Expressionsvektor mit C-terminalen <i>Strep</i> -tag®II,amp ^R	IBA-GmbH, Göttingen
	pASK-IBA7	Expressionsvektor mit N-terminalen <i>Strep</i> -tag®II,amp ^R	IBA-GmbH, Göttingen
ECA717	pECD1168	<i>cupA</i> als <i>EcoRI/SalI</i> Fragment ohne Promotor-Region kloniert hinter <i>tet</i> -Promotor, pASK-IBA7 Derivat (N-terminaler <i>Strep</i> -tag®II) amp ^R	diese Arbeit
ECA805	pECD1230	<i>gshA</i> mit Promotorregion als <i>SacII/EcoRI</i> -Fragment in pASK-IBA3plus kloniert, hinter <i>tet</i> -Promotor, pASK-IBA3plus Derivat (C-terminaler <i>Strep</i> -tag®II) amp ^R	diese Arbeit
ECA806	pECD1231	<i>gshA</i> mit Promotorregion und C-terminalem <i>Strep</i> -tag®II in pBBR1-MCS2 kloniert, km ^R	diese Arbeit
	pGEM®-T Easy	<i>lacPOZ</i> , Klonierungsvektor für PCR-Produkte amp ^R	Promega, Madison (USA)

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien und Zusätze für Bakterien

A) Nährbouillon (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

8 g Nährbouillon ad 1 l H₂O_{bidest.}

Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *C. metallidurans*-Stämmen.

B) Nähragar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

23 g Nähragar ad 1 l H₂O_{bidest.}

Dieses Festmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*- und *C. metallidurans*-Stämmen in den Konjugationsexperimenten.

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

20 g ad 1 l H₂O_{bidest.}

Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

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

35 g ad 1 l H₂O_{bidest.}

Dieses Festmedium diente der Zellanzucht von *E. coli*-Stämmen.

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

20 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 ml 0,25 M KCl

NaOH ad pH 7,0

ad 1 l H₂O_{bidest.}

SOB-Medium wurde zur Anzucht von elektrokompentenen *E. coli*-Zellen eingesetzt. Nach der Elektroporation wurde zu den Zellen SOC-Medium hinzugegeben, das sich aus SOB-Medium, 5 µl/ml 1 M MgSO₄ und 20 µl/ml 1 M Glucose zusammensetzt.

F) Spurenelementlösung SL6 (10-fach) nach (Pfennig, 1974)

0,10 g ZnSO₄ x 7 H₂O
0,03 g MnCl₂ x 4 H₂O
0,30 g H₃BO₃
0,20 g CoCl₂ x 6 H₂O
0,01 g CuCl₂ x 2 H₂O
0,188 g NiCl₂ x 6 H₂O
0,03 g Na₂MO₄ x 2 H₂O
ad 1 l H₂O_{bidest.}

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

Komponente A (20-fach):

800 ml H₂O_{bidest.}
121,1 g Tris-HCl
HCl ad pH 7,0
danach Zugabe von:
93,6 g NaCl
29,8 g KCl
21,4 g NH₄Cl
4,0 g MgCl₂ x 6 H₂O
0,60 g CaCl₂ x 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 x 2 H₂O
ad 1 l H₂O_{bidest.}

Die Komponenten A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Für die aerobe Kultivierung von *E. coli* wurden 3 g/l Casaminosäurenhydrolysat und 20 g/l Glycerin zugesetzt und autoklaviert. Als Kohlenstoffquelle für die Anzucht von *C. metallidurans* wurden 2 g/l Natriumgluconat zugesetzt. Für Tris-Minimal-Festmedien wurden zusätzlich vor dem Autoklavieren 20 g/l BactoTM-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt.

H) Medienzusätze

Schwermetallsalze

Die Schwermetallsalze AgNO_3 , CoCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 , $\text{Na}_3\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und NaAuCl_4 lagen als 0,1 M, 0,5 M oder 1 M wässrige Stammlösungen vor, die durch Filtration sterilisiert wurden. Die Stammlösungen wurden in sterilem Medium auf die beschriebene Endkonzentration verdünnt.

Antibiotika

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

Tab. 2: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen im Medium.

Antibiotika/Mediumzusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	125 mg/l
Chloramphenicol	15 mg/ml 96 % Ethanol	15 mg/l
Gentamycin	15 mg/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	15 mg/ml
Kanamycin	25 mg/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	50 mg/l (<i>E. coli</i>) 1,5 g/l (<i>C. metallidurans</i>)
Tetracyclin	12,5 mg/ml 50 % Ethanol	12,5 mg/l
AHT	10 mg/ml DMF	200 $\mu\text{g/l}$

weitere Medienzusätze

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

IPTG lag als wässrige Stammlösung von 40 mg/ml vor und wurde in einer Endkonzentration von 40 mg/l den sterilen Medien zugesetzt. X-Gal wurde in 48 mg/ml in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Die Endkonzentration im Medium betrug 48 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.2 Anzucht, Induktion und Zellernte

A) *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in NB- oder LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Medienzusätze in den beschriebenen Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben, Schikanekolben,

Seitenarmkolben und 24well- bzw. 96well-Mikroplatten, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C bzw. 37°C in schräg eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (HS500, IKA Labortechnik) oder auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200-250 rpm, in einem neoLab Shaker DTS-2 (neoLab, Heidelberg) bei 1300 rpm oder für Wachstumsversuche im TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) bei 1300 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀, OD₅₀₀) mit einem Spektrophotometer SmartSpec™3000, (BIORAD, München oder Amsterdam) oder dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Switzerland) gegen unbeimpftes Medium gemessen.

Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 37°C im Brutraum für 16-24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation in der Sorvall RC5 (Fisher Scientific, Schwerte) mit 20200 g bei 4°C, der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (4500 g, 15 min, 4°C) bzw. 5417R (Eppendorf, Hamburg) mit 10500 g für 30 min bei 4°C oder in der Sigma Tischzentrifuge (Laborzentrifugen GmbH, Osterode) mit 10500 g bei Raumtemperatur.

B) *C. metallidurans*

Die Anzucht von *C. metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-Minimalmedium (Tris-MM), dem als einzige Kohlenstoffquelle 2 g/l Natriumgluconat zugesetzt wurde. Als Kulturgefäße für die Anzucht dienten sterile Erlenmeyerkolben, Seitenarmkolben, 55 ml Reagenzgläser (25 mm Durchmesser, Clark Scientific LTD) und 48well- bzw. 96well-Mikroplatten. Dabei wurde ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 eingehalten, um eine optimale Sauerstoffzufuhr für die obligat aeroben Zellen zu gewährleisten. Die Zugabe der Medienzusätze erfolgte in den beschriebenen Konzentrationen (s. 2.2.1). Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz oder IKA-Schüttler HS500, IKA-Labortechnik, Staufen) in einem Wasserschüttler (HAT, Infor AG, Bottmingen, Schweiz), dem neoLab Shaker DTS-2 (neoLab, Heidelberg) oder für Wachstumsversuche im TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) angezogen. Das Zellwachstum wurde zum einen mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Switzerland) gemessen oder mit einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., USA) in Klett-Einheiten (KE) verfolgt. Dabei wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, da er im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) das meiste Licht transmittiert. Zur Kalibrierung der Skala wurde unbeimpftes Medium verwendet. Der Vorteil der Messung von Kletteinheiten besteht darin, dass durch die Verwendung von

Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probenentnahme zur Messung notwendig ist und somit eine Kontamination der Kulturen vermieden wird. Die Zellernte erfolgte entweder durch Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) für 30 min, 4500 g bei 4°C, in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R für 10 min bei 4°C und 10500 g oder durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und Raumtemperatur in der Sigma-Tischzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode).

2.2.3 Stammhaltung

Die Kultivierung der *C. metallidurans*-Stämme erfolgte auf Tris-MM-Agarplatten. Zur Kultivierung der megaplasmidtragenden Stämme, des Wildtyp-Stammes CH34 sowie dessen Derivate AE126 und AE128, wurde den Agarplatten NiCl₂ bzw. ZnCl₂ in der Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Bei der Insertion von Antibiotika-Resistenzkassetten in das bakterielle Genom bzw. auf ein Plasmid wurde das entsprechende Antibiotikum zur Selektion eingesetzt (s. 2.2.1). Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so dass zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand.

Die *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum entsprechender Konzentration kultiviert. Die Stämme wurden alle vier bis fünf Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 37°C wurden alle Platten im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Um einer Kontamination der Stämme vorzubeugen, wurden alle Stämme mit neu konstruierten Plasmiden sowie die Stämme, mit denen ständig gearbeitet wurde, in Glycerinkulturen bei -80°C aufbewahrt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Glycerin (Endkonzentration 20 % [v/v]) versetzt.

2.3 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.3.1 Isolierung von DNA

Da es für die Arbeit mit DNA erforderlich war, vorhandene DNasen zu inaktivieren, wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen vor Beginn der Versuche bei 121°C autoklaviert. Hitzeinstabile Geräte wurden mit 70%igem Ethanol abgerieben, hitzelabile Lösungen filtersterilisiert.

2.3.1.1 Isolation genomischer DNA mittels *Spin* Säule (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Diese Methode diente zur Gewinnung genomischer DNA, die für Southern Hybridisierungsexperimente und als *template* für PCR-Amplifikationen eingesetzt wurde. 700 µl einer Vorkultur von *C. metallidurans* wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 10500 g pelletiert. Die anschließende Isolation der Gesamt-DNA erfolgte nach dem Isolierungsprotokoll des Herstellers. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit 70°C erhitztem H₂O_{bidest.} eluiert. Die anschließende Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.1.2 Plasmidisolation mittels *Spin* Säule (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung, zur präparativen Restriktion und zur Transformation eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H₂O_{bidest.} eluiert. Es wurden 4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 10500 g pelletiert (Sigma 1-14, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte unter Verwendung des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.2 DNA-Techniken

2.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern (Easy Cast™ Elektrophoresis System). Dabei variierte die Gelkonzentration von 8 g/l bei großen Fragmenten bis zu 20 g/l bei kleinen Fragmenten. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA [pH 8,0]) eingesetzt. Die Agarose wurde dem Puffer zugegeben und in der Mikrowelle (TechnoStar) gelöst. Anschließend wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung 0,5 g/l Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. Stopp-Lösung (40 % [v/v] Glycerin, 0,1 g/l SDS, 0,1 M EDTA, 2,5 g/l BPB) versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-20 µl (analytische Gele) bzw. 20-50 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (Biometra®, Göttingen bzw. Pharmacia Biosystems, Freiburg) bis die Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (UV-Transilluminator, INTAS UV-

Systeme), die Dokumentation mittels der dazugehörigen Bild-Aufnahme-Software (INTAS UV-Systeme).

2.3.2.2 DNA-Größenstandard

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

2.3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Fragmenten erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität von mit Ethidiumbromid markierten DNA-Proben mit DNA-Fragmenten bekannter Konzentration (DNA-Größenstandard) im Agarosegel. Dies war vor allem für Restriktionsansätze wichtig. Die Konzentrationsbestimmung für Ligationen erfolgte durch direkten Vergleich der miteinander zu ligierenden Fragmente.

2.3.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0,1 Vol. des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10-fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Für eine vollständige Restriktion wurden pro µg DNA 2 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h, oder über Nacht, bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37°C spaltet.

2.3.2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

Die Reinigung der DNA erfolgte über das *GeneJETTM PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silikat-Gel-Membran, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift, erfolgte die Elution der DNA mit 30-50 µl sterilem H₂O_{bidest.}. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment rasch aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) wurde die DNA mit 30-50 µl sterilem H₂O_{bidest.} eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:3. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem H₂O_{bidest.} versetzt und zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2-3 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Es folgte eine Inkubation des Ligationsansatzes über Nacht bei 4°C.

Die Ligation von PCR-Produkten in pGEM[®]-T Easy wurde in einem 10 µl Ansatz durchgeführt. Hierzu wurde ungeschnittenes, gereinigtes PCR-Fragment eingesetzt und auf Eis zusammen mit 1 µl Vektor-DNA, 5 µl 2 x Ligationspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (Promega GmbH, Mannheim) sowie 3 µl gereinigtes PCR-Produkt pipettiert. Der pGEM[®]-T Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C bzw. für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.3.1 Auswahl der Primer

Die Ableitung der Primer erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms Clone Manager (Version 9, Scientific & Educational Software) aus bekannten Sequenzen.

Die Oligonukleotid-Primer (Tab. 3) wurden von einem kommerziellen Anbieter (Metabion GmbH, Martinsried) in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden in sterilem H₂O_{bidest.} gelöst (Stammlösung: 100 pmol/µl) und auf eine Endkonzentration von 10 pmol/µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Primer.

Primernamen/ Orientierung	Sequenz 5'-3' Position ^{a)}	Beschreibung
Primer für <i>cre-lox</i> Mutagenese		
<i>golS cre-lox Not down</i> 988	← AAA <u>GCG GCC GC</u> GGG TCA TCG GAG TCG TGG AA	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom ATG _{cupA}
<i>golS cre-lox Mun up</i> 599	→ AAA <u>CAA TTG</u> TCT TGT TTG GCG GCG ACG AT	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 400 bp stromaufwärts vom ATG _{cupA}
<i>golT cre-lox Age down</i> 4132	← AAA <u>ACC GGT</u> CGG CCA GCC CAT GTA CCA GC	<i>AgeI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 300 bp stromabwärts vom TAA _{cupR}
<i>golT cre-lox Apa up</i> 3818	→ AAA <u>GGG CCC</u> CCC GTG CCG ACA GCG AGG AT	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 38 bp direkt stromaufwärts vom TAA _{cupR}
Rmet3525 <i>golB cre Not up</i> 4242	→ AAA <u>GCG GCC GC</u> TCG TCG CCG CCA AAC AAG AAA	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom TGA _{cupB}
Rmet3525 <i>golB cre Mun down</i> 4542	← AAA <u>CAA TTG</u> CGT TCG TGC AAG GTG AAT TCG	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 300 bp stromaufwärts vom TGA _{cupB}
Rmet6119 <i>cre Apa up</i> 3419	→ AAA <u>GGG CCC</u> CGC GAG CCG ATC GTT GTT GCA	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom TGA _{copF}
Rmet6119 <i>cre Age down</i> 3712	← AAA <u>ACC GGT</u> GGC CGG CAC ATG CCC CTC AAT	<i>AgeI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 310 bp stromabwärts vom TGA _{copF}
JM Rmet6119 <i>cre Mun up</i> 660	→ AAA <u>CAA TTG</u> ATG GCG GGA AGG ATT ATG GTG	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 340 bp stromaufwärts vom ATG _{copF}
JM Rmet6119 <i>cre Not down</i> 978	← AAA <u>GCG GCC GC</u> TGC GAC TCC TGT ATT CCG ACG	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom ATG _{copF}
NW Rmet_2046 <i>MunI</i> bearbeitet	→ AAA <u>CAA TTG</u> GCT TCA CCT GGC TGA TCG ATG	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 400 bp stromaufwärts vom ATG _{rdxI}
NW Rmet_2046 <i>NotI</i>	← AAA <u>GCG GCC GC</u> AGT GCG CTT TTA GTA CCC AGC G	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom ATG _{rdxI}
NW Rmet_2046 <i>ApaI</i>	→ AAA <u>GGG CCC</u> CCA GGG AGT CCT GAA TAT GG	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom TGA _{rdxI}
NW Rmet_2046 <i>AgeI</i>	← AAA <u>ACC GGT</u> ATT CAG ACC CCC AAT GCA AAA AG	<i>AgeI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 320 bp stromabwärts vom TGA _{rdxI}
NW KO Rmet_2379 <i>MunI</i>	→ AAA <u>CAA TTG</u> ATG GTC CTG ATG GAC AGG GCA	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet 327 bp stromaufwärts vom ATG _{cupA1}

Fortsetzung Tab. 3:

NW KO Rmet_2379 <i>NotI</i>	←	AAA <u>GCG GCC GC</u> AAC TAC GGT CCG CTC TTG GC	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 20 bp stromabwärts vom ATG _{ctpA1}
NW KO Rmet_2379 <i>ApaI</i>	→	AAA <u>GGG CCC</u> TCC TGA ACA CCT GCA GGC TG	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 75 bp stromaufwärts vom TGA _{ctpA1}
NW KO Rmet_2379 <i>AgeI</i>	←	AAAA <u>CCG GTA</u> CGA AGC CGA ACG CCC ATC C	<i>AgeI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 230 bp stromabwärts vom TGA _{ctpA1}
NW <i>copABCD</i> <i>MunI</i>	→	AAA <u>CAA TTG</u> CTC GTT CAG CGC CAT ATG C	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet 324 bp stromaufwärts vom ATG _{copA}
NW <i>copABCD</i> <i>NotI</i>	←	AAA <u>GCG GCC GC</u> GCT GTC AAT TCC TTC TCA TC	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom ATG _{copA}
NW <i>copABCD</i> <i>ApaI</i>	→	AAA <u>GGG CCC</u> TGG ACC GCT GCC GCC TCT GG	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom TGA _{copD}
NW <i>copABCD</i> <i>AgeI</i>	←	AAA <u>ACC GGT</u> GCG GCA TGG CAG AGC GCA AT	<i>AgeI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 200 bp stromabwärts vom TGA _{copD}
NW <i>cus-like</i> <i>MunI</i>	→	AAA <u>CAA TTG</u> GTG GAT ATC GGA TCC AGA AC	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet 315 bp stromaufwärts vom GTG _{cusD}
NW <i>cus-like</i> <i>NotI</i>	←	AAA <u>GCG GCC GC</u> GAT CTA CGA GGA TGT CAA AAC	<i>NotI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom GTG _{cusD}
NW <i>cus-like</i> <i>ApaI</i>	→	AAA <u>GGG CCC</u> CGC GAT CGA GCC GCG CCG AC	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom TAG _{cusF}
NW <i>cus-like</i> <i>AgeI</i>	←	AAA <u>ACC GGT</u> AGT GGG CCA TCG CAA TCG AAG GG	<i>AgeI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 300 bp stromabwärts vom TAG _{cusF}
Rm2 Δ <i>gshA</i> <i>EcoRI</i>	→	TGT <u>GAA TTC</u> TGC CTG CGG GGC ATA GAG	<i>EcoRI</i> -Schnittstelle, bindet 297 bp stromaufwärts vom ATG _{gshA}
Rm Δ <i>gshA</i> OR <i>MunI</i>	←	CAG <u>CAA TTG</u> GAT GAG ATG CGG GAC CAT ATC CAT	<i>MunI</i> -Schnittstelle, bindet 15 bp stromabwärts vom ATG _{gshA}
Rm2 Δ <i>gshA</i> <i>SacI</i> rev	←	ATG <u>GAG CTC</u> GGC GGA TCC TTG CGC ATC A	<i>SacI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 290 bp stromabwärts vom TGA _{gshA}
Rm2 Δ <i>gshA</i> <i>ApaI</i> fwd	→	CTC <u>GGG CCC</u> ACC GAC CCG AAT CCG ATC CTC	<i>ApaI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 20 bp stromaufwärts vom TGA _{gshA}

Primer für Konstruktion der *lacZ*-Reporterfusion

JM <i>golS-lacZ</i> <i>PstI</i> <i>up 101</i>	→	AAA <u>CTG CAG</u> GCG GGT ATC GGC GGT ATG A	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet 317 bp stromaufwärts vom TAA _{cupR}
--	---	---	---

Fortsetzung Tab. 3:

JM <i>golS-lacZ Sal</i> <i>down</i> 402	←	AAA <u>GTC GAC</u> TTA GTG ATG GCA GGC CGG G	<i>SalI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom TAA _{<i>cupR</i>}
JM <i>golT-lacZ Pst</i> <i>up</i> 2082	→	AAA <u>CTG CAG</u> GGT GGG CGA CGG CAT CAA CGA	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet 358 bp stromaufwärts vom TGA _{<i>cupA</i>}
JM <i>golT-lacZ Sal</i> <i>down</i> 2398	←	AAA <u>GTC GAC</u> ACT GCC TGC GAG CGG ATG CCA	<i>SalI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 20 bp stromaufwärts vom TGA _{<i>cupA</i>}
NW <i>cusCFBA</i> <i>lacZ SalI</i>	→	AAA <u>GTC GAC CCT</u> CTC TCC ACG CAG CCG TCT	<i>SalI</i> -Schnittstelle, bindet 335 bp stromaufwärts vom TAG _{<i>cusF</i>}
NW <i>cusCFBA</i> <i>lacZ XbaI</i>	←	AAA <u>TCT AGA CTA</u> CTT GCG CAA GTC GGT GA	<i>XbaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom TAG _{<i>cusF</i>}
NW <i>copABCD</i> <i>lacZ PstI</i>	→	AAA <u>CTG CAG</u> GAG TAT CGG TAC CGT GAT CGT CG	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet 313 bp stromaufwärts vom TGA _{<i>copD</i>}
NW <i>copABCD</i> <i>lacZ XbaI</i>	←	AAA <u>TCT AGA TCA</u> GGG CTC AGG CGA TTG CAC A	<i>XbaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom TGA _{<i>copD</i>}
JM 4682- <i>lacZ Pst</i> <i>up</i> 129	→	AAA <u>CTG CAG CTC</u> GGT GTT CTT CCT GTC GG	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet ca. 340 bp stromaufwärts vom TAG ₄₆₈₂
JM 4682- <i>lacZ Sal</i> <i>down</i> 451	←	AAA <u>GTC GAC CTA</u> CTT GAT GCC GAA TCG GC	<i>SalI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromaufwärts vom TAG ₄₆₈₂
NW <i>gshB-lacZ</i> <i>PstI</i>	→	AAA <u>CTG CAG CTG</u> CTG ATC GGC GGC AAG C	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet 321 bp stromaufwärts vom TGA _{<i>gshB</i>}
NW <i>gshB-lacZ</i> <i>XbaI</i> Korrig	←	AAA <u>TCT AGA TCA</u> GCG ACG GTC GGC GGC T	<i>XbaI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom TGA _{<i>gshB</i>}

Primer für Disruptionen

NW Dis <i>arsC1</i> Rmet_0329 <i>PstI</i>	→	AAA <u>CTG CAG CCG</u> TCA CCA TCT ATC ACA ACC C	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom ATG _{<i>arsC1</i>}
NW Dis <i>arsC1</i> Rmet_0329 <i>XbaI</i>	←	AAA <u>TCT AGA CCG</u> CAC ACC AAG CTC AGT G	<i>XbaI</i> -Schnittstelle, bindet 306 bp stromabwärts vom ATG _{<i>arsC1</i>}
NW Dis <i>arsC2</i> Rmet_0331 <i>PstI</i>	→	AAA <u>CTG CAG ACC</u> GAC AAG ACC TTC AAC GTG	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet direkt stromabwärts vom ATG _{<i>arsC2</i>}
NW Dis <i>arsC2</i> Rmet_0331 <i>XbaI</i>	←	AAA <u>TCT AGA TGG</u> CCA GAT CGG GCA CAC C	<i>XbaI</i> -Schnittstelle, bindet 296 bp stromabwärts vom ATG _{<i>arsC2</i>}
NW Dis <i>merA4</i> Rmet_5011 <i>PstI</i>	→	AAA <u>CTG CAG GTT</u> GCT GGA GGC CGA CCA GAT CTT	<i>PstI</i> -Schnittstelle, bindet 991 bp stromaufwärts vom TAG _{<i>merA4</i>}
NW Dis <i>merA4</i> Rmet_5011 <i>XbaI</i>	←	AAA <u>TCT AGA GAC</u> AGT TGG CGT CGA GCC GAA CC	<i>XbaI</i> -Schnittstelle, bindet 700 bp stromabwärts vom ATG _{<i>merA4</i>}

Fortsetzung Tab. 3:

Überexpressionsprimer und Primer zur Komplementation in *trans*

NW Promo+ <i>gshA</i> <i>SacII</i>	→	AAA <u>CCG CGG</u> TAA TGC CTG CGG GGC ATA GAG TG	5' kodierender Bereich von <i>gshA</i> mit Promotorregion für die Klonierung in pASK-IBA3plus
NW <i>gshA</i> <i>EcoRI</i>	←	AAA <u>GAA TTC</u> GAG GAT CGG ATT CGG GTC GGT C	3' kodierender Bereich von <i>gshA</i> ohne Stoppcodon für die Klonierung in pASK-IBA3plus
Rmet_3524 <i>EcoRI</i> ATG	→	AAA <u>GAA TTC</u> ACC CAT CCT GCC GCA TCT CTC C	5' kodierender Bereich von <i>cupA</i> ohne Startcodon für die Klonierung in pASK-IBA7
Rmet_3524 <i>Sall</i> TCA	←	AAA <u>GTC GAC</u> TTG CGT TAC CTC CTT GTG GCC A	3' kodierender Bereich von <i>cupA</i> ohne Stoppcodon für die Klonierung in pASK-IBA7

Primer für RT-PCR

NW AtoE <i>ApaI</i>	→	AAA <u>GGG CCC</u> CCC AGT TCA GGT AGC TGC C	bindet innerhalb des <i>atoE</i> -Gens
NW Rmet_4683 <i>ApaI</i>	←	AAA GGG CCC AAT TTC CCG ACG GTC CTG CGG C	bindet innerhalb des Rmet_4683-Gens
NW Rmet_4681 <i>ApaI</i>	→	AAAGGGCCCGCCTAGATCTGGCCGATATC C	bindet innerhalb des Rmet_4681-Gens
NW <i>doxX</i> <i>MunI</i>	→	AAACAATTGAGCAGCCCGGTGACCTTGGT	bindet innerhalb des Rmet_4682-Gens
NW Rmet_4685 <i>MunI</i>	←	AAACAATTGGAAGTGCTACGGCGTGGCC A	bindet innerhalb des Rmet_4685-Gens,

Sequenzier- und Vektorprimer

pGEM <i>fwd</i>	→	GCG AAA GGG GGA TGT GCT GC	<i>forward</i> Sequenzierprimer (ABI) für pGEM-T Easy-Konstrukte
pGEM <i>rev</i>	←	CGC CTG CAG GTC GAC CAT AT	<i>reverse</i> Sequenzierprimer (ABI) für pGEM-T Easy-Konstrukte
Kan 1362	←	TAA CAT ACC CTT CGG GCT ACG	Test für Fragmenteinbau in pCM184, bindet in Km-Kassette
Kan 1909	→	CCT ATG GAA CTG CCT CGG TGA	Test für Fragmenteinbau in pCM184, bindet in Km-Kassette
pLO2 <i>lacZ</i> 5519	→	GGC GGA AAA TCG TGT TGA GGC	Sequenzierprimer für die pECD794-1 Konstrukte (bindet ca. 270 bp stromaufwärts vom ATG _{<i>lacZ</i>})
pLO2 <i>lacZ</i> 5924	←	GCC TCT CGC TAT TAC GCC AG	Sequenzierprimer für die pECD794-1 Konstrukte (bindet ca. 100 bp stromaufwärts vom ATG _{<i>lacZ</i>})

Fortsetzung Tab. 3:

<i>lacZ</i> Ralsti-Fusion	←	CAC AGA TGA AAC GCC GAG TTA ACG	Sequenzierprimer für die pECD794-1 Konstrukte
pBBR1 <i> fwd</i>	←	CGC AGT CGG CCT ATT GGT TA	<i>forward</i> Sequenzierprimer für pBBR1-MCS2-Konstrukte
pBBR1 3415 <i> rev</i>	→	CGG CTC GTA TGT TGT GTG GAA	<i>reverse</i> Sequenzierprimer für pBBR1-MCS2-Konstrukte
pASK <i> u</i>	←	CGG TAA ACG GCA GAC AAA AAA AAT G	<i>reverse</i> Sequenzierprimer (ABI) für pASK-IBA3plus/7 Konstrukte
pASK <i> d</i>	→	AAA AGT GAA ATG AAT AGT TCG ACA AAA	<i>forward</i> Sequenzierprimer (ABI) für pASK-IBA3plus/7 Konstrukte

Primer zur Überprüfung der Megaplasmide in *C. metallidurans*

<i>czcA</i> <i>NdeI</i> 5932	→	AAA <u>CAT ATG</u> ACG GGG GTG GAA GGC AAG ATG TT	<i>NdeI</i> -Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>czcA</i>
<i>czcA</i> <i>XbaI</i> 6459	←	AAA <u>TCT AGA</u> GGA TGG CGG ACA GAC GTT CGG CA	<i>XbaI</i> -Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>czcA</i>
<i>cnrA</i> <i>NdeI</i> 1539	→	AAA <u>CAT ATG</u> CTC TGC CTT CGT GCT CGC TCA	<i>NdeI</i> -Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>cnrA</i>
<i>cnrA</i> <i>XbaI</i> 1962	←	AAA <u>TCT AGA</u> GCC ATT CGC TTT TCG GTT TCA GA	<i>XbaI</i> -Schnittstelle liegt in der Mitte von <i>cnrA</i>

a) Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen. Nicht unterstrichene Schnittstellen wurden nicht für die Klonierung verwendet.

2.3.3.2 Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten für präparative und analytische Zwecke.

Für präparative Zwecke wurde ein Gemisch aus *Taq*- und *Pwo*-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet, da die *Pwo*-Polymerase eine 5'-3'-*proof-reading*-Aktivität besitzt. In diesem Fall diente gereinigte DNA als *template* für die Reaktion.

Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Hierbei wurden entweder gereinigte Plasmide oder frisches Koloniematerial als *template* verwendet. Die Zellen wurden mit sterilem Zahnstocher von der Agaroberfläche in 40 µl steriles H₂O_{bidest.} überführt. Nach Erhitzen für 10 min bei 96°C und anschließender Zentrifugation konnten 2 µl des Überstandes als Template eingesetzt werden.

Der allgemeine PCR-Ansatz, der ein 50 µl Volumen umfasst, setzte sich folgendermaßen zusammen:

<i>template</i> -DNA (ca. 100 ng/µl)	1-2 µl
10 x PCR Puffer	5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Polymerase (1 U/µl)	0,7-1 µl
DMSO	5 µl
H ₂ O _{bidest.} (steril)	ad 50 µl

Die Reaktionen wurden als *Hot-Start*-Reaktionen im PCR-Block (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen oder Trio-Thermoblock, Biometra) nach folgendem Protokoll gefahren:

1.	5 min	95°C	<i>Hot-Start</i>
2.	30 s	95°C	Denaturierung
3.	30 s	x°C	<i>Annealing</i>
4.	1 min/kb	68/72°C	<i>Extension</i>
	Schritt 2-4:	26-30 Zyklen	
5.	5 min	68/72°C	Nachsynthese
6.	Pause	8°C	Kühlung

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

2.3.3.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem Protokoll des *GeneJETTM PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.3.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurde durch enzymatische Synthese eine markierte, komplementäre Kopie des zu sequenzierenden Matrizenstranges erstellt.

2.3.4.1 Sequenzierung durch kommerzielle Anbieter

Für die Sequenzreaktionen sind 1,5 µg Plasmid-DNA und 20 pmol Primer, in einem Gesamtvolumen von 15 µl, verwendet wurden. Dabei wurde auf Anbieter wie Microsynth AG, Lindau zurückgegriffen. Das Pipettieren des Ansatzes und der Versand erfolgten in Mikroschraubdeckelröhrchen von Sarstedt.

2.3.4.2 Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung des Programms Chromas. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit dem Computerprogramm Clone Manager (Version 9, Scientific & Educational Software) und Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken NCBI (Nation Center For Biotechnology Information) und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Internet-Programm *Basic Logical Alignment Search Tool* (Blast) ermittelt (Altschul *et al.*, 1997). Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Computerprogramm Clone Manager (Version 9, Scientific & Educational Software) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen, Hydropathieprofilen und die Berechnung von Protein-Molekulargewichten und den theoretischen Extinktionskoeffizienten anhand der AS-Sequenzen erfolgte mit dem Internet-Programm *Expasy* des *Expasy Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz). Topologievoraussagungen wurden nach dem TMHMM-Modell des *TMHMM Server v. 2.0* (Zentrum für biologische Sequenzanalyse, Technische Universität, Lyngby, Dänemark) erstellt, wobei postulierte Signalsequenzen mit dem Programm *SignalP 3.0* (Zentrum für biologische Sequenzanalyse, Technische Universität, Lyngby, Dänemark) untersucht wurden.

2.3.5 DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone

2.3.5.1 Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode

A) Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1970). Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. Diese Kultur wurde in frischem LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,3 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, gekühltes Greiner-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 4500 g und 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg). Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskalter 0,1 M

CaCl₂-Lösung resuspendiert und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis gelagert oder mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Glycerin (Endkonzentration 25 % [v/v]) versetzt. Jeweils 100 µl der kompetenten Zellen sind in 1,5 ml Eppendorftubes aliquotiert worden. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

B) Transformation

Die Transformation selbst wurde nach Sambrook *et al.*, (1989) durchgeführt. CaCl₂-kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der zu transformierenden DNA vorsichtig gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C im Wasserbad an, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis für 2 min gekühlt wurden. Nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium und einer Inkubation für 45 min schüttelnd bei 37°C ist ein Teil des Ansatzes auf Selektivagar ausplattiert worden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.5.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

A) Herstellung kompetenter Zellen

50 ml SOB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit einer Vorkultur 1:100 beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 kultiviert. Die Kultur wurde nach 15-minütigem Abkühlen auf Eis zentrifugiert (15 min, 4500 g, 4°C) und das Zellpellet dreimal mit je 50 ml 10%igen, eiskaltem Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min, 4500 g, 4°C) und das Zellpellet in 500 µl Glycerin (10 % [v/v]) aufgenommen. Als 40 µl Aliquots wurden die elektrokompenten Zellen dann bei -80°C aufbewahrt.

B) Elektroporation

Elektroporation erfolgte mit dem Gene PulserTM (BIORAD, München). Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in sterile, gekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 1,8 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3,5-4,5 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. 50-200 µl des Ansatzes wurden auf Selektivagar ausplattiert.

2.3.5.3 Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Transformanten wurden auf LB-Agarplatten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ausplattiert. Bei rekombinanten Klonen, die durch Test auf α -Komplementation identifiziert werden konnten, wurde den Selektionsplatten IPTG und X-Gal zugegeben. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α -Komplementation der β -Galaktosidase durch die im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal (weiße Kolonien) zugrunde.

2.3.5.4 Plasmidtransfer in *C. metallidurans* durch Konjugation

Der konjugative Plasmidtransfer wurde mit Zellen aus LB-Übernachtskulturen (*E. coli*-Stamm S17/1) und Tris-MM-Kulturen (*C. metallidurans*) durchgeführt. Je 200 μ l der zu konjugierenden Stämme wurden auf einer NA-Platte ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Konjuganten wurden direkt mit einer Impföse von der bewachsenen Platte entnommen, in 300 μ l Tris-MM suspendiert und auf Tris-MM-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Ein Wachstum von *E. coli*-Zellen auf diesen Medien wurde aufgrund von Auxotrophien bzw. zu hohen Konzentrationen an Antibiotikum verhindert.

2.3.5.5 Selektion von *single cross*-Rekombinanten

Zur Konstruktion dieser Mutanten wurde eine Methode von (Lenz *et al.*, 1994) in leicht veränderter Form eingesetzt. Der zu rekombinierende DNA-Bereich wurde dazu in den Vektor pLO2::*lacZ* kloniert, der in *C. metallidurans* nicht repliziert. Entscheidend ist dabei, dass sich eine homologe Kopie von diesem DNA-Bereich in *C. metallidurans* befindet. Der Vektor pLO2::*lacZ* trägt zum einen eine Kanamycin-Resistenz-Kassette und zum anderen das Gen für die β -Galaktosidase (*lacZ*). Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E. coli*-Stamm (S17/1) mit *C. metallidurans* konjugiert werden. Bei der Konjugation kommt es zur Rekombination zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, welche durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden können. Zur Überprüfung wurde eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment in Verbindung mit *lacZ* durchgeführt.

2.3.5.6 Konstruktion von Deletionsmutanten mittels *cre-lox* System

Die Konstruktion von Mutanten erfolgte mit dem *cre-lox* System nach (Marx und Lidstrom, 2002) in leicht veränderter Form. Diese Methode ermöglicht die Herstellung markerloser Mutationen in einer Vielzahl von Gram-negativen Bakterien. Die Derivate des Vektor pECD889 besitzen eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette sowie eine Kanamycin-Resistenz-

Kassette, flankiert von *loxP*-Erkennungsstellen, welche von der ortsspezifischen Cre-Rekombinase des Phagen P1 erkannt werden und somit die *in vivo* Exzision der Kanamycin-Resistenzkassette katalysiert. Um besser selektieren zu können, tragen die Derivate des Vektors pECD1003 zum einen das *lacZ*-Gen und zum anderen das *sacB*-Gen. Wird dem Medium Saccharose zugegeben, sorgt das Genprodukt des *sacB*-Gens dafür, dass die Zellen sterben, da das Periplasma mit dem aus dem Zucker synthetisierten Levan-Polymer verstopft wird.

Es wurden Fragmente amplifiziert, die direkt stromaufwärts und stromabwärts des Zielgenes lokalisiert sind. Diese Fragmente wurden so in den Vektor pECD1003 kloniert, dass sie die *loxP*-Erkennungsstellen beiderseits flankieren. Nach dem Transfer des Plasmids mittels Konjugation aus *E. coli* S17/1 in *C. metallidurans* kommt es zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was Cointegrate zur Folge hat, die durch Selektion auf Kanamycin, Tetracyclin und X-Gal identifiziert werden können. Die Zellen wurden in mehreren flüssigen Passagen mit Tris-MM mit Saccharose (Suizid-Medium) und Kanamycin angezogen, wobei die Cointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten und es dabei zur Plasmid-Exzision kam. Damit wurde auf die Kanamycin-Resistenzkassette zwischen den *loxP*-Erkennungsstellen selektiert, zum anderen kommt es durch die Zugabe von Saccharose zum Abtöten der Kulturen mit Cointegrat. Durch negative Selektion auf Tetracyclin-haltigen Medium und X-Gal konnten die Doppelrekombinaten identifiziert werden. Zur zusätzlichen Überprüfung der damit erhaltenen Kanamycin-Insertionsmutanten wurde eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment durchgeführt.

Um die vollständigen Deletionsmutanten zu erhalten, wurde durch einen weiteren konjugativen Transfer das Plasmid pCM157 in die Kanamycin-Insertionsmutante von *C. metallidurans* gebracht. Dieses Plasmid trägt das Gen für die Cre-Rekombinase des Phagen P1. Durch Zugabe von Tetracyclin konnte auf dieses Plasmid selektiert werden. Die Zellen wurden zwei Tage in Tris-MM angezogen, wobei es zur Exzision der Kanamycin-Resistenzkassette an den *loxP*-Erkennungsstellen durch die Cre-Rekombinase kam. Die gewünschten Deletionsmutanten konnten durch negative Selektion auf Kanamycin identifiziert werden. Außerdem wurde durch negative Selektion auf Tetracyclin der Verlust des Plasmids pCM157 nachgewiesen. Zur zusätzlichen Überprüfung der Deletionsmutanten wurde eine analytische PCR auf Verlust des Zielgenes sowie eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

2.3.6 Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

2.3.6.1 Herstellung der Sonden (DIG DNA LABELING Kit, Roche, Mannheim)

Durch PCR wurden ca. 300 bp-Fragmente der genomischen DNA von *C. metallidurans* amplifiziert, die als Sonden für den Nachweis von Nukleinsäuren dienen sollten.

Die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des *DIG DNA Labeling und Detection Kit* (Roche, Mannheim) durch *Random Priming* mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Je 1 µg PCR-Produkt wurde in 15 µl sterilem H₂O_{bidest.} aufgenommen und 10 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 2 µl Hexanukleotid-Mix (10 x) und dNTP-Labeling-Mix (10 x) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) beendet. Die Fällung der Sonde erfolgte mit 2,5 Vol. 96%igem Ethanol sowie 0,1 Vol. LiCl₂ für 30 min bei -80°C. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10500 g in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) sowie 5-minütigen Waschens mit 70%igem Ethanol wurde die markierte Sonde luftgetrocknet und in 50 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen. Die Sonde wurde bei -20°C gelagert.

2.3.6.2 Digoxigenin-markierte Längenstandards

Zur Größenbestimmung der über Hybridisierung nachzuweisenden DNA-Fragmente wurde Digoxigenin-markierte Größenstandards (Roche, Mannheim) eingesetzt. Für die Southern-Experimente kam der DIG-Marker VII (17 DNA-Fragmente: 81; 359; 492; 710; 718; 992; 1,164; 1,482; 1,515; 1,882; 1,953; 2,799; 3,639; 4,899; 6,106; 7,427 and 8,576 bp) und DIG-Marker II (8 DNA-Fragmente: 125; 564; 2,027; 2,322; 4,361; 6,557; 9,416; 23,130 bp) zum Einsatz. Der Marker wurde ebenfalls im Gel aufgetrennt, auf die Membran transferiert und im Chemilumineszenz-Nachweis sichtbar gemacht.

2.3.6.3 DNA:DNA-Hybridisierung (Southern, 1975)

A) Gelelektrophorese und DNA-Blotting

Die genomische DNA der zu untersuchenden Derivate von *C. metallidurans* wurde nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen in einem 0,8%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für mindestens 2 h in 1 x TAE-Puffer. Das Agarosegel wurde unter leichtem Schwenken auf einer Laborwippe wie folgt für den DNA-Transfer auf die Membran vorbereitet:

Depurinierung: 5 min in 0,25 N HCl
Denaturierung: 20 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)
Neutralisierung: 20 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris [pH 7,5], 1,5 M NaCl)

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

Parallel dazu wurde eine Nylonmembran (Nylon *Membranes, positively charged*, Roche, Mannheim) auf Gelgröße zugeschnitten und für 20 min in sterilem H₂O_{bidest.} und anschließend 20 min in 10 x SSC (0,15 M Na-Citrat [pH 7,0], 1,5 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der Nukleinsäuren aus dem Agarosegel auf die Membran erfolgte mittels Kapillarblot. In der mit 10 x SSC gefüllten Blotting-Apparatur wurde die vorbereitete Membran auf das Gel gelegt, mit mehreren Lagen Filterpapier bedeckt und mit einem leichten Gewicht beschwert. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht.

Anschließend wurde die Position des Gels auf der Membran markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch 5-minütige Bestrahlung mit UV-Licht (Transilluminator). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und zwischen Filterpapier bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

B) Hybridisierung

Die Membran mit der fixierten DNA wurde zur Entfernung von Salzresten kurz in sterilem Wasser gespült und anschließend für mindestens 1 h in 15 ml Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 10 g/l Blocking Reagenz, 10 g/l N-Lauroylsarcosin, 0,2 g/l SDS) im Hybridisierungsofen (GFL 7601) bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (68°C) prähybridisiert. 25 µl der markierten Sonde wurden in 5 ml neuer Hybridisierungslösung aufgenommen und 10 min im Wasserbad denaturiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde sie gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht.

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte die Entfernung unspezifischer Bindungen durch die Waschschrte:

2 x 5 min bei RT in 2 x SSC mit 1 g/l SDS

2 x 15 min bei der Hybridisierungstemperatur in 0,1 x SSC mit 1 g/l SDS

Die Membran war nach dem Waschen dem Nachweisverfahren zugänglich.

2.3.6.4 Chemilumineszenz-Nachweis (DIG-Luminescent Detection Kit, Roche Mannheim)

Alle Schritte zum Chemilumineszenz-Nachweis wurden unter leichtem Schwenken (Laborwippe) bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Lösungen wurden in solchen Mengen eingesetzt, dass die Membran bedeckt war.

Die Membran wurde zuerst 5 min in Waschpuffer (Puffer 1 [0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5] mit 0,3 % (v/v) Tween 20] inkubiert. Es schloss sich eine Inkubation über 30 min in Puffer 2 (Puffer 1 mit 1 % [v/v] Blocking-Reagenz) an. Danach wurde für weitere 30 min mit Anti-DIG-AP-Konjugat (Verdünnung 1:25000 in Puffer 2) behandelt. Anschließend wurde zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Anti-DIG-Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde 5 min in Puffer 3 (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) äquilibriert, vorsichtig abgetropft und auf eine saubere Folie gelegt. Anschließend wurde sie gleichmäßig mit 0,5 ml der verdünnten Substratlösung (CSPD in Puffer 3 1:100) benetzt, mit einer zweiten Folie abgedeckt und 5 min inkubiert. Die Membran wurde auf sauberem Filterpapier soweit abgetrocknet, dass keine überschüssige Flüssigkeit mehr vorhanden war und dann luftblasenfrei in eine neue Folie eingeschweißt. Zum besseren Start des Substratumsatzes wurde sie 15 min bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde in einer Röntgenkassette für 3-4 h bis über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch kurze Inkubation in Entwicklerlösung (DENTAMAT 500 Calbe Chemie, Calbe). Entwicklerreste wurden durch kurzes Spülen im Wasserbad entfernt. Die Fixierung des Filmes erfolgte in Fixierlösung (DENTAMAT 500 Calbe Chemie, Calbe). Danach wurde der Film in Wasser gespült.

2.4 Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

Alle verwendeten Puffer, Lösungen und auch H₂O_{bidest.} wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, das ein starker Inhibitor von RNAsen ist, und über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

2.4.1 Gesamt-RNA-Isolation

Die *C. metallidurans* Stämme wurden in einer ersten Vorkultur bis zur frühen stationären Phase bei 30°C und 220 rpm angezogen. Mit den Vorkulturen wurden 4 ml Tris-MM 1:400 beimpft und für 24 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden Klettkolben, die jeweils 20 ml Tris-MM enthielten, 2%ig angeimpft und schüttelnd bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Kulturen wurden nach Erreichen von 150 Klett mit verschiedenen

Konzentrationen an AuHCl_4 und CuCl_2 für 10 oder 30 min inkubiert. Als Kontrollansatz diente eine Kultur, die mit keinem Metall inkubiert wurde. Zur Zellernte wurden die Kulturen in Aliquots von 10 ml in Greinerröhrchen für 10 min bei 4500 g und 4 °C in der Eppendorf Zentrifuge 5804R zentrifugiert, das Medium vollständig abgenommen und die Zellpellets sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bis zur Isolation der RNA bei -80°C gelagert.

Um die Gesamt-RNA zu gewinnen, wurde zunächst das Lysegemisch (6 ml Phenol/Chloroformgemisch, 72 µl 20 % (w/v) SDS, 2,5 ml AE-Puffer) in ein 15 ml Greinerröhrchen pipettiert und auf 60°C vorgewärmt. Pro Isolation wurden die Zellpellets mit 500 µl AE-Puffer (20 mM Na-acetat pH 5,5, 1 mM EDTA in DEPC- H_2O) durch mehrmaliges Aufziehen in einer sterilen Spritze mit Kanüle resuspendiert und zu den vorgewärmten Lysegemisch gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 60°C inkubiert und währenddessen alle 30 sec geschüttelt. Danach wurde der Ansatz auf Eis für mindestens 10 min stehen gelassen. Anschließend erfolgte durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 10°C und 4500 g eine Phasentrennung in der Eppendorf Zentrifuge 5804R. Die Oberphase wurde daraufhin mit 3 ml Phenolgemisch und 300 µl 3 M Na-acetat pH 5,5 gemischt. Nach starkem Schütteln erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 4500 g. Diese Schritte wurden 4-5 mal wiederholt, um die Proteine aus der Interphase zu entfernen. Die Oberphase wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 2,5 Vol. eiskaltem 96%igen (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch einstündige Zentrifugation bei 4°C und 4500 g. Das Pellet wurde nochmals mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol für 10 min bei 4°C und 4500 g in der Eppendorf Zentrifuge 5804R zentrifugiert. Der Ethanol wurde vollständig abgenommen und das Greinerröhrchen kopfüber zum Trocknen des Pellets gestellt. Anschließend wurde dieses zweimal mit 50 µl DEPC- H_2O gelöst und in ein Eppendorftube überführt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Um die Konzentration der präparierten RNA zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 nm an einem NanoDrop®ND-1000 Spektrophotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemessen. Eine Absorptionseinheit $A_{260\text{nm}}$ entspricht 40 µg ssRNA/ml. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen zu. Ist dieser Wert kleiner als 1,7, ist die RNA-Präparation mit Proteinen verunreinigt. Beträgt der Wert 1,7 oder mehr, spricht dies für eine geringe Verunreinigung mit Phenol und die RNA-Präparation gilt als rein.

2.4.3 DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA

Um die nach der Isolation noch vorhandene DNA aus der Gesamt-RNA-Präparation zu entfernen, wurde ein Verdau mit RNase-freier DNaseI durchgeführt.

Dafür wurden 30 bis 40 µg RNA eingesetzt. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 60 µl durchgeführt. Nach Auffüllen der entsprechenden Menge an RNA mit DEPC-H₂O wurde diese für 3 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 6 µl 10x DNase Puffer und 6 µl RNase-freie DNaseI (Promega, Mannheim) hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Dazu wurden 100 µl des Phenol/Chloroformgemisches und 10 µl 3 M Na-acetat pH 5,2 hinzugegeben, gut geschüttelt und für 2 min bei 10500 g zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit 2,5 Vol. eiskaltem 96%igem (v/v) Ethanol für 1 h bei -80°C gefällt. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 10500 g wurde die RNA im Pellet gewonnen und nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol luftgetrocknet und in 22 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Im Anschluss wurde die präparierte RNA im Formaldehydgel auf Intaktheit und mittels PCR auf Verunreinigungen mit DNA überprüft. Die RNA wurde auf Eis oder bei -20°C gelagert.

2.4.4 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische Zwecke wurden 1,5%ige denaturierende Formaldehydgele verwendet. Für ein 50 ml Gel wurden 0,75 g Agarose in 43,5 ml DEPC-H₂O mit 5 ml 10 x MOPS (0,2 M MOPS, 0,05 M Na-acetat, 0,01 M EDTA in DEPC-H₂O pH 7,0) in der Mikrowelle gelöst und auf ca. 50°C abgekühlt. Danach wurden 1,5 ml Formaldehyd hinzugegeben, gut gemischt und in eine Minigelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS. Es wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA mit 12,5 µl Formamid, 2,5 µl 10 x MOPS und 4 µl Formaldehyd gemischt und bei 65°C für 15 min denaturiert. Zum schnellen Abkühlen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und anschließend mit 3 µl Probenpuffer (100 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % SDS, 0,1 % BPB) und 0,5 µl Ethidiumbromid versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V.

2.4.5 Reverse transcriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Um die Operonstruktur und die Expression der Gene *gigPABT* in dem Stamm AE104 zu verifizieren, wurde die Methode der RT-PCR angewandt. Dabei wurde im ersten Schritt die RNA mittels der Reversen Transkriptase SUPERSRIPTTMII (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben, die im zweiten Schritt amplifiziert wurde.

cDNA-Synthese:

Gesamt-RNA	1 µg
<i>random</i> Primer	1 µl
steriles DEPC-H ₂ O _{bidest.}	ad 6 µl

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt.

Danach erfolgte die Zugabe von:

5x <i>first strand</i> -Puffer	2 µl
0,1 M DTT	1 µl
10 mM dNTP-Lösung	0.5 µl
SUPERSRIPTTMII (200 U/µl)	0.5 µl

Der Ansatz wurde bei RT für 10 min inkubiert.

Daran schloss sich die Reaktion für 1 h bei 42°C an. Das Enzym wurde danach für 15 min bei 70°C inaktiviert.

Im zweiten Schritt schloss sich die Amplifizierung der synthetisierten cDNA an:

cDNA	1 µl
Primer1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer2 (10 pmol/µl)	1 µl
10 mM dNTP-Lösung	1 µl
10 x PCR-Puffer	5 µl
H ₂ O _{bidest.}	40 µl
Taq-Polymerase (Roche, Mannheim, 1 U/µL)	1 µl

Der Ansatz wurde gut gemischt und die cDNA nach dem unter 2.3.3.2. beschriebenen Protokoll amplifiziert. Je 10 µl der RT-PCR-Produkte wurden dann in einem 1,5%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollen wurden PCR-Reaktionen mit genomischer DNA des *C. metallidurans* Stammes AE104 als *Template* (Positivkontrollen) und ohne *Template* (Negativkontrollen) mitgeführt.

2.5 Zellwachstumsversuche

2.5.1 Wachstumsversuche in Flüssigmedien

2.5.1.1 Messung der Zelltrübung

Das Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., New York) diente der Zelltrübungsmessung wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Dazu wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, da er im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) das meiste Licht transmittiert. Zur Kalibrierung der Skala wurde unbeimpftes Medium als Nullwert verwendet. Aus den erhaltenen Klett-Einheiten (KE) konnte unter Verwendung einer Eichkurve die Konzentration der zugehörigen Zellsuspension ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Bakterienkultivierung keine Probenentnahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

Neben der kontinuierlichen Messung des Zellwachstums wurde auch die Zelldichte nach einer definierten Wachstumszeit (16 h *E. coli* und 20 h *C. metallidurans*) bestimmt. Dazu wurde die Optische Dichte der Kulturen bei 500 nm und 600 nm mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen. Die Bestimmung des Zelltrockengewichtes und der Zellzahl erfolgte mittels Eichkurven.

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

Die Endpunktbestimmung (*dose-response*-Experimente) des Zellwachstums von *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen an CuCl₂ und AuHCl₄ wurde in LB-Medium und TrisMM durchgeführt. Die Aufnahme von Zellwachstumskurven erforderte einheitliche, in LB-Medium bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase, angezogene Vorkulturen des jeweiligen Stammes. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, im Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Diese LB-Kulturen wurden in Tris-MM, 1:400 verdünnt und ebenfalls für 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nach 16 h wurde die zweite Vorkultur 1:400 verdünnt und die Mittelkultur für 2 h im Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Für *E. coli*-Stämme mit einer Antibiotikaresistenz, wurden die jeweiligen Antibiotika den Vor- und Mittelkulturen zugefügt. In den Inkubationsexperimenten erfolgte bereits in der Mittelkultur die Zugabe von CuCl₂ in definierten Konzentrationen. Nach zweistündigem Wachstum wurden 5 µl einer 1:10 verdünnten Mittelkultur in 200 µl Tris-MM mit verschiedenen Schwermetallen in entsprechenden Konzentrationen überimpft und in 96well-Mikroplatten (greiner Bio-One Frickenhausen) kultiviert. Die Hauptkulturen wurden bei 37°C in einem neoLab Shaker DTS-2 (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) bei

1300 rpm angezogen. Nach 16 h erfolgte die Messung der Optischen Dichte bei 500 nm und 600 nm mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz).

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

Die Endpunktbestimmung (*dose response* Experimente) des Zellwachstums von *C. metallidurans* mit verschiedenen Konzentrationen an NaAuCl_4 , $\text{Na}_3\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 und ZnCl_2 wurde in Tris-MM durchgeführt. Aus einer Tris-MM Vorkultur, der frühen stationären Phase wurde eine zweite Vorkultur 5 %ig beimpft. Diese wurde für 24 h schüttelnd bei 30°C, bis zum Erreichen der späten stationären Phase, angezogen. Die Anzucht der einzelnen Kulturen fand in 55 ml Reagenzgläsern (25 mm Durchmesser, *Clark Scientific LTD*) statt. Stämme mit Resistenzkassetten wurden mit den entsprechenden Antibiotika in den beiden Vorkulturen inkubiert. In Inkubationsexperimenten erfolgte die Zugabe von AuHCl_4 und CuCl_2 in definierten Konzentrationen zu der zweiten Vorkultur. Die Hauptkultur wurde 10%ig angeimpft und in 96well-Mikroplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) bei 30°C und 1300 rpm in einem neoLab Shaker DTS-2 (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) kultiviert. Nach 20 h erfolgte die Messung der Optischen Dichte bei 500 nm und 600 nm mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz). Aus den erhaltenen Daten wurden die IC_{50} -Werte und *b-values* berechnet (Formel 1). Der IC_{50} -Wert gab dabei den Wert an, bei dem das Wachstum um die Hälfte reduziert war. Im Gegensatz dazu gibt der *b-value* den Anstieg der Sigmoidalkurve an. Die Berechnung basiert auf der abgewandelten Formel von (Pace und Scholtz, 1997).

$$\text{OD}(c)=\text{OD}0/(1+\exp[\frac{c-\text{IC}_{50}}{b}])$$

2.5.2 Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration gegen Schwermetallsalze

Die Bestimmung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) verschiedener *C. metallidurans*-Stämme erfolgte auf Tris-MM-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Schwermetallsalzes gegossen wurden. Die zweite Vorkultur wurden hierzu 5%ig mit einer ersten Vorkultur in Tris-MM angeimpft und für 24 h, bis zum Erreichen der späten stationären Phase, bei 30°C und 200 rpm kultiviert. Diese wurde im folgenden 1:100 verdünnt und die Stämme in Sektoren auf den Platten ausgestrichen. Die MIC-Platten wurden für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert und im Anschluss das Zellwachstum auf

den Platten ausgewertet. Als MIC wird dabei die Metallkonzentration bezeichnet, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen.

2.6 Enzymologische Methoden

2.6.1 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

2.6.1.1 Zellwachstum, Induktion und Zellernte der *C. metallidurans*-Stämme

Die für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *C. metallidurans* wurden in Tris-MM mit 1,5 mg/ml Kanamycin angezogen. Aus den Vorkulturen der frühen stationären Phase wurden zweite Vokulturen in Klettkolben mit 10 ml Tris-MM auf 30 Klett-Einheiten beimpft und bei 30°C und 250 rpm im Wasserbad inkubiert. Nach Verdopplung der Zelldichte erfolgte eine Aufteilung der Kulturen in sterile 96well-Mikroplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen). Diesen Kulturen wurden unterschiedliche Konzentrationen von AuHCl_4 , $\text{Na}_3\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, CuCl_2 und NiCl_2 zugesetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 30°C und 1300 rpm im neoLab Shaker DTS-2 (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) wurden 200 μl Kultur in 96well-Mikroplatten mit *round bottom* (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt, die OD_{600} am TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen und durch Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 4500 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung am nächsten Tag bei -20°C gelagert.

2.6.1.2 Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität (Miller, 1972; Miller, 1992; Griffith und Wolf, 2002)

Das Zellpellet wurde in 190 μl Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 0,05 M β -Mercaptoethanol) mit 10 μl Permeabilisierungspuffer (6,9 mM CTAB, 12 mM Natriumdesoxycholat) resuspendiert. Das Mercaptoethanol wurde stets frisch zu einem Aliquot des Puffers gegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend mit 20 μl Substratlösung (13,3 mM ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid [ONPG] in Z-Puffer ohne β -Mercaptoethanol) versetzt. Die weitere Inkubation bis zur Gelbfärbung erfolgte bei 30°C im neoLab Shaker DTS-2 (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg) bei 300 rpm. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung von ONPG zu o-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 1 M Na_2CO_3 -Lösung gestoppt. Na_2CO_3 erhöht dabei den pH-Wert im Reaktionsansatz auf pH 11, wodurch die β -Galaktosidase inaktiviert wird. Die Zeit von Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion (Reaktionszeit) wurde für die Berechnung der spezifischen Aktivität notiert. Anschließend wurde die

Extinktion bei 420 nm und 550 nm mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial. Mit Hilfe der Extinktionen und der Reaktionszeit konnte die Gesamt-Enzymaktivität in U nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = 315,8 \mu\text{mol/l} \times (\text{OD}_{420} - \frac{[1,75 \times \text{OD}_{550}]}{\text{Reaktionszeit}(\text{min})})$$

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

Der Faktor 315,8 setzt sich zusammen aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von *o*-Nitrophenol ($\epsilon = 4500 \text{ l/mol} \times \text{cm}$), der Schichtdicke der 96well-Mikroplatten (*round bottom*) ($d = 0,95 \text{ cm}$), dem Koeffizienten aus Kulturvolumen und Reaktionsansatz mit 1,35 und dem Umrechnungsfaktor 10^6 für die Einheit nmol pro min.

Die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase wurde durch Division der errechneten Gesamtaktivität durch die Zelltrockenmasse des Reaktionsansatzes bestimmt.

$$\text{spezifische Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg TG}} \right] = \frac{\text{Aktivität [U]}}{\text{Zelltrockenmasse [mg]}}$$

2.6.2 Bestimmung des Glutathiongehaltes der Zelle

Das Prinzip dieses Assays beruht auf einem enzymatischen Recycling-Prozess, bei dem Glutathion durch DTNB (2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure) oxidiert und in Anwesenheit der Glutathion-Reduktase durch NADPH reduziert wird. Aus DTNB entsteht bei diesem Prozess NTB (2-Nitro-5-thiobenzoessäure), welches photometrisch gemessen werden kann und mit dem eine Aussage über den Glutathiongehalt (reduziertes und oxidiertes Glutathion (GSH/GSSG)) gemacht werden kann.

2.6.2.1 Messung des Glutathiongehaltes

Die Zellen wurden, wie unter Punkt 2.5.1.3 beschrieben, angezogen. Anschließend wurde das Kulturvolumen (5 mg Trockengewicht) in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert (4 °C, 3700 g, 15 min), die Zellpellets in 100-300 μl SSA (5-Sulfosalicylsäure) resuspendiert und viermal einem Zyklus aus Einfrieren und Auftauen unterzogen (flüssiger Stickstoff und Wasserbad bei 37 °C). Im Anschluss an ein 5-minütiges Abkühlen auf Eis wurde der Ansatz erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und

der Überstand sorgfältig abgenommen, dessen Volumen und die Proteinkonzentration bestimmt wurden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C .

Zur Messung des Glutathiongehaltes wurden 96well-Mikroplatten verwendet. Als Nullwert diente 5 % SSA. Die Eichreihe wurde mittels 1 mg/ml GSH-Stocklösung erstellt. 10 μl der verdünnten Probenansätze wurden zusammen mit 150 μl Reaktionsansatz für 5 min bei RT in den Mikroplatten inkubiert und anschließend mit 50 μl NADPH (2,5 μl [40 mg/ml-Stocklösung] in 625 μl 1 x Puffer] gemischt. Die Messung der Optischen Dichte bei 412 nm erfolgte bei 30°C in 8 Zyklen (je 42s) mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz).

Die Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen (Angaben für 10 Reaktionen):

2 ml 1x Puffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 1 mM EDTA)

57 μl verdünnte GSSG-Reduktase (0,95 μl GSSG-Reduktase [400 U/ml in 3,6 mM Ammoniumsulfat pH 7,0 + 0,1 mM DTT] in 62,5 μl 1 x Puffer]

57 μl DTNB (1,5 mg/ml in DMSO).

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Protein-Expression und -Reinigung über das *Strep-tag®II Protein Purification System*

Das *Strep-tag®II Purification System* basiert auf der spezifischen Bindung des *Strep-tag®II*-Fusionsproteins an das Säulenmaterial *StrepTactin*. Der *Strep-tag®II*, setzt sich aus den Aminosäuren WSHPQFEK zusammen und ist je nach Vektorsystem N- oder C-terminal kodiert. Diese Methode ermöglicht die Einschnitt-Affinitätschromatographie unter physiologischen Bedingungen, sodass die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt. Aufgrund der geringen Größe beeinflusst der *Strep-tag®II* weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Die Induktion der Genexpression erfolgte mittels AHT, da das Gen des zu exprimierenden Proteins hinter einen *tet*-Promotor kloniert wurde. Unspezifisch bindende Proteine konnten während eines Waschschrilles entfernt werden, während das *target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule eluiert werden konnte. Während der Expression und Aufreinigung der Proteine wurden Proben entnommen, die eine Kontrolle des gesamten Prozesses durch SDS-PAGE (2.7.4.3) ermöglichten.

2.7.1.1 Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den *E. coli* Überexpressionsstamm BL21(pLys) transformiert. Eine Vorkultur, welche über Nacht bei 37°C schüttelnd kultiviert wurde, wurde 2%ig in frisches LB-Medium überführt. Diese Hauptkulturen wurden schüttelnd bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6-0,8 inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von 200 µg AHT/l induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 20200 g und 4°C (Sorvall RC5, Fisher Scientific, Schwerte) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss zur Fraktionierung des Periplasmas verwendet.

2.7.1.2 Aufschlussmethoden

A) Ultraschall

Das Zellpellet wurde in 2 ml (pro 100 ml Kultur) Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl) mit 1 mM Proteaseinhibitor PMSF und 10 µg/ml DNaseI resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 10-12 x 30 s bei Intervalleinstellung 70 % und 80 W Leistung auf Eis aufgeschlossen, wobei zwischen den einzelnen Zyklen die Zellen 30 s auf Eis abgekühlt worden sind. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die aufgeschlossenen Kulturen 30 min bei 4500 g und 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert.

B) French-Press

Das Zellpellet wurde in 30 ml (pro 1 l Kultur) Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl) resuspendiert und mit 1 mM PMSF und 10 µg/ml DNaseI versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einer French-Press (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm²) in 6 Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) (4500 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

2.7.1.3 Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der klare Überstand des Rohextraktes einer Ultrazentrifugation (100000 g, 1 h, 4°C) unterzogen. Das so gewonnene Membranpellet wurde in Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl) aufgenommen und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Kit (2.7.2.1) oder dem Bradford Reagenz (2.7.2.2)

bestimmt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Die Solubilisierung der Membran erfolgte mit 1 % n-Dodecyl- β -D-Maltosid für 1 h auf dem Rotator bei 4°C. Nach der Solubilisierung schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 min bei 100000 g und 4°C an, um ungelöste Membranreste und Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand mit den solubilisierten Membranproteinen wurde bis zur Affinitätschromatographie auf Eis gelagert.

2.7.1.4 Native Proteinreinigung mittels *StrepTactin*-Chromatographie

Eine Einweg-Säule (*Polypropylene Column* 1 ml–10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1-5 ml Säulenmaterial (*StrepTactin*) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W (100 mM Tris-HCl [pH 7,6], 150 mM NaCl) äquilibriert. Die Fraktion mit solubilisierten Membranproteinen, welche das gewünschte *Strep-tag*®II Fusionsprotein enthielt, wurde anschließend auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 10 Vol. Puffer W entfernt. Das rekombinante Protein wurde mittels 3-4 Vol. Puffer E (100 mM Tris-HCl [pH 7,6], 150 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch das Spülen mit 10 Vol. Puffer R (100 mM Tris-HCl [pH 7,6], 150 mM NaCl, 1 mM HABA) regeneriert und konnte nach der Äquilibration wiederverwendet werden. Für die Reinigung von Membranproteinen enthielten alle verwendeten Puffer 0,2 % n-Dodecyl- β -D-Maltosid. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch die Auftragung der Proben auf SDS- Polyacrylamidgele.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.7.2.1 BCA-Test (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit*; Sigma GmbH, Osterode)

Zu 25 μ l Proteinlösung wurden 200 μ l BCA-Lösung zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 37°C inkubiert und danach die Absorption bei 562 nm gegen einen Nullwert mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichreihe, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml BSA-Lösung erstellt wurde.

2.7.2.2 Bradford-Proteinbestimmung

Nach dieser Proteinbestimmung (Bradford, 1976) wurden 50 μ l der zu vermessenden Proteinlösung bzw. Verdünnung mit 750 μ l Bradford-Lösung (Roti®-Quant, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und 200 μ l H₂O_{bidest.} versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm mit dem Spektrophotometer

(SmartSpec™3000, BIORAD, München). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde.

2.7.2.3 Lowry Proteinbestimmung (Lowry *et al.*, 1951)

Zur Proteinbestimmung wurde ein von (Riccio *et al.*, 1975) abgewandelter Test verwendet. 10 µl der zu vermessenden Proteinlösung bzw. deren Verdünnung wurden in einer 96well-Mikroplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 100 µl frisch hergestellter Lösung C versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 15 µl Lösung D zugegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 750 nm im TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz). Mit Hilfe des BSA-Standards wurde eine Eichgerade erstellt.

Lösung A: 22 % (w/v) Na₂CO₃, 0,5 % (w/v) Natriumtartrat und 0,1 N NaOH

Lösung B: 0,1 % (w/v) CuSO₄ x 5 H₂O

Lösung C: 90 % (v/v) Lösung A und 10 % (v/v) Lösung B

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

2.7.2.4 Direkte Bestimmung am NanoDrop®ND-1000 Spektrometer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine direkte spektroskopische Methode verwendet, bei der das spezifische Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins berücksichtigt wurden. Der theoretische Extinktionskoeffizient des rekombinanten Proteins wurde mit Hilfe des Programms ProtParam des *Expasy*-Systems bestimmt, welches mit dem korrigierten Extinktionskoeffizienten rechnet (Pace *et al.*, 1995). Mit diesem Extinktionskoeffizient konnte mittels NanoDrop®ND-1000 Spektrometer (Thermo Scientific, USA) die Proteinkonzentration bei 280 nm bestimmt werden.

2.7.3 Konzentrieren von Proteinlösungen

2.7.3.1 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Proteinlösungen konnten mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert oder in andere Lösungen umpuffert werden. VivaSpin-Säulen mit Porengrößen von 50 kDa wurden verwendet. Vor dem Benutzen wurden die Vivaspin-Röhrchen mit mindestens 2 Vol. Puffer gespült (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg). Anschließend wurde die einzuengende Proteinlösung in die Röhrchen gegeben und erneut bei 4500 g und 4°C zentrifugiert bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht wurde. Zur

Lagerung wurde die Säule mit dem jeweiligen Puffer benetzt. Für die Entsalzung der Elutionsfraktionen wurden die Proben auf eine mit dem entsprechenden Puffer äquilibrierte PD10-Säule (GE Healthcare, Freiburg) gegeben. Die rekombinanten Proteine wandern bei dieser Methode schneller durch die Säulenmatrix als die Salze. Die Elutionsfraktionen, in denen das Protein nachgewiesen werden konnte, wurden bei -80°C gelagert.

2.7.4 Elektrophoretische Methoden

Die SDS-PAGE wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (*Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt.

2.7.4.1 Probenvorbereitung

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer (0,125 M Tris-HCl [pH 6,8], 20 g/l SDS, 50 % [v/v] Glycerin, 0,5 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 0,01 g/l BPB) gemischt und 30 min bei 30°C oder 5 min bei 95°C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit einer 25 μ l Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) auf das Gel.

2.7.4.2 Proteinmarker

Um Aussagen über die Größe der im Gel analysierten Proteine treffen zu können, wurden folgende Proteinmarker aufgetragen: Proteinmarker *PageRuler™ Unstained* (#26614) (Thermo Scientific, USA) mit Proteinbanden der Größen 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 und 10 kDa und der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder Plus* (#26619) (Thermo Scientific, USA) mit folgenden Proteingrößen 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 und 10 kDa.

2.7.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet.

Trenngel:	10 %	12,5 %
30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid Stammlösung	2,0 ml	2,5 ml
1,88 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,2 ml	1,2 ml
5 g/l SDS	1,2 ml	1,2 ml
H ₂ O _{bidest.}	1,6 ml	1,1 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
10 % (w/v) APS	30 μ l	30 μ l

Das Gelgemisch wurde nach vorsichtigem Mischen luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um eine planare Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel mit 70 % Ethanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Ethanol wieder entfernt, das Trenngel mehrmals mit H₂O_{bidest.} gespült und anschließend 1,5 ml Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben auf das Trenngel gegeben, in das zur Formierung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde.

Sammelgel:

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacylamid Stammlösung	0,33 ml
0,625 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,4 ml
5 g/l SDS	0,4 ml
H ₂ O _{bidest.}	0,87 ml
TEMED	2 µl
10 % (w/v) APS	10 µl

Der Elektrodenpuffer 1 x Laemmli-Puffer (2,5 mM Tris [pH 8,3], 0,2 M Glyzin, 3,5 mM SDS) (Laemmli, 1970) wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, USA) gegeben, der Kamm entnommen und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Stromstärke und 150-200 V durchgeführt.

2.7.4.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Eschwege) oder Nitrocellulose-Membran (Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren) mittels *Semi-Dry-blot*. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol und H₂O_{bidest.} geschwenkt (nur PVDF Membran). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris-HCl, 0,192 M Glycin, 20 % [v/v] Methanol). Vier Lagen Blottingpapier (VWR International GmbH, Dresden) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in Towbin-Puffer getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer für 15 min in Towbin-Puffer geschwenkt. In der Blotapparatur (BIORAD, München) wurden zwei Lagen Blottingpapier, die Membran, das Proteingel und zwei weitere Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinander gelegt, die Apparatur verschlossen und Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke und

Spannung (3 mA/cm² Gelfläche, 15 V) für 45 min. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt und die Membran luftgetrocknet.

2.7.4.5 *Strep-tag*®II-Detektionssystem

Der spezifische Nachweis *Strep-tag*®II-haltiger Proteine auf Nitrocellulose-Membranen oder PVDF-Membranen erfolgte mittels *StrepTactin*®-Peroxidase-Konjugat (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen).

Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran in 20 ml Blockingpuffer (1 x PBS-Puffer [4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl] mit 3 % BSA [w/v] und 0,5 % Tween 20) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen vor der Detektion zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen. Nach dem letzten Wachsritt wurde 10 ml PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20 hinzugegeben. Für den Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte eine einstündige Inkubation mit 1:100000 *StrepTactin*-HRP-Konjugat (Biorad, München), verdünnt in 1 x PBS mit 0,2 % (w/v) BSA und 0,1 % Tween 20. Anschließend wurde die Membran 2 x 1 min in PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20 und 2 x 1 min in PBS-Puffer gewaschen. Das Konjugat war mit einer Meerrettich-Peroxidase markiert, welche mittels ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*) nachgewiesen werden konnte. Bei diesem Nachweis wird Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ unter Lichtaussendung oxidiert. Die Lösungen A (5 ml 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 22 µl 90 mM *p*-Cumarsäure [in DMSO gelöst], 50 µl 250 mM Luminol [3-Aminophtalhydrazid, in DMSO gelöst]) und B (5 ml 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 4 µl 30 % H₂O₂ [v/v]) wurden zu diesem Zweck im Dunkeln gemischt und für einige Minuten auf die Membran gegeben. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei in eine Folie gelegt und in einer Fotokassette durch Auflegen eines Röntgenfilms (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) für 5 min bis 1 h exponiert. Der Röntgenfilm wurde in Entwicklerlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) geschwenkt und anschließend in Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte eine Inkubation in Fixiererlösung (Calbe Fotochemie, Calbe).

2.7.4.6 Proteinfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden 1 h oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung (2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0,5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O_{bidest.}) inkubiert (Weber und Osborn, 1969). Anschließend erfolgte die Entfärbung von nicht

proteingebundenem Farbstoff innerhalb von 1-2 h durch Entfärberlösung (10 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure) (Weber und Osborn, 1969). Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O_{bidest.} aufbewahrt.

2.8 Rekonstitution von Membranproteinen

Unter Rekonstitution versteht man den funktionstüchtigen Einbau eines Membranproteins in ein Membransystem (Eytan, 1982; Dencher, 1989; Zakim und Scotto, 1989). Ein solches Membransystem können z.B. Liposomen sein. Bei diesen handelt es sich um künstlich hergestellte in sich geschlossenen Phospholipide, die einen mit wässrigen Medium gefüllten Innenraum besitzen, der durch eine Lipiddoppelschicht umgeben ist. Erforderlich für die Rekonstitution ist ein nativ gefaltetes Membranprotein, das in Detergenz gereinigt vorliegt. Das zu rekonstituierende Membranprotein kann nun mittels verschiedener Techniken in vorgefertigte Membranen eingebaut werden. Dabei erfolgt der Einbau grundsätzlich in zwei verschiedenen Richtungen (*cytoplasmic-out* oder *periplasmic-out*), was Einfluss auf die Funktionalität des Proteins nimmt (Eytan, 1982).

2.8.1 Herstellung von unilamellaren Vesikeln

Multilamellare Vesikeln sind für Analysen von Translokationsprozessen eher ungeeignet, da nur die äußere Schicht der Lipidmembranen untersucht werden kann. Daher werden unilamellare Vesikel benötigt.

Zur Rekonstitution von Membranproteinen wurden *E. coli*-Phospholipide (Avanti® Polar Lipids, Alabaster, USA; *E. coli Total Lipid Extract*: 57,5 % Phosphatidylethanolamin, 15,1 % Phosphatidylglycerol, 9,8 % Cardiolipin, 17,6 % Andere) verwendet. Die in Chloroform gelösten Lipide (25 mg/ml) wurden unter Stickstoffstrom vorsichtig verblasen. Anschließend wurde der Lipidfilm in Puffer W-Detergenz-Lösung (Puffer W: 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl, mit 1 % Octyl- β -D-glucopyranosid) aufgenommen und für 2 h auf Eis inkubiert. Für die Herstellung unilamellarer Vesikel fand zum einen der Extruder (Avestin Liposo-Fast™-50) oder das Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 52 H) seine Anwendung.

Die Extruder-Apparatur wurde mit zwei Filterpapieren, sowie einer Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße (200 nm) versehen. Der erforderliche Druck wurde durch zwei Hamilton-Spritzen erreicht, die die Lipidsuspension durch die Membran drücken. Im Fall der Verwendung des Ultraschallbades wurde die Lipidsuspension im Ultraschallbad beschallt, bis der Ansatz klar war (~15 min).

2.8.2 Rekonstitution von Membranproteinen mit Hilfe von Biobeads

Für die Rekonstitution von gereinigten Proteinen in Liposomen mit Hilfe von Bio-Beads®SM wurden die unilamellaren Vesikel gemäß 2.7.1. hergestellt. Der Rekonstitutionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

250 µl Lipid/OG-Gemisch (8,33 mg/ml)

60 µg solubilisiertes Membranprotein (0,2 mg/ml)

Das Lipid-Protein-Verhältnis betrug 1:41,65.

ATP (Endkonzentration 10 mM)

Der Ansatz wurde mit Puffer W auf 600 µl aufgefüllt.

Unter Verwendung von Bio-Beads®SM (Biorad, Hercules, USA), welche nach den Herstellerangaben vorbehandelt und aktiviert wurden, konnte das Detergenz nach dem Einbau des zu rekonstituierenden Membranproteins aus den Liposomen entfernt werden. Bei Bio-Beads handelt es sich um poröse Polystyrolpolymere (Harzkügelchen), die durch hydrophobe Wechselwirkungen die Detergenzmoleküle adsorbieren, sodass das Protein möglichst nicht mehr von Detergenzmolekülen umgeben ist. Die Zugabe darf jedoch nur in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis erfolgen, da die Harzkügelchen auch Membranproteine, sowie Lipidmoleküle aufgrund ihrer Hydrophobizität binden können. Jedem Rekonstitutionsansatz wurden 60 mg der Bio-Beads®SM zugegeben. Der Ansatz wurde mit Stickstoff begast und für 2 h langsam bei 4°C gerührt. Daraufhin wurden die Bio-Beads®SM gewechselt und der Ansatz für weitere 1-2 h unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (300 g, 1 min) wurden 200 µl der Proteoliposomenlösung 30 min bei 56000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Das erhaltene Proteoliposomenpellet wurde in Puffer W resuspendiert und unverdünnt oder 1:1 mit Puffer W verdünnt zur Aktivitätsmessung verwendet. Um den Einbau des Proteins in die Liposomen zu kontrollieren, wurden 12 µl des Rekonstitutionsansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen und quantifiziert.

2.8.3 ATPase-Aktivitätstest (Lanzetta *et al.*, 1979)

Die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (Pi) liefert die Energie, die für die Translokation von Kupferionen durch die P-Typ ATPasen benötigt wird. Das freigesetzte Pi kann mit der Methode nach Lanzetta *et al.*, (1979) kolorimetrisch im nanomolaren Bereich detektiert werden. Die Phosphatbestimmung erfolgt dabei diskontinuierlich an Proben, die dem Reaktionsansatz in regelmäßigen Abständen entnommen worden sind. Aus dem Phosphatgehalt der einzelnen

Proben zum Entnahmezeitpunkt t und der eingesetzten Proteinmenge wurde die Enzymaktivität in nmol Pi/ mg Protein ermittelt.

Der ATPase Aktivitätsansatz enthielt 100 mM Tris-HCl (pH 7,6), 3 mM MgCl₂, 6 mM ATP, 20 mM Cystein, 2,5 mM DTT, und 0,01 mg/ml Proteoliposomen. Die Reaktionsansätze wurden zunächst bei 30°C für eine Minute vorinkubiert, bevor die Metalle AuHCl₄ und bzw. oder CuCl₂ zugegeben worden sind. Als Kontrollen dienten Reaktionspuffer ohne und mit dem Metall sowie Proteoliposomenansätze, bei denen eine Zugabe von AuHCl₄ oder CuCl₂ nicht vorgenommen worden ist. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden dann 50 µl Probenansätze entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zu diesem wurden 800 µl Farbreagenz (Ammoniummolybdat/ Malachitgrünhydrochlorid/ Tween 20) und nach 1 min 100 µl 34 % Natriumcitrat-Lösung zugegeben. Nach 30 min bis 2 h wurde die Optische Dichte bei 660 nm mit dem TECAN Infinite 200 PRO reader (TECAN, Männersdorf, Schweiz) bestimmt.

Farbreagenzchemikalien:

0,045 % Malachitgrünhydrochlorid (MG)

4,2 % Ammoniummolybdat in 4N HCl (AM)

34 % Natriumcitrat x 2 H₂O (w/v)

Das Farbreagenz wurde wie folgt aus den oben aufgeführten Lösungen vorbereitet:

Ein 3:1 Ansatz von Malachitgrünhydrochlorid und Ammoniummolybdat wurde für mindestens 20 min gemischt und anschließend durch ein Whatman-Filter (VWR International GmbH, Dresden) filtriert. Zu einer 40 ml MG/AM-Lösung wurden anschließend 24 µl Tween 20 hinzugegeben, und der Ansatz für eine weitere Stunden auf einem Magnetrührer inkubiert. Die Lagerung der Lösung erfolgte im Dunkeln auf Eis.

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 Analytische Elektronenmikroskopie-EDX

2.9.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Aus einer Tris-MM Vorkultur, der frühen stationären Phase wurde eine zweite Vorkultur 5%ig beimpft. Diese wurde schüttelnd bei 30°C und 200 rpm für 24 h, bis zum Erreichen der späten stationären Phase, angezogen. Die Anzucht der einzelnen Kulturen fand in 55 ml Reagenzgläsern (25 mm Durchmesser, *Clark Scientific LTD*) statt. Anschließend wurden die Zellen bei 4500 g für 10 min in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert und die Zellpellets in Tris-MM mit entsprechenden Metallzusätzen resuspendiert.

Nach Inkubation der Kultur für 72 h bei 30°C und 100 rpm, wurden die Zellen direkt für 3 h mit 3 % Glutaraldehyd (Sigma, Taufkirchen) in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (SCB) fixiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4500 g für 5 min und die Aufnahme in 4 % Agar/SCB, gefolgt von einem Waschschrift mit SCB-Puffer über Nacht bei 4°C und drei Waschschriften mit dem gleichen Puffer für 5 min. Nach anschließender Postfixierung mit Osmiumtetroxid für 1 h, wurden die Proben in einer steigenden Reihe von Ethanolkonzentrationen dehydriert (10 %, 30 %, 50 %), dann mit 1 % Uranylacetat/70 % Ethanol für 1 h inkubiert und mit weiteren Ethanolreihen dehydriert (70 %, 90 % und 100 %). Anschließend sind die Proben mit Epoxidharz infiltriert (Spurr, 1969) und bei 70°C polymerisiert worden. Die Ultradünnschnitte (80-100 nm) wurden mit einem EM900 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss SMT, Oberkochen) bei 80 kV betrachtet und die Dokumentation mit einer Variospeed SSCCD Kamera SM-1k-120 (TRS, Moorenweis) vorgenommen.

2.9.1.2 EDX-Analyse

Ergänzend zur Transmissionselektronenmikroskopie wurde die EDX-Analyse (*energy dispersive X-ray analysis*) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein klassisches Verfahren, das seine Anwendung in der Analyse von oberflächennahen Bereichen von Festkörpern oder zur Charakterisierung von Ultradünnschnitten findet. Bei dem EDX-Verfahren emittiert die zu untersuchende Probe, die mit energiereichen Elektronen bestrahlt wird, Röntgenstrahlung einer für das jeweilige Element spezifischen Energie. Die Anregung dieser charakteristischen Röntgenstrahlung erfolgt dadurch, dass ein Elektron durch einen Elektronenstrahl einheitlicher Energie aus der kernnahen Elektronenschale des angeregten Atoms herausgeschlagen wird. Ein derartiger Zustand ist instabil und die entstandene Elektronenlücke wird daher mit einem energiereicheren Elektron einer entfernt befindenen Elektronenschale aufgefüllt. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Elektronenschalen wird als Röntgenquant abgegeben. Die Auswertung der erhaltenen Spektrallinien im Röntgenspektrum erlaubt es, die Zusammensetzung der Probe zu identifizieren und über die Intensität der Spektrallinien zu quantifizieren (Nadeau, 2012).

Die EDX-Messungen wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt (FEI, Titan³ GS 80-300), das mit einer hohen Helligkeit Feldemissions-Elektronenkanone, einer sphärischen Abberation (Cs)-Korrektur für die Objektivlinse und einem Siliziumdriftdetektor ausgestattet ist. Die Untersuchungen wurden an 100 nm Ultradünnschnitten im STEM-Modus (*scanning transmission electron microscopy*) und einer Beschleunigungsspannung von 80 keV

durchgeführt. Im STEM-Modus wird der Elektronenstrahl über einen Teil der untersuchenden Probe gescannt und an jedem einzelnen Punkt des gescannten Bereiches wird ein vollständiges EDX-Spektrum aufgenommen (QMap). Diese Spektren wurden mit der Esprit 1.9 Software von Bruker analysiert. Desweiteren erfolgte die EDX-Messung einzelner Partikel im Transmissionselektronenmikroskop FEI, Tecnai G² F20.

2.9.2 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS)

Für die Messung wurde die X Series II ICP-MS von Thermo Fisher eingesetzt. Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma sollte der Spurenelementanalyse in Zellen von *C. metallidurans* dienen, die verschiedenen Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren. Das Prinzip beruht auf der Ionisierung des zu analysierenden Probenmaterials in einem Plasma bei etwa 5000-10000°C. Zur Erzeugung dieses Plasmas wird ein hochfrequenter Strom ionisiertes Argon induziert. Aus diesem Plasma werden die Ionen durch zwei Blenden, dem Sampler und Skimmer, in das Vakuumsystem des Massenspektrometers überführt. Nach Fokussierung durch Linsensysteme wird der Ionenstrahl im Quadropol in Ionen unterschiedlicher Massen getrennt und anschließend quantitativ und simultan vom analog/PC Detektor erfasst (Niu und Houk, 1996).

2.9.2.1 Zellanzucht von *C. metallidurans*

Zur quantitativen Elementanalytik mittels ICP-MS wurde eine *C. metallidurans*-Vorkultur in Tris-MM bis zur frühen stationären Phase bei 30°C und 200 rpm angezogen. Mit dieser Vorkultur wurde eine zweite Tris-MM-Vorkultur 5%ig angeimpft, die dann ebenfalls bei 30°C und 200 rpm für 24 h inkubiert wurde. Die Hauptkultur wurde 2%ig angeimpft und in einem Wasserbad bei 30°C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer Optischen Dichte von 100 KE, die mittels des Klett-Summerson Colorimeter (Klett MFG Co., New York) bestimmt worden ist, wurden AuHCl₄ und CuCl₂ in definierten Konzentrationen zu den wachsenden Kulturen gegeben. Das Wachstum wurde dann bis 150 Klett unter den Ausgangsbedingungen im Wasserbad fortgesetzt und anschließend 10 ml der Zellen durch Zentrifugation bei 4500 g und 4°C für 30 min in der Eppendorf-Zentrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg) geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal mit Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,0], 10 mM EDTA) gewaschen, um überschüssige Metalle zu entfernen. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Probenvorbereitung für die ICP-MS bei -20°C. Als Nullwerte dienten Medienansätze, ohne bzw. mit den entsprechenden Metallkonzentrationen, die in parallelen Ansätzen wie die Kulturproben behandelt worden sind.

2.9.2.2 Probenvorbereitung und ICP-MS Messung

Das Zellpellet wurde in konzentriertes Königswasser suspendiert (analytischer Grad 30 % HCl und 67 % HNO₃ in einem Verhältnis von 3:1, Normatom/PROLABO) und für mindestens 4 h bei 70°C im Hybridisierungsöfen mineralisiert. Die Endkonzentrationen von HCl in der Probe betrug 5 % (v/v) und die von HNO₃ 2 % (v/v). Nach Abkühlen der Proben wurden sie auf ein Volumen von 1,5-5 ml mit Reinstwasser aufgefüllt.

2.9.2.3 Ermittlung des Metallgehaltes ganzer Zellen

Zur quantitativen Bestimmung des Metallgehaltes in den Proben, wurden vor jeder Messreihe Eichgeraden erstellt. Zu diesem Zweck wurde ein ICP-MS Multielementstandard (Merck KGaA, Darmstadt) in 5 % HCl in Konzentrationen von 0 bis 100 ppb (parts per billion) erstellt, wobei das Verhältnis der gemessenen counts gegen den internen Indiumstandard bestimmt wurde.

Die Konzentration der jeweiligen Elemente wurde in ppb bestimmt. Die gemessenen ppb-Werte der Nullwerte dienten als Korrekturfaktor für die Berechnung. Außerdem wurden Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen errechnet. Die Nachweisgrenze berechnet sich aus der Summe des Nullwertmittelwertes (MW) und der dreifachen absoluten Standardabweichung (SAW) des Nullwertes. Hingegen lässt sich die Bestimmungsgrenze aus der Summe des Nullwertmittelwertes und der zehnfachen absoluten Standardabweichung des Nullwertes bestimmen.

Nachweisgrenze: $MW+(3 \times SAW)$

Bestimmungsgrenze: $MW+(10 \times SAW)$

Für die Auswertung wurden die resultierenden ppm, ppb oder ppt-Werte via Molarer Einheiten in Atome transformiert und durch die Zellzahl in der Probe dividiert, die zuvor als *colony-forming units* bestimmt wurde.

$$\text{Atome/Zelle} = \frac{\text{ppb-Werte} \times 10^6 \times N_A}{2 \times M \times Z}$$

N_A – Avogadrokonstante $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

M – Molare Masse [g/mol]

Z – Zellzahl pro Liter [Zellen/l]

2 – Verdünnungsfaktor resultierend aus der Konzentrierung der Probe von 10 ml auf 5 ml

10^6 – Einheitenkorrekturfaktor

3 Ergebnisse

3.1 Keine Beteiligung von Staphyloferrin B an der Goldresistenz

In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit wird dem Siderophor Delftibactin A aus *D. acidovorans* eine große Bedeutung an der Reduzierung von Au(III)-Komplexen zu elementarem Au(0) im extrazellulären Raum nachgewiesen (Johnston *et al.*, 2013).

C. metallidurans ist in der Lage als einziges bisher bekanntes Siderophor in diesem Organismus Staphyloferrin B zu synthetisieren, welches zuvor Alcaligin E bezeichnet wurde (Gilis *et al.*, 1996). Die Biosynthese und das Aufnahmecluster sind unter der strikten Kontrolle des Sigmafaktors RpoI (Grosse *et al.*, 2007). Sollte dieser Siderophor an der Goldresistenz beteiligt sein, so müsste die Deletion des Sigmafaktors die Goldresistenz von *C. metallidurans* wesentlich beeinträchtigen. Um dies zu untersuchen wurden Wachstumsendpunktbestimmungen mit steigenden Konzentrationen an Goldchlorid durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Deletion von *rpoI* sowie die der verwandten Sigmafaktoren *rpoJ* und *rpoK* (Grosse *et al.*, 2007) einen leichten Anstieg an der Goldresistenz verursachten, der aus der möglichen abnehmenden Mobilisierung der Goldkomplexe durch die Mutanten resultieren könnte. Diese Deletionen führten jedoch nicht zu der drastisch abnehmenden Resistenz, die durch Deletion von Delftibactin A in *D. acidovorans* beobachtet werden konnte.

Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass die Golddetoxifizierung in den Bakterien *D. acidovorans* und *C. metallidurans* über unterschiedliche Mechanismen verlaufen muss.

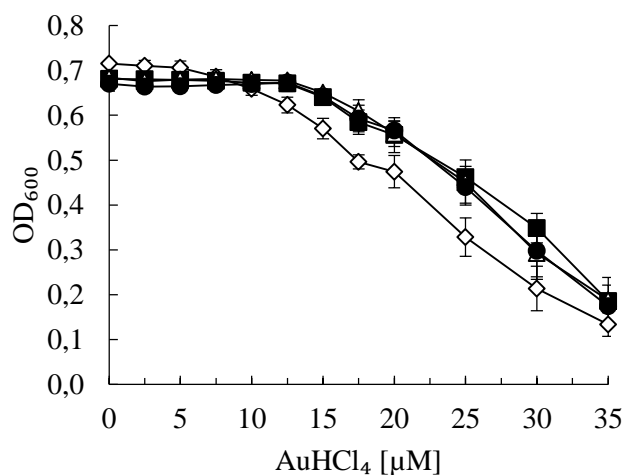


Abb. 3: Goldresistenz der Sigmafaktor-Deletionsmutanten. Der *C. metallidurans* Wildtypstamm CH34 (◇) sowie die Deletionsmutanten DN486 ($\Delta rpoJ$) (■), DN488 ($\Delta rpoI$) (△) und DN490 ($\Delta rpoK$) (●) wurden in einer Vorkultur bis zur frühen stationären Phase in Tris-MM angezogen. Aus dieser wurde eine zweite Vorkultur 5%ig angeimpft und für 24 h bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an AuHCl₄ inkubiert. Die jeweilige Optische Dichte bei 600 nm wurde nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen.

3.2 Die Megaplasmide sind nicht an der Goldresistenz und der Biomineralisierung beteiligt

Die Schwermetallresistenz von *C. metallidurans* wird durch eine Vielzahl von Resistenzsystemen vermittelt, die auf den beiden Chromosomen (Legatzki *et al.*, 2003; Munkelt *et al.*, 2004), sowie den beiden Plasmiden pMOL28 (171 kb) und pMOL30 (233 kb) lokalisiert sind (Mergeay *et al.*, 1978; Mergeay *et al.*, 1985; Monchy *et al.*, 2007). Trotz der hohen Redundanz von Schwermetallresistenzsystemen konnten jedoch in Microarrays nur wenige Genregionen auf den Plasmiden durch Goldchlorid (Reith *et al.*, 2009), Goldcyanid, Goldthiomalat oder Goldthiosulfat (Wiesemann *et al.*, 2013) hochreguliert werden. Bei diesen Systemen handelt es sich um *mer*-Determinanten auf den beiden Plasmiden sowie das auf pMOL30-lokalisierte *cop*-Cluster, das aus 19 putativen Genen besteht, deren Proteine wesentlich zur cytoplasmatischen und periplasmatischen Kupferdetoxifizierung beitragen könnten (Monchy *et al.*, 2006).

Um den Einfluss der Plasmide auf die Goldresistenz zu untersuchen wurde die Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) (2.5.2) des Wildtypstammes CH34 sowie dessen plasmidfreien Derivates AE104 bestimmt und Wachstumsendpunktbestimmungen (2.5.1.3) mit diesen Stämmen durchgeführt. Bei der MIC handelt es sich um die kleinste Metallkonzentration, bei der der untersuchte Stamm nicht mehr in der Lage ist zu wachsen. Dazu wurden den Tris-MM-Agarplatten verschiedene Konzentrationen der Schwermetallsalze zugegeben. Die *C. metallidurans*-Stämme wurden auf den Agarplatten ausgestrichen und für 4 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum ausgewertet und die MIC bestimmt (Tab. 4). Es lässt sich erkennen, dass die Plasmide keinen Einfluss auf die Resistenz gegen AuHCl₄ oder Au(S₂O₃)₂ auf Festmedium haben.

Tab. 4: Bestimmung der MIC von CH34 und AE104 (n=3).

Stamm	relevanter Genotyp	Minimale Inhibitor Konzentration (MIC) [µM]	
		AuHCl ₄	Au(S ₂ O ₃) ₂
CH34	pMOL28, pMOL30	1,0	0,6
AE104	plasmidfrei	1,0	0,6

Dieses Ergebnis konnte auch in den Wachstumsendpunktbestimmungen verifiziert werden, die in 96well-Mikroplatten mit steigenden Konzentrationen an Goldchlorid oder Goldthiosulfat durchgeführt wurden (Abb. 4). Während jedoch planktonische Zellen höhere Konzentrationen toxischer Goldkomplexe in den Flüssigkulturen tolerieren können, kann ein Wachstumsdefizit

bereits bei geringeren Konzentrationen auf Festmedium gezeigt werden. Diese Konzentrationsunterschiede konnten nicht bei anderen Schwermetallsalzen, wie Silberchlorid und Kupferchlorid nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). *C. metallidurans* kann daher abhängig von den Wachstumsbedingungen unterschiedlich mit der Goldtoxizität umgehen.

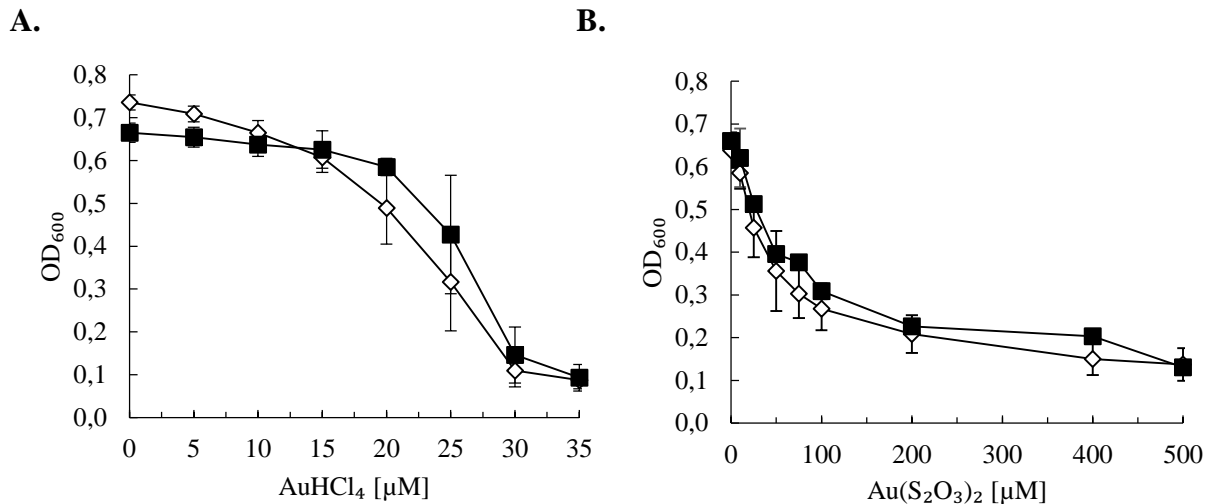


Abb. 4: Die Plasmide pMOL28 und pMOL30 von *C. metallidurans* haben keinen Einfluss auf die Resistenz von AuHCl₄ und Au(S₂O₃)₂. Die *C. metallidurans* Stämme CH34 (pMOL28, pMOL30) (◇) und AE104 (plasmidfrei) (■) wurden in einer Vorkultur bis zur frühen stationären Phase in Tris-MM angezogen. Aus dieser wurde eine zweite Vorkultur 5%ig angeimpft und für 24 h bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an A. AuHCl₄ und B. Au(S₂O₃)₂ inkubiert. Die jeweilige Optische Dichte bei 600 nm wurde nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Der Einfluss der Plasmide auf die Goldbiomineralisierung wurde mit transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit verschiedenen Konzentrationen an Goldchlorid und Goldthiosulfat für 24-80 h in Tris-MM kultiviert, um die Anzucht der Zellen für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu etablieren. Die Zellen bildeten mit 40 μM AuHCl₄ ab 56 h Nanopartikel. Bei entsprechenden Inkubationen mit Goldthiosulfat (50 μM-500 μM, bis 80 h) konnten unter den getesteten Bedingungen keine Nanopartikel detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu nicht behandelten Zellen bildeten die mit 50 μM AuHCl₄ inkubierten Zellen des Wildtypstammes CH34(pMOL28, pMOL30) sowie dessen Derivate AE104(plasmidfrei), AE126(pMOL28) und AE128(pMOL30) fibrilläre Strukturen des Cytoplasmas sowie metallische Goldnanopartikel in der Größenordnung von $13,3 \pm 3,9$ nm.

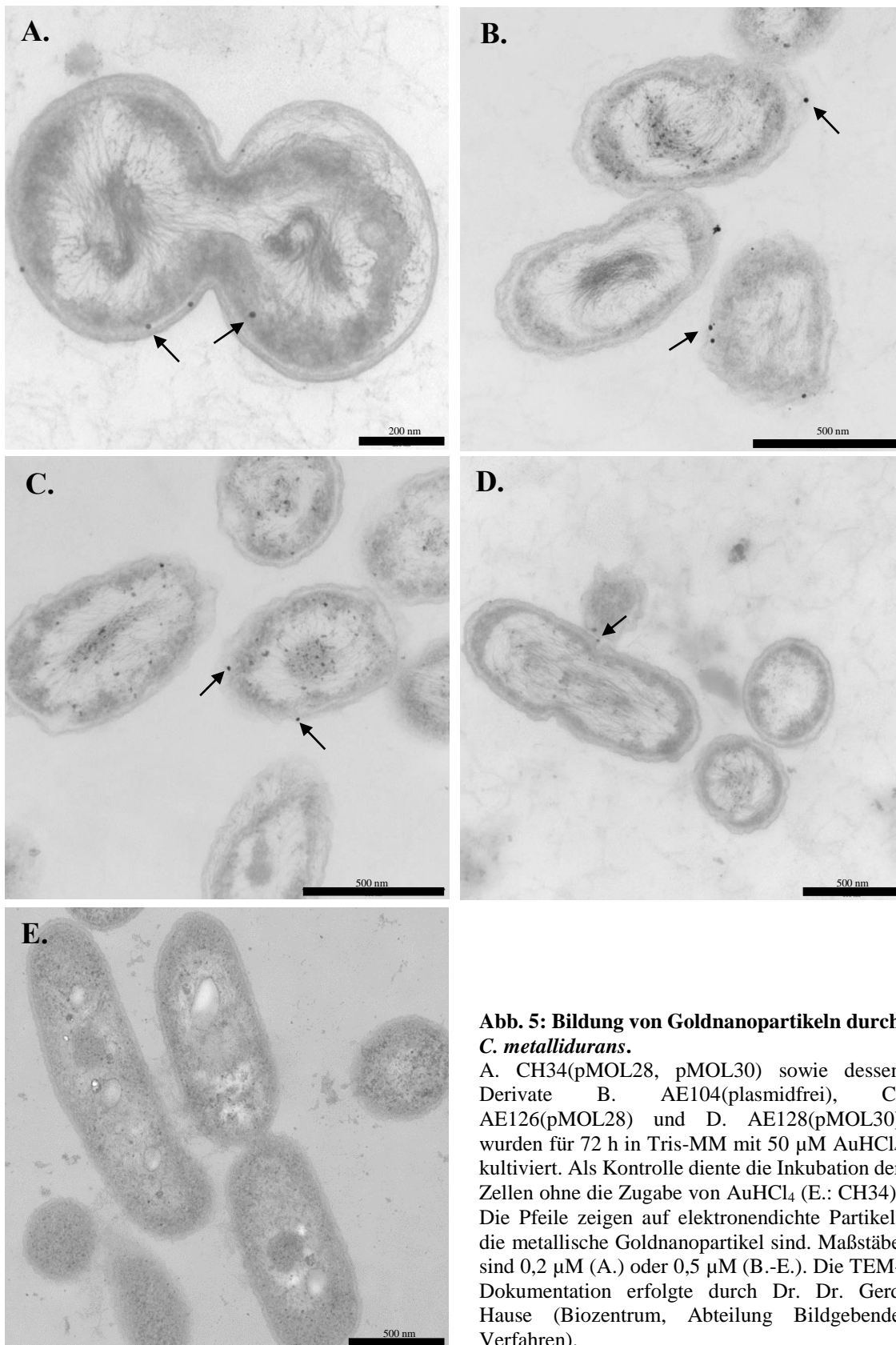


Abb. 5: Bildung von Goldnanopartikeln durch *C. metallidurans*.

A. CH34(pMOL28, pMOL30) sowie dessen Derivate B. AE104(plasmidfrei), C. AE126(pMOL28) und D. AE128(pMOL30) wurden für 72 h in Tris-MM mit $50 \mu\text{M}$ AuHCl_4 kultiviert. Als Kontrolle diente die Inkubation der Zellen ohne die Zugabe von AuHCl_4 (E.: CH34). Die Pfeile zeigen auf elektronendichte Partikel, die metallische Goldnanopartikel sind. Maßstäbe sind $0,2 \mu\text{M}$ (A.) oder $0,5 \mu\text{M}$ (B.-E.). Die TEM-Dokumentation erfolgte durch Dr. Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Abteilung Bildgebende Verfahren).

Die Analyse der chemischen Zusammensetzung der elektronendichten Partikel wurde mit dem FEI TEM/STEM Tecnai G² F20 durchgeführt. Dazu wird die bei der Messung entstehende charakteristische Röntgenstrahlung analysiert (*energy dispersive X-ray analysis*, EDX). Die EDX-Analyse ist exemplarisch an den TEM-Schnitten des plasmidfreien Derivates AE104 dargestellt, dessen Zellwachstum mit 50 µM AuHCl₄ erfolgte. Es konnten Goldnanopartikel im Periplasma und an der Cytoplasmamembran (Abb. 6) sowie in wenigen Fällen auch im Cytoplasma (s. Anhang Abb. 36) analysiert und identifiziert werden. Neben Gold als Bestandteil dieser Nanostrukturen konnten auch Osmium, Uran und Kupfer detektiert werden, dessen Vorkommen auf die Probenvorbereitung für die TEM-Untersuchungen zurückgeführt werden kann. Osmium und Uran fanden bei der Fixierung der Proben ihre Verwendung, während Kupfer auf das Trägernetzchen zurückzuführen ist, auf dem die Ultradünnschnitte von 100 nm aufgezogen wurden. Als Kontrolle erfolgte die elementspezifische Analyse außerhalb der Zelle, in denen kein Gold detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

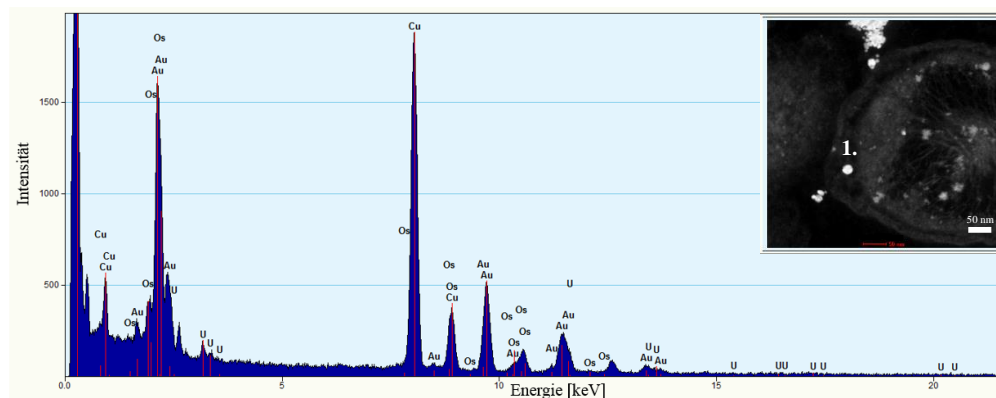


Abb. 6: Transmissionselektronenmikroskopie eines *C. metallidurans* Dünnschnittes mit EDX-Analyse. EDX-Analyse eines im Periplasma lokalisierten Goldnanopartikels. Die weiße Zahl im STEM-Bild zeigt die Nanostruktur, die während der EDX-Analyse gescannt wurde. Bei dem 17 nm großen Partikel im Periplasma konnte Gold als Bestandteil identifiziert werden. Daneben konnten die Fixierungsreagenzien Osmium und Uran sowie Kupfer vom Trägernetzchen detektiert werden. Die technische Betreuung des Gerätes wurde von Lutz Berthold vorgenommen (Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik, Halle).

Die elementspezifische Analyse einer im TEM-Schnitt sichtbaren Zelle wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop FEI TEM/STEM Titan³ G2 60-300 durchgeführt. Das Titan-EDX bietet neben der gleichzeitigen elementspezifischen Identifikation der Nanostrukturen einer Zelle auch die Möglichkeit der ersten Quantifizierung der chemischen Komposition mit Präzision im subprozentualen-Bereich (Massenauflösung von >0,5-1% des Massenanteils). Die absolute Konzentration wurde ermittelt, indem verschiedene Korrekturen in Bezug auf Matrixeffekte durchgeführt wurden. Diese Korrekturen werden unter dem Begriff

ZAF zusammengefasst (Z-Kernladungszahleffekt, A-Absorption, F-Fluoreszenz). Geräte wie das Titan-EDX können eine Software-basierte standardlose Quantifizierung durchführen, die auf eine Anpassung von Korrekturfaktoren zum gemessenen Spektrum beruht. Die Microtom-Dünnschnitte zeigten neben Gold als Nanostrukturen im Periplasma, an der Cytoplasmamembran und durch Lyse der Zellen im extrazellulären Raum (s. Anhang Abb. 37) auch eine Verteilung von Gold im Cytoplasma bzw. im Nucleoid mit einem Massenanteil von 5,4 %.

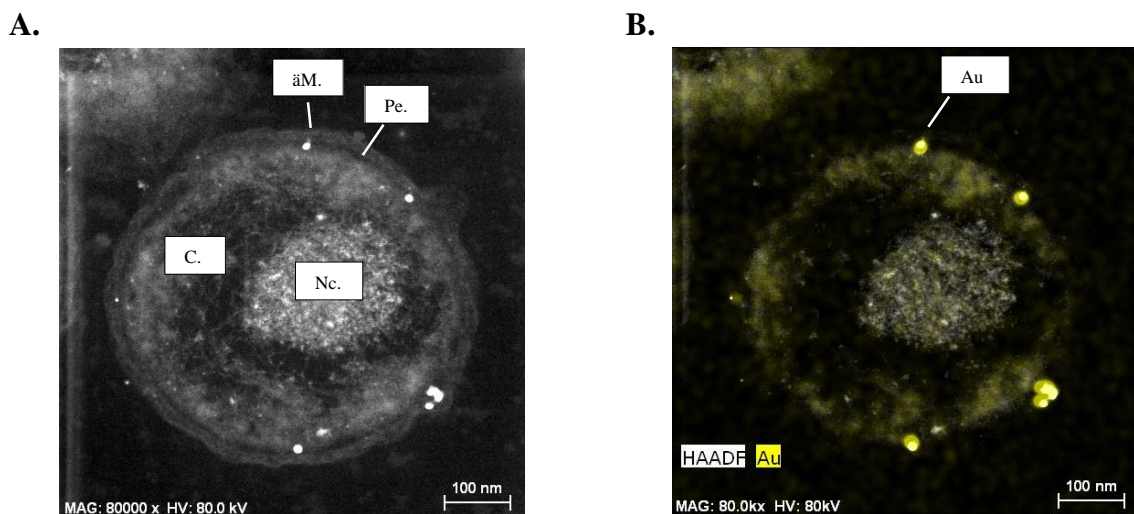


Abb. 7: Inkubation von AE104 mit AuHCl₄. Der Stamm AE104 wurde mit 50 μM AuHCl₄ für 72 h kultiviert. A. STEM-Aufnahme mit HAADF-Detektor, B. HAADF-STEM kombiniert mit EDX-Nanoanalytik um eine direkte Korrelation der Abbildung mit der lokalen Goldzusammensetzung zu erhalten (XEDS-energy dispersive X-ray spectrometry, Goldkanal [L α ₁] in gelb gezeigt). Nc.: Nucleoid, C.: Cytoplasma, Pe.: Periplasma, äM: äußere Membran. Die Aufnahmen und die Auswertungen erfolgten durch Lutz Berthold (Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik, Halle).

Das schwermetallresistente Bakterium *C. metallidurans* benötigt daher die beide Plasmide mit den dort lokalisierten Resistenzsystemen nicht für die Goldresistenz oder die Biotransformation von Gold.

3.3 Interferenz der Gold- und Kupferresistenz

3.3.1 Die Kupferinkubation erhöht die Goldsensitivität

Ausgehend von ICP-MS bzw. ICP-OES-Bestimmungen von Bodenprobenmaterial aus goldhaltigen Standorten in Australien konnte eine Korrelation zwischen den Goldvorkommen und erhöhten Konzentrationen an Schwermetallen, wie Kupfer, Nickel, Zink oder Kobalt festgestellt werden (Reith *et al.*, 2012). In einem nächsten Schritt wurde daher in Wachstumsendpunktbestimmungen die Interferenz der Goldresistenz durch andere Schwermetalle, wie CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂ und ZnCl₂ untersucht. Dazu wurde eine zweite

Vorkultur von CH34 5%ig in frischem Tris-MM mit der entsprechenden Konzentration an Schwermetall inkubiert. Die Konzentrationen an CoCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 und ZnCl_2 sind so gewählt worden, dass sie keinen Einfluss auf das Wachstum der zweiten Vorkultur oder der Hauptkultur aufwiesen, wie in zeitlichen Wachstumskurven dokumentiert wurde (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle erfolgte die Anzucht von CH34 ohne die Zugabe eines Schwermetalls in der zweiten Vorkultur (Abb. 8).

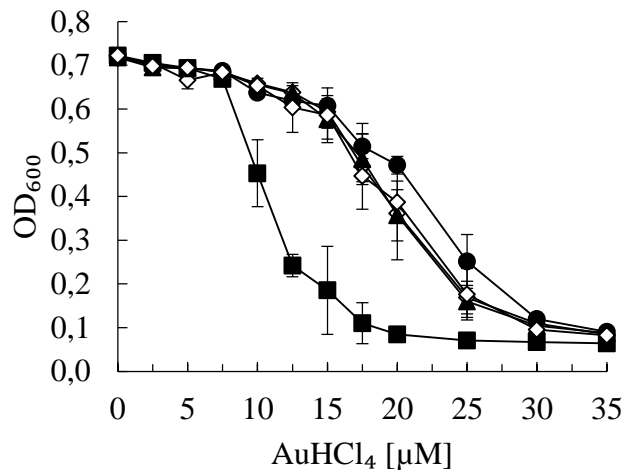


Abb. 8: Die Abhängigkeit der Goldtoxizität von der Vorinkubation mit Schwermetallkationen. CH34-Zellen wurden bis zur frühen stationären Phase in Tris-MM bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Aus dieser Kultur wurde eine zweite Vorkultur 5%ig in frischem Tris-MM verdünnt, mit 100 µM CuCl_2 (■), 100 µM CoCl_2 (●), 100 µM NiCl_2 (▲) oder 100 µM ZnCl_2 (○) versetzt und für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle erfolgte das Wachstum von CH34 in der zweiten Vorkultur ohne eine Metallzugabe (◇). Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an AuHCl_4 bei 30°C und 1300 rpm inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3-5 unabhängigen Messungen.

Nur die Vorinkubation mit CuCl_2 führte zu einer Steigerung der Goldsensitivität. Ausgehend von dieser Beobachtung und der Ähnlichkeit der Metallchemie von Gold und Kupfer wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass es eine Interferenz zwischen Gold und den Kupferresistenzsystemen geben könnte, die wesentlich die Goldresistenz und die Bildung der Goldnanopartikel durch Au(III)-Komplexe beeinflussen könnte.

Für die nachfolgenden Analysen sind Gold- und Kupferkonzentrationen gewählt worden, die den Bedingungen an den goldhaltigen Standorten gleichen und keinen Einfluss auf das Wachstum der zweiten Vorkultur oder der Hauptkultur, sowie der Zellmorphologie oder der Zelldichte (cfu) hatten (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss einer Kupfervorinkubation auf die Kupfer- und Goldresistenz wurde mit den Stämmen CH34(pMOL28, pMOL30) und AE104(plasmidfrei) bei unterschiedlichen Konzentrationen an CuCl_2 genauer analysiert (Abb. 9).

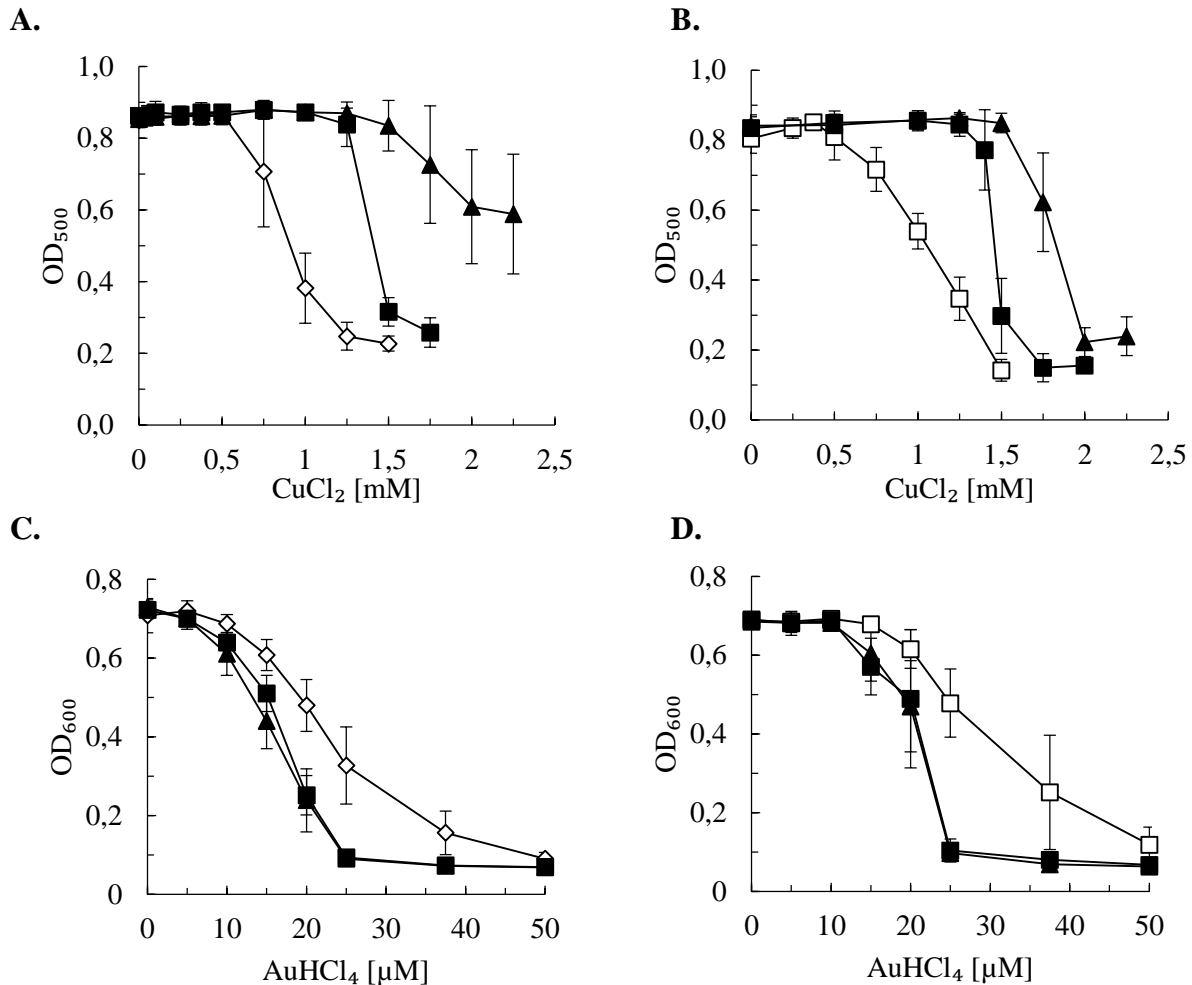


Abb. 9: Einfluss einer Kupfervorinkubation auf die Kupfer- und Goldresistenz von CH34 (A., C.) und AE104 (B., D.). Eine zweite Vorkultur wurde 5%ig aus der ersten Vorkultur in frischem Tris-MM angeimpft und mit 50 μM (■) oder 200 μM Cu(II) (▲) versetzt und für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle erfolgte das Wachstum von CH34 (◇) und AE104 (□) ohne eine Metallzugabe. Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an CuCl₂ oder AuHCl₄ bei 30°C und 1300 rpm inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 500 nm bzw. 600 nm nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 5 unabhängigen Experimenten.

Die Abnahme der Goldresistenz war dabei unabhängig von den Plasmiden pMOL28 und pMOL30 und der in diesen Experimenten eingesetzten Kupferkonzentration (Abb. 9 C/D). In diesem Zusammenhang verdeutlichten die zeitlichen Wachstumskurven der CH34-Zellen (s. Anhang Abb. 38A), dass eine Vorinkubation mit 200 μM CuCl₂ zu einer längeren *lag*-Phase und einem etwa 5 h verzögerten Eintritt in die stationäre Phase führte. Dieser Effekt konnte mit einer geringeren Konzentration an CuCl₂ von 5 μM nicht gezeigt werden. Deutlichere Wachstumsunterschiede waren durch Vorinkubation der Zellen erkennbar, deren Wachstum in der Hauptkultur mit 10 μM AuHCl₄ statt 5 μM AuHCl₄ vorgenommen wurde. Dies führte zu einer längeren *lag*-Phase der Zellen, wobei auch innerhalb des Zeitintervalls nicht die gleichen

Optischen Dichten der stationären Phase erreicht werden konnten, wie sie für Zellen ohne eine Vorinkubation ermittelt wurden (s. Anhang Abb. 38B).

Während eine Vorinkubation mit CuCl_2 zu einer Steigerung der Goldsensitivität führte, erhöhte sie die Kupferresistenz von CH34(pMOL28, pMOL30) und AE104(plasmidfrei) (Abb. 9A/B). Ab einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ CuCl_2 in der zweiten Vorkultur war ein deutlicher Resistenzunterschied zwischen den beiden Stämmen erkennbar, der auf das ausgedehnte *cop*-Cluster auf pMOL30 von CH34 zurückgeführt werden kann.

Die inversen Experimente mit einer Goldvorinkubation hatten keinen Einfluss auf das Resistenzniveau gegen AuHCl_4 oder CuCl_2 von CH34 und AE104, wie in Wachstumsendpunktbestimmungen (Abb 10) und zeitlichen Wachstumskurven (s. Anhang Abb. 39A/B) dokumentiert wurde.

Kontroll-Experimente mit CoCl_2 verdeutlichten bereits bei geringen Konzentrationen die Notwendigkeit der Plasmide für dessen Detoxifizierung. So führte eine Vorinkubation von CH34-Zellen zu einer deutlichen Resistenzsteigerung (s. Anhang Abb. 40A), jedoch beeinflussten variierende Konzentrationen an CoCl_2 nicht die Goldresistenz von CH34 und AE104 (CH34: $100 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ CoCl_2 , AE104: $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ CoCl_2) (s. Anhang Abb. 40 C/D). Eine Vorinkubation mit AuHCl_4 verursachte auch keine Änderung der Resistenz gegen CoCl_2 (s. Anhang Abb. 41A/B).

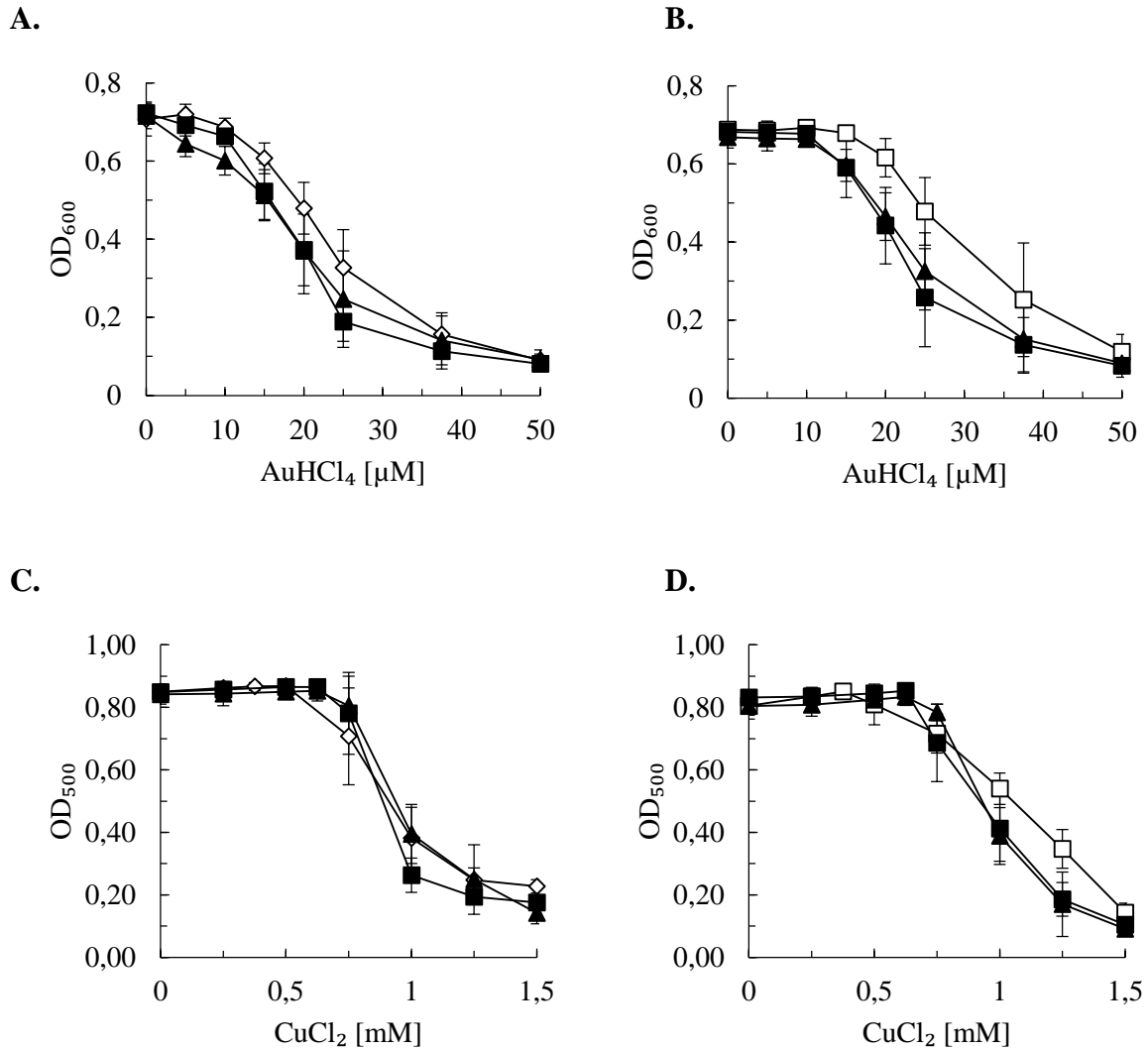


Abb. 10: Einfluss einer Goldvorinkubation auf die Gold- und Kupferresistenz von CH34 (A.,C.) und AE104 (B., D.). Eine zweite Vorkultur wurde 5%ig aus der ersten Vorkultur in frischem Tris-MM angeimpft, mit 2,5 μM (■) oder 5 μM AuHCl₄(▲) versetzt und für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle erfolgte das Wachstum von CH34 (◇) und AE104 (□) ohne eine Metallzugabe. Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an AuHCl₄ oder CuCl₂ bei 30°C und 1300 rpm inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 500 nm bzw. 600 nm nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 7 unabhängigen Experimenten.

Das Phänomen der Steigerung der Goldsensitivität durch eine Vorinkubation mit CuCl₂ konnte auch bei Untersuchungen mit *E. coli* W3110 beobachtet werden (Abb. 11). Im Vergleich zu *C. metallidurans* ist die Goldresistenz jedoch deutlich geringer was auf die unterschiedlichen Animpfvolumina der Hauptkultur zurückgeführt werden kann. Des Weiteren konnte im Unterschied zu *C. metallidurans* die Goldsensitivität mit steigenden Konzentrationen an CuCl₂ erhöht werden. Bei der Interferenz der Goldresistenz durch CuCl₂ könnte es sich demnach um einen generellen Mechanismus handeln.

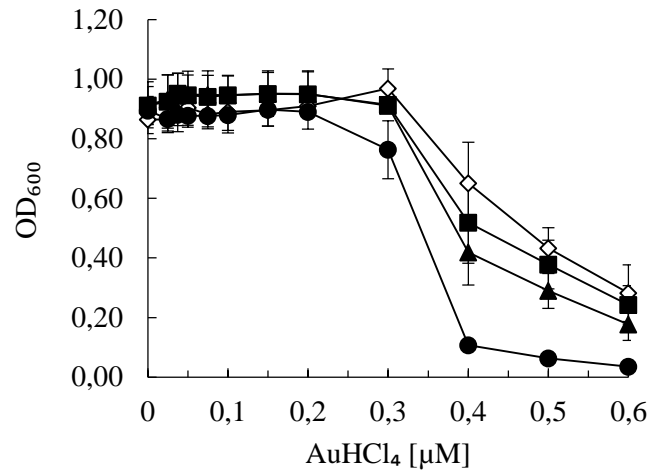
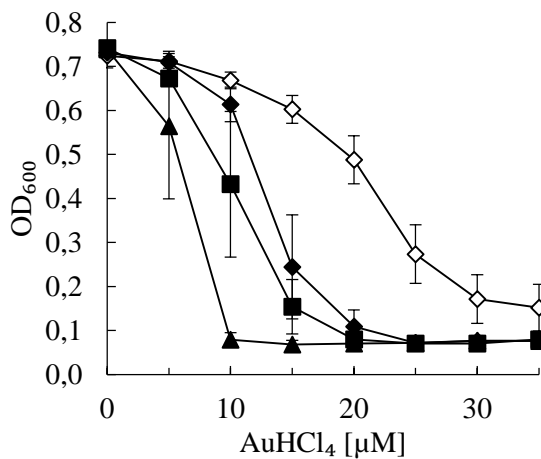


Abb. 11: Einfluss der Goldresistenz des *E. coli* Stammes W3110 durch Vorinkubation mit CuCl₂. LB-Übernachtskulturen wurden 1:400 in Tris-MM verdünnt und in Anwesenheit von 0,05 mM (■), 0,1 mM (▲) oder 0,25 mM CuCl₂ (●) oder ohne (◇) CuCl₂ für 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Vorkulturen wurde erneut in Tris-MM 1:400 verdünnt und ohne bzw. mit der gleichen Konzentration an CuCl₂ wie in der zweiten Vorkultur für zwei Stunden bei 37°C kultiviert. Diese Mittelkulturen wurde 1:400 in der Hauptkultur eingesetzt und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an AuHCl₄ inkubiert. Nach 16-stündigem Wachstum wurde die Optische Dichte bei 600 nm ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

In weiteren Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Anwesenheit von Kupferionen in der zweiten Vorkultur maßgebend die Goldresistenz von *C. metallidurans* beeinflussten. Die Zugabe einer definierten Kupferkonzentration zu steigenden Konzentrationen an AuHCl₄ in der Hauptkultur führte mit CH34- und AE104-Zellen zur größten Abnahme der Goldresistenz. Die Resistenz konnte jedoch durch eine zusätzliche Vorinkubation mit CuCl₂ wieder gesteigert werden (Abb. 12). Daneben hatte die gleichzeitige Zugabe beider Metalle auch eine Reduzierung der Kupferresistenz zur Folge, wobei eine Goldvorinkubation keine Auswirkung auf die Resistenz des Metallsalzes Kupfer hatte (Abb. 13). Die beobachteten Ergebnisse waren dabei unabhängig von den Stämmen und der eingesetzten Konzentration an CuCl₂. Die Abb. 12 fasst die Ergebnisse für CH34 und AE104 bei 200 μM CuCl₂ zusammen. Gleiche Effekte konnten jedoch auch bei geringeren Konzentrationen an CuCl₂ (50 μM) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

A.



B.

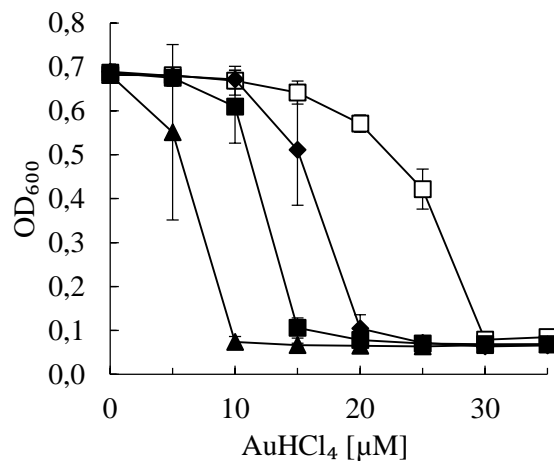
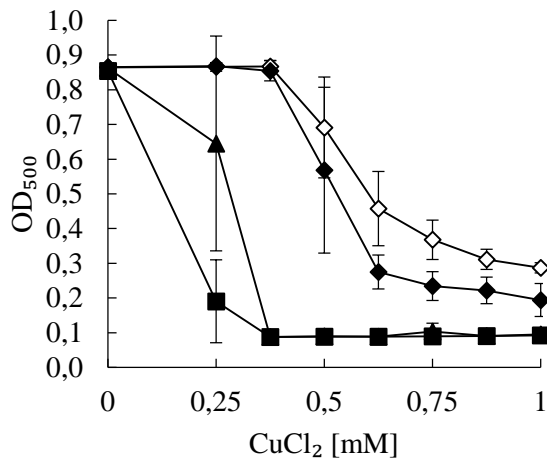


Abb. 12: Einfluss der Goldresistenz von CH34 (A.) und AE104 (B.) durch 200 μM CuCl_2 . Aus einer Vorkultur der frühen stationären Phase wurde eine zweite 24 h Vorkultur 5%ig angeimpft und 10%ig in Tris-MM-Hauptkulturen mit den steigenden Konzentrationen an AuHCl_4 überimpft. Nach Inkubation für 20 h bei 30°C wurde die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Als Kontrolle erfolgte die Anzucht ohne Metallinkubation: CH34(◇)AE104 (□). Daneben wurden Kulturen mit 200 μM CuCl_2 in der zweiten Vorkultur (◆) oder parallel zu steigenden Konzentrationen an AuHCl_4 in der Hauptkultur (▲) inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Kulturen vorinkubiert und enthielten auch die gleiche Konzentration an CuCl_2 in der Hauptkultur (■). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

A.



B.

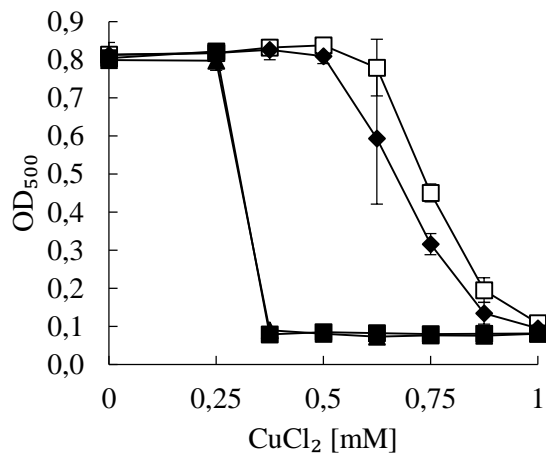


Abb. 13: Einfluss der Kupferresistenz von CH34 (A.) und AE104 (B.) durch 2,5 μM AuHCl_4 . Aus einer Vorkultur der frühen stationären Phase wurde eine zweite 24 h Vorkultur 5%ig angeimpft und 10%ig in Tris-MM-Hauptkulturen mit steigenden Konzentrationen an CuCl_2 überimpft. Nach Inkubation für 20 h bei 30°C wurde die Optische Dichte bei 500 nm bestimmt. Als Kontrolle erfolgte die Anzucht ohne Metallinkubation: CH34(◇), AE104 (□). Daneben wurden Kulturen in den Kupferexperimenten mit 2,5 μM AuHCl_4 in der zweiten Vorkultur (◆) oder parallel zu steigenden Konzentrationen an CuCl_2 in der Hauptkultur (▲) inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Kulturen sowohl vorinkubiert und enthielten auch die gleiche Konzentration an AuHCl_4 in der Hauptkultur (■). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens sieben unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse konnten auch in der Bestimmung der MIC verifiziert werden (Abb. 14). Die Anwesenheit beider Metalle führte zu einer Abnahme der MIC von AuHCl_4 und CuCl_2 auf

festem Tris-MM. Dabei folgten die Abnahmen einer linearen Funktion mit einem Regressionskoeffizienten von 95,8 % für AuHCl_4 und 90,6 % für CuCl_2 . Eine Kupferkonzentration von 864 μM reduzierte die MIC von Gold um die Hälfte. Dieser Wert lag unter den 50 % des MIC-Wertes von CuCl_2 , der ohne die gleichzeitige Zugabe mit AuHCl_4 bestimmt werden konnte (2,25 mM). Hingegen waren 0,54 μM AuHCl_4 nötig um die MIC von CuCl_2 um die Hälfte zu reduzieren. Auch dieser Wert lag nahe an den 50 % des MIC-Wertes von Gold ohne die gleichzeitige Anwesenheit von Kupfer (0,96 μM).

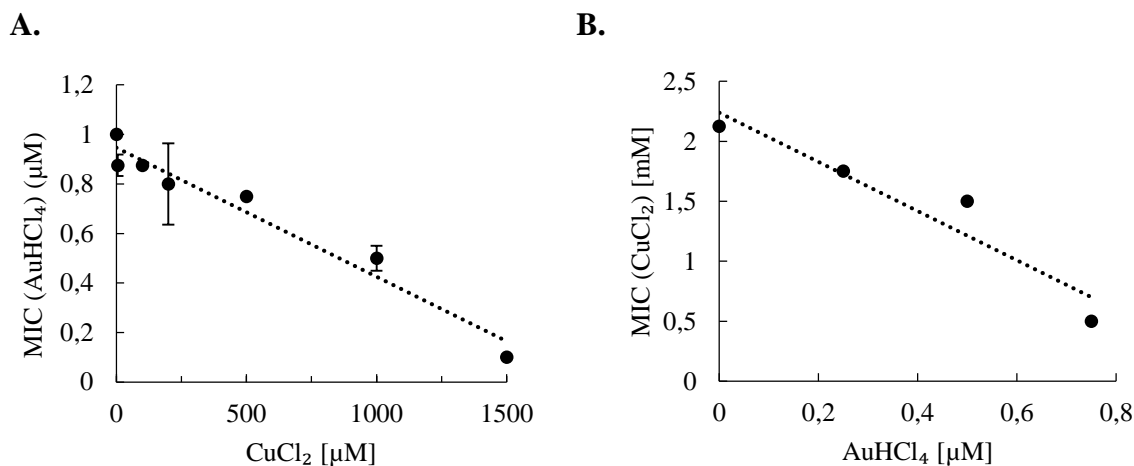


Abb. 14: Minimale Inhibitor Konzentration von AuHCl_4 und CuCl_2 in Gegenwart des jeweilig anderen Metalls. A. Au(III)-MIC von CH34 in Gegenwart steigender Konzentrationen an CuCl_2 . Die gestrichelte Linie stellt die lineare Regression mit der Funktion $\text{MIC}(\text{AuHCl}_4) = 0,95 \mu\text{M} - 5,21 \times 10^{-4} \times \text{Cu}(\text{II})$ (Regressionskoeffizient 95,8 %) dar. B. Cu(II)-MIC von CH34 in Gegenwart steigender Konzentrationen an AuHCl_4 . Die Funktion ist $\text{MIC}(\text{CuCl}_2) = 2,24 \text{ mM} - 2,05 \times \text{Au}(\text{III})$ (Regressionskoeffizient 91 %). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Messungen.

3.3.2 Veränderung der Gold- und Kupfergehalte durch Metallinkubation

Einhergehend mit diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, inwieweit Änderungen in den Gold- und Kupfergehalten zur Reduzierung der Resistenzen beitragen könnten. Die *C. metallidurans*-Stämme CH34(pMOL28, pMOL30) und AE104(plasmidfrei) wurden hierzu in Tris-MM angezogen und bei 150 Klett-Einheiten, der mittleren exponentiellen Wachstumsphase, geerntet. Neben der Metallinkubation der Kulturen in der zweiten Vorkultur erfolgte bei 100 Klett die Zugabe von 2,5 μM AuHCl_4 und/oder 100 μM CuCl_2 in der Hauptkultur. Nach zwei Waschschrritten wurden die Zellen mineralisiert und anschließend der Metallgehalt mit der ICP-MS bestimmt und mit Hilfe der cfu (*colony forming unit*) der Metallgehalt pro Zelle berechnet (2.9.2). Eine Zusammenfassung der Gold- und Kupfergehalte der Stämme bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ist in Tab. 5 dargestellt. Das Kultivierungsmedium enthielt bereits 6 nM Kupfer, was in der Tabelle nicht seine

Berücksichtigung findet, sondern lediglich die zugegebenen Metallkonzentrationen aufgeführt sind.

Für andere Metalle konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden, so dass sie daher in der Tabelle nicht aufgelistet wurden. Für die Makroelemente Magnesium und Eisen wurden 10×10^6 Atome/Zelle und 700×10^3 Atome/Zelle und für die Mikroelemente Zink 70.000 Atome/Zelle und Kobalt 5.000 Atome/Zelle berechnet.

Tab. 5: Kupfer- und Goldgehalt von CH34 und AE104 bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>4).

				Stamm	
Vorkultur		Hauptkultur		CH34	AE104
Au(III)(μ M)	Cu(II) (μ M)	Au(III) (μ M)	Cu(II) (μ M)	Kupfer [Atome/Zelle $\times 10^3$]	
0	0	0	0	09 \pm 05	18 \pm 06
0	0	2,5	0	07 \pm 05	14 \pm 06
0	0	0	100	27 \pm 07	84 \pm 11
0	0	2,5	100	58 \pm 17	140 \pm 10
0	100	2,5	0	32 \pm 03	46 \pm 04
0	100	0	100	44 \pm 07	66 \pm 12
0	100	2,5	100	51 \pm 07	73 \pm 08
2,5	0	2,5	0	04 \pm 04	13 \pm 05
2,5	0	0	100	59 \pm 03	68 \pm 03
2,5	0	2,5	100	80 \pm 11	144 \pm 17

Au(III) (μ M)	Cu(II) (μ M)	Au(III) (μ M)	Cu(II) (μ M)	Gold [Atome/Zelle $\times 10^3$]	
0	0	0	0	00 \pm 00	00 \pm 00
0	0	2,5	0	41 \pm 09	50 \pm 07
0	0	0	100	00 \pm 00	00 \pm 00
0	0	2,5	100	96 \pm 05	176 \pm 21
0	100	2,5	0	58 \pm 02	105 \pm 11
0	100	0	100	00 \pm 00	00 \pm 00
0	100	2,5	100	84 \pm 09	93 \pm 08
2,5	0	2,5	0	50 \pm 09	72 \pm 10
2,5	0	0	100	15 \pm 03	10 \pm 03
2,5	0	2,5	100	122 \pm 27	192 \pm 28

Die Zugabe von CuCl_2 oder AuHCl_4 nach Erreichen von 100 Klett führte in den Stämmen CH34 und AE104 zu unterschiedlichen Kupfergehalten, jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden im Goldgehalt (mit der Ausnahme der zusätzlichen Zugabe von Kupfer). CH34 mit seinem ausgedehnten *cop*-Cluster auf pMOL30 besitzt eine deutlich erhöhte Kapazität an Efflux- und

Speichersystemen, die wesentlich zur Detoxifizierung von Kupfer beitragen und den verringerten Kupfergehalt erklären könnten. Eine Vorinkubation mit CuCl_2 steigerte die Goldsensitivität, was unter den Wachstumsbedingungen für die Metallgehaltanalyse mittels ICP-MS mit einer Zunahme des Goldgehaltes in den CH34- und AE104-Zellen einhergeht. Im Gegensatz zu dem geringen Anstieg des Goldgehaltes in CH34 um 17.000 Goldatome pro Zelle, verdoppelte sich der Metallgehalt in dem plasmidfreien Derivat AE104 um 50.000 Goldatome pro Zelle. Die Zugabe beider Metalle in der Hauptkultur führte zur größten Abnahme der Gold- und Kupferresistenz, was sich in der Zunahme beider Metalle in der Analyse der Metallgehalte widerspiegelte. Für CH34-Zellen konnten unter diesen Wachstumsbedingungen 57 % mehr Goldatome/Zelle und 53 % mehr Kupferatome/Zelle detektiert werden. Für AE104 lag die Zunahme des Metallgehaltes für die Goldatome/Zelle bei 71,6 % und für die Kupferatome/Zelle bei 40 %. Eine zusätzliche Vorinkubation mit AuHCl_4 hatte keine Auswirkung auf die Metallgehalte. Eine Vorinkubation mit CuCl_2 führte jedoch zu einer 50%igen Abnahme des Gold- und Kupfergehaltes der Gold/Kupfer-inkubierten AE104-Zellen. In CH34 blieb der Gehalt beider Metalle hingegen annähernd gleich.

3.3.3 Die ATPase-Aktivität der Cu(I)-P-Typ ATPase CupA wird durch AuHCl_4 gehemmt

Bei der Gold-Kupfer-Interferenz scheint es sich um einen allgemeinen Mechanismus der Organismen zu handeln. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von CuCl_2 in der Hauptkultur zu einer Zunahme der Gold- und Kupfersensitivität führte, die auf eine erhöhte Akkumulation des Gold- und Kupfergehaltes der CH34- und AE104-Zellen zurückgeführt werden kann. Es stellte sich die Frage, wie der erhöhte Gehalt an Kupfer erklärt werden kann. Könnte der Kupfertransport aus dem Cytoplasma über Cu(I)-P-Typ ATPasen durch Goldchlorid gehemmt sein?

P-Typ ATPasen gehören zur Familie der membrangebundenen primären Transportsysteme (Fagan und Saier, 1994), die durch die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i die Energie für den Transport beispielsweise von Schwermetallen bereitstellen. Dem Schwermetallresistenten Stamm CH34 werden 13 putative P-Typ ATPasen vorhergesagt, von denen vier als putative Cu(I)-P-Typ ATPasen (CupA, CopF, RdxI, CtpA) annotiert sind (von Rozycki und Nies, 2009). CupA besitzt eine 45%ige Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zu GolT aus *S. enterica* sv. Typhimurium und ist im Cluster auf Chromosom 1 kodiert, das aus drei sich überlappenden und divergent verlaufenden Genen gebildet wird, die als *cupR* : MerR-Familie

Transkriptionsregulator, *cupA*: Schwermetall-translozierende P-Typ ATPase und *cupC*: Schwermetalltransportprotein annotiert sind. CopF ist auf pMOL30 kodiert und von dem *cop*-Cluster umgeben, dem eine Bedeutung bei der cytoplasmatischen oder periplasmatischen Kupferdetoxifizierung zukommt. Die beiden anderen P-Typ ATPasen, RdxI und CtpA1, werden chromosomal kodiert, befinden sich jedoch in keinem Kupferresistenzcluster, sondern in Nachbarschaft zu Genen, die für die Untereinheiten der Cytochrom-*c*-Oxidasen kodieren. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss der vier putativen P-Typ ATPasen auf die Gold- und Kupferresistenz untersucht. Hierzu wurden die Deletionsmutanten der P-Typ ATPasen *rdxI* und *ctpA1* mit Hilfe des *cre-lox* Systems hergestellt, während die der P-Typ ATPasen *cupA* und *copF* bereits zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen. Die Erzeugung der *rdxI*-Deletionsmutante ist in Abb. 15 dargestellt. Zunächst wurden ca. 300 bp Fragmente direkt stromaufwärts des Startcodons ATG mittels der Deletionsprimer (NW Rmet_2046 *MunI* und NW Rmet_2046 *NotI*) und 14 bp vor dem Stoppcodon TGA mittels der Deletionsprimer (NW Rmet_2046 *ApaI* und NW Rmet_2046 *AgeI*) amplifiziert. Die Fragmente wurden dann über die eingefügten Restriktionsschnittstellen nacheinander in den Rekombinationsvektor pECD1003 kloniert, sodass sie eine Kanamycin-Resistenzkassette flankieren. Der daraus entstandene Vektor pECD1369 wurde in *E. coli* S17/1 transformiert und mit dessen Hilfe in *C. metallidurans* CH34 und AE104 konjugiert. Im ersten Rekombinationsschritt ist der Vektor in das Genom über die klonierten Sequenzen stromaufwärts bzw. stromabwärts des Gens inseriert worden, was zur Bildung eines Cointegrates führte. Erst mit dem folgenden zweiten Rekombinationsschritt entstand die Kanamycin-Insertionsmutante. Die markerlose Deletion wurde durch den darauffolgenden konjugativen Transfer des Vektors pCM157 erreicht, auf dem das Gen *cre* aus dem P1-Phagen kodiert ist und dessen Expression vom *lacZ*-Promotor aus *E. coli* gesteuert wird. Die Cre-Rekombinase erkennt die Kanamycin-Kassette flankierenden *loxP*-sites und katalysiert die Exzision der Resistenzkassette. Die Deletionsmutanten wurden durch PCR mit den beiden äußeren Deletionsprimern überprüft. Dabei wurde in der Mutante ein durch den Deletionsbereich verkürztes PCR-Fragment detektiert (Daten nicht gezeigt). Um unspezifische Rekombinationsereignisse auszuschließen, wurden die Deletionen zusätzlich noch mit Southern/DNA::DNA-Hybridisierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

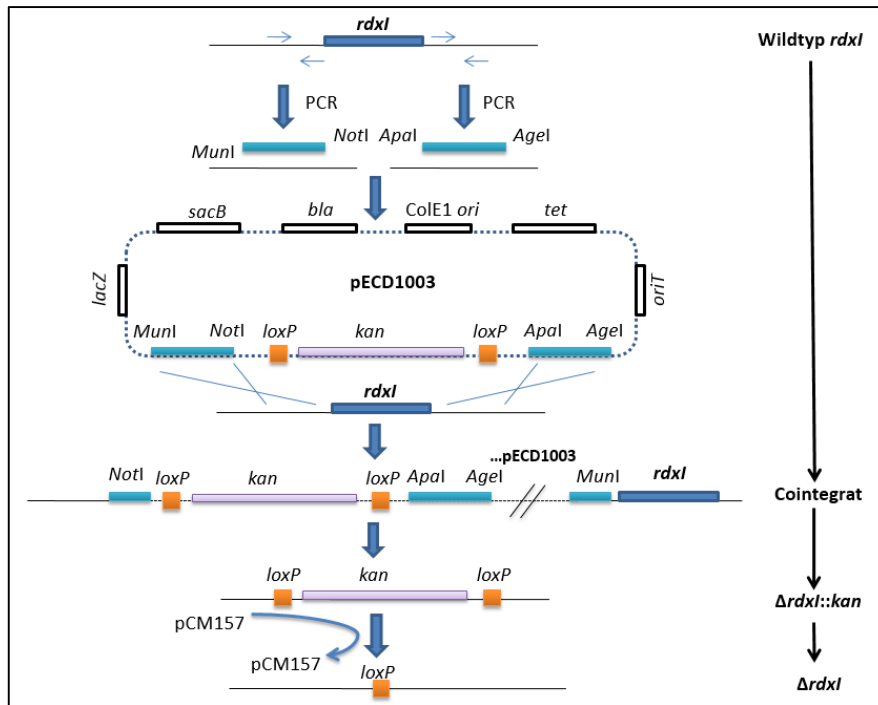


Abb. 15: Konstruktion einer Gendeletion in *C. metallidurans* mittels *cre-lox* System am Beispiel von *rdxI* (verändert nach Marx & Lidstrom, 2002). Stromaufwärts und stromabwärts des Gens *rdxI* wurden ca. 300 bp Fragmente amplifiziert und dabei Restriktionsschnittstellen über die verwendeten Primer eingefügt. Nach Klonierung dieser Fragmente in den Vektor pECD1003, der eine Kanamycin-Resistenzkassette flankiert von *loxP*-sites trägt, wurde der so konstruierte Vektor pECD1369 im *E. coli* Stamm S17/1 zur Konjugation mit CH34 und AE104 eingesetzt. In zwei nacheinander stattfindenden homologen Rekombinationsschritten wurde das Gen *rdxI* gegen die Kanamycin-Resistenzkassette deletiert. Die markerlose Deletion wurde durch den konjugativen Transfer des Vektors pCM157 erreicht, auf dem das Gen *cre* der Cre-Rekombinase kodiert ist und die die Exzision der Resistenzkassette bewirkt.

Die nachfolgende Tabelle fasst die durchgeführten Wachstumsendpunktbestimmungen der Einzel-, Doppel- und Dreifachdeletionen der P-Typ ATPasen in CH34 und AE104 zusammen. Es konnte keine *ctpA1*-Deletion im Stamm AE104, CH34 und den Derivaten von CH34 regeneriert werden. Zur besseren Übersicht sind die IC_{50} -Werte und *b-values* aufgeführt. Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration an, bei der das Wachstum im Experiment um die Hälfte vermindert war, während der *b-value* die Steigung der sigmoidal verlaufenden Kurve beschreibt.

Tab. 6: Resistenz von CH34, AE104 und den Derivaten gegenüber AuHCl₄ und CuCl₂ (n>6).

Stamm	Genotyp	IC ₅₀ , <i>b-value</i>	
		AuHCl ₄ [μM]	CuCl ₂ [μM]
Derivat vom Stamm CH34			
CH34		22,3 ± 2,7 4,4 ± 1,5	893 ± 91,3 250 ± 123,3
DN648	<i>ΔcupAR</i>	23,0 ± 3,7 4,5 ± 1,4	368 ± 25,7 60,2 ± 8,2
DN649	<i>ΔcupCAR</i>	25,5 ± 1,5 3,9 ± 0,3	359 ± 13,6 51,9 ± 16,1
DN779	<i>ΔrdxI</i>	22,8 ± 3,8 4,1 ± 1,0	1052 ± 169 293 ± 150
DN653	<i>ΔcopF</i>	22,7 ± 2,4 4,0 ± 1,3	916 ± 90,1 89,0 ± 56,2
DN762	<i>ΔcupAR ΔrdxI</i>	25,8 ± 2,1 4,1 ± 2,7	365 ± 62,7 59,9 ± 32,6
DN763	<i>ΔcupCAR ΔrdxI</i>	20,5 ± 0,1 4,6 ± 0,2	495 ± 23,3 29,5 ± 13,0
DN654	<i>ΔcupCAR ΔcopF</i>	24,5 ± 3,4 4,8 ± 1,6	190 ± 19,7 46,1 ± 15,4
DN764	<i>ΔcopF ΔrdxI</i>	18,7 ± 3,5 3,6 ± 1,3	959 ± 69,2 84,7 ± 29,8
DN765	<i>ΔcupCAR ΔcopF ΔrdxI</i>	23,0 ± 1,4 5,1 ± 1,2	55,7 ± 3,1 18,7 ± 12,7
Derivat vom Stamm AE104			
AE104		21,8 ± 0,9 4,0 ± 0,8	956 ± 19,7 60,7 ± 10,2
DN655	<i>ΔcupAR</i>	22,2 ± 1,4 4,1 ± 0,7	410 ± 23,2 70,1 ± 9,1
DN656	<i>ΔcupCAR</i>	20,8 ± 0,9 4,0 ± 0,9	406 ± 44,7 85,7 ± 21,7
DN760	<i>ΔrdxI</i>	22,7 ± 1,2 4,3 ± 1,3	955 ± 57,3 79,20 ± 5,7
DN766	<i>ΔcupAR ΔrdxI</i>	23,0 ± 1,4 3,90 ± 1,0	166 ± 48,1 87,9 ± 29,5
DN767	<i>ΔcupAR ΔctpA1</i>	23,3 ± 2,9 4,0 ± 0,6	236 ± 23,9 60,8 ± 40,9
DN768	<i>ΔcupAR ΔrdxI ΔctpA1</i>	23,1 ± 1,4 4,7 ± 2,1	58,5 ± 12,4 11,2 ± 5,9

Das Wachstum mit AuHCl₄ war nicht durch die Deletion der P-Typ ATPasen beeinträchtigt. Aus den IC₅₀-Werten für das Schwermetallsalz CuCl₂ ist erkennbar, dass die Deletion von

cupCAR einen Resistenzverlust zur Folge hatte, der durch die Einzel- oder Doppeldeletion von *copF* oder *rdxI* nicht nachgewiesen werden konnte. Die Deletion von *ctpA1* in DN656(A104 Δ *cupCAR*) und *copF* in DN649(CH34 Δ *cupCAR*) führte zu einer weiteren Reduzierung der Kupferresistenz, wohingegen eine zusätzliche Deletion von *rdxI* in DN656(AE104 Δ *cupCAR*) keine signifikanten Wachstumsunterschiede zeigte. Erst in den Doppeldeletionsstämmen DN654(CH34 Δ *cupCAR* Δ *copF*) und DN767(AE104 Δ *cupCAR* Δ *ctpA1*) führte die *rdxI*-Deletion zu einem sensitiveren Kupferphänotyp. Durch die Deletionen aller putativen Cu(I)-P-Typ-ATPasen in AE104 konnte noch ein IC₅₀-Wert für das Schwermetallsalz CuCl₂ von 58,5 μ M bestimmt werden, der nur noch 1/16 des Wertes von AE104 entsprach und mit dem der Dreifachdeletionsmutante DN768(CH34 Δ *cupCAR* Δ *copF* Δ *rdxI*) vergleichbar war.

CupA ist demnach die Kupfer-translozierende -P-Typ-ATPase, die für die cytoplasmatische Detoxifizierung von Kupferionen in *C. metallidurans* verantwortlich ist und einen wesentlichen Beitrag zur Kupferhomöostase leistet. Um zu untersuchen, ob der Cu(I)-Transport von CupA durch Gold blockiert sein könnte, sollte CupA in Liposomen rekonstituiert werden und das anorganische Phosphat aus der Hydrolyse von ATP mit der Methode von Lanzetta *et al.*, (1979) kolorimetrisch detektiert werden. CupA wurde hierzu zunächst heterolog als *Strep*-tag®II-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde CupA ohne eigenes Start- und Stoppcodon hinter den *tetA*-Promotor in den Vektor pASK-IBA7 kloniert (pECD1168), sodass die Genexpression im *E. coli* Stamm BL21(pLysS) durch AHT induziert werden konnte. Nach Solubilisierung des Komplexes aus der Membran mit 1 % n-Dodecyl- β -D-Maltosid konnte CupA aufgrund des N-terminalen *Strep*-tag Epitops (WSHPQFEK), dass an das Säulenmaterial *Strep*Tactin Sepharose bindet, durch Affinitätschromatographie bis zur Homogenität nativ gereinigt werden (Molekulargewicht: 87,6 kDa) (Abb. 16 A). Bei der Aufreinigung wurde eine Ausbeute von 1,5 mg Protein je Liter Kultur erzielt. Anschließend wurde CupA in Detergenz destabilisierten Liposomen rekonstituiert, die zuvor aus Lipiden von *E. coli* hergestellt wurden. Um den Einbau von CupA in Liposomen zu quantifizieren wurden 10 μ l der Proteoliposomenlösung im Vergleich zu 2 μ g gereinigtem Protein auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und angefärbt (Abb. 16 B). Anschließend wurde mit Hilfe der HEROLAB-Photodokumentation mit dem Programm „E.A.S.Y. plus Enhanced Analysis System“ quantifiziert. Durch drei Bestimmungen konnte ein Einbau von 40,2 % des zur Rekonstitution eingesetzten Proteins in die Liposomen festgestellt werden.

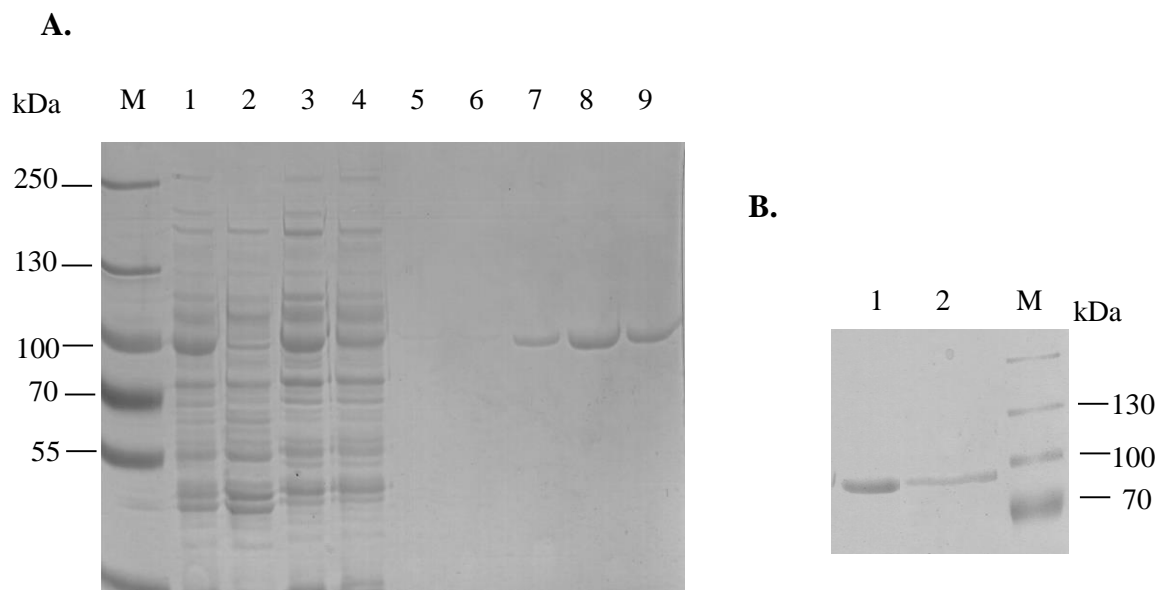


Abb. 16: Aufreinigung von CupA als Strep-tag®II-Fusionsprotein und Rekonstitution in Liposomen. A. CupA wurde als N-terminale Strep-tag®II-Fusion *in vivo* synthetisiert und über das Strep-tag®II-System gereinigt. Solubilisiert wurde mit dem Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid. In einer 10%igen SDS-PAGE wurden verschiedene Fraktionen der StrepTactin Affinitätschromatographie aufgetragen. 1: 10 μ l resuspendierte Pelletfraktion nach Zellaufschluss und Zentrifugation (25 μ g), 2: 10 μ l lösliche Fraktion (25 μ g), 3: 10 μ l Membranfraktion (25 μ g), 4: 10 μ l Säulendurchfluss (25 μ g), 5: 10 μ l der letzten Waschfraktion, 6: 10 μ l der ersten Elutionsfraktion, 7: 10 μ l der dritten Elutionsfraktion, 8: 10 μ l der fünften Elutionsfraktion, 9: 10 μ l der siebten Elutionsfraktion. B. Einbau von CupA in Liposomen, die aus *E. coli* Phospholipiden hergestellt wurden. 1. 10 μ l gereinigtes CupA (2 μ g), 2: 10 μ l CupA-rekonstituierte Liposomen. Zur Größenbestimmung wurde der Protein Marker (M) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#SM26619) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Nach erfolgreichen Einbau von CupA in Liposomen konnte die Hydrolyse von ATP, die mit der Translokation von Cu(I)-ionen einhergeht, mit der Methode von Lanzetta *et al.*, (1979) detektiert werden. Die Phosphatbestimmung erfolgte dabei an Proben, die dem Reaktionsansatz in regelmäßigen Abständen entnommen wurden. Die Extinktionswerte der spontanen Hydrolyse von ATP des Puffers wurden von den Messwerten abgezogen. Aus dem Phosphatgehalt der einzelnen Proben zum Entnahmezeitpunkt t und der eingesetzten Proteinmenge wurde anschließend die Enzymaktivität in nmol Pi/mg Protein berechnet (Abb. 17). Den Rekonstitutionsansätzen wurden neben den Metallen AuHCl₄ und CuCl₂ auch das Reduktionsmittel DTT zugegeben, da CupA nur in der Lage sein sollte Cu(I) zu transportieren. Während im Rekonstitutionsansatz ohne Metallzugabe kein Anstieg an anorganischem Phosphat detektiert werden konnte, führte die Anwesenheit von 100 μ M CuCl₂ unter reduzierenden Bedingungen zu einem linearen Anstieg an freigesetztem Phosphat (Wechselzahl von 0,0314 s⁻¹) (Daten ohne die Zugabe von DTT sind nicht aufgeführt). In Anwesenheit von AuHCl₄ unter reduzierenden Bedingungen konnte hingegen keine Zunahme an Phosphat kolorimetrisch detektiert werden (Abb. 17). Die Zugabe von Au(S₂O₃)₂ führte auch

nicht zur Steigerung der ATPase-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Das Cup-System transportiert demnach kein Gold und ist daher nicht direkt an der Golddetoxifizierung beteiligt. Die Zugabe beider Metalle führte zu einer Blockierung der Cu(I)-abhängigen Hydrolyse von ATP.

Demnach könnte AuHCl₄ unter reduzierenden Bedingungen den Kupferexport von CupA blockieren, was letztlich das niedrige Kupferresistenzniveau in Gegenwart von AuHCl₄ und die erhöhte zelluläre Akkumulation von Kupfer in CH34- und AE104-Zellen erklären könnte.

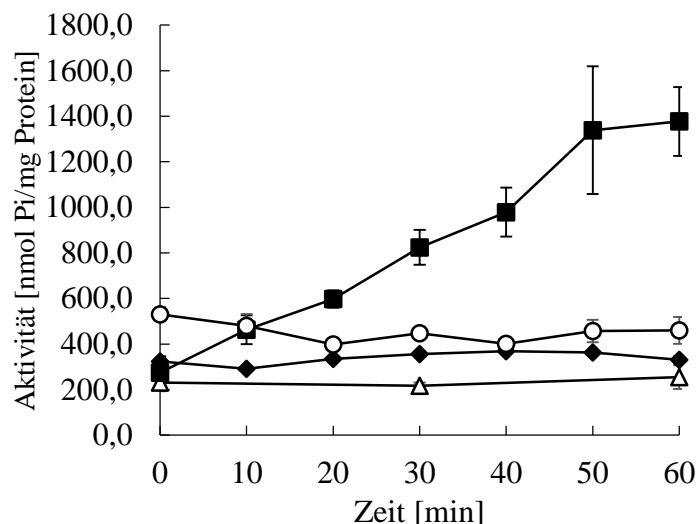


Abb. 17: ATPase-Aktivität von CupA im rekonstituierten System. Die ATPase-Aktivitätsmessung wurde bei 30°C ohne Metallzugabe (Δ), mit 100 μM CuCl₂ (■), mit 100 μM AuHCl₄ (◆) oder 100 μM AuHCl₄/CuCl₂ (○) durchgeführt. Als Reduktionsmittel wurde den Ansätzen DTT in einer Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben. Nach definierten Zeitabschnitten wurden Proben aus den Rekonstitutionsansätzen entnommen, um das freigesetzte Phosphat der ATP-Hydrolyse kolorimetrisch mit der Methode von Lanzetta *et al.*, (1979) zu bestimmen.

3.4 Welchen Einfluss haben die Kupferresistenzsysteme auf die Gold-Kupfer-Interferenz?

Die abnehmende Kupferresistenz in Anwesenheit von 2,5 μM AuHCl₄ in der Hauptkultur, die mit einem erhöhten zellulären Kupfergehalt einhergeht, könnte mit der Inhibierung der Haupt-exportierenden Cu(I)-P-Typ ATPase durch Goldionen begründet werden. Mit den *in vitro* Daten lässt sich jedoch nicht der hohe zelluläre Goldgehalt bei Anwesenheit von CuCl₂ verstehen. Die bisherigen Daten begründen auch nicht den Kupfer-induzierten Resistenzanstieg der Gold/Kupfer-induzierten Zellen, der mit einer Abnahme beider Metallgehalte in AE104 einhergeht. Unter diesen Bedingungen könnten die Kupferresistenzsysteme, die an der cytoplasmatischen (CupCAR-System) oder periplasmatischen (Cus-System, Cop-System) Detoxifizierung von Kupferionen beteiligt sind, eine zentrale Rolle spielen und standen daher im Fokus weiterer Betrachtungen.

3.4.1 Der Beitrag der periplasmatischen Kupferresistenzsysteme an der Gold-Kupfer-Interferenz

Die Gene des *cus*-Operons von *C. metallidurans* wurden in Microarray-Analysen nicht mit Goldchlorid, Goldcyanid oder Goldthiomalat hochreguliert, weshalb eine direkte Beteiligung an der Golddetoxifizierung nicht vermutet wurde. Die Gene des *cop*-Operons konnten bei einer 30-minütigen Inkubation mit 50 μM Goldchlorid hochreguliert werden (*copA* 2,1-fache und *copD* 9,2-fache Hochregulation), wohingegen mit kürzerer Inkubationsdauer von 10 min und variierenden Goldkonzentrationen von 10 μM , 50 μM und 100 μM die Induktionswerte unter der zweifachen Hochregulation lagen (Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013). Um die Ergebnisse der Microarray-Analyse zu verifizieren wurde die Induktion mit einer Operonfusion von *cusF* und *copD* mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen untersucht.

Im Folgenden ist die Klonierung von *cusF-lacZ* exemplarisch erklärt. Mit den Primern (NW *cusCFBA lacZ SalI* sowie NW *cusCFBA lacZ XbaI*) wurde ein 300 bp Fragment stromaufwärts des Stoppcodons von *cusF* amplifiziert. Dieses Fragment wurde zunächst in pGEM-T-Easy kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Fragment über die in der PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen (*SalI/ XbaI*) aus pGEM herausgeschnitten und in die *multi-cloning site* des Vektors pEC794-1 kloniert, woraus der Vektor pECD1386 entstand. Bei pECD794-1 handelt es sich um ein pLO2-Derivat, der in *C. metallidurans* nicht replizieren kann und daher in das Genom rekombinieren muss, um erhalten zu bleiben. Die Rekombination ins Genom wurde durch Selektion auf Kanamycin und X-Gal überprüft. Der *E. coli*-Stamm S17/1 wurde mit dem konstruierten Plasmid transformiert und das Plasmid anschließend mittels Konjugation in AE104 transferiert und durch *single-cross* Rekombination in das Genom inseriert. Die korrekte Position der Insertion wurde mittels PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Durch die Insertion des Vektors pECD1386 in das Genom von *C. metallidurans* lag das Reportergen *lacZ* direkt stromabwärts in gleicher Transkriptionsrichtung wie das zu untersuchende Gen vor. Die ermittelte spezifische Aktivität der β -Galaktosidase war ein Maß für die Expression des Zielgens, da die Transkription von Zielgen und *lacZ* durch die Bildung einer mRNA, initiiert durch den selben Promotor gekoppelt war. Das Enzym β -Galaktosidase setzt die synthetische Verbindung ONPG zu Galaktose und *o*-Nitrophenol um, dessen Umsetzung photometrisch gemessen werden konnte.

Die Induktion von *cusF-lacZ* und *copD-lacZ* wurde über eine Konzentrationsspanne von 0-20 μM AuHCl_4 und 0-400 μM CuCl_2 untersucht (Abb. 18). Dazu wurden die Stämme AE104(ϕ (*cusF-lacZ*)), DN686(Δ *copABCD*, ϕ (*cusF-lacZ*)), AE104(ϕ (*copD-lacZ*)) und DN729(Δ *cusCFBA*, ϕ (*copD-lacZ*)) auf 30 Klett angeimpft und nach Erreichen der

Verdopplungsphase mit AuHCl_4 oder CuCl_2 für 3 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden je 200 μl Probe entnommen und die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

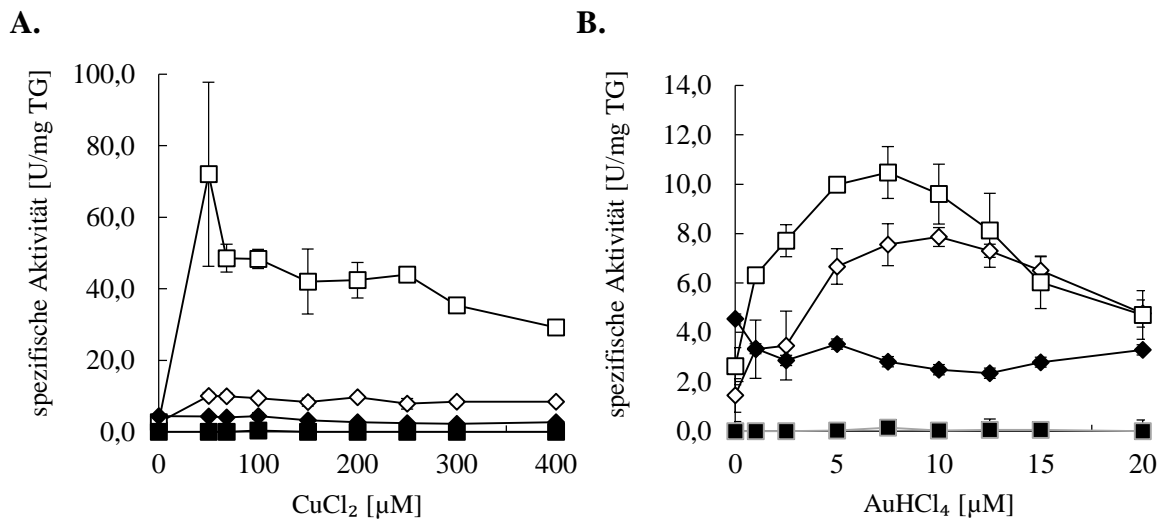


Abb. 18: Induktion einer *cusF-lacZ* und *copD-lacZ*-Fusion durch CuCl_2 und AuHCl_4 in verschiedenen *C. metallidurans*-Stämmen. AE104($\phi(\text{cusF-lacZ})$) (\diamond), AE104($\phi(\text{copD-lacZ})$) (\blacklozenge) sowie die Deletionsmutanten DN686($\Delta\text{copABCD}$, $\phi(\text{cusF-lacZ})$) (\square) und DN729($\Delta\text{cusCFBA}$, $\phi(\text{copD-lacZ})$) (\blacksquare) wurden in Tris-MM bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30°C angezogen, um anschließend eine Hauptkultur zu 30 Klett zu inokulieren. Nach Erreichen der Verdopplung wurden die Kulturen nachfolgend zur Induktion der Genexpression für weitere 3 h bei 1300 rpm mit verschiedenen Konzentrationen an A. CuCl_2 und B. AuHCl_4 inkubiert. Die gewonnenen Zellpellets dieser Kulturen wurden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

CusF besitzt eine Basisaktivität ohne zusätzliche Metallzugabe von $\sim 2,5$ U/mg in den Stämmen AE104 sowie in DN686($\Delta\text{copABCD}$). Steigende Konzentrationen an CuCl_2 und AuHCl_4 führten in beiden Stämmen zu einer Hochregulation von *cusF*, dessen Induktionsraten im Stammhintergrund DN686($\Delta\text{copABCD}$) höher waren als im AE104-Stamm. Bei 100 μM CuCl_2 erhöhte sich die spezifische Aktivität von *cusF-lacZ* um das vierfache verglichen zur Grundlevelaktivität, wohingegen im Deletionsstamm eine 20-fache Steigerung der spezifischen Aktivität registriert werden konnte. Der Unterschied der spezifischen Aktivität beider Stämme bei Goldchlorid war nicht so deutlich. Bei 7,5 μM AuHCl_4 erhöhte sich die Aktivität von *cusF-lacZ* um das 2,5-fache im Stammhintergrund AE104 und um das 2-fache im Stammhintergrund DN686($\Delta\text{copABCD}$). Dahingehend wurde *copD* im Stammhintergrund AE104 über eine Konzentrationsspanne von 0-400 μM CuCl_2 und 0-20 μM AuHCl_4 konstitutiv exprimiert. Die spezifische Aktivität hat ~ 4 U/mg Trockengewicht betragen. Im Stamm DN729($\Delta\text{cusCFBA}$) konnte keine spezifische Aktivität der β -Galaktosidase für beide Metalle gemessen werden. Die Induktionen mit den Standardabweichungen für das Schwermetallsalz CuCl_2 sind zur besseren Illustration ohne den Stamm DN686($\Delta\text{copABCD}$, $\phi(\text{cusF-lacZ})$) nochmal im Anhang aufgeführt (s. Anhang Abb. 42).

Während ein Verlust des *cop*-Systems eine erhöhte Induzierbarkeit des *cus*-Systems bei Inkubation mit CuCl₂ oder AuHCl₄ zur Folge hatte, führte die Deletion des RND-Systems zu keiner Induzierbarkeit des *cop*-Systems.

Im Weiteren wurde der Einfluss der Deletionsmutanten DN686($\Delta copABCD$) und DN729($\Delta cusCFBA$) auf die Gold-Kupfer-Interferenz mit Wachstumsendpunktbestimmungen (Tab. 7) und der Analyse des Metallgehaltes mittels ICP-MS (Tab. 9) untersucht.

Tab. 7: Gold- und Kupferresistenz von AE104 und den Derivaten DN729($\Delta cusCFBA$) und DN686($\Delta copABCD$) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>6).

Vorkultur		Hauptkultur	AE104	Stamm	
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]		DN729 ($\Delta cusCFBA$)	DN686 ($\Delta copABCD$)
				IC ₅₀ , <i>b</i> -value AuHCl ₄ [μ M]	
0	0	0	28,3 ± 2,6 3,9 ± 0,5	24,5 ± 3,1 4,1 ± 1,1	17,9 ± 0,8 2,8 ± 0,8
2,5	0	0	25,68 ± 2,9 3,81 ± 1,4	25,9 ± 3,7 4,8 ± 0,8	18,8 ± 1,1 3,0 ± 0,6
0	50	0	18,5 ± 0,5 1,5 ± 0,4	25,5 ± 2,3 2,7 ± 0,6	13,0 ± 5,6 4,0 ± 2,3
0	100	0	21,7 ± 1,9 1,7 ± 0,9	22,8 ± 3,6 2,6 ± 0,8	14,1 ± 3,4 4,7 ± 0,2
0	0	100	8,0 ± 1,8 0,5 ± 0,1	9,7 ± 2,3 0,7 ± 0,1	6,4 ± 1,9 2,1 ± 2,4
0	100	100	14,9 ± 0,6 1,2 ± 0,3	20,0 ± 5,3 1,9 ± 1,0	6,3 ± 0,5 2,8 ± 0,6
2,5	0	100	8,2 ± 0,4 0,7 ± 0,2	8,2 ± 3,2 1,2 ± 1,0	6,8 ± 1,6 1,1 ± 0,1

Vorkultur		Hauptkultur	AE104	Stamm	
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Au(III) [μ M]		DN729 ($\Delta cusCFBA$)	DN686 ($\Delta copABCD$)
				IC ₅₀ , <i>b</i> -value CuCl ₂ [μ M]	
0	0	0	1148 ± 75,2 153 ± 85,1	1114 ± 42,5 59,3 ± 17,8	683 ± 66,2 182 ± 57,1
2,5	0	0	1040 ± 85,9 97,0 ± 30,0	1129 ± 16,3 71,9 ± 36,9	468 ± 105 125 ± 67,1
0	0	2,5	616 ± 168 35,5 ± 21,1	749 ± 161 37,2 ± 11,0	449 ± 192 94,2 ± 11,5
2,5	0	2,5	628 ± 205 42,6 ± 28,4	863 ± 53,5 24,2 ± 12,2	317 ± 166 95,4 ± 54,0

Die Deletion von *cusCFBA* hatte keinen Einfluss auf die Gold- und Kupferresistenz in Wachstumsendpunktbestimmungen, führte jedoch in den Metallgehaltanalysen zu einem um 44000 Goldatome/Zelle signifikant höheren Goldgehalt im Stamm DN729(Δ *cusCFBA*) als im Stamm AE104. Die Unterschiede im Kupfergehalt waren hingegen nicht signifikant. Durch die Deletion des RND-Systems konnte die Steigerung der Goldsensitivität durch Vorinkubation mit CuCl_2 nicht mehr gezeigt werden. Das Resistenzverhalten des Stammes DN729(Δ *cusCFBA*) unter den anderen getesteten Wachstumsbedingungen war ähnlich zum Wildtyp-Derivat AE104.

Die Metallgehaltanalyse zeigte in diesem Zusammenhang (Tab. 9), dass die Doppelinkubation von AE104 und DN729(Δ *cusCFBA*) zu ähnlichen Gehalten an Gold und Kupfer führten. Jedoch erhöhte sich der Goldgehalt in DN729(Δ *cusCFBA*) nur um das Doppelte, im Vergleich zu AE104, was auf den höheren Wert des Goldgehaltes nur bei der Goldinkubation zurückgeführt werden kann. Eine zusätzliche Vorinkubation mit Gold veränderte nicht den Gold- und Kupfergehalt der AE104-Zellen, führte aber in DN729(Δ *cusCFBA*) zu einem signifikant höheren Kupfergehalt. Eine entsprechende Vorinkubation mit Kupfer führte in den Gold/Kupfer-inkubierten Zellen zu einer Steigerung der Resistenzen und der Abnahme beider Metallgehalte in AE104. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen konnte keine Änderung der Metallgehalte in der Deletionsmutante unter diesen Bedingungen festgestellt werden, verglichen mit nicht induzierten Zellen. In den Zellen der Deletionsmutante konnten ~30.000 mehr Kupferatome pro Zelle als im Stamm AE104 detektiert werden, und auch der Goldgehalt betrug unter der Berücksichtigung der hohen Standardabweichung ungefähr das Doppelte.

Das *Cus*-System trägt demnach dazu bei den Kupfer- und den Goldgehalt der Kupfer-/Gold-inkubierten Zellen durch eine Vorinkubation mit Kupfer zu reduzieren und nur den Kupfergehalt durch eine Vorinkubation mit Gold zu senken. Das *Cus*-System scheint nicht an dem erhöhten Anstieg des Gold- und Kupfergehaltes nach Inkubation beider Metalle verantwortlich zu sein.

Die Deletion des *copABCD*-Systems führte in Wachstumsendpunktbestimmungen zu einer Abnahme der Goldresistenz in CH34 und AE104 (s. Anhang Abb. 43A), wohingegen nur die Deletion in AE104 die Kupferresistenz beeinträchtigte (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der Bestimmung der MIC auf Festmedium (s. Anhang Abb. 43B).

Die ermittelten IC_{50} -Werte für AuHCl_4 und CuCl_2 waren daher bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen im Deletionsstamm DN686(AE104 Δ *copABCD*) geringer. Die

Zugabe beider Metalle ohne oder mit zusätzlicher Vorinkubation von AuHCl_4 führte zu einer Reduzierung der Gold- und Kupferresistenz, wie sie in AE104 beobachtet werden konnte. Eine Vorinkubation mit CuCl_2 steigerte jedoch nicht die Kupferresistenz im Stamm DN686($\Delta\text{copABCD}$), im Gegensatz zu AE104.

Die Deletion des Systems hatte keine Auswirkung auf den Metallgehalt der Zellen, denen in der exponentiellen Wachstumsphase $2,5 \mu\text{M AuHCl}_4$ oder $100 \mu\text{M CuCl}_2$ zugegeben wurden. Die Zugabe beider Metalle führte hingegen zu einem deutlich größeren Anstieg des Kupfergehaltes, während der Goldgehalt 70.000 Atome pro Zelle geringer war als in den AE104-Zellen. Der Gehalt beider Metalle änderte sich nicht durch eine zusätzliche Vorinkubation mit AuHCl_4 . Jedoch liegt der Kupfergehalt von DN686($\Delta\text{copABCD}$) mit $194 \pm 15 \times 10^3$ Atome pro Zelle über dem des Stammes AE104 ($144 \pm 17 \times 10^3$ Atome pro Zelle) und ist dem Wert des Stammes DN729($\Delta\text{cusCFBA}$) vergleichbar. Die Vorinkubation mit Kupfer führte zu der bereits beschriebenen Abnahme des Kupfergehaltes der Gold-Kupfer inkubierten Zellen, jedoch war der Werte mit $149 \pm 09 \times 10^3$ Atome pro Zelle um das doppelte größer als in den AE104-Zellen. Und wie bereits im Stamm DN729($\Delta\text{cusCFBA}$) gezeigt, führte diese Wachstumsbedingung auch zu einer Zunahme des Goldgehaltes um den Faktor 2.

Das Cus-System und das Cop-System könnten demnach für die Reduzierung des Kupfer- und Goldgehaltes der Gold/Kupfer-inkubierten Zellen, die mit CuCl_2 vorinkubiert wurden, benötigt werden. Das Cop-System ist außerdem für die Reduktion des Kupfergehaltes und Erhöhung des Goldgehaltes in den Gold/Kupfer-inkubierten Zellen verantwortlich. Die periplasmatischen Systeme stellen daher einen indirekten Weg der Metalldetoxifizierung unter den Metallbedingungen der natürlichen Standorte, in denen Gold- und Kupfer detektiert werden konnte (Reith *et al.*, 2012).

3.4.2 Der Beitrag des cytoplasmatischen Kupferresistenzsystems an der Gold-Kupfer-Interferenz

Die Gene des *cup*-Systems in *C.metallidurans* wurden in Microarray-Analysen mit Goldchlorid und Goldcyanid hochreguliert (Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013), was ihre Bedeutung an der Golddetoxifizierung untermauern könnte, wobei eine direkte Beteiligung der P-Typ ATPase CupA an dem Goldtransport durch die *in vitro*-Analysen ausgeschlossen werden kann. Für die Verifizierung der Microarray Daten wurden in der Diplomarbeit von Juliane Mohr Induktionsexperimente der Gen-Operonfusionen vorgenommen. Es ließ sich nachweisen, dass durch die Inkubation der Zellen mit AuHCl_4 oder CuCl_2 alle drei Gene des *cup*-Systems

induziert wurden, wobei die höchste spezifische Aktivität der β -Galaktosidase mit AuHCl₄ festgestellt werden konnte (Wiesemann *et al.*, 2013).

Im Weiteren wurde der Einfluss der *cupCAR*-Deletion auf die Gold/Kupfer-Interferenz mit Wachstumsendpunktbestimmungen (Tab. 8) und der Metallgehaltanalyse mittels ICP-MS (Tab. 9) untersucht. Für die Experimente der Wachstumsendpunktbestimmungen wurden Kupferkonzentrationen von 10 μ M gewählt, die das Wachstum der zweiten Vorkultur sowie der Hauptkultur nicht beeinflussten. Für die ICP-MS Proben konnten höhere Konzentrationen an CuCl₂ gewählt werden, da die Zugabe des Schwermetallsalzes erst ab der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei 100 Klett erfolgte.

Tab. 8: Gold- und Kupferresistenz von AE104 und DN656(Δ *cupCAR*) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>5).

Vorkultur		Hauptkultur	Stamm	
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]	AE104	DN656(Δ <i>cupCAR</i>)
			IC ₅₀ , <i>b-value</i> AuHCl ₄ [μ M]	
0	0	0	28,4 \pm 2,6 3,9 \pm 0,6	26,3 \pm 2,2 2,9 \pm 0,3
0	0	0	25,7 \pm 2,9 3,8 \pm 1,4	25,5 \pm 0,2 3,5 \pm 0,1
0	10	0	14,9 \pm 1,5 2,1 \pm 0,4	23,3 \pm 2,9 2,2 \pm 0,7
0	0	10	10,2 \pm 2,1 1,1 \pm 0,6	10,9 \pm 2,2 1,6 \pm 0,6
0	10	10	13,2 \pm 1,7 0,9 \pm 0,3	16,4 \pm 2,3 2,9 \pm 2,2
2,5	0	100	10,1 \pm 1,7 1,3 \pm 0,3	11,0 \pm 2,4 1,4 \pm 1,3

Vorkultur		Hauptkultur	Stamm	
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Au(III) [μ M]	AE104	DN656(Δ <i>cupCAR</i>)
			IC ₅₀ , <i>b-value</i> CuCl ₂ [μ M]	
0	0	0	1148,1 \pm 75,2 152,8 \pm 85,1	406 \pm 44,7 85,7 \pm 21,6
2,5	0	0	1040,3 \pm 85,9 97,0 \pm 30,0	512 \pm 129,3 73,6 \pm 13,7
0	0	2,5	615,8 \pm 168,0 35,5 \pm 21,1	395 \pm 36,3 81,3 \pm 43,8
2,5	0	2,5	628,1 \pm 204,7 42,6 \pm 28,4	375 \pm 44,1 59,2 \pm 25,7

Die Deletion des *cupCAR*-Clusters hatte keinen Einfluss auf die Goldresistenz, führte aber zur Reduzierung der Kupferresistenz. Dabei konnten durch unterschiedliche Inkubations-

bedingungen die IC₅₀-Werte für Kupfer bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen nicht weiter reduziert werden. Eine Vorinkubation mit einer geringeren Konzentration an CuCl₂ (10 µM), als bisher in den Experimenten verwendet wurde, senkte auch in AE104 die Goldresistenz, jedoch zeigte sich keine Veränderung des IC₅₀-Wertes im Stamm DN656($\Delta cupCAR$). Die Doppelinkubation mit und ohne einer Gold- oder Kupfervorinkubation führte im Stamm DN656($\Delta cupCAR$) zu den gleichen Effekten der Goldresistenz, wie für den Stamm AE104 bestimmt werden konnte.

Einhergehend mit der fehlenden Reduzierung der Goldresistenz durch Vorinkubation mit 10 µM CuCl₂, konnte in den Metallgehaltanalysen mit 100 µM CuCl₂ auch kein Anstieg des Goldgehaltes der Deletionsmutante unter diesen Bedingungen beobachtet werden. Die Vorinkubation mit AuHCl₄ führte hingegen zu einem drastischen Anstieg des Kupfergehaltes in Zellen, denen ab der frühen exponentiellen Wachstumsphase 100 µM CuCl₂ zugegeben wurde und lag mit $289 \pm 120 \times 10^3$ Kupferatome/Zelle über den Werten der periplasmatischen Kupferdeletionsmutanten DN686($\Delta copABCD$) ($82 \pm 04 \times 10^3$ Kupferatome/Zelle) und DN729($\Delta cusCFBA$) ($120 \pm 20 \times 10^3$ Kupferatome/Zelle) und dem Wildtypstamm AE104 ($68 \pm 03 \times 10^3$ Kupferatome/ Zelle).

Die Zugabe beider Metalle führte in den Wachstumsendpunktbestimmungen zur Abnahme der Goldresistenz und hatte keine Auswirkung auf die Kupferresistenz im Stamm DN656($\Delta cupCAR$). Mit einer höheren Kupferkonzentration in den ICP-MS Proben konnte unter der Zugabe beider Metalle auch ein Anstieg des Goldgehaltes bestimmt werden. Unter der Berücksichtigung der Standardabweichung nahm jedoch der Kupfergehalt nur um 3.000 Kupferatome pro Zelle in der Deletionsmutante zu, während im Stamm AE104 der Gehalt um 35.000 Kupferatome pro Zelle zunahm. Die Vorinkubation mit Kupfer führte in den Gold-Kupfer-inkubierten Zellen von AE104 zur Reduzierung des Gold- und Kupfergehaltes. Im Stamm DN656($\Delta cupCAR$) war die Abnahme des Goldgehaltes nicht signifikant und der Wert lag ~50.000 Goldatome/Zelle über dem des Wildtypstammes. Die Vorinkubation mit Gold steigert in den Gold-Kupfer-inkubierten Zellen der Deletionsmutante minimal den Goldgehalt, und liegt mit einem Wert von $231 \pm 04 \times 10^3$ Goldatome pro Zelle über dem der Wildtypzellen ($192 \pm 28 \times 10^3$ Goldatome pro Zelle).

Das Cup-System scheint demnach für die Abnahme der Goldresistenz bei Vorinkubation mit CuCl₂ verantwortlich zu sein, was auch mit der Inhibierung des Kupfer-vermittelten Effluxes durch Gold einhergeht, sowie für die Abnahme der Kupferresistenz bei Vorinkubation mit AuHCl₄, einhergehend mit der Reduktion des Kupfergehaltes unter dieser Bedingung. Des

Weiteren leistet es einen Beitrag an der Reduzierung des Goldgehaltes der Gold/Kupfer-inkubierten Zellen, die mit CuCl_2 vorinkubiert wurden.

Tab. 9: Kupfer- und Goldgehalt von AE104 und den Deletionsmutanten DN729($\Delta cusCFBA$), DN686($\Delta copABCD$), DN656($\Delta cupCAR$) und DN657($\Delta gigPABT$) (n>6).

Vorkultur			Hauptkultur			Stamm				
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]	AE104	DN729 ($\Delta cusCFBA$)	DN686 ($\Delta copABCD$)	DN656 ($\Delta cupCAR$)	DN657 ($\Delta gigPABT$)
						Kupfer [Atome/Zelle] x 10 ³				
0	0	0	0	0	0	18 ± 06	13 ± 04	12 ± 03	11 ± 02	14 ± 05
0	0	0	2,5	2,5	0	14 ± 06	10 ± 02	03 ± 01	13 ± 03	18 ± 05
0	0	0	0	0	100	84 ± 11	123 ± 33	112 ± 27	93 ± 17	98 ± 17
0	0	0	2,5	2,5	100	140 ± 10	133 ± 07	283 ± 64	136 ± 22	139 ± 15
0	100	100	2,5	2,5	0	46 ± 04	53 ± 14	62 ± 09	68 ± 11	38 ± 06
0	100	100	0	0	100	66 ± 12	85 ± 09	97 ± 32	68 ± 03	138 ± 31
0	100	100	2,5	2,5	100	73 ± 08	106 ± 05	149 ± 09	85 ± 14	94 ± 01
2,5	0	0	2,5	2,5	0	13 ± 05	09 ± 02	11 ± 05	08 ± 04	31 ± 09
2,5	0	0	0	0	100	68 ± 03	120 ± 20	82 ± 04	289 ± 120	121 ± 43
2,5	0	0	2,5	2,5	100	144 ± 17	215 ± 40	194 ± 15	167 ± 15	190 ± 59

Vorkultur			Hauptkultur			Stamm				
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]	AE104	DN729 ($\Delta cusCFBA$)	DN686 ($\Delta copABCD$)	DN656 ($\Delta cupCAR$)	DN657 ($\Delta gigPABT$)
						Gold [Atome/Zelle] x 10 ³				
0	0	0	0	0	0	00 ± 00	01 ± 01	03 ± 03	00 ± 00	01 ± 02
0	0	0	2,5	2,5	0	50 ± 07	94 ± 17	46 ± 04	63 ± 01	48 ± 10
0	0	0	0	0	100	00 ± 00	01 ± 01	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
0	0	0	2,5	2,5	100	176 ± 21	161 ± 11	104 ± 06	160 ± 60	115 ± 19
0	100	100	2,5	2,5	0	105 ± 11	126 ± 32	119 ± 37	65 ± 04	76 ± 08
0	100	100	0	0	100	00 ± 00	01 ± 01	02 ± 01	01 ± 01	00 ± 00
0	100	100	2,5	2,5	100	93 ± 08	203 ± 58	201 ± 11	142 ± 06	86 ± 01
2,5	0	0	2,5	2,5	0	72 ± 10	80 ± 12	64 ± 18	124 ± 28	63 ± 04
2,5	0	0	0	0	100	10 ± 03	11 ± 03	08 ± 02	11 ± 06	09 ± 02
2,5	0	0	2,5	2,5	100	192 ± 28	168 ± 50	116 ± 04	231 ± 04	189 ± 23

u.B. unter der Bestimmungsgrenze

3.5 Das goldinduzierte Cluster (*gig*-Cluster)

3.5.1 Der Beitrag des Gig-Systems an der Gold-Kupfer-Interferenz

Die Gene des *gig*-Clusters von *C. metallidurans* wurden in Microarray-Analysen mit Goldchlorid, Goldcyanid oder Goldthiomalat am stärksten hochreguliert, weshalb eine direkte Beteiligung an der Golddetoxifizierung vermutet wurde. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Deletion des *gigPABT*-Clusters auf die Gold-Kupfer-Interferenz mit Wachstumsendpunktbestimmungen (Tab. 10) und der Analyse des Metallgehaltes mittels ICP-MS (Tab. 9) untersucht.

Tab. 10: Gold- und Kupferresistenz von AE104 und dem Derivat DN657(Δ *gigPABT*) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ($n > 5$).

Vorkultur		Hauptkultur	Stamm	
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Cu(II) [μ M]	AE104	DN657 (Δ <i>gigPABT</i>)
			IC ₅₀ , <i>b</i> -value AuHCl ₄ [μ M]	
0	0	0	28,3 ± 2,6 3,9 ± 0,5	25,1 ± 1,5 4,0 ± 0,8
2,5	0	0	25,7 ± 2,9 3,81 ± 1,4	16,7 ± 2,1 4,0 ± 0,9
0	50	0	18,5 ± 0,5 1,5 ± 0,4	14,9 ± 1,8 1,8 ± 0,4
0	100	0	21,7 ± 1,9 1,7 ± 0,9	15,8 ± 1,8 1,8 ± 0,6
0	0	100	8,0 ± 1,8 0,5 ± 0,1	5,3 ± 1,3 0,8 ± 0,3
0	100	100	14,9 ± 0,6 1,2 ± 0,3	11,2 ± 1,5 1,3 ± 0,4
2,5	0	100	8,2 ± 0,4 0,7 ± 0,2	4,9 ± 1,2 1,1 ± 0,2

Vorkultur		Hauptkultur	Stamm	
Au(III) [μ M]	Cu(II) [μ M]	Au(III) [μ M]	AE104	DN657 (Δ <i>gigPABT</i>)
			IC ₅₀ , <i>b</i> -value CuCl ₂ [μ M]	
0	0	0	1148 ± 75,2 153 ± 85,1	1111 ± 42,0 55,5 ± 19,9
2,5	0	0	1040 ± 85,9 97,0 ± 30,0	840 ± 38,1 135 ± 40,0
0	0	2,5	616 ± 168 35,5 ± 21,1	556 ± 14,3 30,8 ± 8,2
2,5	0	2,5	628 ± 205 42,6 ± 28,4	394 ± 23,0 45,7 ± 11,6

Die Deletion des *gig*-Clusters hatte keinen Einfluss auf die Gold- und Kupferresistenz in Wachstumsendpunktbestimmungen von Zellen, die in der Hauptkultur mit verschiedenen Konzentrationen an AuHCl_4 oder CuCl_2 inkubiert wurden. Die ermittelten Kupfer- und Goldgehalte waren unter den Wachstumsbedingungen für die Metallgehaltanalyse auch vergleichbar zwischen den beiden Stämmen.

Die Vorinkubation mit CuCl_2 führte zur Abnahme der Goldresistenz, wie sie für den Wildtypstamm beobachtet werden konnte. Der IC_{50} -Wert von AuHCl_4 lag jedoch für DN657($\Delta\text{gigPABT}$) deutlich niedriger als für AE104 und lässt sich eher mit dem der Deletionsmutante DN686($\Delta\text{copABCD}$) vergleichen. Im Unterschied zu AE104 konnte auch eine Reduzierung der Gold- und Kupferresistenz durch Vorinkubation mit AuHCl_4 dokumentiert werden. Diese geht unter den Wachstumsbedingungen für die Metallgehaltanalyse mittels ICP-MS mit einer Zunahme des Kupfergehaltes in DN657($\Delta\text{gigPABT}$) einher. Das Resistenzverhalten des Stammes DN657($\Delta\text{gigPABT}$) unter den anderen getesteten Wachstumsbedingungen war hingegen vergleichbar zum Wildtyp-Derivat AE104.

Weitere Unterschiede in der Metallgehaltanalyse zeigten sich durch Vorinkubation der Kupfer-inkubierten Zellen und Kupfer-Gold-inkubierten Zellen mit CuCl_2 , was zu einem höheren Kupfergehalt in der Deletionsmutante führte. Weiterhin führte die Doppelinkubation in DN657($\Delta\text{gigPABT}$) zu einem geringeren Goldgehalt als für AE104 dokumentiert wurde, wobei der Wert mit dem der Deletionsmutante DN686($\Delta\text{copABCD}$) vergleichbar war. Eine entsprechende Vorinkubation mit Gold, die keinen Einfluss auf das Resistenzverhalten der Au/Cu-inkubierten Zellen der Deletionsmutante zeigte, führte jedoch zu einem Anstieg des Goldgehaltes der Deletionsmutante.

Die Zunahme der Goldresistenz durch eine Vorinkubation mit CuCl_2 der $\text{AuHCl}_4/\text{CuCl}_2$ -inkubierten Zellen ist demnach nicht vom *Gig*-System abhängig, im Unterschied zu den periplasmatischen Kupferresistenzsystemen. Das *Gig*-System scheint vielmehr die Zahl an gespeicherten Kupferatomen unter Bedingungen erhöhter Kupfer- oder Goldkonzentrationen in der Vorkultur zu begrenzen.

3.5.2 Untersuchung der Expression der Gene des *gig*-Clusters auf RNA-Ebene

Mittels *reverse transcriptase*-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) wurde als Kontrolle überprüft, ob es sich beim *gig*-Cluster um ein Operon handelt und ob es unter den gewählten Bedingungen (AuHCl_4 oder CuCl_2) exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen des Stammes AE104 isoliert, die dann mit *random*-Primern in cDNA umgeschrieben wurde. Mit genspezifischen Primern wurde *gigPABT* bzw. *gigAB* in PCR-Reaktionen amplifiziert, wobei die cDNA als *Template* eingesetzt wurde. Durch die Detektion eines *gigPABT*-spezifischen PCR-Produktes (2032 bp) nach Inkubation der Zellen mit $25 \mu\text{M}$ AuHCl_4 für 10 min wurde der Nachweis erbracht, dass die Gene *gigPABT* gemeinsam transkribiert werden, was die Operonstruktur dieser Gene darlegt (Abb. 19A).

Durch die Detektion von *gigAB*-spezifischen PCR-Produkten mit einer jeweiligen Größe von 862 bp konnte nachgewiesen werden, dass das Operon unter den gewählten Bedingungen exprimiert wurde. Bei Inkubation der Zellen ohne zusätzliche Metallzugabe wurde hingegen das *gig*-Operon nicht exprimiert. Die Expression der Gene nimmt dabei mit längerer Metallinkubation und höherer Goldkonzentration zu (Abb. 19B). Die Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ AuHCl_4 oder $500 \mu\text{M}$ CuCl_2 resultierte jedoch in schwächeren Bandenintensitäten.

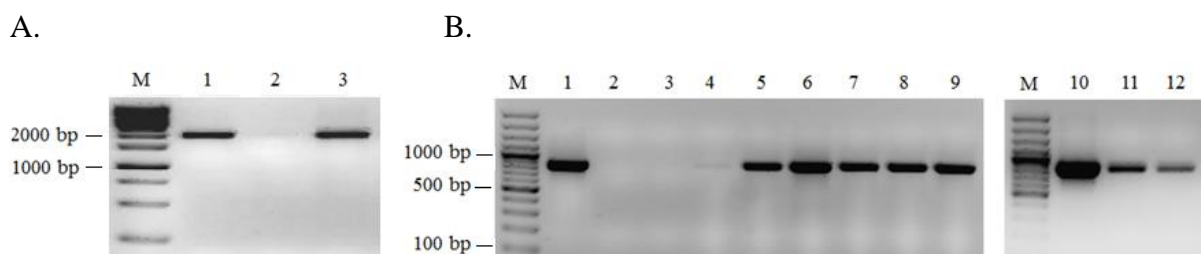


Abb. 19: Nachweis der Operonstruktur der Gene *gigPABT* des *gig*-Clusters. Der *C. metallidurans*-Wildtyp AE104 wurde über eine erste und zweite Vorkultur (24 h, 5 %) in einer Hauptkultur (2 %) bis 150 Klett-Einheiten bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min oder 30 min mit verschiedenen Konzentrationen an AuHCl_4 oder CuCl_2 inkubiert. Aus den Zellpellets dieser Kulturen wurde die RNA isoliert und anschließend für die cDNA-Synthese, bei der *random* Primer verwendet wurden, eingesetzt. Die cDNAs dienen als *Template* für eine RT-PCR, die mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt wurde. $10 \mu\text{l}$ des PCR-Produktes wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

A. Zum Nachweis der Operonstruktur der Gene des *gig*-Clusters wurde der entsprechende Genbereich (Rmet_4682 bis Rmet_4685) in einer PCR amplifiziert (2032 bp). M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 1: Positivkontrolle (genomische DNA von AE104), 2: Negativkontrolle (ohne *Template*), 3: $25 \mu\text{M}$ AuHCl_4 , 10 min

B. Nachweis der Expression des Genbereiches Rmet_4683-Rmet_4684 (862 bp). M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1: Positivkontrolle (genomische DNA von AE104), 2: Negativkontrolle (ohne *Template*), 3: ohne zusätzliche Metallinkubation, 4: $10 \mu\text{M}$ AuHCl_4 , 30 min, 5: $25 \mu\text{M}$ AuHCl_4 , 10 min, 6: $25 \mu\text{M}$ AuHCl_4 , 30 min, 7: $50 \mu\text{M}$ AuHCl_4 , 10 min, 8: $50 \mu\text{M}$ AuHCl_4 , 30 min, 9: $100 \mu\text{M}$ CuCl_2 , 10 min, 10: $100 \mu\text{M}$ CuCl_2 , 30 min, 11: $500 \mu\text{M}$ CuCl_2 , 30 min, 12: $500 \mu\text{M}$ CuCl_2 , 10 min.

3.5.3 Untersuchung der Expression der Gene des *gig*-Clusters auf physiologischer Ebene

Die Deletion des *gig*-Cluster hatte keinen Einfluss auf die Resistenz gegen verschiedene Stressoren, was vermuten lässt, dass dieses System durch andere Metallresistenzsysteme, wie dem Cop-System kompensiert werden könnte. Um dies in einem ersten Schritt auf physiologischer Ebene zu prüfen, wurde die Expression des Genclusters durch eine *gigT-lacZ*-Operonfusion in den Stämmen DN686($\Delta copABCD$), DN656($\Delta cupCAR$) und DN729($\Delta cusCFBA$) untersucht (Abb. 20). Die Deletion des *cupCAR*-Systems wirkte sich nicht auf die Induktion der Gene des *gig*-Clusters durch $AuHCl_4$ und $CuCl_2$ aus. Hingegen führte die Deletion der *copABCD*-Determinante zu einer verstärkten Expression der Gene des *gig*-Clusters durch $CuCl_2$, wohingegen die Inkubation mit $AuHCl_4$ keine Unterschiede in der Expression dieser Gene zum Wildtyp AE104 zeigte. Die Deletion des *cusCFBA*-Systems führte dazu, dass die Gene des *gig*-Clusters nicht mehr durch $AuHCl_4$ induziert wurden, wohingegen die Expression durch $CuCl_2$ vergleichbar in den Stämmen DN729($\Delta cusCFBA$) und AE104 war.

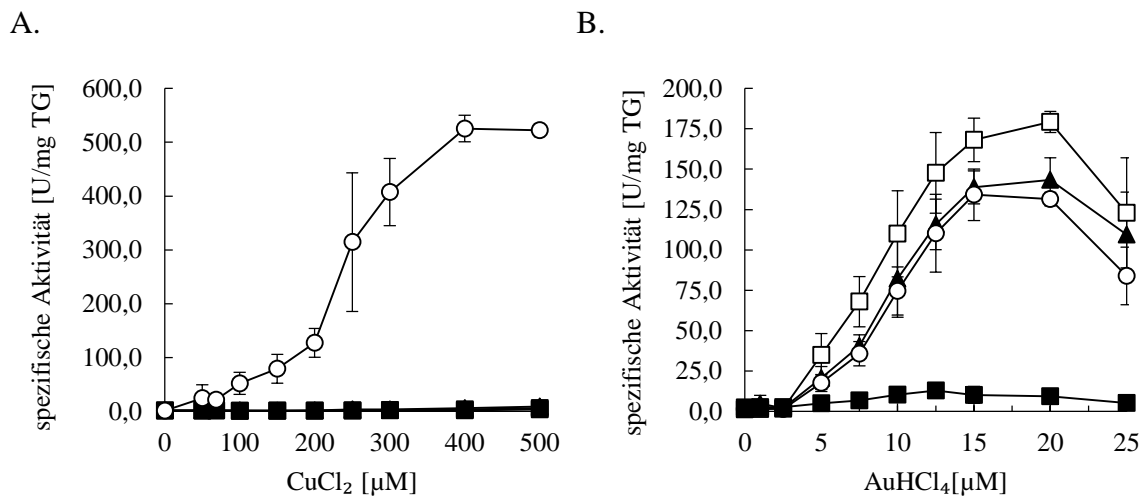


Abb. 20: Induktion einer *gigT-lacZ*-Fusion in AE104, DN686($\Delta copABCD$), DN729($\Delta cusCFBA$) und DN656($\Delta cupCAR$). AE104($\phi(gigT-lacZ)$) (□), DN686($\Delta copABCD$, $\phi(gigT-lacZ)$) (○), DN729($\Delta cusCFBA$, $\phi(gigT-lacZ)$) (■) und DN656($\Delta cupCAR$, $\phi(gigT-lacZ)$) (▲) wurden in Tris-MM bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30°C angezogen, um anschließend eine Hauptkultur zu 30 Klett zu inokulieren. Nach Erreichen der Verdopplung wurden die Kulturen nachfolgend zur Induktion der Genexpression für weitere 3 h bei 1300 rpm mit verschiedenen Konzentrationen an A. $CuCl_2$ und B. $AuHCl_4$ inkubiert. Die gewonnenen Zellpellets dieser Kulturen wurden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Thioredoxine, Glutaredoxine und Glutathion schützen die Zelle vor oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezien, indem sie das Milieu des Zellinneren reduziert halten. Dabei können hohe Konzentrationen an Metallen einen solchen Stress auslösen. Eine Vermutung war, dass es sich bei dem *Gig*-System um ein Thioredoxin-System oder Glutaredoxin handeln könnte. Daher

wurden für diese Experimente neben dem Wildtypderivat AE104 auch die Deletionsmutante DN710(AE104 Δ *gshA*) verwendet, in welcher das Gen für die γ -Glutamylcysteinsynthetase deletiert ist. Durch diese Deletion kann Glutamat und Cystein nicht zu γ -Glutamylcystein umgewandelt werden, welches den Grundbaustein zur Synthese von Glutathion durch die Glutathion-Synthetase (kodiert durch *gshB*) darstellt. Die Expression des Genclusters wurde durch eine *gigT-lacZ*-Operonfusion untersucht. Zur Induktion der Genexpression wurden die Zellen der Hauptkulturen hierzu für 3 h bei verschiedenen Konzentrationen an CuCl_2 , AuHCl_4 , $\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2$, H_2O_2 und Paraquat inkubiert. Die Ergebnisse sind in der Abb. 21 dargestellt.

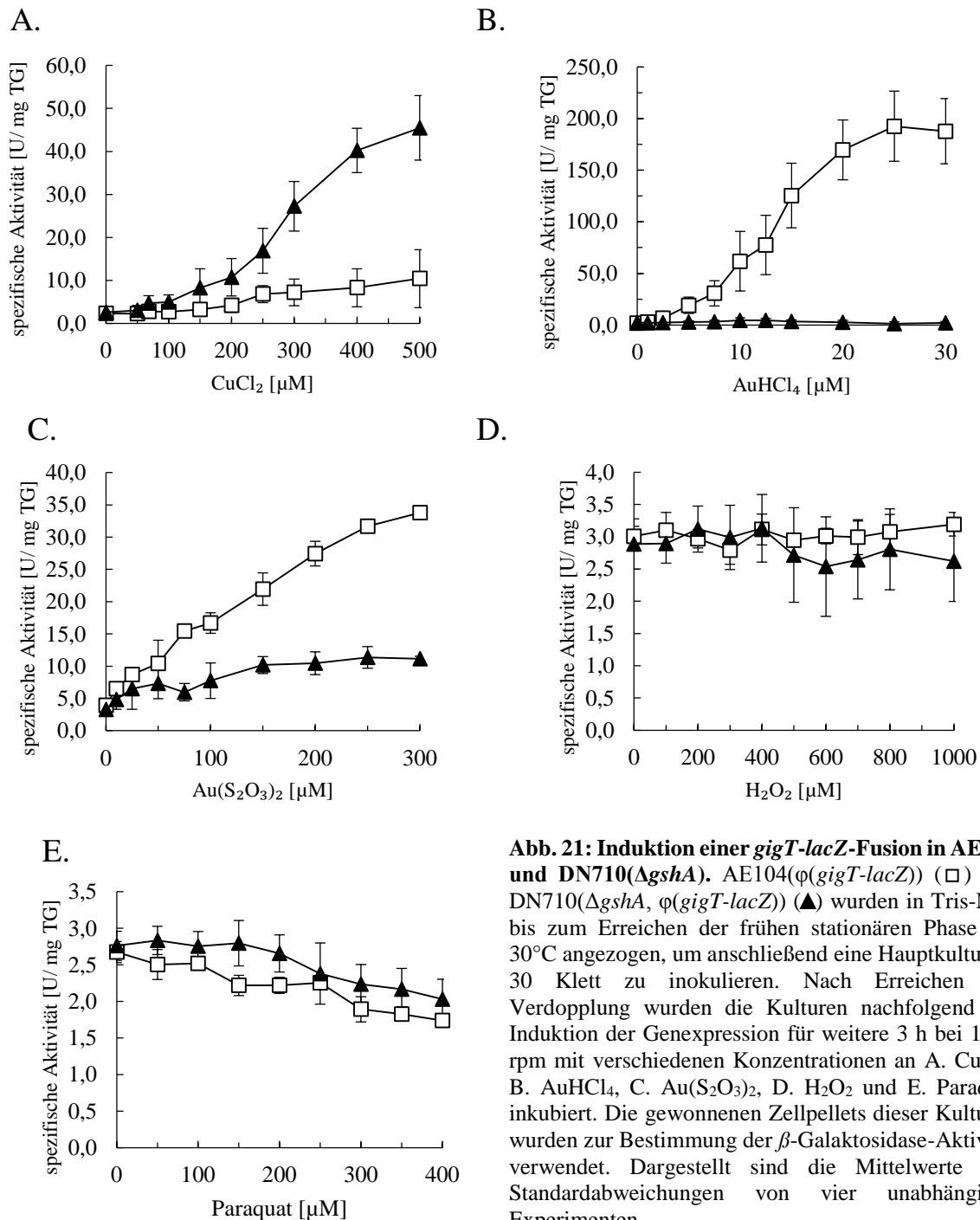


Abb. 21: Induktion einer *gigT-lacZ*-Fusion in AE104 und DN710(Δ *gshA*). AE104(ϕ (*gigT-lacZ*)) (\square) und DN710(Δ *gshA*, ϕ (*gigT-lacZ*)) (\blacktriangle) wurden in Tris-MM bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30°C angezogen, um anschließend eine Hauptkultur zu 30 Klett zu inokulieren. Nach Erreichen der Verdopplung wurden die Kulturen nachfolgend zur Induktion der Genexpression für weitere 3 h bei 1300 rpm mit verschiedenen Konzentrationen an A. CuCl_2 , B. AuHCl_4 , C. $\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2$, D. H_2O_2 und E. Paraquat inkubiert. Die gewonnenen Zellpellets dieser Kulturen wurden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Die Induktion der Genexpression durch AuHCl_4 und $\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2$ war stärker als mit CuCl_2 im Wildtypstamm AE104. Mit steigenden Konzentrationen an Gold blieb die Expression in der Deletionsmutante auf einem niedrigen Niveau, wohingegen mit CuCl_2 eine Zunahme dieser verzeichnet werden konnte. Die Induktionsrate durch Deletion von *gshA* lag mit $12,2 \pm 1,2$ bei $500 \mu\text{M}$ CuCl_2 deutlich über der des Wildtypstammes ($4,1 \pm 1,1$). In Gegenwart von Paraquat und H_2O_2 blieb die Expression über den gesamten Bereich in beiden Stämmen niedrig und konstitutiv. Diese Ergebnisse ließen sich auch durch Veränderung der Anzuchtbedingungen mit einer zusätzlichen zweiten Vorkultur reproduzieren (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf einen Zusammenhang zwischen Glutathion und dem *gig*-Cluster und damit auf die Beteiligung des Clusters am Schutz vor oxidativen Stress hin. In einem nächsten Schritt wurde daher der Einfluss der Gene des *gig*-Clusters auf den Glutathiongehalt der Zelle in Abhängigkeit der Anwesenheit von AuHCl_4 untersucht. Die Messung beruht auf einem enzymatischen Recycling Prozess, bei dem Glutathion durch DTNB (2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoesäure) oxidiert und bei Anwesenheit der entsprechenden Glutathionreduktase durch NADPH reduziert wird. Die Entstehung von NTB (2-Nitro-5-thiobenzoessäure) aus DTNB kann photometrisch gemessen werden. Auf diesem Weg konnte der Gesamtgehalt an reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion in der Zelle bestimmt werden (Griffith, 1980).

Der Glutathiongehalt der Stämme AE104, DN657($\Delta\text{gigPABT}$) sowie DN658(ΔrpoQ) bei den entsprechenden Goldkonzentrationen hat sich nicht voneinander unterschieden (Abb. 22). Diese Ergebnisse ließen sich durch Veränderungen der Anzuchtbedingungen reproduzieren.

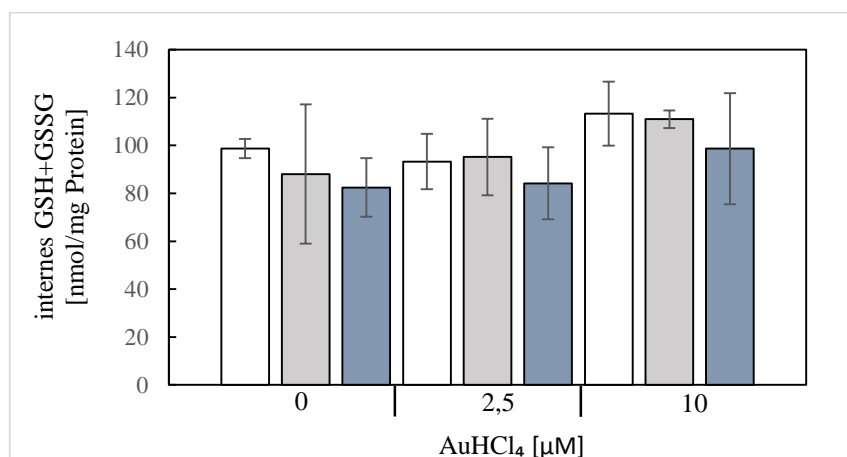


Abb. 22: Einfluss des *gig*-Clusters auf den Glutathiongehalt. Die Zellen der Stämme AE104 (□), DN657($\Delta\text{gigPABT}$) (▒) und DN658(ΔrpoQ) (■) wurden in einer Vorkultur bis zum Erreichen der frühen stationären Phase inkubiert und mit dieser eine zweite Vorkultur (24 h, 5 %) angeimpft. (A) Die Hauptkulturen wurden 10%ig inokuliert, gegebenenfalls mit Gold versetzt und 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen der Hauptkulturen (5 mg Trockengewicht) wurden nach Entfernung des Kulturmediums aufgeschlossen, die Zelltrümmer abgetrennt und der Glutathiongehalt im Überstand bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

3.5.4 Einfluss der Deletion von *rpoQ* auf die Expression der Gene des *gig*-Clusters

Um zu untersuchen, ob die Gene *gigPABT* unter der Kontrolle des putativen Sigma-Faktors RpoQ stehen, wurden Induktionsexperimente (β -Galaktosidase-Assay) durchgeführt. Dazu wurde sich der *gigT-lacZ*-Fusion bedient, um die Induktion der Gene in Abhängigkeit verschiedener Metallkonzentrationen und der Anwesenheit von RpoQ zu untersuchen (Abb. 23).

Hierfür wurden neben dem Wildtypderivat AE104 die Deletionsmutanten DN658($\Delta rpoQ$) und DN659($\Delta rpoQ \Delta Rmet_{4687}$) verwendet. In Gegenwart von $CuCl_2$ und $AuHCl_4$ blieb die Expression in den Deletionsmutanten über den gesamten Bereich hoch und konstitutiv. Die zusätzliche Deletion des putativen Anti-Sigma-Faktors (*Rmet₄₆₈₇*), welcher RpoQ inhibieren und so die Transkription verhindern sollte, führte zu keinem veränderten Effekt.

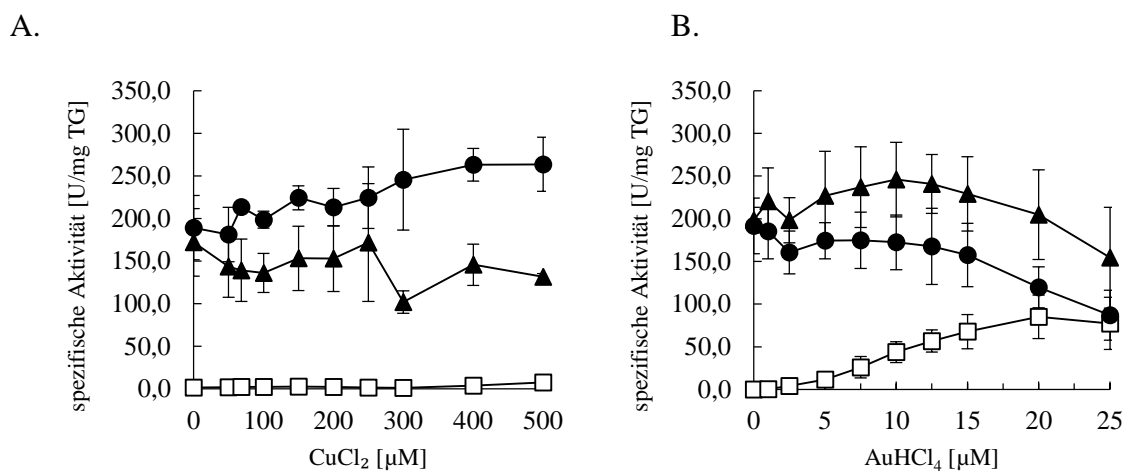


Abb. 23: Einfluss der *rpoQ*-Deletion auf die Induktion einer *gigT-lacZ*-Fusion durch $CuCl_2$ und $AuHCl_4$. Die Zellen des *C. metallidurans*-Wildtyps AE104($\Phi(gigT-lacZ)$) (□) sowie der Deletionsmutanten DN658($\Delta rpoQ(\Phi(gigT-lacZ))$) (▲) und DN659($\Delta rpoQ\Delta Rmet_{4687}(\Phi(gigT-lacZ))$) (●) wurden in Tris-MM bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30°C angezogen, um anschließend eine Hauptkultur zu 30 Klett zu inokulieren. Nach Erreichen der Verdopplung wurden die Kulturen nachfolgend zur Induktion der Genexpression für weitere 3 h bei 1300 rpm mit verschiedenen Konzentrationen an A. $CuCl_2$ und B. $AuHCl_4$ inkubiert. Die gewonnenen Zellpellets dieser Kulturen wurden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

3.6 Beteiligung der Metallaufnahmesysteme von *C. metallidurans* an der Goldresistenz

C. metallidurans verfügt über eine Vielzahl an Metallaufnahmesystemen (CorA1-3, ZupT, CadA, ZntB, PitA, HoxN, MgtA, MgtB) die über eine geringe Spezifität und ein breites Substratspektrum verfügen (Kirsten *et al.*, 2011). Ein möglicher Importer für Kupferionen ist

bisher weitestgehend unbekannt. In Wachstumsendpunktbestimmungen wurde der Einfluss einer *zupT*-Deletion und einer Deletionsmutante, in der sieben der neun bisher annotierten Importsysteme von *C. metallidurans* deletiert sind, auf die Gold- und Kupferresistenz untersucht. Bei einer Beteiligung dieser Transporter am Import von Gold oder Kupfer ins Cytoplasma würde man demnach eine gesteigerte Gold- und Kupferresistenz vermuten. Jedoch führte die Deletion von *zupT* zu einer Abnahme beider Resistenzen, die durch die Deletion der weiteren sechs Aufnahmesysteme verstärkt werden konnte (Abb. 24). Eine zusätzliche Deletion des *cup*-Systems im Stamm DN681($\Delta corA1-3 \Delta zupT \Delta pitA \Delta zntB \Delta zupT \Delta hoxN$) veränderte nicht weiter das Resistenzniveau von Gold.

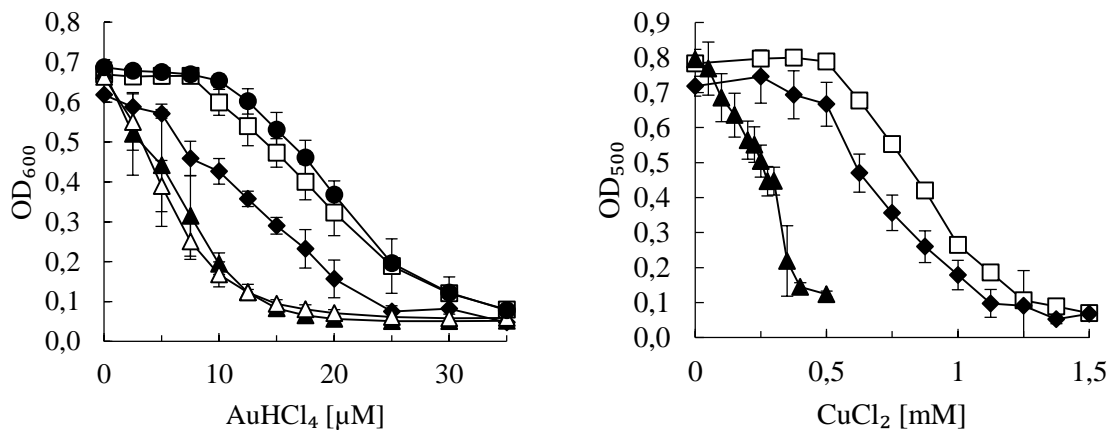


Abb. 24: Kupfer- und Goldresistenz des Stammes AE104 und der Derivate, die Deletionen in den Metallaufnahmesystemen tragen. Zellen des Stammes AE104 (□) und der Deletionsmutanten DN515($\Delta zupT$) (◆), DN681($\Delta corA1-3 \Delta zupT \Delta pitA \Delta zntB \Delta zupT \Delta hoxN$) (▲), DN687($\Delta corA1-3 \Delta zupT \Delta pitA \Delta zntB \Delta zupT \Delta hoxN \Delta cupCAR$) (△) sowie DN656($\Delta cupCAR$) (●) wurden bei 30°C in Tris-MM bis zur frühen stationären Phase kultiviert, 5%ig in frischem Tris-MM verdünnt und für weitere 24 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend sind die Zellen 10%ig in Tris-MM mit verschiedenen Konzentrationen an A. AuHCl₄ und B. CuCl₂ verdünnt und für 20 h bei 1300 rpm und 30°C inkubiert worden. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten.

Um zu prüfen, ob die Reduktion der Resistenzen von AuHCl₄ und CuCl₂ mit einem Anstieg des Gold- bzw. Kupfergehaltes begründet werden kann, wurde sich der CupR-abhängigen Expression der *cupA-lacZ*-Reportergenfusion bedient. CupR aus *C. metallidurans* ist ein MerR-Typ Regulationsprotein, das in der Lage ist Goldkomplexe zu binden (Jian *et al.*, 2009). Als Dimer bindet der Regulator an die Operatorregion des Promotors von *cupA* und rekrutiert die RNA-Polymerase, die aufgrund der Verdrehung der DNA nicht in der Lage ist vollständig an den Promotor zu binden. Durch Bindung von Au(I) oder Cu(I) an den Regulator kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass die RNA-Polymerase vollständig an die Promotorregion bindet und die Transkription initiiert wird (Brown *et al.*, 2003). Durch die Induktion der *cupA-lacZ*-Reportergenfusion durch CupR mit steigenden Konzentrationen an AuHCl₄ kann die Anwesenheit von Goldionen im Cytoplasma bestimmt werden, wobei somit auch Änderungen

in den Stämmen AE104($\phi cupA-lacZ$), DN515($\Delta zupT$, $\phi cupA-lacZ$) und DN681($\Delta corA1-3 \Delta zupT \Delta pitA \Delta zntB \Delta zupT \Delta hoxN$, $\phi cupA-lacZ$) messbar sind (Abb. 25).

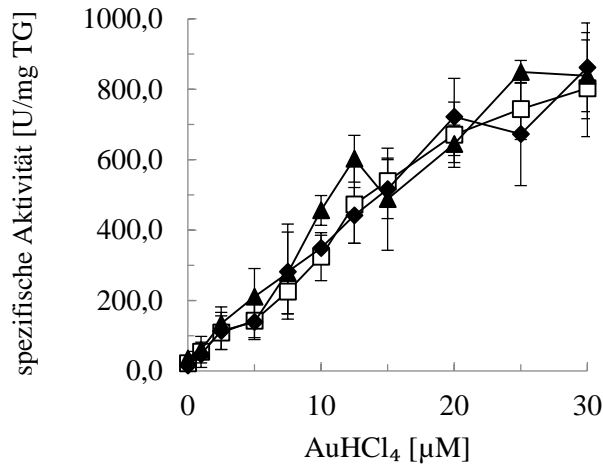


Abb. 25: Regulation der *cupA-lacZ*-Fusion in Gegenwart und Abwesenheit der Metall-aufnahmesysteme. Exponentiell wachsende Zellen der Stämme AE104 (□), DN515($\Delta zupT$, $\phi(cupA-lacZ)$) (◆) und DN681($\Delta corA1-3 \Delta zupT \Delta pitA \Delta zntB \Delta zupT \Delta hoxN$, $\phi(cupA-lacZ)$) (▲) wurden in parallelen Kulturen aufgeteilt und mit verschiedenen Konzentrationen an AuHCl₄ für 3 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Nach Inkubation mit AuHCl₄ konnten keine Unterschiede der β -Galaktosidaseaktivität der *lacZ*-Reporterfusion von *cupA* zwischen den Importdeletionsmutanten und dem Wildtypderivat AE104 festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelieren auch mit der Analyse des Metallgehaltes von AE104 und DN515($\Delta zupT$) mittels ICP-MS, in der ähnliche Gold- und Kupfergehalte in den Zellen ermittelt werden konnten (Tab. 11).

Die abnehmende Gold- und Kupferresistenz in den Import-Deletionsmutanten scheint daher nicht das Ergebnis einer gesteigerten Goldakkumulation in diesen Zellen zu sein, sondern kann vielmehr auf eine Störung der gesamten Übergangsmetallhomöostase zurückgeführt werden.

Tab. 11: Kupfer- und Goldgehalt von AE104 und DN515($\Delta zupT$) (n=3).

Hauptkultur		Stamm	
		AE104	DN515($\Delta zupT$)
Au(III) [μM]	Cu(II) [μM]	Kupfer [Atome/Zelle x 10 ³]	
0	0	14,5 ± 4,0	14,1 ± 7,0
2,5	0	7,6 ± 2,8	10,6 ± 2,7
0	100	71 ± 3,7	64,5 ± 10,1
Au(III) [μM]	Cu(II) [μM]	Gold [Atome/Zelle x 10 ³]	
0	0	00±00	00±00
2,5	0	48,1 ± 4,7	55,9 ± 5,2

3.7 Der Einfluss von Glutathion auf die Metallresistenz von *C. metallidurans*

Das Pseudotripeptid Glutathion ist an der Übergangsmetallhomöostase in Eukaryoten und Bakterien beteiligt (Smirnova und Oktyabrsky, 2005). Es wird aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet. Dabei erfolgt die Synthese über zwei ATP-verbrauchende Schritte. Im ersten Schritt werden Cystein und Glutamat über eine Isopeptidbindung zu γ -Glutamylcystein verknüpft. Diese Reaktion wird durch die γ -Glutamylcysteinsynthetase katalysiert, die vom Gen *gshA* kodiert wird. Die Glutathionsynthetase, die vom Gen *gshB* kodiert wird, katalysiert anschließend den zweiten Schritt, bei dem Glycin mit dem terminalen Kohlenstoffatom von γ -EC verbunden wird und zu GSH reagiert (Samuels, 1953). Beide Gene liegen in einer Operon-ähnlichen Anordnung. Das Pseudotripeptid kann als reduzierte Form (GSH) und als oxidierte Form (GSSG) vorliegen (Jocelyn, 1995; Smirnova und Oktyabrsky, 2005; Dalle-Donne und Rossi, 2009). Aufgrund der reversiblen Umwandlung der beiden Formen durch die Glutathion-Reduktase kann ein Einfluss von Glutathion auf die Redoxpotenziale in den intrazellulären Kompartimenten für den Metabolismus vermutet werden. Im Folgenden wurde der Einfluss von Glutathion auf die Goldresistenz und die Goldnanopartikelbildung untersucht.

3.7.1 Der Einfluss der *gshA*-Deletion auf die Goldresistenz und den Goldgehalt

Der Beitrag von Glutathion an der Schwermetallhomöostase wurde unter Einfluss von $ZnCl_2$, $CdCl_2$ und $CoCl_2$ (s. Anhang Abb. 44) sowie $AuHCl_4$ und $CuCl_2$ (Abb. 26) analysiert. Dabei zeigten die Wachstumsendpunktbestimmungen des Stammes DN710($\Delta gshA$) eine Reduzierung der Zn(II), Cd(II), Au(III) und Cu(II)-resistenz, wohingegen die Zugabe von Co(II) keine signifikante Änderung der Resistenz verursachte.

Um den Effekt der Reduzierung der Schwermetallresistenz der *gshA*-Deletion in DN710($\Delta gshA$) zu komplementieren, wurde der *broad-host-range* Vektor pECD1231 (pBBR1-MCS2::*gshA*) in *E. coli* S17/1 mit dem Deletionsstamm DN710($\Delta gshA$) konjugiert. Die Klonierung von pECD1231(pBBR1-MCS2::*gshA*) erfolgte über den Vektor pASK-IBA3*plus*, sodass GshA als C-terminales *Strep-tag*®II-Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Das Fragment mit *Strep-tag*®II wurde in Orientierung des T7-Promotors in die *multi-cloning site* des pBBR1-MCS2 Vektors kloniert. Da auf dem Plasmid das *gshA*-Gen mit der zugehörigen Promotorregion kodiert ist, wurde eine konstitutive Expression von *gshA* erreicht, die der

natürlichen Situation entspricht. So konnte das Glutathion-Operon durch AuHCl_4 und CuCl_2 konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert werden (s. Anhang Abb.45).

Der Komplementationsstamm sowie die Deletionsmutante wurden in Wachstumsendpunktbestimmungen (Abb. 26) physiologisch charakterisiert.

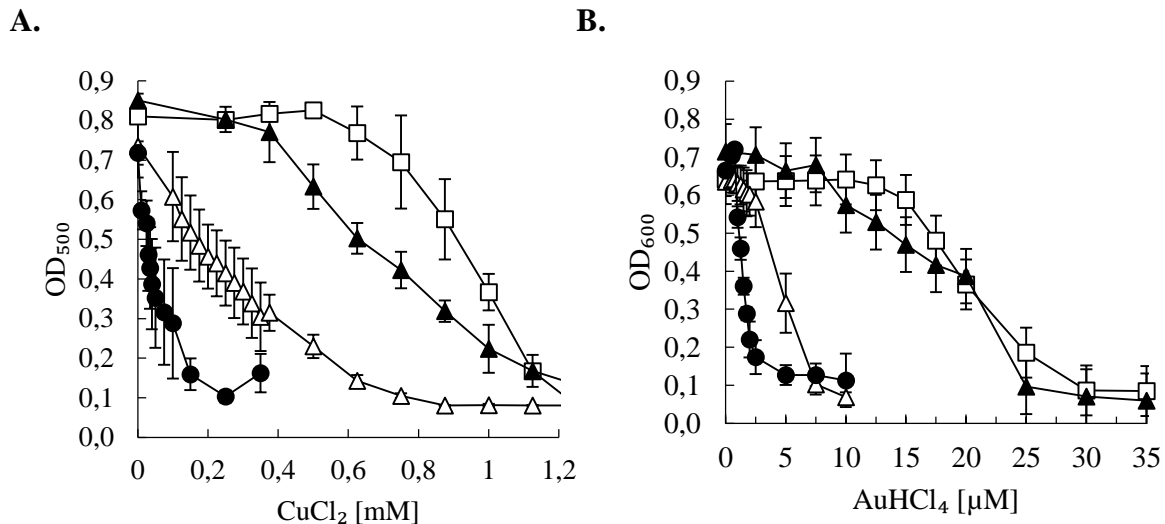


Abb. 26: Kupfer- und Goldresistenz der Stämme AE104 und DN710(*AgshA*). Die Zellen des Stammes AE104 (\square) und DN710(*AgshA*) (Δ) sowie des Stammes DN710(Δ *gshA*, pBBR1-MCS2) (\bullet) und des Komplementationsstammes DN710(Δ *gshA*, pECD1231) (\blacktriangle) wurden in der Hauptkultur 5%ig mit der zweiten Vorkultur in frischem Tris-MM verdünnt und mit steigenden Konzentrationen an A. CuCl_2 und B. AuHCl_4 -chlorid bei 30°C für 20 h kultiviert. Die Optische Dichte bei 500 nm bzw. 600 nm wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Die Komplementation von *gshA* in trans führte zu einer Steigerung der Gold- und Kupferresistenz, wobei das gleiche Resistenzniveau gegen AuHCl_4 des Wildtypstamms erreicht werden konnte. Als Kontrolle diente der Stamm DN710(Δ *gshA*) mit pBBR1-MCS2 als Leervektor, der in der Hauptkultur einen sensitiveren Phänotyp als die Deletionsmutante zeigte. Der Nachweis von GshA im Komplementationsstamm konnte im Western-Blot und anschließender Detektion mittels *Strep*Tactin-Peroxidase Konjugat nachgewiesen werden (Molekulare Masse: 47 kDa) (s. Anhang Abb. 46). Eine zusätzliche Bande war bei 70 kDa im Western-Blot detektierbar, die dem Biotin-Carrierprotein von *C. metallidurans* zugeordnet werden kann. Durch die Komplementation war der Glutathiongehalt (reduziertes/oxidiertes Glutathion [GSH+GSSG]) des Stammes DN710(Δ *gshA*, pECD1231) dem des Stammes AE104 vergleichbar (AE104: 103 ± 13 nmol/mg Protein; DN710(Δ *gshA*, pECD1231): 125 ± 14 nmol/mg Protein), während für die Deletionsmutante mit und ohne den Leervektor ein niedrigerer Glutathiongehalt ermittelt werden konnte (DN710(Δ *gshA*, pBBR1-MCS2): 18 ± 1 nmol/mg Protein; DN710(Δ *gshA*): 18 ± 3 nmol/mg Protein).

Darüberhinaus wurde die Änderung der Metallgehalte durch eine *gshA*-Deletion mittels ICP-MS untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in der Tab. 12 aufgelistet. Es lässt sich erkennen, dass die Deletion von *gshA* zu einem deutlich erhöhten Gold- und Kupfergehalt nach Inkubation mit 1 μM oder 2,5 μM AuHCl_4 oder 100 μM CuCl_2 führte. Der Gold- und Kupfergehalt der AE104-Zellen machte nur 15 % und 60 % von dem Gehalt der Deletionsmutante aus. Die Zugabe beider Metalle führte in den Stämmen zu dem bereits beschriebenen Anstieg des Gold- und Kupfergehaltes, allerdings waren die absoluten Zahlen der Metallgehalte der Deletionsmutante deutlich höher.

Tab. 12: Kupfer- und Goldgehalt von AE104 und DN710(Δ *gshA*) bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (n>4).

Hauptkultur		Stamm	
		AE104	DN710(Δ <i>gshA</i>)
Au(III) [μM]	Cu(II) [μM]	Kupfer [Atome/Zelle $\times 10^3$]	
0	0	19,8 \pm 4,6	27,6 \pm 3,4
0	100	71,2 \pm 6,8	130,4 \pm 36,0
1	100	96,1 \pm 10,9	261,8 \pm 21,5
Au(III) [μM]	Cu(II) [μM]	Gold [Atome/Zelle $\times 10^3$]	
0	0	u.B.	u.B.
1	0	22,3 \pm 1,7	103,3 \pm 7,7
2,5	0	54,7 \pm 5,6	334,8 \pm 55,2
1	100	39,9 \pm 5,5	541,9 \pm 76,1

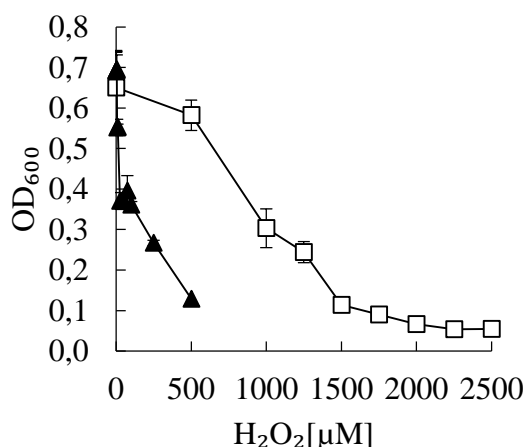
u.B. unter der Bestimmungsgrenze

3.7.2 Die γ -Glutamylcysteinsynthetase-Deletionsmutante ist sensitiver gegenüber oxidativen Stress als der Wildtypstamm AE104

Für die Stämme AE104 und DN710(AE104 Δ *gshA*) wurden Wachstumsendpunktbestimmung unter Zugabe von H_2O_2 und Paraquat durchgeführt. Das Ziel dabei war das Auslösen von Stress auf den unterschiedlichen Ebenen der ROS-Entgiftung. Der Organismus schützt sich gegen die toxische Wirkung von H_2O_2 mittels seiner Enzyme (z.B. Katalasen, Peroxidasen), die es wieder zum ungiftigen molekularen O_2 und H_2O zersetzen. Auch die Zugabe von Paraquat (Methylviologen) führt in dem Bakterium zum oxidativen Stress. Dabei regeneriert Paraquat durch univalente Elektronenübertragung auf molekularen O_2 Superoxid-Anionen (Hyperoxide) im Cytoplasma von Zellen und steigert somit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezien. Diese Hyperoxide können in Gegenwart von Wasser unter der Bildung von Sauerstoff und Hydroxiden sowie von Wasserstoffperoxid (Superoxiddismutasen) zerfallen. Durch die

Wirkung von H_2O_2 kann es wiederum zur Bildung von Hydroxylradikalen kommen (Haber-Weiss oder Fenton-Reaktion) (Hassan und Fridovich, 1977; Fridovich, 1986; Imlay, 2008). Es ist daher anzunehmen, dass unter Paraquat vergleichbare Effekte wie unter H_2O_2 -Stress auftreten. Die Abb. 27 zeigt das Wachstum von DN710($\Delta gshA$) im Vergleich zum plasmidfreien Derivat AE104 in Anwesenheit von A. H_2O_2 und B. Paraquat. Bereits geringe Konzentrationen der Reagenzien inhibieren das Wachstum der Mutante, die demnach deutlich sensitiver gegenüber oxidativen Stress ist als der Stamm AE104.

A.



B.

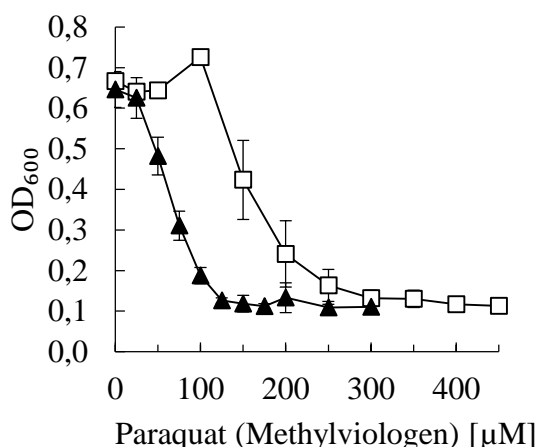


Abb. 27: Resistenz der *gshA*-Deletionsmutante gegen H_2O_2 und Paraquat. Zellen des Wildtypstammes AE104 (□) oder der Mutante DN710($\Delta gshA$) (▲) wurden in der Hauptkultur 5%ig mit der zweiten Vorkultur in frischem Tris-MM verdünnt und mit steigenden Konzentrationen an A. H_2O_2 und B. Paraquat bei 30°C für 20 h kultiviert. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

3.7.3 Wo ist das vermehrte Gold in der *gshA*-Deletionsmutante lokalisiert?

Diese Frage sollte durch die Induktion der CupR-abhängigen Expression einer *cupA-lacZ*-Reporterfusion beantwortet werden. Durch den Vergleich der Induktionen in den Stämmen AE104 und DN710($\Delta gshA$) konnte der erhöhte Goldgehalt der Deletionsmutante auf eine erhöhte Akkumulation von Goldionen im Cytoplasma der Zellen zurückgeführt werden (Abb. 28). Die Basisaktivität der β -Galaktosidase ohne zusätzliches Metall im Tris-MM betrug bei beiden Stämmen 10-17 U/mg TG. Jedoch zeigten die Induktionsexperimente einen deutlich höheren Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität in DN710($\Delta gshA$) bei geringeren Goldkonzentrationen. Bei 7,5 μM AuHCl_4 konnte für die Deletionsmutante und dem Wildtyp eine spezifische Aktivität von 600 U/mg TG und 196 U/mg TG ermittelt werden. Eine höhere Konzentration des Schwermetallsalzes konnte aufgrund der Letalität des Stammes DN710($\Delta gshA$) nicht eingesetzt werden. Erst bei einer Konzentration an AuHCl_4 von 30 μM

erreichte die β -Galaktosidase Aktivität in AE104 einen vergleichbaren Wert zur Deletionsmutante. Im Vergleich zu AuHCl_4 hatte die Zugabe von CuCl_2 keine signifikanten Unterschiede auf die Genexpression in beiden Stämmen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass die erhöhte Akkumulation von Kupfer in der Deletionsmutante sich vorwiegend auf das periplasmatische Kompartiment beschränken könnte.

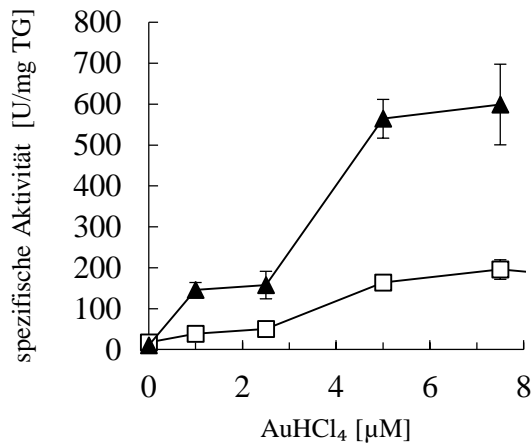


Abb. 28: Induktion einer *cupA-lacZ*-Fusion durch AuHCl_4 in AE104 und DN710($\Delta gshA$). Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme AE104($\Phi(\text{cupA-lacZ})$) (□) und DN710($\Delta gshA$, $\Phi(\text{cupA-lacZ})$) (▲) mit verschiedenen Konzentrationen an AuHCl_4 inkubiert. Nach 3 h wurde die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und gegen die eingesetzten Metallkonzentrationen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

3.7.4 Der Einfluss von Glutathion auf die Biomineralisierung von Gold

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass *C. metallidurans* in der Lage ist AuHCl_4 zu metallischen Goldnanopartikeln zu synthetisieren, die vorwiegend im Periplasma und an der Cytoplasmamembran und weniger im Cytoplasma lokalisiert sind. Die erhöhte Goldsensitivität des Stammes DN710($\Delta gshA$) geht mit einem erhöhten Goldgehalt im Cytoplasma einher. Im Folgenden wurde mit dem TEM untersucht, welche Auswirkung die erhöhten Konzentrationen an AuHCl_4 im Stamm DN710($\Delta gshA$) auf die Synthese der Nanopartikel hatte. Dazu wurden AE104, DN710($\Delta gshA$, pECD1231) sowie DN710($\Delta gshA$) mit Konzentrationen an AuHCl_4 inkubiert, die bei den Zellen ähnliche Toxizitäten hervorrufen. Der Stamm DN710($\Delta gshA$) wurde mit 10 μM bzw. 20 μM AuHCl_4 und die beiden Kontrollstämme mit 40 μM AuHCl_4 über eine Zeitspanne von 56-72 h kultiviert. Die Abb. 29 zeigt exemplarisch die TEM-Aufnahmen der Zellen, die 72 h mit AuHCl_4 inkubiert wurden. Bei ähnlichen Toxizitätslevel konnte die Deletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp-Derivat und dem Komplementationsstamm keine Goldnanopartikel synthetisieren. Die Zugabe ähnlicher Konzentrationen wie für AE104 reduzierte im Stamm DN710($\Delta gshA$) die cfu um die Hälfte und wurde daher in die Untersuchung der Goldnanopartikelbildung nicht mit einbezogen.

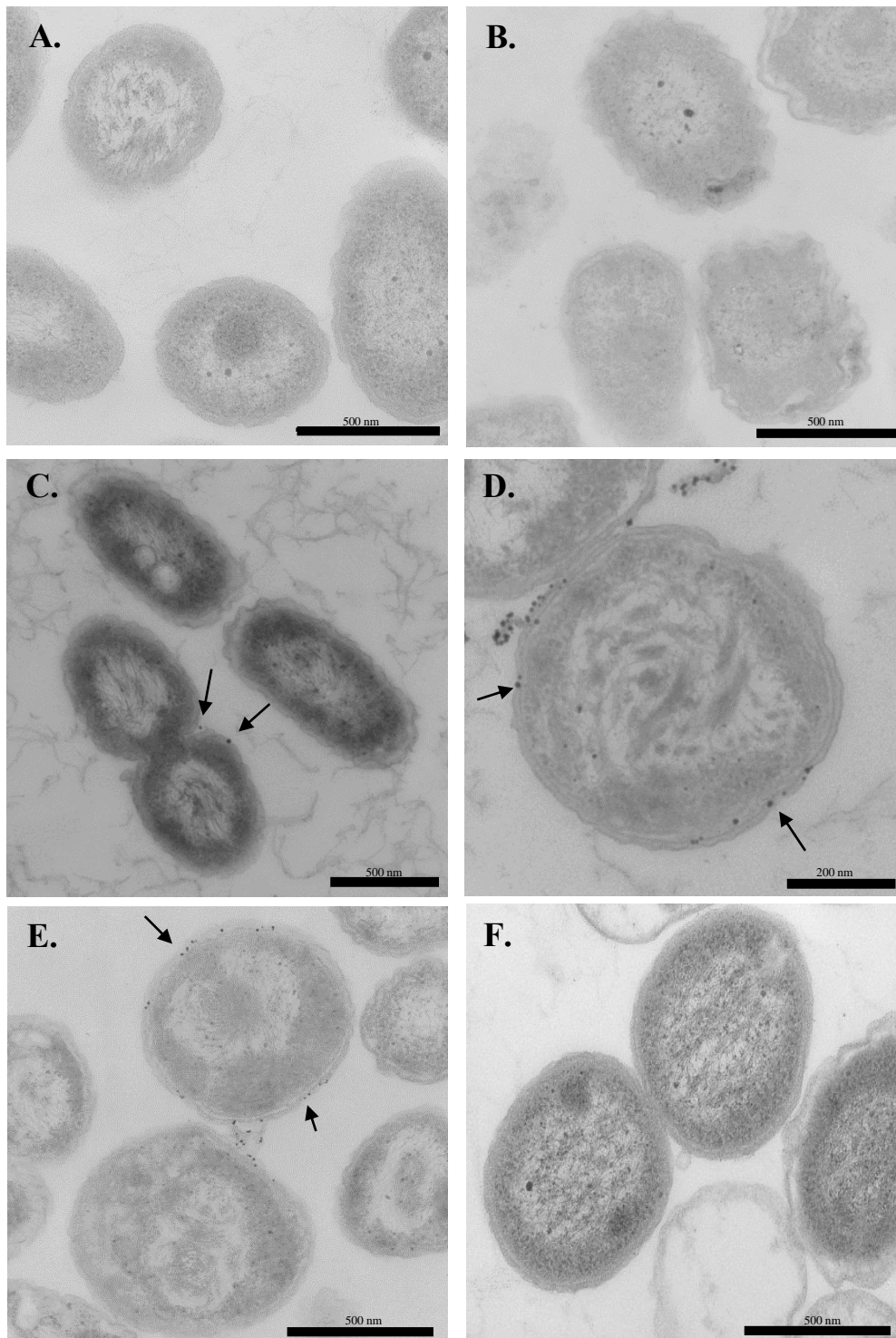


Abb. 29: TEM-Aufnahmen von DN710($\Delta gshA$) und DN710($\Delta gshA$, pECD1231). Die *C. metallidurans*-Zellen wurden für 72 h in Tris-MM ohne bzw. mit AuHCl₄ kultiviert. A. DN710($\Delta gshA$) mit 10 μ M AuHCl₄, B. DN710($\Delta gshA$) mit 20 μ M AuHCl₄, C.-D. DN710($\Delta gshA$, pECD1231) mit 40 μ M AuHCl₄, E. AE104 mit 40 μ M AuHCl₄, F. DN710($\Delta gshA$) ohne zusätzliche Metallinkubation. Die Pfeile zeigen auf Goldnanopartikel. Maßstäbe sind 0,2 μ M (D.) und 0,5 μ M (A.-C., E.-F.). Die Probenpräparation für das TEM erfolgte durch Dr. Dr. Gerd Hause.

4 Diskussion

4.1 Orthologe Goldresistenzsysteme von *D. acidovorans* und *S. enterica* sv. *Typhimurium* haben keinen Einfluss auf die Goldhomöostase

4.1.1 Die Beteiligung von Siderophoren an der Goldresistenz und Goldbiomineralisierung

Siderophoren sind in der Regel Chelatoren mit einer starken Affinität für Eisen, die Nährstoffe aus der Umgebung aufnehmen und Mikroorganismen unter Eisen-limitierenden Bedingungen versorgen können. Trotz ihrer bevorzugten Präferenz für Eisen können sie auch eine Reihe anderer Metallionen chelatieren wie Silber, Aluminium, Cadmium, Kobalt, Chrom, Kupfer, Quecksilber, Mangan, Nickel, Blei, Zinn und Zink (Schalk *et al.*, 2011; Ahmed und Holmstrom, 2014). Sie nehmen daher eine wichtige Rolle in der Metalltoleranz ein, in dem sie durch die Reduzierung der extrazellulären Konzentrationen zur Detoxifizierung sowie zur Bioverfügbarkeit dieser Metalle beitragen können (Schalk *et al.*, 2011).

Es gibt nun eine Reihe von Studien mit Cyanobakterien, Schwefelbakterien, und *Stenothrophomonas* sp, die in der Lage sind die Menge an toxischem und mobilen Gold durch die Produktion und Sekretion von Polysacchariden ins äußere Milieu zu limitieren. Die extrazellulären polymeren Substanzen sowie die sekretierten Proteine sind dabei maßgebend an der extrazellulären Bildung der Goldnanopartikel beteiligt (Lengke *et al.*, 2006a; Lengke *et al.*, 2006b; Reith *et al.*, 2007; Nangia *et al.*, 2009). So sekretiert *D. acidovorans* das sekundäre Siderophor bzw. Metallophor Delftibactin A um die Au(III)-Toxizität durch die Bildung extrazellulärer Nanopartikel zu reduzieren (Johnston *et al.*, 2013). Das Cluster für dessen Synthese hat keine homologen Sequenzen in anderen Bakterien.

C. metallidurans kann als bisher bekanntes Siderophor in diesem Organismus Staphyloferrin B (frühere Bezeichnung Alcaligin E) synthetisieren, dessen Biosynthese durch den Sigmafaktor RpoI kontrolliert wird (Gilis *et al.*, 1996; Grosse *et al.*, 2007). Als Folge der direkten Interaktion zwischen Staphyloferrin B und Cadmium, kommt es beispielsweise zur Abnahme der Bioverfügbarkeit von Cadmium und einer damit einhergehenden Reduzierung des toxischen Metalleffektes (Gilis *et al.*, 1998). Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass dieses Siderophor keine direkte Bedeutung für die Goldresistenz (Abb. 3) oder die Goldbiomineralisierung (Daten nicht gezeigt) hat. Während die Nanopartikel vorwiegend im Periplasma und an der Cytoplasmamembran im Wildtypstamm AE104 und der Deletionsmutante DN488($\Delta rpoI$) lokalisiert waren, beschränkte sich die Synthese dieser Nanostrukturen in *D. acidovorans* lediglich auf das extrazelluläre Milieu. Das geringe

Vorkommen an Goldnanopartikeln außerhalb der *C. metallidurans*-Zelle kann hingegen mit dem Lysieren dieser begründet werden (s. Anhang Abb. 37C/D). Ausgehend von dieser Argumentation spricht dies eher gegen eine Beteiligung dieses Siderophors an der Nanopartikelbildung in *C. metallidurans*.

4.1.2 Das Cup-System von *C. metallidurans* ist kein Goldresistenzsystem

Es wird postuliert, dass der *gol*-Locus durch horizontalen Gentransfer erworben wurde (McClelland *et al.*, 2001; Checa *et al.*, 2007; Espariz *et al.*, 2007). So verfügen die identifizierten Organismen aus den Biofilmen der Goldnuggets (*S. enterica* sv. Typhimurium LT2, *C. metallidurans* CH34, *Stenotrophomonas maltophilia* R551-2, *D. acidovorans* SPH-1 und *Burkholderia cenocepacia* HI2424) über die Gene dieses Locus, wobei sich deren genetische Organisation unterscheidet (Abb. 30) (Reith *et al.*, 2006; Checa und Soncini, 2011).

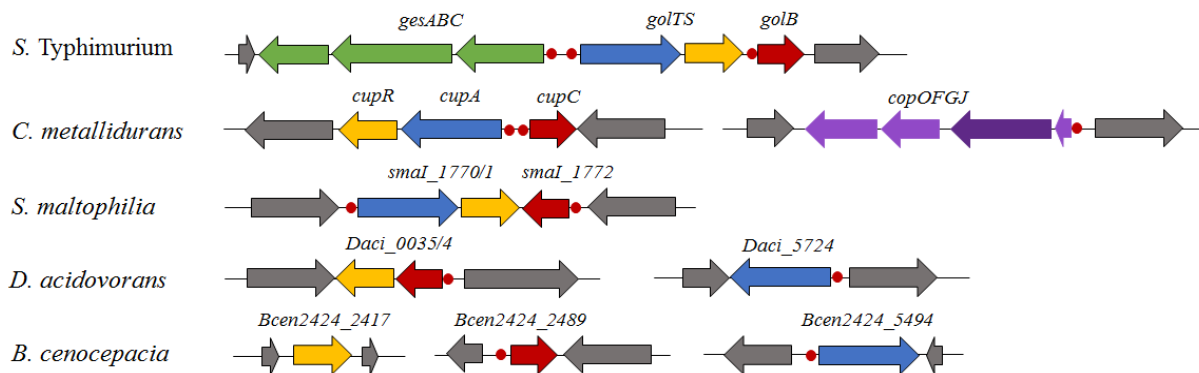


Abb. 30: Schematische Darstellung der genetischen Organisation *gol*-ähnlicher Loci in verschiedenen Organismen. Die Gene, die für den Goldsensor, der P-Typ ATPase und dem Chaperon kodieren, sind in gelb, blau und rot dargestellt. Das *gesABC*-System wurde in grün hervorgehoben. Gene, die unter der putativen Regulation des Transkriptionsregulators stehen könnten, sind in verschiedenen Violetttönen markiert und befinden sich in *C. metallidurans* auf dem Plasmid pMOL30 (Perez Audero *et al.*, 2010). Dabei kodiert *copF* für eine Cu(I)-P-Typ ATPase (Mergeay *et al.*, 2003), während die Funktionen der anderen drei Gene unbekannt sind (Monchy *et al.*, 2006). Die roten Kreise stellen die postulierten Operatorsequenzen des Regulators dar (modifiziert nach Checa & Soncini, 2011).

Salmonella besitzt zwei homologe Transkriptionsregulatoren CueR und GolS (Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz: 42 %), die für die Detektion und Resistenz der Cu(I)- und Au(I)-ionen verantwortlich sind (Checa *et al.*, 2007; Espariz *et al.*, 2007; Pontel *et al.*, 2007; Pontel und Soncini, 2009; Perez Audero *et al.*, 2010). Nur in Abwesenheit des anderen Regulators können die Regulatoren die Zielbindestellen des jeweils anderen erkennen (Perez Audero *et al.*, 2010). GolS aus *S. enterica* sv. Typhimurium und CupR aus *C. metallidurans* besitzen dabei die typische DNA-Bindungsdomäne an ihren N-terminalen Regionen sowie die Signatur der MerR-

Regulatoren, die monovalente Metallionen (Cu(I), Ag(I)) binden, wie z.B. das S-X₂-V-K Motif in der Dimerisierungshelix und das C-X-G-X₄_D-C-P Motif, das den C-terminalen Loop bildet (Changela *et al.*, 2003). Ein Alignment des Metallbindeloops der Transkriptionsregulatoren CueR (*E. coli*), CueR und GolS (*S. enterica* sv. Typhimurium), sowie CupR (*C. metallidurans*) zeigt, dass alle vier Regulatoren die konservierten Cysteine 112 und 120 besitzen (Jian *et al.*, 2009), die für die Aktivierung der Transkriptionsregulatoren durch Gold-, Silber- und Kupfersalze verantwortlich sind (Tab. 13) (Changela *et al.*, 2003; Stoyanov und Brown, 2003a). GolS zeigt jedoch eine größere Präferenz für das größere Au(I)-ion als für die Cu(I)- und Ag(I)-ionen (Affinitätskonstanten: Au 0,2 µM, Cu 10,4 µM) (Checa *et al.*, 2007; Ibanez *et al.*, 2013). CueR aus *E. coli* bindet hingegen mit ähnlichen Affinitäten Cu(I), Ag(I) und Au(I) (Affinitätskonstanten: Au 2,1 µM, Cu 2,4 µM) und induziert so die Expression der Gene, die für die P-Typ ATPase CopA und die MKO CueO kodieren (Changela *et al.*, 2003; Stoyanov und Brown, 2003a; Stoyanov *et al.*, 2003b). Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für CupR aus *C. metallidurans* ergab, dass dieser Regulator wie auch GolS affiner für Au(I)-ionen als für Cu(I)-ionen ist. (Jian *et al.*, 2009). Ausgehend von diesen Beobachtungen wird postuliert, dass spezifische Reste für die Metallpräferenz von großer Bedeutung sind (Tab. 13). So verfügen GolS sowie die Homologen unter anderem aus den Organismen der goldhaltigen Standorte über ein konserviertes Prolin an Position 118, während sich vorwiegend ein Alanin an dieser Position in CueR aus *E. coli*, *S. enterica* sv. Typhimurium und CueR-ähnlichen Proteinen befindet (Checa *et al.*, 2007; Checa und Soncini, 2011; Ibanez *et al.*, 2013). Hingegen besitzen CueR-ähnliche Proteine an Position 113 ein Prolinrest, der in den Regulatoren GolS und CupR fehlt und stattdessen hier mit einem Alanin- oder Threoninrest substituiert ist (Checa *et al.*, 2007; Checa und Soncini, 2011; Ibanez *et al.*, 2013). Der Prolinrest an Position 113 begünstigt dabei die Erkennung von Cu(I)-ionen, während das Prolin 118 für diesen Erkennungsmechanismus nicht relevant zu sein scheint (Ibanez *et al.*, 2013). So haben Substitutionsanalysen des Metallbindeloops von GolS mit der CueR-Sequenz aus *E. coli* (von I109 bis C120) gezeigt, dass *golB* unter diesen Bedingungen gleichermaßen durch Gold als auch durch Kupfer exprimiert werden kann (Checa *et al.*, 2007). Desweiteren verfügt GolS über eine größere C-terminale Region, die für die Metallpräferenz jedoch nicht entscheidend ist und es fehlt das CHH-Motif im Metallbindeloop, dass die Bindung der Goldionen in der MKO CueR aus *E. coli* beeinflusst (Stoyanov und Brown, 2003a; Perez Audero *et al.*, 2010). Ein CHH-Motif ist auch in der Sequenz von CupR zu finden, dessen Funktion jedoch unklar ist (Perez Audero *et al.*, 2010).

Tab. 13: Die Aminosäurereste der Metallbindeschleife sind innerhalb der GoLS und CueR-ähnlichen Proteingruppen hochkonserviert (modifiziert nach Checa *et al.*, 2007; Perez Audero *et al.*, 2010; Humbert *et al.*, 2013; Ibanez *et al.*, 2013).

GoLS-ähnliche/CueR-ähnliche Proteine	NCBI Referenzsequenz	Bakterienspezies	Sequenz der Metallbindeschleife C112-C120
GoLS-ähnliche Proteine			
GoLS (STM0354)	NP_459349.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2	CAGDALPDC
CupR Rmet_3523	YP_585664.1	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	CTIGDDRRPDC
Daci_0034	YP_001561066.1	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	CHGDDRRPDC
Smal_1771	YP_002028158.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	CAGDERPEC
Bcen2424_2217	ABK08968.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	CHGDDGRPEC
XCV2335	YP_364066.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria str. 85-10	CAGDDRRPDC
Ajs_1373	YP_985666.1	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	CAGDDRRPDC
Sputw3181_1120	YP_962523.1	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1:	CAGNEKPDC
Sputw3181_1111	YP_962515.1	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1:	CAGDERSEC
Meso_3892	YP_676424.1	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	CSGDNRPDC
PA4778	NP_253466.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	CQGDHRPDC
CueR-ähnliche Proteine			
CueR (Y75_p0474)	YP_488778.1	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110	CPGDDSDADC
CueR (STM0499)	NP_459494.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2	CPGDDSDADC
CKO_02653	YP_001454197.1	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	CPGDDSDADC
ECA1194	YP_049300.1	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	CPGDGGSEC
plu3823	NP_931027.1	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. Laumondii TTO1	CPGDDGGAAC
CueR (VC0974)	NP_230621.1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor str. N16961	CPGDQGSDC
CueR (y1094)	NP_668421.1	<i>Yersinia pestis</i> KIM10+	CPGDEGADC
YPTB1023	YP_069563.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	CPGDEGADC
CueR (SMWW4_v1c11050)	YP_007404928.1	<i>Serratia marcescens</i> WW4	CPGDEGAEC

Die Induktion der Expression des *gol*-Locus von *S. enterica* sv. Typhimurium ist im LB-Medium wesentlich höher als die des *cup*-Locus von *C. metallidurans* im Tris-MM. Eine maximale Induktion der Expression des Reportergens von *golB* wurde nach Inkubation mit 12 μM AuHCl_4 beobachtet (160-fache Erhöhung), im Vergleich zu einer 8-fachen Erhöhung bei 18 μM CuSO_4 und einer 9-fachen Erhöhung bei 6 μM AgNO_3 (Checa *et al.*, 2007). Die Expression von *golT* wurde durch die GolS-abhängige Induktion bei 10 μM AuHCl_4 um das 10-fache erhöht, während keine nennenswerte Induktion in Gegenwart von Cu(II)-ionen bestimmt werden konnte (Checa *et al.*, 2007). Dies ist auf ein weiteres Gencluster zurückzuführen, das eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase spielt und unter der Kontrolle des Kupfer sensierenden CueR-Regulators steht. Es kodiert für die P-Typ ATPase CopA und die CueO-orthologe MKO CuiD (Espariz *et al.*, 2007). Die transkriptionelle Aktivierung des *gesABC*-Operons unterschied sich von den anderen beiden GolS-kontrollierten transkriptionellen Einheiten dahingehend, dass deutlich höhere Goldkonzentrationen für die Aktivierung erforderlich waren und das System nicht durch Kupfer exprimiert werden konnte (Pontel *et al.*, 2007; Perez Audero *et al.*, 2010; Checa und Soncini, 2011).

CupR aktiviert die Expression von *cupA* und *cupC* nach Zugabe von Gold, Kupfer und Silber, wobei auch in diesem Organismus *cupC* die stärkste Induktion in Microarray-Analysen und der Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit AuHCl_4 zeigte (Reith *et al.*, 2009, Wiesemann *et al.*, 2013). Es konnte eine 19,8-fache Induktion mit 50 μM AuHCl_4 , eine 3,5-fache Induktion mit 500 μM CuCl_2 und eine 9,2-fache Induktion mit 1 μM AgNO_3 bestimmt werden. Die maximale Induktion der Expression des Reportergens von *cupA* erhöhte sich um das 10,7-fache bei 50 μM AuHCl_4 und war vergleichbar mit der 9,2-fachen Induktionserhöhung bei 1 μM AgNO_3 . Im Gegensatz zum *golT* aus *S. enterica* sv. Typhimurium konnte auch eine 3,1-fache Erhöhung der Induktion bei 500 μM CuCl_2 ermittelt werden (Wiesemann *et al.*, 2013). Neben der Aktivierung des *cup*-Locus auf Chromosom 1 wird ausgehend von *in silico* Analysen eine CupR-Operatorsequenz *upstream* des *copOFGJ*-Operons auf pMOL30 postuliert (Abb. 30) (Perez Audero *et al.*, 2010), das Teil eines großen Kupferresistenzcluster ist (Monchy *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2009). Diese Operatorsequenz ist weniger konserviert, weshalb Perez-Audero *et al.*, (2010) dem System erst bei längerer Goldexposition eine direkte Funktion zuordnen, ähnlich dem GesABC-System aus *S. enterica* sv. Typhimurium. Bestätigung findet dies in den Microarray-Analysen, in denen das System seine stärkste Induktion nach längerer Goldexposition zeigte (Reith *et al.*, 2009). Diese Hypothese kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch ausgeschlossen werden, da den Plasmiden keine direkte Beteiligung an der

Goldresistenz (Abb. 4, Tab. 4) oder der Goldbiomineralisierung (Abb. 5) zugeordnet werden kann.

Trotz der Expression der Gene, die für die P-Typ ATPase CupA oder dem Metallchaperon CupC kodieren, konnte kein Einfluss des Systems auf die Goldresistenz (Tab. 6) oder die Synthese der Nanopartikel (Daten nicht aufgeführt) gezeigt werden. Die P-Typ ATPase CupA trägt nur zur cytoplasmatischen Detoxifizierung der Kupferionen bei, wie die Wachstumsendpunktbestimmungen (Tab. 6) und die *in-vitro*-Studien bestätigten (Abb. 17). Die Zugabe von CuCl₂ zu den mit dem Reduktionsmittel DTT behandelten Liposomen mit inkorporiertem CupA führte dabei zu einem linearen Anstieg an freigesetztem Phosphat, der durch die Transport-vermittelte ATP-Dephosphorylierung entsteht (Rensing *et al.*, 1999). Es konnte eine *turn-over* Zahl pro transportierten Metallion von 0,0314 s⁻¹ bestimmt werden, die vergleichbar ist zu denen der Zn- und Cd-exportierenden Proteine ZntA, PbrA und CadA aus diesem Bakterium (Scherer und Nies, 2009). Dagegen konnte mit 100 µM AuHCl₄ kein Anstieg an anorganischem Phosphat kolorimetrisch detektiert werden. Desweiteren führte die Deletion des *cup*-Systems auch nur zu einem minimal signifikant höheren Goldgehalt der Zelle (AE104: $50 \pm 07 \times 10^3$ Goldatome/Zelle und DN656($\Delta cupCAR$): $63 \pm 01 \times 10^3$ Goldatome/Zelle), was die Tatsache untermauert, dass dieses System kein direktes goldspezifisches Transportsystem in *C. metallidurans* ist.

Für CopA aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Promotor von CopA durch Goldchlorid zwar reguliert wird, jedoch die cytoplasmatische Regulation nicht durch die Deletion der P-Typ ATPase verändert wird, was auch auf den fehlenden Efflux der Goldionen durch CopA zurückgeführt wird (Stoyanov und Brown, 2003a; Stoyanov *et al.*, 2003b).

Das GolSTB-System trägt hingegen nur bei Fehlen der P-Typ ATPase CopA zur Kupferresistenz bei. So können GolT und GolB bei Fehlen der Cu(I)-translozierenden P-Typ ATPase CopA oder des *copA*-Aktivators CueR zur Cu(I)-resistenz beitragen (Checa *et al.*, 2007; Espariz *et al.*, 2007; Checa und Soncini, 2011). Analog dazu kann CopA, als präferierter Cu(I)-Transporter, auch zum Goldefflux in *Salmonella* beitragen, jedoch nur bei sehr hohen Goldkonzentrationen (Checa *et al.*, 2007; Checa und Soncini, 2011). Die Deletion einer der Komponenten des *gol*-Locus beeinflusst maßgebend das Überleben in Gegenwart von Goldionen und führt zur Reduzierung der Goldresistenz (Checa *et al.*, 2007; Pontel *et al.*, 2007). Die Überlebensrate der Deletionsmutante des gesamten *gol*-Locus sinkt bei Zugabe von 40 µM AuHCl₄ um 80 % (Checa *et al.*, 2007). Diese Beobachtung konnte nur im LB-Kultivierungsmedium von Checa *et al.*, (2007) dokumentiert werden. Osman *et al.*, (2010) konnten hingegen diesen Resistenzverlust sowohl in LB-Medium als auch in M9-MM nicht

bestätigen, obwohl sie die goldabhängige Expression der Promotor-*lacZ*-Konstrukte von *copA* und *golTS* auch zeigen konnten. Die Deletionen von *golT* wie auch *copA* führten in dieser Studie zur Reduktion der Kupferresistenz und des zellulären Kupfergehaltes, hatten jedoch wie CupA aus *C. metallidurans* keine Auswirkung auf die Goldtoleranz oder die Goldakkumulation in der Zelle (Osman *et al.*, 2010). Als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse wird die Verwendung verschiedener *Salmonella*-Stämme aufgeführt, *S. enterica* sv. Typhimurium 14028s (Checa *et al.*, 2007) und SL1344 (Osman *et al.*, 2010).

Eine abschließende Frage bleibt dennoch. Warum sollte *S. enterica* sv. Typhimurium evolutionär ein System zur Gold-Detoxifizierung entwickelt haben, wo doch die Existenz des Organismus in keiner direkten Verbindung mit goldhaltigen Standorten gebracht werden kann.

4.2 *C. metallidurans* und sein Vorkommen an goldhaltigen Standorten

Die Vielfalt an Schwermetallresistenzmechanismen zeichnet *C. metallidurans* als Modellorganismus aus (von Rozycki und Nies, 2009). Die Entfernung von überschüssigen Metallionen scheint über zwei Stufen zu erfolgen. In der einen Stufe werden Metallkationen durch P-Typ ATPasen und CDF-Proteine aus dem Cytoplasma über die innere Membran ins Periplasma transportiert. RND-Proteine stellen hingegen die andere Stufe der Entgiftung dar und transportieren die Metalle aus dem Periplasma in den extrazellulären Raum (Tseng *et al.*, 1999; Thieme *et al.*, 2008). Diese Transportmechanismen sind in *C. metallidurans* auf den beiden Chromosomen oder den Megaplasmiden pMOL28 und pMOL30 kodiert (von Rozycki und Nies, 2009; Janssen *et al.*, 2010).

P-Typ ATPasen sind in der Lage diverse Kationen wie Cu(I), Cu(II), Ag(I), Zn(II), Pb(II) und Cd(II) aus dem Cytoplasma über die innere Membran ins Periplasma zu transportieren. Sie sind nach der Definition Kationen-exportierende Systeme und stellen eine grundlegende Abwehr gegen toxische Schwermetallkonzentrationen (Fagan und Saier, 1994). Zn(II) und Cd(II) werden in *C. metallidurans* durch die P-Typ ATPasen ZntA und CadA transloziert, wobei ZntA auf dem Chromosom 2 und CadA auf dem Chromosom 1 kodiert sind (Legatzki *et al.*, 2003). Auf dem Megaplasmid pMOL30 sind die Gene zweier weiterer P-Typ ATPasen lokalisiert, die am Efflux von Zn(II), Pb(II) und Cd(II) (CzcP und PbrA) beteiligt sind (Scherer und Nies, 2009; Taghavi *et al.*, 2009).

Eine weitere Familie membrangebundener Transportproteine ist die der CDF-Proteine (*cationen diffusion facilitator*) (Nies, 2003), die über einen Protonen- oder Kaliumgradienten (chemoosmotischen Gradienten) divalente Kationen wie Zn(II), Cd(II), Ni(II) und Co(II) aus

dem Cytoplasma transportieren (Paulsen und Saier, 1997; Anton *et al.*, 1999; Munkelt *et al.*, 2004). Vertreter dieser Proteine sind CzcD, DmeF (für *divalent metal efflux*) und FieF (für *ferrous iron efflux*) in *C. metallidurans* (von Rozycki und Nies, 2009). Auf dem Megaplasmid pMOL30 ist *czcD* kodiert, das an der Regulation des RND-Systems CzcCBA beteiligt ist (Nies, 1992; Legatzki *et al.*, 2003; Grosse *et al.*, 2004). Es ist für den Export an Co(II), Zn(II) oder Cd(II) verantwortlich (Anton *et al.*, 1999; Anton *et al.*, 2004). Die Gene *fieF* und *dmeF* sind hingegen auf dem Chromosom kodiert. Beide Proteine zeigen dasselbe Substratspektrum für Co(II), Ni(II), Zn(II) und Cd(II). Dabei spielt DmeF die zentrale Rolle in der Co(II)-Homöostase in *C. metallidurans* (Munkelt *et al.*, 2004; Scherer und Nies, 2009). Eine Disruption führte zur funktionellen Inaktivierung der Resistenzsysteme Czc (Co/Zn/Cd) (Nies *et al.*, 1987) bzw. Cnr (Co/Ni) (Liesegang *et al.*, 1993). Das ist bisher der eindeutigste Beweis dafür, dass RND-Transporter der HME (*heavy metal efflux*) Familie (Tseng *et al.*, 1999) ihr Substrat aus dem Periplasma beziehen und so das Kompartiment entgiften können. Die wichtigsten Gene, die für RND-Proteine kodieren, befinden sich in *C. metallidurans* auf den Megaplasmiden pMOL28 (*cnr*) (Siddiqui *et al.*, 1988; Siddiqui *et al.*, 1989; Liesegang *et al.*, 1993; Grass *et al.*, 2000; Marx und Lidstrom, 2002) und pMOL30 (*czc*) (Nies *et al.*, 1987; Nies und Silver, 1989b) und tragen wesentlich am Efflux von Nickel, Cobalt, Zink und Cadmium aus dem Periplasma bei.

Nach der Entdeckung von Biofilmen auf Goldnuggets und der Analyse deren 16S rDNA stand fest, dass sich *C. metallidurans* auf jedem Nugget befand, jedoch nicht im umgebenden Boden identifiziert werden konnte (Reith *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2012). Bis heute ist der dort vorkommende Stamm nicht isoliert worden. Mittels Rasterelektronenmikroskopie und EDX-Analyse konnte die Präzipitation metallischen Goldes in CH34-Zellen nachgewiesen werden (Reith *et al.*, 2009). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die beiden Plasmide mit den dort lokalisierten Resistenzsystemen nicht für die Resistenz gegen AuHCl₄ oder Au(S₂O₃)₂ oder die Biomineralisierung von Gold nach Inkubation mit AuHCl₄ benötigt werden. Es stellt sich daher die Frage, in wieweit der Organismus auf die beiden Plasmide an den goldhaltigen, ökologischen Nischen in Australien angewiesen sein könnte. In Reith *et al.*, 2012 wurde eine Analyse des Metallgehaltes an vier australischen Goldminen (Tomakin Park, Wildcate, Humpback und Old Pirate) vorgenommen. Dabei konnte eine Korrelation zwischen den Goldvorkommen und erhöhten Konzentrationen an Ag(I), Co(II), Cu(II), Cr(II), Hg(II), Ni(II), Pb(II) und Zn(II) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt, unveröffentlicht). Um das Maß der Toxizität der Metalle für Organismen an diesen Standorten anzugeben, ist das Verhältnis der ICP-MS bzw. ICP-OES ermittelten maximalen Metallgehalte (Reith *et al.*, 2012) zu den

publizierten MIC-Werten von *E. coli* (s. Anhang Tab. 15), als nicht Schwermetallresistentes Bakterium, von CH34 oder zur MIC des plasmidfreien Derivates AE104 bestimmt worden (s. Anhang Tab. 14.1 und Tab. 14.2). In dieser theoretischen Kalkulation wird davon ausgegangen, dass die Metallgehalte der Proben auch in diesen Konzentrationen im festen Tris-MM bioverfügbar sind. Die theoretischen Werte (Max/MIC) sind dabei höher als die MIC von *E. coli* für Ni(II), Cu(II) und Zn(II). Die entsprechende Kalkulation für CH34 und AE104 ergab, dass der plasmidfreie Stamm die dort vorkommenden Nickel- und Zinkkonzentrationen nicht tolerieren kann. Die Silberkonzentrationen liegen hingegen für beide Stämme oberhalb der tolerierbaren Resistenzgrenzen. Das Vorkommen erhöhter Konzentrationen an Ni(II), Co(II) bzw. Cr(II) in der Old Pirate Goldmine begründet die Notwendigkeit des Plasmides pMOL28 beispielsweise mit dem Cnr-System, wohingegen die pMOL30-lokalisierten Resistenzsysteme (z.B. Czc-System, CzcP) für ein Vorkommen an den drei anderen Goldminen essentiell zu sein scheinen, um die erhöhten Konzentrationen an Zn(II) zu tolerieren (s. Anhang Tab. 16). Die beiden Plasmide werden daher für die Detoxifizierung der erhöhten Schwermetallkonzentrationen an den goldhaltigen Standorten benötigt.

Auch *D. acidovorans*, der neben *C. metallidurans* vorherrschend auf den Goldnuggets identifiziert werden konnte, verfügt über die Resistenzsysteme, die ein Überleben an solchen Standorten ermöglichen (Van Houdt *et al.*, 2009). So enthält das Genom alle akzessorischen Gene für die Metallresistenz, bestehend aus Resistenzclustern für Cu, Cu(I)/Ag(I), Cd/Pb, Co/Ni, Co/Zn/Cd, Hg und As. Die Cluster *silABCDR*, *pbrRcadApbrC*, *merRTPA* und *arsRIC2BC1H* werden durch das *parAB*-cluster und dem *int*-Gen flankiert und haben die entsprechenden Gegenpartner in CH34 (*sil* auf pMOL30, *pbr*, *mer* und *ars* auf dem Chromosom). Die 10 *cop*-Gene (*copK*, *copDC*, *copGFO* und *copBARS*) zeigen eine enge Verwandtschaft zu den chromosomalen *cop*-Genen von *C. metallidurans*, während andere den auf dem Plasmid pMOL30 kodierenden *cop*-Genen ähnlich sind (Van Houdt *et al.*, 2009).

4.3 Indirekter Weg der Metallentgiftung in *C. metallidurans*

Aufgrund des Vorkommens erhöhter Konzentrationen anderer Metalle an den goldhaltigen Standorten scheint eine Zusammenarbeit der Schwermetallresistenzsysteme an der Golddetoxifizierung möglich zu sein (Reith *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013). Gestützt wird diese Hypothese durch frühere Arbeiten von Reith *et al.*, (2009), die gezeigt haben, dass Au(III)-Komplexe durch *C. metallidurans*-Zellen aufgenommen und zu Au(I) reduziert werden, was mit einer Hochregulation von Genen einhergeht, die an der

Quecksilberresistenz, der Kupferhomöostase und dem oxidativen Stress beteiligt sind (Reith *et al.*, 2009). Da *C. metallidurans* auch Au(I)-Komplexen in der Umgebung ausgesetzt ist, wurde in Wiesemann *et al.*, (2013) der Einfluss von Au(I)-cyanid, Au(I)-thiosulfat und Au(I)-thiomalat auf das globale Transkriptom untersucht (Wiesemann *et al.*, 2013). Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation von Genen, die spezifisch für den Umgang mit Au(I)-Komplexen sind, im Gegensatz zu denen die für die Akkumulation des Au(III)-Komplexes und/oder der Reduktion von Au(III) zu Au(I) benötigt werden (Reith *et al.*, 2009). Dabei führte die Inkubation mit Au(I)-cyanid und Au(I)-thiomalat zu der Hochregulation von Genen, die bereits durch den Au(III)-Komplex analysiert werden konnten.

In Wachstumsendpunktbestimmungen zeigt Goldthiosulfat eine geringere Toxizität als AuHCl₄ (Abb. 4B). Dies könnte damit begründet werden, dass Au(S₂O₃)₂ nicht so effektiv von der Zelle aufgenommen wird und daher auch nicht so hohe Induktionsraten verursacht, wie AuHCl₄. Dies konnte am Beispiel der Induktion der *cup*-Komponenten gezeigt werden (Wiesemann *et al.*, 2013). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit der Goldionen hatte die Inkubation mit Au(I)-thiosulfat daher nur minimale Auswirkungen auf die Genregulation.

Die Intensitäten der Antwort waren unter Au(III)-chlorid und Au(I)-cyanid höher, wobei CN⁻ auch falsch negative Transkriptomantworten bewirkte (Wiesemann *et al.*, 2013). Letztlich verdeutlichten die Microarray-Analysen, dass AuHCl₄ der geeignete Goldkomplex war, um die Interaktion der Goldkomponenten auf die Zellen von *C. metallidurans* zu untersuchen, und die Au(III)-induzierten Gene im Hinblick auf mögliche Goldtransport- und Goldmodifikationssysteme zu analysieren.

Unter anderem wurden eine Reihe von Genen auf dem Chromosom und dem Plasmid pMOL30 hochreguliert, die vorwiegend für die Kupferhomöostase benötigt werden (Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu Gold ist Kupfer in den Oberflächenumgebungen abundant und zeigt eine hohe chemische Solubilität, Mobilität und Bioverfügbarkeit (Emsley, 1989; Kabata-Pendias, 2011). Die durchschnittliche Konzentration von Kupfer im Boden liegt bei 25 µg/g, wohingegen die Goldkonzentrationen nur einige ng/g betragen. In den goldhaltigen ökologischen Nischen in Australien, wo die Goldnuggets und die Biofilmpopulationen charakterisiert worden sind, konnte auch immer Kupfer als begleitendes Schwermetall detektiert werden. Dabei variierte das Verhältnis von Kupfer zu Gold in Lösung zwischen 35 und 9000 (Reith *et al.*, 2012; Reith *et al.*, 2013) (Abb. 31).

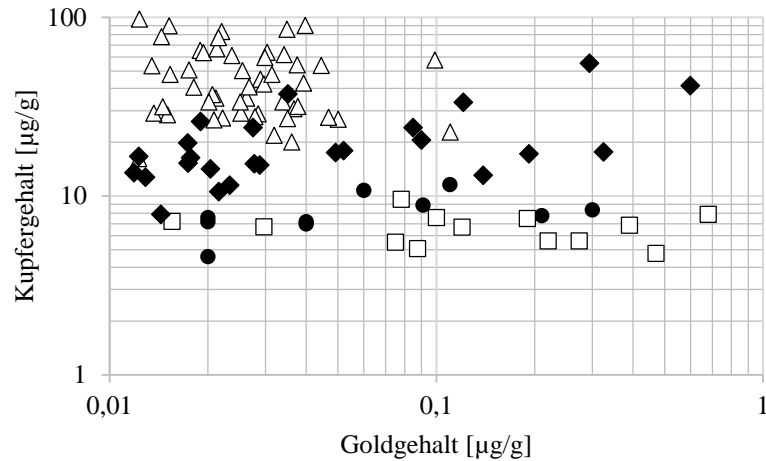


Abb. 31: Gold und Kupfergehalt in der Umgebung der Goldminen in Australien (Reith *et al.*, 2012). Der Goldgehalt wurde gegen den Kupfergehalt der Bodenproben aufgetragen, die an vier goldhaltigen Standorten entnommen wurden. Old Pirate (●), Tomakin Park (□), Wildcate (△) und Humpback (◆). Die Detektionsgrenze für Gold liegt bei 0,01 µg/g. Am Standort Wildcate konnten eher geringe Goldgehalte (bis zu 0,11 µg/g) und sehr hohe Kupfergehalte (16,24-105,88 µg/g) bestimmt werden. Am Tomakin Park waren hingegen die Goldgehalte mit bis zu 1,1 µg/g eher hoch und vergleichbar niedrige Kupfergehalte mit bis zu 9,6 µg/g. Die Humpback Proben zeigten eine ähnliche Korrelation des Kupfergehaltes zum Goldgehalt, während die Old Pirate Proben sehr stark im Goldgehalt variierten und der Kupfergehalt eher gering war.

In Gebieten, in denen Goldkonzentrationen bis 2 µg/g Gold detektiert werden konnten, enthielten die Lösungen auch mehrere Hundert µg/g Kupfer im Boden, als Beispiele seien hier die Pouyazarkan Goldminen von Aghadare von Takab (Moghadami, 2013) und die Batu Hijau Kupfer-Goldmine auf der Insel Sumbawa in Indonesien zu nennen (Angel *et al.*, 2013). Daher konnte vermutet werden, dass das mobile Kupfer einen wesentlich höheren Beitrag zur Toxizität leistet als das mobile Gold. Denn die Solubilität und Bioverfügbarkeit von Gold in der Natur ist so gering, dass toxische Goldkonzentrationen sehr selten detektiert werden können (Kabata-Pendias, 2011). Die evolutionäre Entwicklung genetischer Goldresistenzsysteme scheinen daher energetisch ungünstiger zu sein, was sich in den Inkubationsexperimenten für *C. metallidurans* bestätigen lässt. Während sowohl für Kupfer als auch für Kobalt die Resistenzen durch eine Vorinkubation gesteigert werden konnten (Abb. 9A-B, s. Anhang Abb. 40A-B), führte eine Goldvorinkubation zu keinerlei Resistenzunterschieden und untermauert die These der fehlenden Existenz von spezifischen Goldsystemen (Abb. 10A-B). Dass das Gold aber tatsächlich in die Zelle gelangt und Resistenzsysteme induzieren könnte, haben Reith *et al.*, (2009) mit dem XANES Spektrum, den Synchrotron Daten und der Microarray-Analyse gezeigt. Die Lokalisation der Nanopartikel im Periplasma (Abb. 6, Abb. 7, s. Anhang Abb. 37) und dem Cytoplasma (s. Anhang Abb. 36) sowie die CupR-abhängige Expression der *cupA-lacZ*-Reporterfusion durch AuHCl₄ (Abb. 25) bestätigen desweiter den Goldeintritt in die Zelle. Es muss jedoch Systeme geben, die der weiteren unbegrenzten Aufnahme der Goldionen

entgegenwirken, wie z.B. das RND-System *CusCFBA*, dessen Beteiligung unter 4.3.1 erörtert wird.

Eine Vorinkubation von CH34 mit Kobalt führte zu einer deutlichen Resistenzsteigerung, die vorwiegend auf die plasmidkodierte RND-Systeme *Czc* (Co/Zn/Cd) und *Cnr* (Ni/Co) zurückgeführt werden kann. Die minimale Steigerung der Kobaltresistenz in AE104 kann mit der Expression möglicher Kobalt-transportierender ABC-Transporter begründet werden (Mikolay und Nies, 2009) und ist weniger auf die chromosomal kodierenden CDF-Proteine *FieF* und *DmeF* zurückzuführen, deren Transkriptionen in *C. metallidurans* konstitutiv auf niedrigem Niveau erfolgen (Munkelt *et al.*, 2004). Die permanente Anwesenheit der CDF-Proteine hat sich dabei als vorteilhaft in Umgebungen mit erhöhten Schwermetallen bewährt, während in nicht schwermetallresistenten Bakterien, wie *E. coli*, die Expression von *fieF* metallabhängig durch Zink und Eisen (Grass *et al.*, 2005b) oder *zitB* durch Zink induziert wird (Grass *et al.*, 2001a). Bei Kupfer zeigte sich hingegen der Vorteil eines ausgedehnten *cop*-Clusters auf pMOL30 erst bei Vorinkubation mit einer höherer Kupferkonzentration von 200 μM , die zu deutlichen Resistenzunterschieden führte (Abb. 9A-B). Diese Resistenzsteigerung in beiden Stämmen kann auf die Cu(I)-P-Typ ATPase *CupA* zurückgeführt werden, vergleicht man die IC_{50} -Werte von CuCl_2 der Deletionsmutanten DN656(AE104 ΔcupCAR), DN729(AE104 $\Delta\text{cusCFBA}$) und DN686(AE104 $\Delta\text{copABCD}$) und berücksichtigt die Expression der Induktionen der Operon-*lacZ*-Fusionen durch CuCl_2 . Die Deletion des *cup*-Systems sowie des *copABCD*-Systems führten zur Reduktion der Kupferresistenz (DN656(ΔcupCAR): $\text{IC}_{50}=406 \pm 44,7 \mu\text{M}$; DN686($\Delta\text{copABCD}$): $\text{IC}_{50}=683 \pm 66,2 \mu\text{M}$), wobei jedoch nur die *lacZ*-Reportergenfusion des *cup*-Systems durch CuCl_2 induziert werden konnte. Die Deletion des *cus*-System hatte hingegen keine Auswirkung auf das Resistenzverhalten gegen Kupfer und es konnte ein vergleichbarer IC_{50} -Wert zum Wildtypstamm AE104 bestimmt werden (AE104: $\text{IC}_{50}=1148 \pm 75,2 \mu\text{M}$; DN729($\Delta\text{cusCFBA}$): $\text{IC}_{50}=111 \pm 42,5 \mu\text{M}$). Die Operon-*lacZ*-Fusion dieses System konnte jedoch durch CuCl_2 induziert werden.

Lediglich die Vorinkubation mit Kupfer zeigte eine Beeinflussung der Goldresistenz, die unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen (10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM) (Tab 7 und Tab. 8) und dem Stamm war (Abb. 9C/D). Damit einhergehend nahm unter den Wachstumsbedingungen für die Metallgehalt-Analyse der Goldgehalt in CH34 um 30 % und in AE104 um 50 % zu. Interessanterweise sind die Kupfergehalte in CH34 deutlich geringer als in AE104, was mit der erhöhten Pufferkapazität und den zusätzlichen Resistenzsystemen für die cytoplasmatische und periplasmatische Detoxifizierung von Kupfer auf pMOL30 begründet werden kann (Monchy *et al.*, 2006). Der Goldgehalt ist hingegen zwischen den beiden Stämmen

vergleichbar, jedoch in AE104 mit der Kupfer-Inkubation in der Vorkultur oder der Hauptkultur wesentlich höher (mit Ausnahme der Kupfer-Vorinkubation der Au/Cu-inkubierten Zellen). Wurden die Experimente mit den Bedingungen an den goldhaltigen Standorten durchgeführt, wo Gold auch immer mit Kupfer vorkommt, so führte dies zur maximalen Reduktion der Gold- und Kupferresistenz, wobei die Goldresistenz durch eine zusätzliche Vorinkubation mit Kupfer gesteigert werden konnte, jedoch nicht das Resistenzniveau nicht-induzierter Zellen erreichte. Dies könnte für einen indirekten Weg der Metallentgiftung durch Kupferresistenzsysteme sprechen. Ein ähnlich sensitiver Phänotyp konnte nicht bei einer gleichzeitigen Inkubation von AE104 mit äquimolaren Toxizitätskonzentrationen an CoCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 und CdCl_2 beobachtet werden (persönliche Mitteilung Martin Herzberg). Die Zugabe beider Metalle steigerte dabei den Kupfer- und den Goldgehalt in CH34 um 50 % und 57 % und in AE104 um 40 % und 70 %, im Vergleich zu den Metallgehalten der AuHCl_4 oder CuCl_2 inkubierten Zellen. Diese Metallgehalte änderten sich auch nicht durch eine zusätzliche Vorinkubation mit Goldchlorid. Es stellte sich nun die Frage, wie die erhöhten Metallgehalte erklärt werden können. Dazu wurde die Blockierung des Kupfereffluxes am Beispiel der Kupfer-translozierenden P-Typ ATPase CupA untersucht. Die Inkubation mit $100 \mu\text{M AuHCl}_4$ verhinderte die Kupfer-abhängige ATPase-Aktivität von CupA, was die niedrige Kupfer- und Goldresistenz in Gegenwart des jeweils anderen Metalls sowie den erhöhten Kupfergehalt erklären könnte. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation von CuCl_2 mit CdCl_2 oder $\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2$, die keine Auswirkung auf den Anstieg an kolorimetrisch detektierbaren P_i hatten oder eine mögliche Präzipitation verursachte. Untersuchungen zum ATP-abhängigen $^{64}\text{Cu}(\text{I})$ -Transport von CopA in Membranvesikel haben gezeigt, dass die Zugabe von $\text{Ag}(\text{I})$ und radioaktivem Kupferisotop hingegen zu einer Präzipitation führte und eine Akkumulation von $^{64}\text{Cu}(\text{I})$ nicht gemessen werden konnte. Aus diesen Daten konnte jedoch nicht abgeleitet werden, ob die $\text{Ag}(\text{I})$ -ionen auch den $\text{Cu}(\text{I})$ -Transport von CopA inhibieren könnten. Da radioaktives $\text{Ag}(\text{I})$ kommerziell nicht verfügbar war, wurde der Transport der Silberionen nicht weiter untersucht. In einem unabhängigen Experiment wurde versucht den Metallgehalt der Proteoliposomen mittels ICP-MS zu bestimmen, um die gehemmte ATPase-Aktivität auf eine gestörte Translokation von Kupfer und damit einhergehend einem verringerten Kupfergehalt der Proteoliposomen zurückzuführen. Die Problematik bestand hierbei im Waschschriff mit einem Chelator, der sich nach dem Assay anschloss, um überschüssige Metallionen zu entfernen. Durch das erneute Ultrazentrifugieren und dem vorsichtigen Resuspendieren der Proteoliposomen kam es zum Platzen dieser, weshalb eine signifikante Bestimmung der Änderung des Kupfergehaltes in den Ansätzen nicht möglich war. Eine direkte

Transportmessung konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden, da radioaktive Kupferisotope mit einer Halbwertszeit unter 14 Tage in Deutschland nicht verfügbar sind.

Wo könnte das Gold in der Cu(I)-P-Typ ATPase gebunden haben? Eine typische CPx-Typ ATPase besteht aus acht transmembranen Helices (TMH) und zwei großen cytoplasmatischen Bereichen, dem β -loop zwischen den TMH IV und V und der großen cytoplasmatischen Domäne zwischen den TMH VI und VII mit der Phosphorylierungs- (P) und der Nukleotidbindenden-Domäne (N) (Abb. 32) (Rensing *et al.*, 1999; Argüello *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2010; Mattle *et al.*, 2013; Andersson *et al.*, 2014; Inesi *et al.*, 2014). Innerhalb der P-Domäne befindet sich die konservierte DKTGT-Sequenz, in der das Aspartat katalytisch phosphoryliert wird und so die transmembrane Translokation des Metalles ermöglicht (Argüello *et al.*, 2007). Die zwei hochaffinen transmembranen Metallbindestellen werden durch zwei Cysteinreste und ein Tyrosinrest (Metallbindestelle 1) sowie ein Asparagin, ein Methionin und ein Serin (Metallbindestelle 2) gebildet. Für das Enzym-*turnover* ist eine gleichzeitige Besetzung dieser Bindestellen erforderlich (Solioz und Vulpe, 1996; Argüello, 2003; Mandal und Argüello, 2003; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2008b). Für eine Reihe von Cu(I)-P-Typ ATPasen konnte gezeigt werden, dass sie neben Kupfer auch in der Lage sind Silber zu translozieren, wie der Cu(I)-P-Typ ATPase CopA aus *E. coli* (Fan und Rosen, 2002), CopA und CopB aus *A. fulgidus* (Mandal *et al.*, 2002; Argüello *et al.*, 2003; Mana-Capelli *et al.*, 2003) oder CopB aus *E. hirae* (Odermatt *et al.*, 1994; Solioz und Odermatt, 1995). Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Cu(I), Ag(I) und Au(I) wäre es denkbar, dass CopA auch Goldionen an diesen beiden Metallbinderegionen binden könnte, jedoch aufgrund des größeren Ionenradius die Translokation nicht möglich ist. Daneben verfügen die bakteriellen Cu(I)-ATPasen über mindestens eine cytosolische N-terminale Metallbindedomäne CxxC (Argüello, 2003), die das Level an cytoplasmatischen Cu(I) sensiert und durch eine Cu(I)-abhängige Interaktion mit der katalytisch löslichen Domäne die ATPase *turnover* Rate reguliert, ohne am direkten Metalltransport beteiligt zu sein (Fan *et al.*, 2001; Argüello *et al.*, 2007; Gonzalez-Guerrero und Argüello, 2008a; Boal und Rosenzweig, 2009; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2009; Robinson und Winge, 2010; Padilla-Benavides *et al.*, 2013; Inesi *et al.*, 2014). Eine Besetzung der Metallbindedomäne mit Gold könnte demnach auch die ATPase-Aktivität beeinflussen und daher den fehlenden Anstieg an detektierbaren anorganischen Phosphat erklären. Das CopA tatsächlich in der Lage ist Gold zu binden, zeigen erste Metallgehaltanalysen eines Metallinkubationsassays. Die Bestimmung erfolgte von dem gereinigten rekombinanten Protein, sowie dem erhaltenen Apoprotein nach EDTA-Waschen und nach der Metallinkubation unter reduzierenden Bedingungen mit AuHCl₄/CuCl₂ (Daten nicht gezeigt).

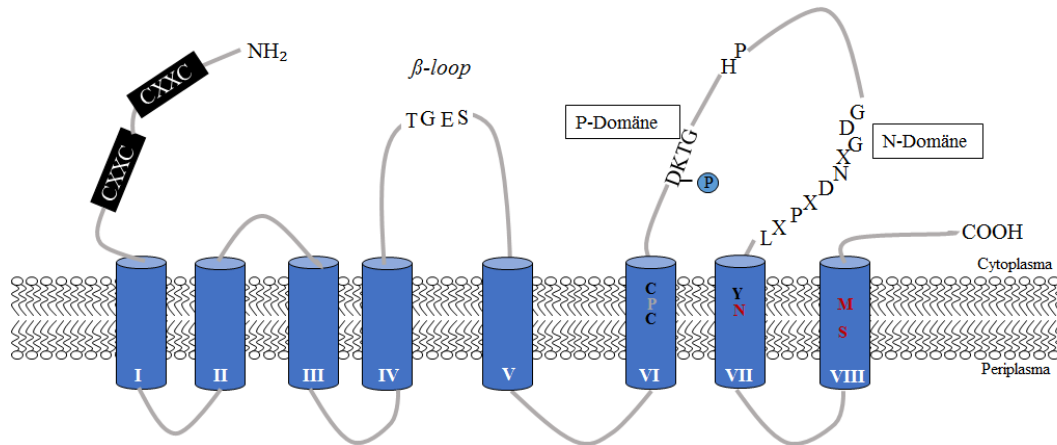


Abb. 32: Topologiemodell der Cpx-Typ ATPase CupA. Dargestellt ist das Modell der Cpx-ATPase CupA mit 8 transmembranen Helices (blaue Zylinder). Die N-terminalen Metallbindedomänen mit dem Bindemotiv CxxC, die beiden hochaffinen transmembranen Metallbindestellen (die Aminosäuren im Einbuchstabencode in schwarz und weiß dargestellt), die Phosphorylierungs-(P-) und Nukleotidbindedomäne (N-) sowie die konservierten Sequenzmotive wurden hervorgehoben. Das Prolin in der sechsten TMH zwischen den beiden Cysteinen der ersten Metallbindestelle von CupA ist in allen P-Typ ATPase konserviert (Argüello, 2003). \textcircled{P} kennzeichnet die Phosphorylierungsstelle des Proteins.

Neben CupA verfügt *C. metallidurans* über eine weitere Cu(I)-entgiftende P-Typ ATPase (CopF) und zwei anabolische P-Typ ATPasen (RdxI und CtpA1), die ebenfalls keinen Einfluss an der Goldresistenz zeigen und nur einen geringeren Beitrag zur Kupferhomöostase leisten (Tab. 6). Nur die Deletion des *cupCA* bzw. *cupCAR*-Systems führte in CH34 und AE104 zu einem kupfersensitiven Phänotyp. Die zusätzliche Deletion der P-Typ ATPase *rdxI* hatte im Stammhintergrund DN649(CH34 Δ *cupCAR*) keine weitere Auswirkung, während die Deletion der P-Typ ATPase *copF* den IC_{50} -Wert von Kupfer weiter um die Hälfte reduzierte. Im Stammhintergrund DN656(AE104 Δ *cupCAR*) verursachte hingegen bereits die zusätzliche Deletion der anabolischen P-Typ ATPase *rdxI* oder *ctpA1* eine Halbierung des IC_{50} -Wertes.

Nur CupA war in der Lage den kupfersensitiven Phänotyp der *copA*-Deletion in *E. coli* zu komplementieren, während die phylogenetisch weiter entfernt verwandten Cu(I)-P-Typ ATPasen CopF, RdxI und CtpA1 dazu nicht in der Lage waren (Steglich, 2012). Jedoch verdeutlichen die Metallgehaltanalysen mittels ICP-MS, dass die Deletion des *cup*-System nicht den Kupfergehalt verändert (Tab. 9). Demnach könnten die beiden anabolischen P-Typ ATPasen im Stamm AE104 auch die Detoxifizierung der Cu(I)-ionen aus dem Cytoplasma gewährleisten. Denkbar wäre jedoch auch ein gesteigerter Efflux aus dem Periplasma über das RND-System CusCFBA in DN656(Δ *cupCAR*).

Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft von *rdxI* und *ctpA1* zu FixI/CopA2-Proteinen (Abb. 33) und ihrer Lokalisation im Genom in Nachbarschaft zu Genen, die für die Biosynthese der Cytochrom *c*-Oxidase benötigt werden, liegt die Vermutung nahe, dass sie den Kupfer für

den Cofaktor der Oxidasen bereitstellen (Francis und Thomas, 1997; Roh und Kaplan, 2000; Hassani *et al.*, 2010). In einem begleitenden Praktikum wurde von Jeanine Rismondo untersucht inwieweit die anabolischen P-Typ ATPasen unter Stress hochreguliert werden. Um dies zu prüfen wurde die Expression der beiden ATPasen auf RNA-Ebene untersucht. Erste Ergebnisse hierzu zeigten, dass die Expression der P-Typ ATPasen nicht nach Inkubation mit Kupfer gesteigert werden konnte, was den geringen Beitrag an der Kupfertoleranz untermauert. Es ist nun nicht auszuschließen, dass auch die anderen P-Typ ATPasen in ihrer Funktion durch Goldchlorid gehemmt sind, was durch *in vitro*-Studien oder mittels eines Oxidase-Assay mit RdxI und CtpA1 untersucht werden könnte. Hierbei sollte die Hemmung dazu führen, dass Kupfer als Kofaktor für die Cytochrom-Untereinheit nicht mehr bereitgestellt wird, was sich in einer möglichen Defizienz der Oxidase-Aktivität widerspiegeln sollte.

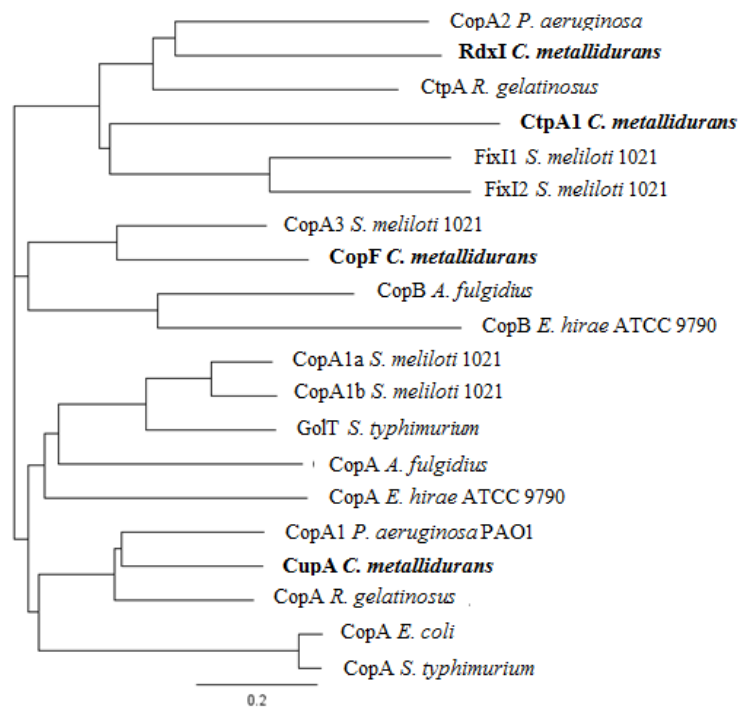


Abb. 33: Phylogenetischer Stammbaum der Kupfer-P-Typ ATPasen verschiedener Organismen. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit CLUSTALW untersucht und der Stammbaum mit dem Programm Geneious 8.0.5. erstellt. Es gibt eine Vielzahl von Organismen, die im Besitz mehrerer Kupfer-P-Typ ATPasen mit verschiedenen Funktionen sind (Chan *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2014). Der symbiotische Organismus *Sinorhizobium meliloti* enthält fünf homologe Kupfer-ATPasen. CopA1a und b werden in ihrer Expression durch Cu(I)-Konzentrationen und einem Metall-Transkriptionsfaktor reguliert und können auch die *copA*-Deletion in *E. coli* komplementieren. Die CopA2-ähnlichen Proteine, FixI1 und FixI2, werden für den Zusammenbau von zwei unterschiedlichen Cytochrom-*c*-Oxidasen in unterschiedlichen Stadien des bakteriellen Lebens benötigt. CopA3 ist phylogenetisch weiter entfernt zu den anderen Cu(I)-P-Typ ATPasen dieses Organismus, wird durch Redoxstress reguliert, leistet keinen Beitrag an der Toleranz und wird während der Symbiose benötigt (Patel *et al.*, 2014). FixI-ähnliche PIB-ATPasen stellen Kupfer für den Cofaktor der Cytochrom-*c*-Untereinheiten und zeigen geringere Transportraten (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Raimunda *et al.*, 2013). Die *fixI/copA2*-Mutantenstämme zeigen eine signifikante Defizienz in der Oxidase Aktivität (Preisig *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 2000; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Hassani *et al.*, 2010), eine erhöhte Sensitivität gegen oxidativen Stress und keinen kupfersensitiven Phänotyp (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2010; Raimunda *et al.*, 2013).

Neben der Hemmung der Kupfer-abhängigen ATPase-Aktivität durch AuHCl_4 sind in der Literatur einige Beispiele von Systemen beschrieben, die nicht in der Lage sind zwischen Schwermetallen ähnlicher Chemie oder ähnlicher Ionenradien zu unterscheiden und in ihrer Funktion so inhibiert werden können, wie beispielsweise Fe(III) und Ga(III), einem Schwermetall mit keiner biologischen Signifikanz für Organismen (Chitambar und Narasimhan, 1991a; Chitambar *et al.*, 1991b; Kaneko *et al.*, 2007). Studien mit *P. aeruginosa* haben gezeigt, dass Gallium das Wachstum und die Biofilmbildung inhibiert (Kaneko *et al.*, 2007). Die antimikrobielle Wirkung beruht auf der chemischen Ähnlichkeit zu Eisen. So sind die Ionenradien von Eisen(III) und Gallium(III) mit 0,65 Å und 0,62 Å einander sehr ähnlich, jedoch kann Gallium im Gegensatz zum Eisen nicht reduziert werden, weshalb deren Bindung sowohl eisenabhängige metabolische Redoxprozesse als auch die Enzymfunktion eisenabhängiger Proteine inhibieren kann, wie beispielsweise der Ribonukleotid-Reduktase in humanen Krebszelllinien (Chitambar und Narasimhan, 1991a; Chitambar *et al.*, 1991b). In einem anderen Beispiel wird der Zink-Import von ZupT aus *E. coli*, einem bakteriellen Vertreter der ZIP-Familie (Grass *et al.*, 2002), in Gegenwart anderer divalenter Kationen inhibiert, jedoch nicht vollständig gehemmt. So konnte in radioaktiven Zinkaufnahmeexperimenten mit *E. coli* gezeigt werden, dass der Zink-Import von ZupT durch äquimolare Mengen an Cadmium stark gehemmt wird (Taudte und Grass, 2010), was die Ergebnisse aus früheren Untersuchungen an ZIP8 und ZIP14 bestätigt (Girijashanker *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Daneben wurde der Zink-Transport auch bei einem 5-fachen Überschuss an Kupfer und einem 50-fachen Überschuss an Mangan, Nickel oder Kobalt gehemmt (Taudte und Grass, 2010).

4.3.1 Die Goldresistenz und Nanopartikelbildung im Periplasma

Unter den natürlichen Bedingungen an den goldhaltigen Standorten (Au,Cu) könnte demnach der Efflux der toxischen Cu(I)-Ionen aus dem Cytoplasma durch CupA blockiert sein. Um der Gold/Kupfer-Toxizität dennoch entgegen zu wirken, scheint die Zelle sich dem Efflux der Metalle durch das CusCFBA-System oder der Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) durch die MKO CopA bedienen zu können (Tab. 9), wobei so der weitere Import der toxischen Cu(I)-Ionen ins Cytoplasma verhindert wird.

Das Genom von *C. metallidurans* kodiert für zwei homologe PcoABCD-Systeme, dessen Gene auf dem Chromosom oder in dem Kupferresistenzcluster auf dem Plasmid pMOL30 lokalisiert sind (Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz: CopA: 77 %, CopB: 50 %, CopC: 64 % und CopD: 48 %) (Monchy *et al.*, 2006). Dass es sich bei dem auf dem Plasmid kodierten CopA um eine

mögliche Oxidase handelt, konnten Komplementationsstudien mit *E. coli* bestätigen. So konnte CopA_{pMOL30} den kupfersensitiven Phänotyp der *E. coli* Mutantenstämme GR1 ($\Delta cueO::cm$) und GR10 ($\Delta cueO \Delta cusCFBA::cm$) vollständig komplementieren (Grass und Rensing, 2001c).

Die Deletion des chromosomalen *cop*-System führte in dieser Arbeit zu einem Verlust der Kupferresistenz in AE104, wobei CH34 mit dem chromosomalen Cop-System dem Effekt entgegen wirken kann (s. Anhang Abb. 43B). Die CopABCD-Determinante auf Chromsom 2 wird jedoch für die volle Goldresistenz in beiden *C. metallidurans*-Stämmen benötigt, wobei die Abnahme der Goldresistenz im Stamm DN685(CH34 $\Delta copABCD$) höher ist als im Stamm DN686(AE104 $\Delta copABCD$) (s. Anhang Abb. 43A). Eine ähnliche Abnahme der Goldresistenz konnte auch mit CH34 und Goldthiosulfat in Flüssigkulturen gezeigt werden. Der Effekt war hier jedoch schwächer im Vergleich zu AuHCl₄ (Daten nicht gezeigt). Einige Plasmid-vermittelte Funktionen könnten daher doch zur erhöhten Goldsensitivität führen, und um diesen Effekt zu kompensieren könnte das CopABCD-System benötigt werden. Trotz dem Verlust beider Resistenzen konnte mit der Mutante DN686(AE104 $\Delta copABCD$) unter den Wachstumsbedingungen für die Metallgehaltanalyse mittels ICP-MS kein Unterschied in den Metallgehalten zum Wildtypstamm festgestellt werden (Tab. 9). Dies könnte mit dem Effluxverhalten des CusCFBA-Systems begründet werden, das scheinbar in der Lage ist sowohl Gold als auch Kupfer aus der Zelle zu transportieren (Tab. 9). So führte die Deletion dieses Systems zu einem höheren Gold- und einem geringen signifikant höheren Kupfergehalt als der Wildtypstamm AE104.

Das plasmidkodierte Pco-System (pRJ1004) aus *E. coli* reduziert hingegen die zelluläre Kupferakkumulation in der logarithmischen Wachstumsphase im LB-Medium, während es in der stationären Phase zur erhöhten Kupferakkumulation beiträgt. Untersuchungen zeigten, dass die Parameter der Kupferaufnahme durch das Plasmid unverändert blieben, sodass die niedrige Akkumulation auch auf den geförderten Kupferefflux in *E. coli* zurückgeführt werden kann (Brown *et al.*, 1995). Das Cop-System auf dem Plasmid pPT23D von *P. syringae* erhöht die Aufnahme und Sequestrierung von Kupfer im periplasmatischen Kompartiment (Cha und Cooksey, 1993; Voloudakis *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995).

Des Weiteren konnte die Operon-*lacZ*-Fusion des Systems im Stammhintergrund AE104 nur konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert werden (Abb. 18), wohingegen eine Induktion des *pcoA*-Promotors bei hohem Kupferlevel im LB-Medium dokumentiert ist. Mit 10 mM CuCl₂ verdoppelte sich die Induktion des *pcoA*-Promotors bei hohem Kupferlevel im LB-Medium (Rouch und Brown, 1997). Solch hohe Konzentration konnten nicht eingesetzt werden, um die Expression der Induktion von *copD-lacZ* zu untersuchen, da sie zur Letalität der Zellen führten.

Das Cop-System muss jedoch induziert werden, wie der Anstieg der Metallgehalte (Tab. 9) und die fehlende Goldresistenzsteigerung durch Vorinkubation mit CuCl_2 der Au/Cu-inkubierten Zellen der Deletionsmutante vermuten lassen (Tab. 7).

Das Cop-System aus *C. metallidurans* spielt auch eine zentrale Rolle in den $\text{AuHCl}_4/\text{CuCl}_2$ inkubierten Zellen. So führt deren Abwesenheit zu einer Verdopplung des Kupfergehaltes und einer gleichzeitigen Halbierung des Goldgehaltes (Tab. 9), die durch eine Vorinkubation mit AuHCl_4 nicht verändert wurden. Der Efflux durch das Cus-System scheint unter diesen Bedingungen weniger eine vorherrschende funktionelle Rolle zu haben, wie den gleichen Metallgehalten der Deletionsmutante DN729(AE104 $\Delta\text{cusCFBA}$) und des Wildtypstammes entnommen werden kann (Tab. 9). Die periplasmatische Detoxifizierung der Goldionen geht demnach im Stamm AE104 mit einer Zunahme des Goldgehaltes einher. So dass sich die Frage stellt, ob das Cop-System auch einen Beitrag zur Bildung der Nanopartikel leistet, oder vielmehr ob das Cop-System die Nanopartikelbildung fördert, um den weiteren Eintritt der Au(I)- oder Au(III)-ionen ins Cytoplasma zu verhindern. Dies könnte dann auch erklären, warum die Goldionen unter diesen Bedingungen nicht über das Cus-System detoxifiziert werden, wobei durch die ICP-MS Daten ein möglicher Goldtransport favorisiert werden könnte. Die Goldnanopartikel sind vorwiegend im Periplasma und an der Cytoplasmamembran lokalisiert, wobei der Durchmesser dieser Nanostrukturen bei $13,4 \pm 2,9$ nm liegt und ungefähr 93.000 Goldatome entspricht. Der Großteil des Goldes liegt demnach als Nanopartikel in der Zelle vor. Um dem Cop-System eine Funktion an der Synthese zuordnen zu können, wurden die Stämme AE104 und DN686($\Delta\text{copABCD}$) mit AuHCl_4 inkubiert, für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert und anschließend die Partikelgröße sowie die Lokalisation der Partikel in beiden Stämmen statistisch analysiert (Abb. 34). Dabei konnten keine direkten Unterschiede in der Partikelgröße oder der Lokalisation der Partikel zwischen beiden Stämmen festgestellt werden. Eine Verdopplung des Metallgehaltes im Stamm AE104 erhöht den Durchmesser der Partikel lediglich um 26 % und liegt damit unter der Standardabweichung von 29 % der Partikelgrößen. Eine direkte Funktion des Cop-Systems an der Bildung der Nanopartikel kann daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Es sind weitere TEM-Untersuchungen der Stämme erforderlich, die mit AuHCl_4 und CuCl_2 inkubiert werden, um statistisch die Signifikanz des Systems an der Synthese der Nanopartikel unter dieser Bedingung bestimmen zu können. Daraus ergeben sich auch weitere biochemische Versuchsansätze, die im Ausblick (4.6.) aufgeführt sind.

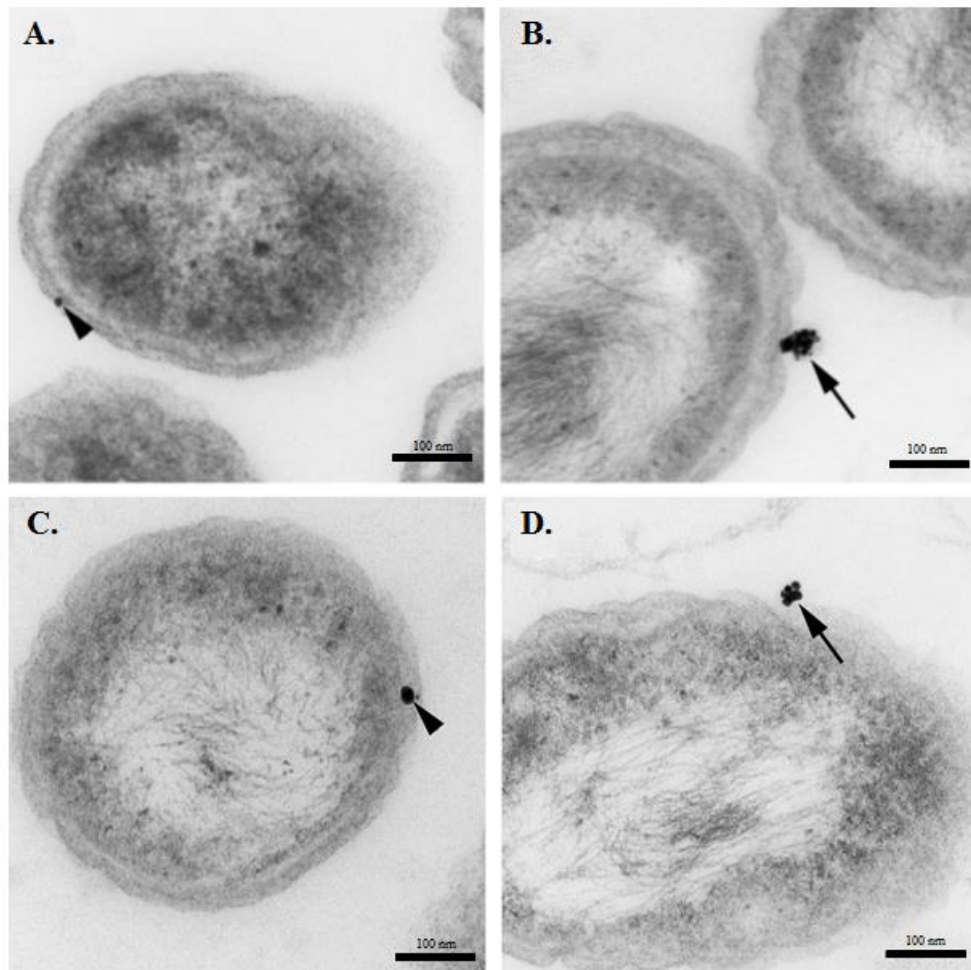


Abb. 34: Vergleich der Goldnanopartikel in den *C. metallidurans*-Zellen AE104 und DN686($\Delta copABCD$). Die Stämme AE104 (A.,B.) und DN686($\Delta copABCD$) (C.,D.) wurden mit $50 \mu\text{M AuHCl}_4$ inkubiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert (2.9.1.1). 17 % der AE104-Zellen ($n=213$) und 24 % der DN686($\Delta copABCD$)-Zellen ($n=409$) enthielten Nanopartikel auf den Ultradünnschnitten. Als Negativkontrolle erfolgte die Anzucht der Stämme ohne die Metallzugabe. Die TEM-Dokumentation zeigte in diesen Stämmen keine Partikelbildung (Daten nicht gezeigt). Für die statistische Auswertung wurden die Partikel der beiden Stämme nach kleinen Partikeln (einzelne Partikel oder Cluster mit drei Partikeln), mittelgroßen Partikeln (Cluster bis 10 Partikel) und großen Partikeln kategorisiert. Die Größenverteilung (klein:mittelgroß:große Partikeln) war in den Stämmen ähnlich (AE104: 59 %:27 %:14 %; DN686($\Delta copABCD$): 57 %:33 %:10 %). Auch in der Verteilung der Partikel konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Etwa 1/3 der Partikel oder Cluster waren im periplasmatischen Raum und etwa 20 % an der Cytoplasmamembran lokalisiert. Die Durchmesser der periplasmatischen Partikel und der Partikel außerhalb bzw. an der äußeren Membran liegen bei den AE104-Zellen bei $13,3 \pm 3,9 \text{ nm}$ und $15,0 \pm 3,4 \text{ nm}$ und bei den Mutantenzellen bei $13,8 \pm 4,1 \text{ nm}$ und $19,0 \pm 2,9 \text{ nm}$. Die Durchmesser der Partikelcluster in diesen Kompartimenten sind in den AE104-Zellen $30,0 \pm 5,3 \text{ nm}$ und $34,4 \pm 11,9 \text{ nm}$ und in den Mutantenzellen $30,0 \pm 11,8 \text{ nm}$ und $35,4 \pm 14,8 \text{ nm}$ groß. Die Präparation sowie die statistische Analyse wurde von Dr. Dr. Hause vorgenommen.

Eine Beteiligung an der Synthese wäre jedoch denkbar, betrachtet man die Redoxpotentiale. Die Multi-Kupferoxidase CopA ist eine Cu(I)-Oxidase, die ein Elektronen von Cu(I) akzeptiert, um Cu(II) und reduzierte Oxidase zu bilden. Prinzipiell zeichnen sich MKO (PcoA, CopA und CueO) durch ein Typ 1 Kupfer als primären Elektronenakzeptor und einem trinukleären Cluster mit einem Typ 2 und zwei Typ 3 Kupfer als Reduktionszentrum von Sauerstoff aus (Ouzounis

und Sander, 1991). Die MKO CueO aus *E. coli* weist darüber hinaus eine fünfte Kupferbindestelle mit zwei Methionin- und zwei Aspartatresten als Liganden an einer methioninreichen Helix auf, die den Zugang des Substrates zum Typ 1 Kupfer blockiert (Roberts *et al.*, 2002). Durch Bindung von Cu(I) in der fünften Kupferbindestelle erfolgt eine Verringerung des Redoxpotentials, wodurch ein Elektronentransfer über eine Wasserstoffbrücke zu dem 7,5 Å entfernten Kupferion ermöglicht wird (Djoko *et al.*, 2010). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kupferoxidase PcoA auch in der Lage ist Ag(I)-Ionen mit einem größeren Ionenradius als Cu(I) zu binden, ohne die Oxidase Aktivität dabei zu inhibieren (Djoko *et al.*, 2008). Aufgrund der Ähnlichkeit der Koordinationschemie von Cu(I), Ag(I) und Au(I) wäre demnach auch eine Bindung der Au(I)-Ionen in der MKO CopA denkbar. So könnte reduziertes CopA die Reduktion von Au(I) zu Au(0) katalysieren ($E_0=1692$ mV) (Weast, 1984). Die Oxidation von Au(I) zu Au(III) durch Sauerstoff ist hingegen thermodynamisch schwierig, aufgrund des höheren Redoxpotentials von Au(I)/Au(III) verglichen zum O₂/H₂O (Weast, 1984). Eine solche Reaktion würde auch die Goldtoxizität erhöhen, als die Oxidation zur weniger toxischen Metallform, wie im Fall von Cu(I)/Cu(II). Eine Reduktion von Cu(I) zu Cu(0) kann auch aufgrund des Redoxpotentials von $E_0=521$ mV ausgeschlossen werden. Dies stützt sich mit der transmissionselektronenmikroskopischen Dokumentation der *C. metallidurans*-Zellen, die nach Inkubation mit variierenden Konzentrationen an Kupferchlorid nicht in der Lage waren Nanopartikel zu synthetisieren (Daten nicht gezeigt). Bisher sind allgemein nur wenige Bakterien bekannt, mit denen die Biosynthese und die Stabilisierung der Kupfernanopartikel in wässriger Lösung gezeigt werden konnte. Als einer der wenigen Vertreter ist das Silberresistenzbakterium *Morganella morganii* RP42 zu nennen (Ramanathan *et al.*, 2013). Der bakterielle Mechanismus, der an dem Biosyntheseprozess beteiligt ist, konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. Die Reduktion der Goldionen könnte zur Regenerierung der MKO beitragen, einhergehend mit einem Anstieg an zellgebundenen Goldatomen in Form von periplasmatischen Partikeln in den Cop-enthaltenen Zellen. Dies könnte die Notwendigkeit des Cop-Systems erklären, mit den toxischen Gold/Kupferkonzentrationen umzugehen.

Die Vorkultur mit Kupfer und nicht mit Gold erhöhte die Goldresistenz der AuHCl₄/CuCl₂ inkubierten Zellen, was mit einer Halbierung des Kupfer- und Goldgehaltes in AE104 einherging. Dieser Effekt ist eher auf die periplasmatischen Komponenten zurückzuführen (Tab. 9 Vergleich der Metallgehalte des cytoplasmatischen und der periplasmatischen Kupferresistenzsysteme). So führte die Deletion des *cop*-Systems unter diesen Bedingungen

nicht zu einem Resistenzanstieg, der in den *dose-response* Experimenten (Tab. 7) dokumentiert ist, während der Deletionsstamm des *cus*-Systems jedoch diesen Resistenzanstieg zeigte. Damit einhergehend konnten Metallgehalte mittels ICP-MS bestimmt werden, die deutlich über denen von AE104 lagen. Die Metallgehalte in den Zellen des Stammes DN686($\Delta copABCD$) waren im Vergleich doppelt so hoch. In den Zellen des Stammes DN729($\Delta cusCFBA$) konnte eine 1,5-fache Erhöhung des Kupfergehaltes und eine Verdopplung des Goldgehaltes bestimmt werden. Dem *Cus*-System kann daher auch eine zentrale Bedeutung zu geordnet werden, dessen Expression dem vermehrten Einstrom von Kupfer und Gold entgegenwirkt. So zeigen die Induktionsexperimente in *C. metallidurans* eine Kupfer- und Goldabhängige Induktion des Systems unter aeroben Bedingungen (Abb. 18), was ein Beweis für deren Notwendigkeit unter $AuHCl_4$ und $CuCl_2$ sein könnte. Das *Cus*-System aus *E. coli* wird unter anaeroben Bedingungen, in denen Cu(I) die relevante Oxidationsstufe des Kupfers ist, sowie auch aerob bei hohen Kupferkonzentrationen hochreguliert (Franke *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2001). Die durchgeführten Induktionsexperimente in *C. metallidurans* bestätigen daher eine signifikante Verteilung von Cu(I) aerob unter extremen Kupferstress (Macomber and Imlay, 2009). Die Deletion des Systems selbst hatte jedoch keinen Einfluss auf die Gold- oder die Kupferresistenz (Tab. 7). Bereits Untersuchungen einer *cus*-Deletionsmutante von *E. coli* haben gezeigt, dass unter aeroben Bedingungen erst die zusätzliche Deletion der MKO *cueO* einen sensitiven Effekt verursacht, wohingegen unter anaeroben Bedingungen die Einzeldelation bereits einen kupfersensitiven Phänotyp hervorruft (Franke *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2001; Grass und Rensing, 2001c; Franke *et al.*, 2003). Unter Betrachtung der ICP-MS Daten lässt sich über eine mögliche Goldtransportfunktion des *Cus*-Systems spekulieren. Jedoch lassen sich in der Literatur nur Angaben über den Transport von Kupfer und Silber durch dieses System finden, wobei kontrovers über den Ausgangsort des Transportes, dem Periplasma oder dem Cytoplasma, diskutiert wird.

Das trimere Membranprotein *CusA* verfügt über drei Methionincluster in seiner periplasmatischen Domäne, die für den Export von Cu(I) und Ag(I) benötigt werden (Long *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). Sie fehlen in anderen RND-Proteinen, wie *CzcA* und *CnrA* (Liesegang *et al.*, 1993), die als Transporter für divalente Schwermetallkationen beschrieben werden (Nies *et al.*, 1989a; Schmidt und Schlegel, 1994). Zusätzlich zu diesen drei Methionin-Metallbindestelle sind in *CusA* vier weitere Methioninpaare in der transmembranen Region und der periplasmatischen Domäne lokalisiert. Aus genetischen Analysen und Transportassays in Liposomen wird postuliert, dass das *CusA*-Protein über diese Methionincluster die Metallionen aus dem Cytoplasma aufnimmt und sie über einen stufenweisen exportierenden

Shuttlemechanismus zu CusB weiter transportiert. Ein Transport vom Periplasma aus, wird jedoch von der Mehrheit favorisiert, da das CusCFBA- System nicht die Funktion der membrangebunden P-Typ ATPase in *E. coli* ersetzen kann (Grass und Rensing, 2001c).

Durch die Kristallisierung von CusB-Cu(I) und CusB-Ag(I) konnten auch mehrere putative Metallbindestellen gezeigt werden (Su *et al.*, 2009), wobei Ag(I)-Ionen mit höherer Affinität gebunden werden, wie durch ITC-Messungen ermittelt wurde (Bagai *et al.*, 2007). Die Affinität von CusF für Ag(I) war ebenfalls höher als die für Cu(I) (ITC), was die effizientere Detoxifizierung der Silberionen zeigt, die wie Goldionen keine zellulären Verwendungen haben (Kittleson *et al.*, 2006; Loftin *et al.*, 2007). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es keine Informationen, ob CusF auch andere Elemente der 11 Gruppe des Periodensystems, wie Gold, binden kann (Kim *et al.*, 2010).

Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich folgendes Modell aufstellen (Abb. 35).

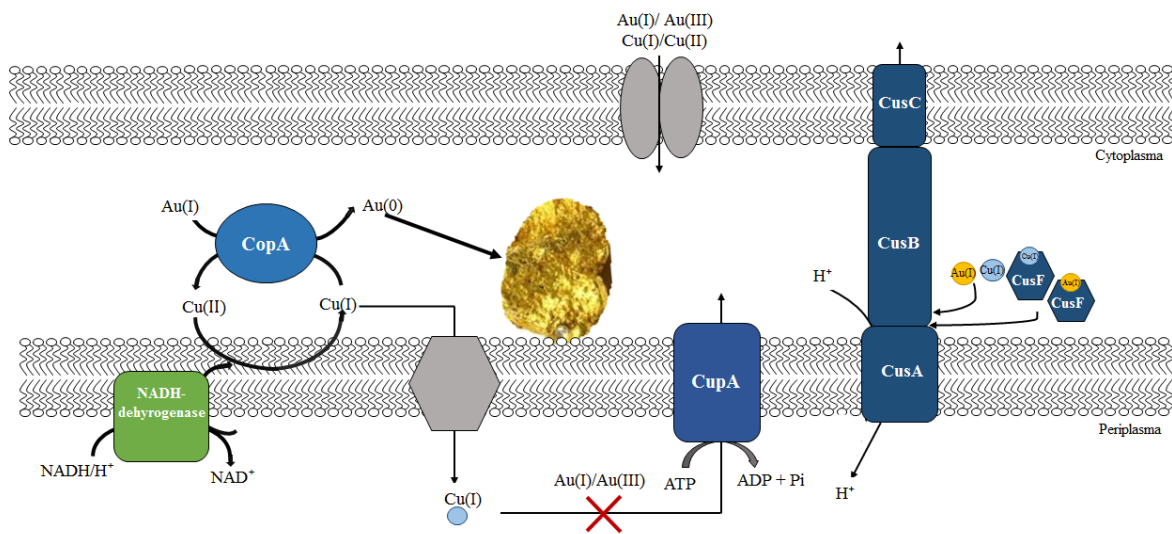


Abb. 35: Detoxifizierung und Biomineralisierung von Gold in *C. metallidurans*. Gold und Kupfer werden aus der goldhaltigen Umgebung von der Zelle aufgenommen; im Periplasma wird Cu(II) durch die Komponenten der Atmungskette zu Cu(I) reduziert (Volentini *et al.*, 2011) und ins Cytoplasma transportiert (Thieme *et al.*, 2008; Grosse *et al.*, 2014). Die Cu(I)-Toxizität wird durch den raschen Export über Cu(I)-P-Typ ATPasen verhindert (Petersen und Moller, 2000; Rensing *et al.*, 2000). Gold inhibiert jedoch diesen Export. Periplasmatisches Cu(I) wird durch die MKO CopA zur weniger toxischen Kupferform Cu(II) oxidiert. Dieser Prozess könnte mit der Reduktion der Au(I)-Ionen gekoppelt sein, die zur Bildung der Nanopartikel im Periplasma und an der Cytoplasmamembran führt. Die Goldionen könnten auch über das RND-System CusCFBA ins extrazelluläre Milieu transportiert werden.

Die Kupferionen gelangen durch äußere Membranporine wie OmpC ins Periplasma (Egler *et al.*, 2005). Inwieweit diese Transporter auch den Import von Goldionen realisieren ist unklar.

Unter den oxischen Bedingungen liegt Cu(II) als vorherrschende Kupferform vor, die durch Komponenten der Atmungskette zu Cu(I) reduziert werden können (Rodriguez-Montelongo *et al.*, 1993; Rodriguez-Montelongo *et al.*, 1995; Volentini *et al.*, 2011). Vorallem Ubiquinon, aber auch Menachinon und die NADH-Dehydrogenase-2 (NDH-2) sind an der zellulären Reduktion von Cu(II) beteiligt (Cu(II)/Cu(I): $E_0=0,15$ V bei pH 7,0, NADH/NAD⁺: $E_0=-0,32$ V bei pH 7,0) (Rapisarda *et al.*, 1999; Rapisarda *et al.*, 2002).

Die toxischen Cu(I)-ionen werden dann ins Cytoplasma transportiert (Thieme *et al.*, 2008), wobei bisher nur sehr wenig über diese Aufnahmesysteme in Bakterien bekannt ist. So ist ein Import der Cu(I)-ionen über Natriumtransporter denkbar (Outten *et al.*, 2001), da der ionische Cu(I)-radius mit 0,96 Å dem des Na(I)-ions mit 0,95 Å sehr ähnlich ist (Weast, 1984). Gestützt wird diese These durch Untersuchungen, dass 0,8 % NaCl resuspendierte *E. coli*-Zellen länger auf Kupferoberflächen überleben können. Ein Indiz dafür, dass höhere Na(I)-Konzentrationen kompetitiv die Cu(I)-Aufnahme durch diese Transportsysteme inhibieren könnten (Elguindi *et al.*, 2011). Aufgrund ähnlicher Ionenradien könnte die passive Absorption von Au(I)-Komplexen über Kaliumtransporter auch zur cytoplasmatischen Aufnahme führen (Ionenradien: Au(I) 1,37 Å, K(I) 1,33 Å) (Nies und Silver, 2007). An der Aufnahme ins Cytoplasma scheinen jedoch nicht die unspezifischen Metallaufnahmesysteme von *C. metallidurans* beteiligt zu sein, deren Deletionen zwar einen Einfluss auf die Gold- und auch Kupferresistenz hatten (Abb. 24), jedoch der Metallgehalt der gesamten Zelle keine Veränderungen zum Wildtyp zeigte (Tab. 11). Diesbezüglich wurde sich auch der CupR-abhängigen *cupA-lacZ*-Fusion bedient um indirekt Veränderungen im Metallgehalt im Cytoplasma der Zellen vergleichen zu können. Es konnten keine Veränderungen in der Induktion der β -Galaktosidase Aktivität in Abhängigkeit variierender Gold- und Kupferkonzentrationen zwischen den Stämmen AE104, DN515($\Delta zupT$) und DN681($\Delta corA1-3 \Delta zupT \Delta pitA \Delta zntB \Delta hoxN$) bestimmt werden (Abb. 25). Geringe Mengen an Cu(II) können in *E. coli* jedoch über den Zink-Importer ZupT ins Cytoplasma transloziert werden, wie Wettbewerbsstudien vermuten lassen (Grass *et al.*, 2002; Grass *et al.*, 2005a; Taudte und Grass, 2010).

Es besteht nun keine Notwendigkeit Kupfer oder auch Gold ins Cytoplasma aufzunehmen, da Gold keine direkte biologische Relevanz hat und Kupfer auch eher als wichtiger Cofaktor periplasmatischer oder membrangebundener Enzyme fungiert. Um die Cu(I)-Toxizität im Cytoplasma zu verhindern, erfolgt der Transport von Kupfer über die Cu(I)-P-Typ ATPase CupA ins Periplasma. Dieser Prozess wird durch Gold blockiert. Jedoch verhindert dies nicht die weitere Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) im Periplasma und den Import ins Cytoplasma, was

sich in der Abnahme beider Resistenzen widerspiegelte, die mit der Zunahme des Metallgehaltes begründet werden kann. Die einzige Möglichkeit der Au/Cu-Toxizität entgegen zu wirken ist der Efflux aus dem Periplasma, z.B. über das Cus-System oder die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) durch die MKO CopA, die auch an der Nanopartikelbildung im Periplasma beteiligt sein könnte. Dies beschreibt einen indirekten Detoxifizierungsweg der Goldionen unter den natürlichen Bedingungen an den goldhaltigen Standorten.

4.4 Glutathion scheint eine wichtige Komponente in der Goldhomöostase zu sein

Die am häufigsten vorkommende Form des Glutathions ist das reduzierte GSH, das etwa 99,5 % des gesamten intrazellulären Glutathiongehaltes in *E. coli* ausmacht. Die Konzentration an oxidiertem Glutathion und der gemischten Disulfide beträgt hingegen nur 0,17-0,33 % und weniger als 1 % (Smirnova und Oktyabrsky, 2005; Dalle-Donne und Rossi, 2009). Das Glutathion eine wichtige Rolle als Redoxpuffer in einer Vielzahl von Zellen spielt, haben bereits frühere Untersuchungen, beispielsweise mit *E. coli* (Helbig *et al.*, 2008a; Helbig *et al.*, 2008b; Grosse *et al.*, 2014) oder auch mit Bacillithion aus *Bacillus subtilis* gezeigt (Eide, 2014; Ma *et al.*, 2014). So ist Glutathion an der Cr(III), Zn(II), Cd(II) und Cu(II)-resistenz (Helbig *et al.*, 2008a; Helbig *et al.*, 2008b) sowie an der Resistenz gegen Arsen und Quecksilber in *E. coli* beteiligt (Latinwo *et al.*, 1998). Die Relevanz für die Resistenzen gegen Cadmium, Zink und Kupfer lässt sich auch in dieser Arbeit mit der Untersuchung der Deletionsmutante DN710($\Delta gshA$) in Wachstumsendpunktbestimmungen bestätigen (s Anhang Abb. 44; Abb. 26). Die *C. metallidurans*-Zellen brauchen GSH für die volle Resistenz von Elementen, die eine hohe Affinität für Thiolgruppen besitzen, wie Cadmium, Kupfer oder auch Chromat. Dies wird bei dem Vergleich der IC₅₀-Werte der *gshA*-Deletion mit den Deletionsmutanten der Cadmium- und Kupfer-exportierenden P-Typ ATPasen deutlich. Während die Deletion der P-Typ ATPasen *zntA* oder *cadA* nur eine geringe Auswirkung auf die Cadmiumresistenz hatten (AE104: IC₅₀[Cd]=91,1 ± 17,0 µM; AE104 $\Delta zntA$: IC₅₀[Cd]=91,2 ± 22,2 µM; AE104 $\Delta cadA$: IC₅₀[Cd]=78,6 ± 7,8 µM), führte die *gshA*-Deletion zu einer drastischen Abnahme der Resistenz (IC₅₀[Cd]=19,5 ± 1,1 µM). Auch in anderen Organismen wie *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* oder *S. cerevisiae* ist GSH an der vollen Cadmiumresistenz beteiligt (Gharieb und Gadd, 2004; Figueira *et al.*, 2005). Desweiteren beeinflusste die Deletion des Redoxpuffers minimal stärker die Kupferresistenz, als die Deletion der Cu(I)-P-Typ ATPase *CupA* (AE104: IC₅₀[Cu]=956 ± 19,7 µM; DN656(AE104 $\Delta cupCAR$): IC₅₀[Cu]=406 ± 44,7 µM; DN710(AE104 $\Delta gshA$): IC₅₀[Cu]=299 ± 70,1 µM). In *E. coli* hatte hingegen erst die zusätzliche

Deletion der P-Typ ATPase CopA im Stammhintergrund W3110 Δ *gshA*, W3110 Δ *gshB* oder W3110 Δ *gshA* Δ *gshB* eine Reduzierung der Kupferresistenz zur Folge (Helbig *et al.*, 2008a). Metallkationen wie Zink lassen sich hingegen eher durch Effluxsysteme detoxifizieren. Die Deletion der P-Typ ATPase *zntA* halbiert den IC₅₀-Wert von Zink, während die Zinkresistenz nur minimal durch die Deletion der P-Typ ATPase *cadA* oder *gshA* beeinflusst wird. Es konnte kein Effekt der *gshA*-Mutation auf die Resistenz gegen CoCl₂ nachgewiesen werden, was redundant zum Ergebnis in *E. coli* ist (Helbig *et al.*, 2008a). Ein Einfluss dieses Metalls wurde hingegen früher in *S. enterica* beschrieben, wobei die *gshA*-Mutante aus einer Transposonmutagenese entstand und polare Effekte nicht ausgeschlossen werden können (Thorgersen und Downs, 2007). Erstmals kann dem Redoxpuffer auch eine zentrale Rolle an der Goldresistenz zugeordnet werden. Die Deletion führte zu einer drastischen Abnahme der Resistenz, dessen Ausmaß in keiner anderen Deletion der Promotionsarbeit nachgewiesen werden konnte.

Wie wirkt nun Glutathion als Redoxpuffer? Im GSH-Molekül bilden die beiden Cysteinreste und die vier Carboxylgruppe mit divalenten Metallkationen sehr stabile oktahedrale-bis-glutathionat-Komplexe (Dominey und Kustin, 1983; Vatamaniuk *et al.*, 2000), sodass jedes divalente Metallkation, das in die Zelle gelangt, auch diesen Komplex bilden sollte. Das Standardredoxpotential von Cu(II)/Cu(I) beträgt -260 mV bei pH 7,0, was in Gegenwart reaktiver Sauerstoffspezies zu einer Fenton-ähnlichen Haber-Weiss Reaktion führt (Liochev und Fridovich, 2002). Innerhalb der Zelle könnte der Prozess unterdrückt werden, indem die Kupferionen sofort an das Tripeptid Glutathion binden (GSH, L-gamma-glutamyl-L-cysteine-glycine) (Freedman *et al.*, 1989). Hepatoma-Zellen, die einem Übermaß an Kupfer ausgesetzt sind, bilden Cu(I)-GSH₂-Komplexe (Freedman *et al.*, 1989; Ciriolo *et al.*, 1990; Kachur *et al.*, 1998; Ferruzza *et al.*, 2000), die eine essentielle Rolle als Carrier der Cu(I)-ionen für die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase spielen könnten (Freedman *et al.*, 1989; Ciriolo *et al.*, 1990; Ascone *et al.*, 1993). Der Cu(I)-GSH₂-Komplex erzeugt mit molekularem Sauerstoff das Superoxidradikal und Cu(II)-GSSG (GSSG, oxidiertes Glutathion) (Speisky *et al.*, 2009). Cu(II)-GSSG reagiert mit freiem GSH und bildet so erneut Cu(I)-GSH₂ (Aliaga *et al.*, 2012). Diese Reaktion erzeugt kontinuierlich Superoxidradikale im Cytoplasma von *E. coli* (Kimuru and Nishioka, 1997), vermeidet jedoch die Bildung des toxischeren H₂O₂ (Aliaga *et al.*, 2012). Cu(I)-GSH₂ ist ein weiterer Mechanismus der Zelle um sich vor freien Kupferionen zu schützen, die in der Lage sind biologische Membranen zu zerstören (Letelier *et al.*, 2005), spezifisch an essentielle Biomoleküle zu binden und die Bildung freier Radikale zu

katalysieren. *C. metallidurans* benötigt Glutathion daher als Redoxpuffer für die Kupfer- und auch Goldhomöostase.

Die Zugabe von AuHCl₄ und/oder CuCl₂ führte in DN710($\Delta gshA$) zu einem deutlich höheren Metallgehalt unter den Wachstumsbedingungen der ICP-MS, was den Resistenzverlust in den Wachstumsendpunktbestimmungen erklären könnte. Die *gshA*-Deletion führte zu einem doppelt so hohen Kupfergehalt und einem fünffach höheren Goldgehalt (Tab. 12). Das vermehrte Kupfer scheint dabei im Periplasma der Zellen lokalisiert zu sein, wie der fehlenden Änderung der Induktion der β -Galaktosidase Aktivität der *cupA-lacZ*-Fusion in den Stämmen AE104 und DN710($\Delta gshA$) entnommen werden kann (Daten nicht gezeigt). Das Gold scheint hingegen auch vermehrt im Cytoplasma vorhanden zu sein, bestätigt durch die Unterschiede der β -Galaktosidase Aktivität zwischen den beiden Stämmen (Abb. 28).

Das zelluläre GSH wird fast vollständig im reduzierten Zustand gehalten. GSH/GSSG hat ein Standardredoxpotential bei pH 7,0 von -240 mV (Rost und Rapoport, 1964), der nah am in vivo Potenzial von -260 mV im Cytoplasma ist (Kirlin *et al.*, 1999). Reduziertes Glutathion müsste daher fähig sein alle Übergangsmetalle mit einem größerem Potenzial als $E_0 = -260$ mV zu reduzieren. So könnte Fe(III) zu Fe(II) ($E_0 = +770$ mV, pH 7,0), sowie Ag(I) und Au(I) zur metallischen Form reduziert werden (Ag: $E_0 = +800$ mV, pH 7,0; Au: $E_0 = 850$ mV, pH 7,0). Bereits Witkiewitz und Shawn, (1981) konnten zeigen, dass die Zugabe von Glutathion zu KAuBr₄ x 2H₂O in verschiedenen molaren Verhältnissen zur sofortigen Entfärbung der gelben Lösung und zur Deposition von metallischen Gold innerhalb weniger Minuten führte. Die TEM-Dokumentationen könnten dies in den Zellen von *C. metallidurans* bestätigen. So führte die Deletion des ersten Enzyms der Glutathionsynthese bei Zugabe von AuHCl₄ in dem gleichen Toxizitätslevel wie für den Wildtypstamm zu keiner Bildung der Nanopartikel, wobei AE104 und der Komplementationsstamm die Nanopartikel im Periplasma und an der Cytoplasmamembran synthetisieren können. Glutathion ist demnach ein geeignetes Oxidationsmittel, um Au(III) zu Au(0) zu reduzieren. Auch andere Oxidationsmittel wie Cystein (Cystein/Cystin, $E_0 = -250$ mV, pH 7,4), NADH (NADH/NAD⁺, $E_0 = -320$ mV, pH 7,0), FADH₂ (FADH₂/2FAD⁺, $E_0 = -150$ mV, pH 7,4) wären in der Lage Au(III) zu Au(0) zu reduzieren. So wird vermutet, dass die NADH-Reduktase von *Rhodopseudomonas capsulae* eine besondere Rolle in der Nanopartikel spielt (He *et al.*, 2007). Es gibt auch Vermutungen darüber, dass Hydrogenasen an der Au(III)-reduktion beteiligt sein könnten. So zeigten frühere Studien mit *Shewanella algae*, einem Fe-reduzierenden Bakterium, dass dieser Organismus Au(III) mit Wasserstoff als Elektronendonator reduzieren kann (nicht jedoch mit Laktat), was eine Beteiligung der Hydrogenase vermuten lässt (Kashefi *et al.*, 2001). Und auch c-Typ

Cytochrome können zur Reduktion zu metallischen Au(0) beitragen (Lovley, 1993; Lovley *et al.*, 1993; Kashefi *et al.*, 2001). Eine direkte Beteiligung der in Microarray-Analysen nach Goldchlorid Inkubation hochregulierten Arsenreduktasen (ArsC1 (Rmet_0392) und ArsC2 (Rmet_0331) sowie der NADH-abhängigen Hg(II)-Reduktase MerA an der Au(III)-reduktion und der Goldresistenz kann ausgeschlossen werden (s. Anhang Abb. 47). Eine entsprechende Kupferreduktase ist in dem *cop*-Cluster auf dem Plasmid pMOL30 kodiert und sollte aus den bisherigen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Goldresistenz oder deren Biomineralisierung haben.

Glutathion wird im Cytoplasma synthetisiert und müsste für die Synthese der Nanopartikel über spezifische Transportsysteme ins Periplasma transportiert werden, wie Atm- und CydDC-Proteinkomplexe. Atm-Proteine und CydDC-Proteine gehören zu ABC-Transportern (ATP-binding cassette), die durch vier Proteindomänen charakterisiert sind. Zwei hydrophobe Domänen sind in der Membran integriert und bilden eine Translokationspore für das Substrat und zwei cytoplasmatisch gelegene hydrophile Nukleotidbindedomänen, die den Transport durch Bindung und Hydrolyse von ATP energetisieren. Kristallstrukturen der Atm-Proteine zeigten, dass die Proteine aus Eukaryoten, wie *S. cerevisiae* (Srinivasan *et al.*, 2014) mit reduziertem Glutathion und homologe Atm-Proteine aus Bakterien, wie *Novosphingobium aromaticivorans* auch mit oxidiertem Glutathion assoziiert sind (Lee *et al.*, 2014). Atm3 aus *Arabidopsis thaliana*, Atm1 aus *S. cerevisiae* und das bakterielle AtmA aus *N. aromaticivorans* (NaAtm1) transportieren GSSG und nicht GSH, in Übereinstimmung mit der Stimulation der ATPase-Aktivität durch GSSG (Lee *et al.*, 2014; Schaedler *et al.*, 2014). Die größte Stimulation der ATP-Hydrolyse von NaAtm1 wurde für Ag- und Hg-komplexiertes GSH beobachtet. Im Hinblick auf die Toxizität dieser Metalle bereits bei niedrigen intrazellulären Konzentrationen wurde von Lee *et al.*, (2014) die *in vivo*-Relevanz der ATPase mittels Metall-Suszeptibilitätsassay getestet. Dazu wurde NaAtm1 in einem metallsensitiven (Ag/Hg) *E. coli* Stamm exprimiert und das veränderte Wachstumsverhalten in Abhängigkeit variierender Metallkonzentrationen dokumentiert. *E. coli*-Stämme selbst besitzen keine Atm-homologen Proteine. In Übereinstimmung mit der Rolle von Atm am Export von Ag-GSH und Hg-GSH gewährte die Expression einen Schutz gegen ansonsten toxische Konzentrationen. Daher vermittelt NaAtm1 eine Resistenz gegen Schwermetalltoxizitäten, wahrscheinlich durch den Export von Metall-komplexierten GSH-Komplexen. Andere funktionelle Eigenschaften sind dagegen bisher nicht identifiziert worden.

CydDC vermittelt den GSH-Transport über die cytoplasmatische Membran von *E. coli* (Pittman *et al.*, 2005). Die Transportaktivität gegenüber reduziertem GSH ist höher als zum Cystein. Es gibt keine weiteren Untersuchungen über den möglichen Transport von Metall-komplexierten GSH.

In einer begleitenden Betreuung einer Bachelorarbeit wurde der Einfluss von Atm- und CydDC-homologen Proteinen in *C. metallidurans* auf die Gold- und Kupferresistenz sowie die Resistenz gegen Paraquat und Wasserstoffperoxid untersucht. Die Disruptionen zeigten jedoch keine Veränderungen im Phänotyp. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Disruptionen einen Einfluss auf Veränderungen in der Induktion der *cupA-lacZ*-Reporterfusion hatten, als Sensor für Änderungen der cytoplasmatischen Goldkonzentrationen. Jedoch konnten keine Induktionsveränderungen durch die Disruptionen beobachtet werden, was vermuten könnte, dass diese Transporter kein Metall-komplexiertes GSH transportieren (Löffler, 2013).

4.5 Das Gig-System mit einer unbekanntem Funktion

In Microarray-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der Gene dieses Clusters bei Anwesenheit von Au(III)- und Au(I)-Ionen hochreguliert war (Reith *et al.*, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013), weshalb eine Beteiligung des Clusters an der Goldresistenz oder der Goldbiomineralisierung vermutet wurde. Induktionsexperimente bestätigten, dass die Gene des Clusters durch Au(III)- und Au(I)-Ionen sowie Cu(II)-Ionen verstärkt exprimiert wurden (Wiesemann *et al.*, 2013). Darüber hinaus zeigten *reverse transcriptase*-PCR Analysen, dass die Transkription der Gene des goldinduzierten Operons durch Zugabe von AuHCl₄ und CuCl₂ gesteigert werden konnte (Reith *et al.*, 2009) (Abb. 19). Ohne Metallexposition wurde auf RNA-Ebene keine Expression der Gene nachgewiesen. Die gemeinsame Transkription der Gene *gigPABT* deutet daraufhin, dass die kodierenden Proteine in einem System mit zusammengehöriger Funktion arbeiten könnten. Die Proteine weisen dabei hohe Homologie zu Proteinen anderer Proteobakterien auf, wie *Pseudomonas*, *Burkholderia* und *Herbaspirillum*, wobei bisher keine Funktion bekannt ist.

Das Gencluster ist immer in der gleichen genetischen Organisation angeordnet, in der einen Orientierung die vier Strukturgene und entgegengesetzt von diesen der putative Sigma-Faktor *rpoQ* (Rmet_4686) und sein putativer Anti-Sigma-Faktor (Rmet_4687). Der Sigmafaktor *rpoQ* wurde unter allen Bedingungen exprimiert und seine Induktion blieb durch die Zugabe der verschiedener Schwermetalle unbeeinflusst (Wiesemann *et al.*, 2013). Dabei zeigt er nur geringe Ähnlichkeit zur ECF-Familie aber ist eng verwandt mit SigH aus *Bacillus subtilis* (Nies, 2004) und könnte ähnliche Funktionen übernehmen. SigH ist für die Regulation vieler Gene

verantwortlich, die beim Übergang der exponentiellen in die stationäre Phase nötig sind (Britton *et al.*, 2002). Diese Funktion könnte erklären, warum *rpoQ* unter allen Bedingungen exprimiert wird (Wiesemann *et al.*, 2013). Das *gigPABT*-Cluster wird jedoch nicht direkt vom Sigmafaktor reguliert. Die Induktionsexperimente mit einer *gigT-lacZ*-Operon-Fusion zeigten ferner, dass die $\Delta rpoQ$ -Deletion zu einer konstitutiven Expression und damit zum Verlust der Transkriptionskontrolle der Gene des *gig*-Clusters führte (Abb. 23). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass RpoQ einen Regulator kontrollieren könnte. So könnte RpoQ als Effektor für einen Repressor fungieren, der die Transkription durch Bindung an die DNA verhindert. Bei Fehlen von RpoQ würde der Repressor demnach nicht mehr binden und die Transkription könnte erfolgen. Es wäre auch denkbar, dass RpoQ die Bindung eines Transkriptionsaktivators reguliert, sodass dieser ohne RpoQ ungehindert an die DNA bindet und die Gene transkribiert werden könnten.

Trotz der Induktion der Expression durch AuHCl_4 und CuCl_2 beeinflusste eine Deletion dieses Clusters nicht die Resistenzen, weshalb vermutet werden kann, dass dieses System durch andere Metallresistenzsysteme kompensiert werden könnte, wie dem Cop-System, dem eine direkte Beteiligung an dem Mechanismus der Gold- und Kupferresistenz zugeordnet werden kann. Diese Vermutung wird gestützt durch die Induktionsexperimente mit Kupfer, die im Stamm DN686($\Delta copABCD$) zu einer verstärkten Expression der *gig*-Gene führte (Abb. 20A). Ein Einfluss auf die Expression der Gene durch Gold wurde für die Kupferresistenz-Determinante *cusCFBA* gezeigt. Die Deletion dieser Gene führte dazu, dass die Gene des *gig*-Clusters nicht mehr durch Gold induziert wurden (Abb. 20B). Der Einfluss der Gene *gigPABT* hinsichtlich der Resistenz gegenüber AuHCl_4 wurde weiterhin in Vorinkubationsexperimenten untersucht. Dabei beeinflusste die Vorinkubation mit AuHCl_4 die Gold- und Kupferresistenz, einhergehend mit einer Zunahme des Kupfergehaltes und nicht des Goldgehaltes, wie man erwartet hätte.

Im Gegensatz zum Wildtyp konnte in der $\Delta gshA$ -Deletionsmutante keine β -Galaktosidase-Aktivität des Reporterprodukts bei Inkubation mit Gold detektiert werden (Abb. 21B-C). Bei Inkubation mit Kupfer konnte jedoch eine stärkere Aktivität als beim Wildtyp verzeichnet werden (Abb. 21A). Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen Glutathion und dem *gig*-Cluster deuten und damit auf die Beteiligung des Clusters am Schutz vor oxidativen Stress. Die Deletion des *gig*-Systems hatte jedoch keinen Einfluss auf die Resistenz gegen die Stressoren Wasserstoffperoxid oder Paraquat (Daten nicht gezeigt) und beeinflusste auch nicht den Glutathiongehalt (Abb. 22).

In einer betreuenden Diplomarbeit wurde untersucht, ob es sich bei den Genen des *gig*-Clusters um ein Thioredoxin handeln könnte. Thioredoxin-Systeme (auch: Thioredoxin-Thioredoxin-

Reduktase-Systeme) dienen der Umwandlung von Thiolen und Disulfidbindungen und setzen sich zusammen aus einem Thioredoxin und der korrespondierenden Reduktase (Yang und Ma, 2010). Weiterhin weisen Thioredoxin-Reduktasen typische FAD-bindende Motive (GXGXXG) oder NAD(P)H-bindende Motive (GGGXXA) in ihrer Aminosäuresequenz auf, wie es für die Thioredoxin-Reduktase aus *Thermotoga maritima* gezeigt werden konnte (Yang und Ma, 2010). Sie katalysieren den Elektronentransfer (NADPH-abhängig) zum oxidierten Thioredoxin. Das reduzierte Thioredoxin übt dann die Funktion als Disulfid-Reduktasen aus, um die Disulfide der Proteine im Zellinneren zu reduzieren (Holmgren, 1985; Arner und Holmgren, 2000). Die Aminosäuresequenzen der annotierten Thioredoxin-Reduktasen aus *E. coli* und *C. metallidurans* enthalten die charakteristischen Motive, die jedoch in den Proteinen des Gig-Systems nicht identifiziert werden konnten. Mittels Insulinassay konnte bestätigt werden, dass die Proteine nicht als Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-System fungieren (Steglich, 2014). Dabei reduzieren Thioredoxine die Disulfidbrücken des Insulins, wodurch die β -Ketten des Insulins präzipitieren. Dies konnte für TrxA aus *E. coli* dann durch eine Trübungsmessung detektiert werden. In dem Assay konnte die Reduktion des Thioredoxin auf zwei Wegen erfolgen: durch die Zugabe von DTT oder der korrespondierenden Thioredoxinreduktase. Thioredoxine zeigen ferner ein konserviertes CXXC-Motiv der katalytischen Stelle (Yang und Ma, 2010). TrxA (*E. coli*) weist das für Thioredoxine typische Motiv (CGPC) der katalytischen Stelle auf, wohingegen dieses Motiv in den Proteinen des Gig-Systems fehlt.

Neben den Thioredoxinen selbst, gibt es noch weitere Gruppen von Proteinen, die wie GigB eine Thioredoxin-ähnliche Faltung aufweisen. Zu diesen gehören unter anderem Peroxidasen und Peroxiredoxine (Reduktion von Hydro-Peroxiden), Glutathion-Transferasen (Reduktion von Hydro-Peroxiden, Addition von Glutathion an Moleküle) und Glutaredoxine (Armstrong, 1997; Choi *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003; Poole, 2007; Toppo *et al.*, 2008; Atkinson und Babbit, 2009). Die Induktionsexperimente deuten auf eine Glutathionabhängigkeit der Gene des *gig*-Clusters, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass es sich bei diesen Proteinen um Glutaredoxine handeln könnte. Glutaredoxine und Thioredoxine überlappen teilweise in ihren Funktionen. Jedoch unterscheiden sie sich in der Art und Weise, wie sie in der Zelle reduziert werden. Während Thioredoxine durch Thioredoxin-Reduktasen reduziert werden, stammen die Elektronen zur Reduktion von Glutaredoxinen von GSH (Prieto-Alamo *et al.*, 1999). Sie fungieren daher als Glutathion-abhängige Reduktasen, die die Reduktion von Disulfiden zwischen Proteinen und Glutathion katalysieren (Holmgren, 1989; Holmgren und Åslund, 1995) (Masip *et al.*, 2006). Dabei agieren sie nach zwei verschiedenen katalytischen

Mechanismen. Zum einen über den Dithiol-Weg, in dem sie zwei Cysteinreste der aktiven Stelle (meist CPYC) nutzen, um Protein-Disulfide oder Disulfidbindungen zwischen Proteinen und Glutathion zu reduzieren (Bushweller *et al.*, 1992). Zum anderen über den Monothiol-Weg, wobei sie mit ihrer aktiven Stelle (meist CGFS) Protein-Disulfide reduzieren können (Bushweller *et al.*, 1992). Die Gig-Proteine besitzen jedoch keines der aufgeführten Sequenzmotive, weshalb die Funktion weiter unklar bleibt.

4.6 Ausblick

Gold gehört zu den 10 seltenen Elementen der Erdkruste, dessen Bioverfügbarkeit und Solubilität so gering ist, dass die Entwicklung von spezifischen Resistenzsystemen evolutionär energetisch ungünstig sein sollte. Die Microarray-Analysen nach Inkubation mit Au(III)- und Au(I)-Komplexen führten zur Hochregulation einer Reihe von Genen, die keine direkte Beteiligung an der Goldresistenz oder der Goldbiomineralisierung haben.

In einem nächsten Schritt sollte eine quantitative Proteom-Analyse mit der SYNAPT G2-S durchgeführt werden. Dazu wurde bereits der Stamm AE104 mit AuHCl₄, CuCl₂ und AuHCl₄/CuCl₂ sowie ohne Metallinkubation kultiviert, anschließend in lösliche und solubilisierete Membranproteinfraktion fraktioniert und für die Untersuchung präpariert. Durch den Vergleich der Proteome unter den verschiedenen Bedingungen könnten Proteine für die jeweilige Metallhomöostase ermittelt werden.

Aus den bisherigen Daten kann vermutet werden, dass *C. metallidurans* sich der Resistenzsysteme chemisch ähnlicher Metalle bedient, um die Detoxifizierung von Gold zu gewährleisten. Im Fokus der Untersuchungen sind die periplasmatischen Resistenzsysteme CusCFBA und CopABCD gerückt, die einen indirekten Weg der Detoxifizierung der Goldkonzentrationen unter Gold/Kupfer-Bedingungen darstellen. Dies sollte durch biochemische Charakterisierung der Systeme geprüft werden.

Um zu untersuchen, ob das RND-System Metallionen wie Gold aus dem Periplasma transportiert, könnte der gereinigte Proteinkomplex CusCB in Liposomen rekonstituiert werden, die den Fluoreszenzindikator Phen Green SK im intravesikulären Raum enthalten. Mit einem *stopped-flow*-Transport Assay könnte dann bestimmt werden, ob diese Proteoliposomen auch Gold aus dem extravasikulären Medium aufnehmen. Bei einer Aufnahme müsste dies anhand des Quenchen des Fluoreszenzsignals zu erkennen sein. Durch Atom-Absorptions-Spektroskopie und isothermische Titrationskalorimetrie konnte CusF als Metallbindeprotein bestätigt werden, das Kupfer- und Silber bindet. In weiterführenden Experimenten könnte des Weiteren auch die Bindungsaffinität für die Bindung von Au(I) bestimmt werden.

Die Daten dieser Arbeit lassen auch vermuten, dass das Cop-System einen wichtigen Beitrag zur Goldresistenz leistet und eventuell an der Bildung der Goldnanopartikel beteiligt sein könnte. Durch isothermische Titrationskalorimetrie könnte die MKO CopA als Metallbindeprotein von Au(I) untersucht werden. In einem Metallinkubationsassay des gereinigten Proteins mit Au(I) und Cu(I) könnte die mögliche Nanopartikelbildung im UV-Vis-Spektrum bei einem Absorptionsmaximum bei 540 nm verfolgt werden.

In einem weiteren Projekt sollte der Stamm *C. metallidurans* aus den goldhaltigen Standorten in Australien isoliert und dessen Genom sequenziert werden, um mögliche Unterschiede der genetischen Ausstattung zum *C. metallidurans* Stamm, dessen Isolierung aus einem Zinktank erfolgte, festzustellen. Durch Wachstumsendpunktbestimmungen, der Bestimmung der MIC sowie der Metallgehaltanalyse durch ICP-MS könnte der Stamm mit seinen Resistenzeigenschaften charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Das für seine Resistenz gegenüber einer Vielfalt von Schwermetallen bekannte β -Proteobakterium *C. metallidurans* wurde in Biofilmen auf Goldnuggets identifiziert und wird für die Bildung sekundären Goldes verantwortlich gemacht. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung möglicher Systeme, die für die Goldresistenz und die Goldbiomineralisierung von *C. metallidurans* benötigt werden.

1. Die bekannten Resistenzmechanismen aus *D. acidovorans* und *S. enterica* sv. Typhimurium kommen in *C. metallidurans* nicht zum tragen. Das Siderophor Staphyloferrin B von *C. metallidurans* wird nicht für die Goldresistenz oder die Goldbiomineralisierung benötigt.

Das CupCAR-System trägt zur Kupferresistenz jedoch nicht zur Goldresistenz bei. Durch Rekonstitution der Cu(I)-exportierenden P-Typ ATPase CupA in Detergenz-destabilisierenden Liposomen konnte eine Kupfer-vermittelte ATP-Dephosphorylierung und keine Gold-vermittelte ATP-Dephosphorylierung gezeigt werden.

2. Die auf den Megaplasmiden pMOL28 und pMOL30 lokalisierten Resistenzsysteme sind nicht an der Goldresistenz oder der Goldbiomineralisierung beteiligt. Die Goldnanopartikel sind vorwiegend im Periplasma und der Cytoplasmamembran, und weniger im Cytoplasma lokalisiert.

3. Eine Goldvorinkubation steigert nicht die Goldresistenz und untermauert die fehlende Existenz von goldspezifischen Resistenzsystemen in *C. metallidurans*.

4. Die Inkubation mit CuCl_2 beeinträchtigt die Goldresistenz in CH34 und AE104 und führt zu einem Anstieg des Goldgehaltes. Die Gold-Kupfer-Interferenz scheint ein allgemeiner Mechanismus auch nicht schwermetall-resistenter Bakterien, wie *E. coli* zu sein.

5. Die zelluläre Aufnahme von Au(I)/Au(III)-Komplexen blockiert den CupA-abhängigen Exportmechanismus in *C. metallidurans*. Dies führt zu einer abnehmenden Au/Cu-Resistenz und einer Akkumulation beider Metalle. Um der Gold/Kupfer-Toxizität dennoch entgegen zu wirken, scheint die Zelle sich der Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) durch die MKO CopA bedienen zu können, wobei so der weitere Import der toxischen Cu(I)-ionen ins Cytoplasma verhindert

wird. Eine Beteiligung des Systems an der Nanopartikelbildung im Periplasma und der Cytoplasmamembran ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht auszuschließen.

6. Die Vorinkubation mit CuCl_2 erhöht die Goldresistenz der Au/Cu-inkubierten Zellen von CH34 und AE104, einhergehend mit der Verhinderung der ansteigenden Akkumulation der Kupfer- und Goldionen in Gegenwart des jeweils anderen Metallkomplexes. Zurückzuführen ist dies auf die Co-Verwendung der periplasmatischen Kupferresistenzsysteme *CusCFBA* und *CopABCD* und nicht auf das *Gig*-System.

7. Die Deletion der Gene *gigPABT* hat keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber CuCl_2 , AuHCl_4 , H_2O_2 und Paraquat. In Induktionsexperimenten mit einer Reporter-gen-Fusion und mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass die Expression der Gene des *gig*-Clusters durch CuCl_2 und AuHCl_4 induziert wird. Die Deletion des Gens *gshA* und *cusCFBA* führte dazu, dass die Gene des *gig*-Clusters bei Inkubation der Zellen mit AuHCl_4 nicht mehr exprimiert werden. Das *Gig*-System beeinflusst jedoch nicht den Glutathiongehalt der Zellen. Die Deletion des putativen Sigma-Faktors *RpoQ* führte in Induktionsexperimenten zu einer konstitutiven Expression des Clusters, unabhängig von der Anwesenheit des putativen Anti-Sigma-Faktors (*Rmet_4687*).

8. *ZupT* und andere sekundäre Aufnahmesysteme für Übergangsmetalle beeinflussen zwar die Gold(III)- und Cu(II)-resistenz, jedoch ist dies nicht das Ergebnis einer gesteigerten Gold- oder Kupferakkumulation in diesen Zellen, sondern kann vielmehr auf eine Störung der gesamten Übergangsmetallhomöostase zurückgeführt werden.

9. Glutathion wird für die Goldresistenz und die Goldbiomineralisierung von *C. metallidurans* benötigt.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed, E. und S. J. Holmstrom (2014).** Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* 7: 196-208.
- Aliaga, M. E., C. Lopez-Alarcon, L. Garcia-Rio, M. Martin-Pastor und H. Speisky (2012).** Redox-changes associated with the glutathione-dependent ability of the Cu(II)-GSSG complex to generate superoxide. *Bioorg Med Chem* 20: 2869-2876.
- Allegre, C., G. Manhès und E. Lewin (2001).** Chemical composition of the earth and the volatility control on planetary genetics. *Earth Planet Sci Lett* 185: 49-69.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Andersson, M., D. Mattle, O. Sitsel, T. Klymchuk, A. M. Nielsen, L. B. Moller, S. H. White, P. Nissen und P. Gourdon (2014).** Copper-transporting P-type ATPases use a unique ion-release pathway. *Nat Struct Mol Biol* 21: 43-48.
- Andreini, C., I. Bertini und A. Rosato (2004).** A hint to search for metalloproteins in gene banks. *Bioinformatics* 20: 1373-1380.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini und A. Rosato (2006).** Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* 5: 3173-3178.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini, S. Elmi und A. Rosato (2007).** Non-heme iron through the three domains of life. *Proteins* 67: 317-324.
- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini und A. Rosato (2008).** Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. *J Proteome Res* 7: 209-216.
- Angel, B. M., S. L. Simpson, C. V. Jarolimek, R. Jung, J. Waworuntu und G. Batterham (2013).** Trace metals associated with deep-sea tailings placement at the Batu Hijau copper-gold mine, Sumbawa, Indonesia. *Mar Pollut Bull* 73: 306-313.
- Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl und D. H. Nies (1999).** CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* 181: 6876-6881.
- Anton, A., A. Weltrowski, C. J. Haney, S. Franke, G. Grass, C. Rensing und D. H. Nies (2004).** Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 7499-7507.
- Argüello, J. M. (2003).** Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* 195: 93-108.
- Argüello, J. M., A. K. Mandal und S. Mana-Capelli (2003).** Heavy metal transport CPx-ATPases from the thermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Ann N Y Acad Sci* 986: 212-218.

- Argüello, J. M., E. Eren und M. Gonzalez-Guerrero (2007).** The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases. *Biometals* 20: 233-248.
- Argüello, J. M., D. Raimunda und T. Padilla-Benavides (2013).** Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 73.
- Arner, E. S. J. und A. Holmgren (2000).** Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267: 6102-6109.
- Ascone, I., A. Longo, H. Dexpert, M. R. Ciriolo, G. Rotilio und A. Desideri (1993).** An X-ray absorption study of the reconstitution process of bovine Cu,Zn superoxide dismutase by Cu(I)-glutathione complex. *FEBS Lett* 322: 165-167.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sedman, J. A. Smith und K. Struhl (1993).** Current protocols in molecular biology. *Sec. Edition. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., New York.*
- Bagai, I., W. Liu, C. Rensing, N. J. Blackburn und M. M. McEvoy (2007).** Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system. *J Biol Chem* 282: 35695-35702.
- Bagai, I., C. Rensing, N. J. Blackburn und M. M. McEvoy (2008).** Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone. *Biochemistry* 47: 11408-11414.
- Banci, L., I. Bertini, R. Del Conte, J. Markey und F. J. Ruiz-Duenas (2001).** Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry* 40: 15660-15668.
- Banci, L., I. Bertini und R. Del Conte (2003).** Solution structure of apo CopZ from *Bacillus subtilis*: further analysis of the changes associated with the presence of copper. *Biochemistry* 42: 13422-13428.
- Boal, A. K. und A. C. Rosenzweig (2009).** Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev* 109: 4760-4779.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Britton, R. A., P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, P. Fawcett, R. Monson, R. Losick und A. D. Grossman (2002).** Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184: 4881-4890.
- Bronstein, P. A., M. Marrichi, S. Cartinhour, D. J. Schneider und M. P. DeLisa (2005).** Identification of a twin-arginine translocation system in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and its contribution to pathogenicity and fitness. *J Bacteriol* 187: 8450-8461.
- Brown, K., M. Tegoni, M. Prudencio, A. S. Pereira, S. Besson, J. J. Moura, I. Moura und C. Cambillau (2000).** A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol* 7: 191-195.

- Brown, N. L., S. R. Barrett, J. Camakaris, B. T. Lee und D. A. Rouch (1995).** Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol* 17: 1153-1166.
- Brown, N. L., J. V. Stoyanov, S. P. Kidd und J. L. Hobman (2003).** The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27: 145-163.
- Caboche, S., V. Leclere, M. Pupin, G. Kucherov und P. Jacques (2010).** Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity. *J Bacteriol* 192: 5143-5150.
- Cha, J. S. und D. A. Cooksey (1993).** Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon. *Appl Environ Microbiol* 59: 1671-1674.
- Chan, H., V. Babayan, E. Blyumin, C. Gandhi, K. Hak, D. Harake, K. Kumar, P. Lee, T. T. Li, H. Y. Liu (2010).** The p-type ATPase superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 19: 5-104.
- Changela, A., K. Chen, Y. Xue, J. Holschen, C. E. Outten, T. V. O'Halloran und A. Mondragon (2003).** Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301: 1383-1387.
- Checa, S. K., M. Espariz, M. E. Audero, P. E. Botta, S. V. Spinelli und F. C. Soncini (2007).** Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Mol Microbiol* 63: 1307-1318.
- Checa, S. K. und F. C. Soncini (2011).** Bacterial gold sensing and resistance. *Biometals* 24: 419-427.
- Chitambar, C. R. und J. Narasimhan (1991a).** Targeting iron-dependent DNA synthesis with gallium and transferrin-gallium. *Pathobiology* 59: 3-10.
- Chitambar, C. R., J. Narasimhan, J. Guy, D. S. Sem und W. J. O'Brien (1991b).** Inhibition of ribonucleotide reductase by gallium in murine leukemic L1210 cells. *Cancer Res* 51: 6199-6201.
- Ciriolo, M. R., A. Desideri, M. Paci und G. Rotilio (1990).** Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)•glutathione complex. *J Biol Chem* 265: 11030-11034.
- Collard, J. M., P. Corbisier, L. Diels, Q. Dong, C. Jeanthon, M. Mergeay, S. Taghavi, D. van der Lelie, A. Wilmotte und S. Wuertz (1994).** Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications. *FEMS Microbiol Rev* 14: 405-414.
- Cooksey, D. A. (1987).** Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl Environ Microbiol* 53: 454-456.
- Cooksey, D. A. (1993).** Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 7: 1-5.
- Cooksey, D. A. (1994).** Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 14: 381-386.
- Cooper, R. A., P. F. Knowles, D. E. Brown, M. A. McGuirl und D. M. Dooley (1992).** Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochem J* 288 (Pt 2): 337-340.

- Dalle-Donne, I. und R. Rossi (2009).** Analysis of thiols. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 3271-3273.
- De Feo, C. J., S. G. Aller, G. S. Siluvai, N. J. Blackburn und V. M. Unger (2009).** Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4237-4242.
- Dencher, N. A. (1989).** Gentle and fast transmembrane reconstitution of membrane proteins. *Methods Enzymol* 171: 265-274.
- Diels, L., M. Faelen, M. Mergeay und D. Nies (1985).** Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy-metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch Int Physiol Bio* 93: B27-B28.
- Dinh, T., I. T. Paulsen und M. H. Saier, Jr. (1994).** A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 176: 3825-3831.
- Djoko, K. Y., Z. G. Xiao und A. G. Wedd (2008).** Copper resistance in *E. coli*: The multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{-PcoC}$. *Chembiochem* 9: 1579-1582.
- Djoko, K. Y., L. X. Chong, A. G. Wedd und Z. Xiao (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.
- Dominey, L. A. und K. Kustin (1983).** Kinetics and mechanism of Zn(II) complexation with reduced glutathione. *J Inorg Biochem* 18: 153-160.
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Dupont, C. L., G. Grass und C. Rensing (2011).** Copper toxicity and the origin of bacterial resistance-
-new insights and applications. *Metallomics* 3: 1109-1118.
- Egler, M., C. Grosse, G. Grass und D. H. Nies (2005).** Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 2297-2307.
- Eide, D. J. (2014).** Bacillithiol, a new role in buffering intracellular zinc. *Mol Microbiol* 94: 743-746.
- Elguindi, J., S. Moffitt, H. Hasman, C. Andrade, S. Raghavan und C. Rensing (2011).** Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper ion-resistant bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1963-1970.
- Emsley, J. (1989).** The Elements. *Oxford University Press, Oxford*.
- Espariz, M., S. K. Checa, M. E. Audero, L. B. Pontel und F. C. Soncini (2007).** Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* 153: 2989-2997.
- Eytan, G. D. (1982).** Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim Biophys Acta* 694: 185-202.
- Fagan, M. J. und M. H. Saier, Jr. (1994).** P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol* 38: 57-99.

- Fan, B., G. Grass, C. Rensing und B. P. Rosen (2001).** *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 414-418.
- Fan, B. und B. P. Rosen (2002).** Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J Biol Chem* 277: 46987-46992.
- Ferruzza, S., Y. Sambuy, M. R. Ciriolo, A. De Martino, P. Santaroni, G. Rotilio und M. L. Scarino (2000).** Copper uptake and intracellular distribution in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biometals* 13: 179-185.
- Figueira, E. M., A. I. Lima und S. I. Pereira (2005).** Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae: glutathione as a detoxifying agent. *Can J Microbiol* 51: 7-14.
- Finney, L. A. und T. V. O'Halloran (2003).** Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300: 931-936.
- Focsan, M., Ardelean, II, C. Craciun und S. Astilean (2011).** Interplay between gold nanoparticle biosynthesis and metabolic activity of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Nanotechnology* 22: 485101.
- Francis, M. S. und C. J. Thomas (1997).** The *Listeria monocytogenes* gene *ctpA* encodes a putative P-type ATPase involved in copper transport. *Mol Gen Genet* 253: 484-491.
- Franke, S., G. Grass und D. H. Nies (2001).** The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* 147: 965-972.
- Franke, S., G. Grass, C. Rensing und D. H. Nies (2003).** Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 3804-3812.
- Freedman, J. H., M. R. Ciriolo und J. Peisach (1989).** The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem* 264: 5598-5605.
- Fridovich, I. (1986).** Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11.
- Frobel, J., P. Rose und M. Muller (2012).** Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 1029-1046.
- Garcia-Horsman, J. A., B. Barquera, J. Rumbley, J. Ma und R. B. Gennis (1994).** The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* 176: 5587-5600.
- Gharieb, M. M. und G. M. Gadd (2004).** Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 17: 183-188.
- Gilis, A., M. A. Khan, P. Cornelis, J. M. Meyer, M. Mergeay und D. van der Lelie (1996).** Siderophore-mediated iron uptake in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and identification of *aleB* encoding the ferric iron-alcaligin E receptor. *J Bacteriol* 178: 5499-5507.
- Gilis, A., P. Corbisier, W. Baeyens, S. Taghavi, M. Mergeay und D. van der Lelie (1998).** Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20: 61-68.

- Girijashanker, K., L. He, M. Soleimani, J. M. Reed, H. Li, Z. Liu, B. Wang, T. P. Dalton und D. W. Nebert (2008).** Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol* 73: 1413-1423.
- Glockner, A. B., A. Jungst und W. G. Zumft (1993).** Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd₁*-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol* 160: 18-26.
- Gonzalez-Guerrero, M. und J. M. Argüello (2008a).** Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5992-5997.
- Gonzalez-Guerrero, M., E. Eren, S. Rawat, T. L. Stemmler und J. M. Argüello (2008b).** Structure of the two transmembrane Cu⁺ transport sites of the Cu⁺-ATPases. *J Biol Chem* 283: 29753-29759.
- Gonzalez-Guerrero, M., D. Hong und J. M. Argüello (2009).** Chaperone-mediated Cu⁺ delivery to Cu⁺ transport ATPases: requirement of nucleotide binding. *J Biol Chem* 284: 20804-20811.
- Gonzalez-Guerrero, M., D. Raimunda, X. Cheng und J. M. Argüello (2010).** Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 78: 1246-1258.
- Goris, J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diels, M. Mergeay, K. Kersters und P. Vandamme (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, A. S., D. M. Ferber und J. A. Imlay (1999).** The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32: 179-191.
- Grass, G., C. Grosse und D. H. Nies (2000).** Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* 182: 1390-1398.
- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies und C. Rensing (2001a).** ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 4664-4667.
- Grass, G. und C. Rensing (2001b).** CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 902-908.
- Grass, G. und C. Rensing (2001c).** Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 2145-2147.
- Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith und C. Rensing (2002).** ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 864-866.
- Grass, G., K. Thakali, P. E. Klebba, D. Thieme, A. Muller, G. F. Wildner und C. Rensing (2004).** Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 5826-5833.

- Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire und C. Rensing (2005a).** The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* 187: 1604-1611.
- Grass, G., M. Otto, B. Fricke, C. J. Haney, C. Rensing, D. H. Nies und D. Munkelt (2005b).** FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* 183: 9-18.
- Griffith, K. L. und R. E. Wolf (2002).** Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 397-402.
- Griffith, O. W. (1980).** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212.
- Grosse, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder und D. H. Nies (2004).** Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Arch Microbiol* 182: 109-118.
- Grosse, C., S. Friedrich und D. H. Nies (2007).** Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 227-240.
- Grosse, C., G. Schleuder, C. Schmole und D. H. Nies (2014).** Survival of *Escherichia coli* cells on solid copper surfaces is increased by glutathione. *Appl Environ Microbiol* 80: 7071-7078.
- Guo, Y., K. Smith, J. Lee, D. J. Thiele und M. J. Petris (2004).** Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J Biol Chem* 279: 17428-17433.
- Halliwell, B. und J. M. C. Gutteridge (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
- Halliwell, B. und J. M. Gutteridge (1990).** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- Hassan, H. M. und I. Fridovich (1977).** Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 129: 1574-1583.
- Hassani, B. K., C. Astier, W. Nitschke und S. Ouchane (2010).** CtpA, a copper-translocating P-type ATPase involved in the biogenesis of multiple copper-requiring enzymes. *J Biol Chem* 285: 19330-19337.
- He, S. Y., Z. R. Guo, Y. Zhang, S. Zhang und J. W. N. Gu (2007).** Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters* 61: 3984-3987.
- Helbig, K., C. Bleuel, G. J. Krauss und D. H. Nies (2008a).** Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 5431-5438.
- Helbig, K., C. Grosse und D. H. Nies (2008b).** Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 5439-5454.

- Herzberg, M., L. Bauer und D. H. Nies (2014).** Deletion of the *zupT* gene for a zinc importer influences zinc pools in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* 6: 421-436.
- Hobman, J. L., J. Wilkie und N. L. Brown (2005).** A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. *Biometals* 18: 429-436.
- Holmgren, A. (1985).** Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-271.
- Huffman, D. L., J. Huyett, F. W. Outten, P. E. Doan, L. A. Finney, B. M. Hoffman und T. V. O'Halloran (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.
- Ibanez, M. M., S. Cerminati, S. K. Checa und F. C. Soncini (2013).** Dissecting the metal selectivity of MerR monovalent metal ion sensors in *Salmonella*. *J Bacteriol* 195: 3084-3092.
- Imlay, J. A. und S. Linn (1988).** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309.
- Imlay, J. A. (2008).** Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77: 755-776.
- Inesi, G., R. Pilankatta und F. Tadini-Buoninsegni (2014).** Biochemical characterization of P-type copper ATPases. *Biochem J* 463: 167-176.
- Janssen, P. J., R. Van Houdt, H. Moors, P. Monsieurs, N. Morin, A. Michaux, M. A. Benotmane, N. Leys, T. Vallaey, A. Lapidus (2010).** The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* 5: e10433.
- Jian, X., E. C. Wasinger, J. V. Lockard, L. X. Chen und C. He (2009).** Highly sensitive and selective gold(I) recognition by a metalloregulator in *Ralstonia metallidurans*. *J Am Chem Soc* 131: 10869-10871.
- Jocelyn, P. C. (1995).** Symposium on glutathione. *Biochem Soc Symp* 16: 43.
- Johnston, C. W., M. A. Wyatt, X. Li, A. Ibrahim, J. Shuster, G. Southam und N. A. Magarvey (2013).** Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe. *Nat Chem Biol* 9: 241-243.
- Kabata-Pendias, A. (2011).** Trace elements in soils and plants. *Fourth Edition. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.*
- Kachur, A. V., C. J. Koch und J. E. Biaglow (1998).** Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radic Res* 28: 259-269.
- Kadiiska, M. B. und R. P. Mason (2002).** In vivo copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 58: 1227-1239.
- Kaneko, Y., M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan und P. K. Singh (2007).** The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J Clin Invest* 117: 877-888.

- Karthikeyan, S. und T. J. Beveridge (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms react with and precipitate toxic soluble gold. *Environ Microbiol* 4: 667-675.
- Kashefi, K., J. M. Tor, K. P. Nevin und D. R. Lovley (2001).** Reductive precipitation of gold by dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria and archaea. *Appl Environ Microbiol* 67: 3275-3279.
- Keyer, K. und J. A. Imlay (1996).** Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13635-13640.
- Kim, E. H., C. Rensing und M. M. McEvoy (2010).** Chaperone-mediated copper handling in the periplasm. *Nat Prod Rep* 27: 711-719.
- Kirlin, W. G., J. Cai, S. A. Thompson, D. Diaz, T. J. Kavanagh und D. P. Jones (1999).** Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med* 27: 1208-1218.
- Kirsten, A., M. Herzberg, A. Voigt, J. Seravalli, G. Grass, J. Scherer und D. H. Nies (2011).** Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J Bacteriol* 193: 4652-4663.
- Kittleson, J. T., I. R. Loftin, A. C. Hausrath, K. P. Engelhardt, C. Rensing und M. M. McEvoy (2006).** Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both Cu^I and Ag^I. *Biochemistry* 45: 11096-11102.
- Koch, H. G., C. Winterstein, A. S. Saribas, J. O. Alben und F. Daldal (2000).** Roles of the *ccoGHIS* gene products in the biogenesis of the *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase. *J Mol Biol* 297: 49-65.
- Kosonen, T., J. Y. Uriu-Hare, M. S. Clegg, C. L. Keen und R. B. Rucker (1997).** Incorporation of copper into lysyl oxidase. *Biochem J* 327 (Pt 1): 283-289.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd und K. M. Peterson (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, P. S. Reinach und O. A. Candia (1979).** An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100: 95-97.
- Latinwo, L. M., C. Donald, C. Ikediobi und S. Silver (1998).** Effects of intracellular glutathione on sensitivity of *Escherichia coli* to mercury and arsenite. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 67-70.
- Lee, J. Y., J. G. Yang, D. Zhitnitsky, O. Lewinson und D. C. Rees (2014).** Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science* 343: 1133-1136.
- Legatzki, A., G. Grass, A. Anton, C. Rensing und D. H. Nies (2003).** Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol* 185: 4354-4361.

- Lemire, J. A., J. J. Harrison und R. J. Turner (2013).** Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* 11: 371-384.
- Lengke, M. F., M. E. Fleet und G. Southam (2006a).** Morphology of gold nanoparticles synthesized by filamentous cyanobacteria from gold(I)-thiosulfate and gold(III)-chloride complexes. *Langmuir* 22: 2780-2787.
- Lengke, M. F., B. Ravel, M. E. Fleet, G. Wanger, R. A. Gordon und G. Southam (2006b).** Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold(III)-chloride complex. *Environ Sci Technol* 40.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Dervede, M. Eitinger und B. Friedrich (1994).** The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* 176: 4385-4393.
- Letelier, M. E., A. M. Lepe, M. Faundez, J. Salazar, R. Marin, P. Aracena und H. Speisky (2005).** Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact* 151: 71-82.
- Levchenko, L. A., S. I. Kulakovskaya, A. V. Kulikov, A. P. Sadkov und A. E. Shilov (2000).** Electrochemical and ESR studies of Au-protein from *Micrococcus luteus*. *Appl Biochem Biotechnol* 88: 201-210.
- Levchenko, L. A., A. P. Sadkov, N. V. Lariontseva, E. M. Koldasheva, A. K. Shilova und A. E. Shilov (2001).** Methane oxidation catalyzed by the Au-protein from *Micrococcus luteus*. *Dokl Biochem Biophys* 377: 123-124.
- Levchenko, L. A., A. P. Sadkov, N. V. Lariontseva, E. M. Koldasheva, A. K. Shilova und A. E. Shilov (2002).** Gold helps bacteria to oxidize methane. *J Inorg Biochem* 88: 251-253.
- Lewinson, O., A. T. Lee und D. C. Rees (2009).** A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4677-4682.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui und H. G. Schlegel (1993).** Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* 175: 767-778.
- Lim, C. K. und D. A. Cooksey (1993).** Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 175: 4492-4498.
- Liochev, S. I. und I. Fridovich (2002).** The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 7: 55-57.
- Liu, Z., H. Li, M. Soleimani, K. Girijashanker, J. M. Reed, L. He, T. P. Dalton und D. W. Nebert (2008).** Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 365: 814-820.
- Löffler, M. I. (2013).** Glutathion und putative Glutathiontransporter-Einfluss auf die Metallresistenz in *C. metallidurans*. *Bachelorarbeit*: Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

- Loftin, I. R., S. Franke, S. A. Roberts, A. Weichsel, A. Heroux, W. R. Montfort, C. Rensing und M. M. McEvoy (2005).** A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* 44: 10533-10540.
- Loftin, I. R., S. Franke, N. J. Blackburn und M. M. Mcevoy (2007).** Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of *Escherichia coli* CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorption spectroscopy. *Protein Sci* 16: 2287-2293.
- Long, F., C. C. Su, M. T. Zimmermann, S. E. Boyken, K. R. Rajashankar, R. L. Jernigan und E. W. Yu (2010).** Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature* 467: 484-488.
- Lovley, D. R. (1993).** Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol* 47: 263-290.
- Lovley, D. R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby und S. Goodwin (1993).** *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic-compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol* 159: 336-344.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Ma, Z., P. Chandrangu, T. C. Helmann, A. Romsang, A. Gaballa und J. D. Helmann (2014).** Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 94: 756-770.
- Macomber, L., C. Rensing und J. A. Imlay (2007).** Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 1616-1626.
- Macomber, L. und J. A. Imlay (2009).** The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8344-8349.
- Mana-Capelli, S., A. K. Mandal und J. M. Argüello (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.
- Mandal, A. K., W. D. Cheung und J. M. Argüello (2002).** Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* 277: 7201-7208.
- Mandal, A. K. und J. M. Argüello (2003).** Functional roles of metal binding domains of the *Archaeoglobus fulgidus* Cu⁺-ATPase CopA. *Biochemistry* 42: 11040-11047.
- Mandel, M. und A. Higa (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53: 159-162.
- Marx, C. J. und M. E. Lidstrom (2002).** Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques* 33: 1062-1067.
- Matoba, Y., T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu und M. Sugiyama (2006).** Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J Biol Chem* 281: 8981-8990.

- Mattle, D., O. Sitsel, H. E. Autzen, G. Meloni, P. Gourdon und P. Nissen (2013).** On allosteric modulation of P-type Cu⁺-ATPases. *J Mol Biol* 425: 2299-2308.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du (2001).** Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852-856.
- Mellano, M. A. und D. A. Cooksey (1988).** Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 170: 4399-4401.
- Mergeay, M., C. Houba und J. Gerits (1978).** Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas* [proceedings]. *Arch Int Physiol Biochim* 86: 440-442.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles und F. Van Gijsegem (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* 162: 328-334.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie und R. Wattiez (2003).** *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 385-410.
- Mikolay, A. und D. H. Nies (2009).** The ABC-transporter AtmA is involved in nickel and cobalt resistance of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96: 183-191.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Miller, J. H. (1992).** A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Mills, S. D., C. A. Jasalavich und D. A. Cooksey (1993).** A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 175: 1656-1664.
- Monchy, S., M. A. Benotmane, R. Wattiez, S. van Aelst, V. Auquier, B. Borremans, M. Mergeay, S. Taghavi, D. van der Lelie und T. Vallaey (2006).** Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiology* 152: 1765-1776.
- Monchy, S., M. A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. van der Lelie und M. Mergeay (2007).** Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol* 189: 7417-7425.
- Mosteller, R. D. und R. V. Goldstein (1975).** Unusual sensitivity of *Escherichia coli* to adenine or adenine plus histidine. *J Bacteriol* 123: 750-751.

- Munkelt, D., G. Grass und D. H. Nies (2004).** The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* 186: 8036-8043.
- Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten und T. V. O'Halloran (2000).** Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 182: 5864-5871.
- Nadeau, J. (2012).** Introduction to experimental biophysics. Biological methods for physical scientists. *CRC Press Taylor and Francis Group*.
- Nakamura, M., T. Nakajima, Y. Ohba, S. Yamauchi, B. R. Lee und E. Ichishima (2000).** Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem J* 350 (Pt 2): 537-545.
- Nangia, Y., N. Wangoo, N. Goyal, G. Shekhawat und C. R. Suri (2009).** A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microb Cell Fact* 8: 39.
- Nies, D., M. Mergeay, B. Friedrich und H. G. Schlegel (1987).** Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* 169: 4865-4868.
- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu und S. Silver (1989a).** Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7351-7355.
- Nies, D. H. und S. Silver (1989b).** Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 171: 896-900.
- Nies, D. H. (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, D. H. (2000).** Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* 4: 77-82.
- Nies, D. H. (2003).** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 313-339.
- Nies, D. H. (2004).** Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Arch Microbiol* 181: 255-268.
- Nies, D. H. und S. Silver (2007).** Microbiology Monographs. Molecular Microbiology of Heavy Metals. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Niu, H. und R. S. Houk (1996).** Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim Acta B* 51: 779-815.
- Odermatt, A., R. Krapf und M. Solioz (1994).** Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 44-48.

- Osman, D., K. J. Waldron, H. Denton, C. M. Taylor, A. J. Grant, P. Mastroeni, N. J. Robinson und J. S. Cavet (2010).** Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *J Biol Chem* 285: 25259-25268.
- Osterberg, R., R. Ligaarden und D. Persson (1979).** Copper(I) complexes of penicillamine and glutathione. *J Inorg Biochem* 10: 341-355.
- Outten, C. E. und T. V. O'Halloran (2001).** Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488-2492.
- Outten, F. W., C. E. Outten, J. Hale und T. V. O'Halloran (2000).** Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. *J Biol Chem* 275: 31024-31029.
- Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale und T. V. O'Halloran (2001).** The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 30670-30677.
- Ouyang, H. und H. J. Vogel (1998).** Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies. *Biometals* 11: 213-222.
- Ouzounis, C. und C. Sander (1991).** A structure-derived sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. *FEBS Lett* 279: 73-78.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray (1995).** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4: 2411-2423.
- Pace, C. N. und J. M. Scholtz (1997).** Measuring the conformational stability of a protein by hydrogen exchange. *Protein structure: a practical approach*. IRL press, Oxford, UK: 299-322.
- Padilla-Benavides, T., C. J. McCann und J. M. Argüello (2013).** The mechanism of Cu⁺ transport ATPases: interaction with Cu⁺ chaperones and the role of transient metal-binding sites. *J Biol Chem* 288: 69-78.
- Padilla-Benavides, T., A. M. G. Thompson, M. M. McEvoy und J. M. Argüello (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.
- Palumaa, P. (2013).** Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett* 587: 1902-1910.
- Patel, S. J., T. Padilla-Benavides, J. M. Collins und J. M. Argüello (2014).** Functional diversity of five homologous Cu⁺-ATPases present in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 160: 1237-1251.
- Paulsen, I. T. und M. H. Saier, Jr. (1997).** A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* 156: 99-103.
- Perez Audero, M. E., B. M. Podoroska, M. M. Ibanez, A. Cauherhff, S. K. Checa und F. C. Soncini (2010).** Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors. *Mol Microbiol* 78: 853-865.

- Petersen, C. und L. B. Moller (2000).** Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene* 261: 289-298.
- Pfennig, N. (1974).** *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of Rhodospirillaceae. *Arch Microbiol* 100: 197-206.
- Phung, L. T., G. Ajlani und R. Haselkorn (1994).** P-type ATPase from the cyanobacterium *Synechococcus* 7942 related to the human Menkes and Wilson disease gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9651-9654.
- Pittman, M. S., H. C. Robinson und R. K. Poole (2005).** A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J Biol Chem* 280: 32254-32261.
- Pontel, L. B., M. E. Audero, M. Espariz, S. K. Checa und F. C. Soncini (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.
- Pontel, L. B. und F. C. Soncini (2009).** Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Mol Microbiol* 73: 212-225.
- Pontel, L. B., N. L. Scampoli, S. Porwollik, S. K. Checa, M. McClelland und F. C. Soncini (2014).** Identification of a *Salmonella* ancillary copper detoxification mechanism by a comparative analysis of the genome-wide transcriptional response to copper and zinc excess. *Microbiology* 160: 1659-1669.
- Preisig, O., R. Zufferey und H. Hennecke (1996).** The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. *Arch Microbiol* 165: 297-305.
- Raimunda, D., T. Padilla-Benavides, S. Vogt, S. Boutigny, K. N. Tomkinson, L. A. Finney und J. M. Argüello (2013).** Periplasmic response upon disruption of transmembrane Cu transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics* 5: 144-151.
- Ramanathan, R., M. R. Field, A. P. O'Mullane, P. M. Smooker, S. K. Bhargava und V. Bansal (2013).** Aqueous phase synthesis of copper nanoparticles: a link between heavy metal resistance and nanoparticle synthesis ability in bacterial systems. *Nanoscale* 5: 2300-2306.
- Rapisarda, V. A., L. R. Montelongo, R. N. Farias und E. M. Massa (1999).** Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the *Escherichia coli* respiratory chain. *Arch Biochem Biophys* 370: 143-150.
- Rapisarda, V. A., R. N. Chehin, J. De Las Rivas, L. Rodriguez-Montelongo, R. N. Farias und E. M. Massa (2002).** Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. *Arch Biochem Biophys* 405: 87-94.
- Reith, F., S. L. Rogers, D. C. McPhail und D. Webb (2006).** Biomineralization of gold: biofilms on bacterioform gold. *Science* 313: 233-236.

- Reith, F., M. F. Lengke, D. Falconer, D. Craw und G. Southam (2007). The geomicrobiology of gold. *ISME J* 1: 567-584.
- Reith, F., B. Etschmann, C. Grosse, H. Moors, M. A. Benotmane, P. Monsieurs, G. Grass, C. Doonan, S. Vogt, B. Lai (2009). Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17757-17762.
- Reith, F., L. Fairbrother, G. Nolze, O. Wilhelmi, P. L. Clode, A. Gregg, J. E. Parsons, S. A. Wakelin, A. Pring, R. Hough, G. Southam und J. Brugger (2010). Nanoparticle factories: Biofilms hold the key to gold dispersion and nugget formation. *Geology* 38: 843-846.
- Reith, F., J. Brugger, C. M. Zammit, A. L. Gregg, K. C. Goldfarb, G. L. Andersen, T. Z. DeSantis, Y. M. Piceno, E. L. Brodie, Z. Lu, Z. He, J. Zhou und S. A. Wakelin (2012). Influence of geogenic factors on microbial communities in metallogenic Australian soils. *ISME J* 6: 2107-2118.
- Reith, F., J. Brugger, C. M. Zammit, D. H. Nies und G. Southam (2013). Geobiological cycling of gold: From fundamental process understanding to exploration solutions. *Minerals* 3: 367-394.
- Rensing, C., M. Ghosh und B. P. Rosen (1999). Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 181: 5891-5897.
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra und B. P. Rosen (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 652-656.
- Rensing, C. und G. Grass (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27: 197-213.
- Riccio, P., H. Aquila und M. Klingenberg (1975). Solubilization of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett* 56: 192-132.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing und W. R. Montfort (2002). Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2766-2771.
- Robinson, H., M. C. Ang, Y. G. Gao, M. T. Hay, Y. Lu und A. H. Wang (1999). Structural basis of electron transfer modulation in the purple Cu_A center. *Biochemistry* 38: 5677-5683.
- Robinson, N. J. und D. R. Winge (2010). Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* 79: 537-562.
- Rodriguez-Montelongo, L., L. C. de la Cruz-Rodriguez, R. N. Farias und E. M. Massa (1993). Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1144: 77-84.
- Rodriguez-Montelongo, L., R. N. Farias und E. M. Massa (1995). Sites of electron transfer to membrane-bound copper and hydroperoxide-induced damage in the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 323: 19-26.
- Roh, J. H. und S. Kaplan (2000). Genetic and phenotypic analyses of the *rdx* locus of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* 182: 3475-3481.

- Rost, J. und S. Rapoport (1964).** Reduction-potential of glutathione. *Nature* 201: 185.
- Rouch, D., J. Camakaris, B. T. Lee und R. K. Luke (1985).** Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 131: 939-943.
- Rouch, D. A. und N. L. Brown (1997).** Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiology* 143 (Pt 4): 1191-1202.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer und J. Reizer (1994).** Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11: 841-847.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989).** Molecular Cloning: a laboratory manual. *Sec Edition. Cold Springer Harbor, New York.*
- Samuels, P. J. (1953).** The metabolism of glutathione by bacteria and actions of antibiotics. *J Gen Microbiol* 8: viii.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Sargent, F. (2007).** The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* 35: 835-847.
- Schaedler, T. A., J. D. Thornton, I. Kruse, M. Schwarzlander, A. J. Meyer, H. W. van Veen und J. Balk (2014).** A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *J Biol Chem* 289: 23264-23274.
- Schalk, I. J., M. Hannauer und A. Braud (2011).** New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* 13: 2844-2854.
- Scherer, J. und D. H. Nies (2009).** CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Mol Microbiol* 73: 601-621.
- Schmidt, T. und H. G. Schlegel (1994).** Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* 176: 7045-7054.
- Shaw, C. F. (1999).** Gold-based therapeutic agents. *Chem Rev* 99: 2589-2600.
- Siddiqui, R. A., H. G. Schlegel und M. Meyer (1988).** Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J Bacteriol* 170: 4188-4193.
- Siddiqui, R. A., K. Benthin und H. G. Schlegel (1989).** Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol* 171: 5071-5078.
- Simon, R. (1984).** High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol Gen Genet* 196: 413-420.
- Singh, S. K., S. A. Roberts, S. F. McDevitt, A. Weichsel, G. F. Wildner, G. B. Grass, C. Rensing und W. R. Montfort (2011).** Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): functional role of a methionine-rich sequence. *J Biol Chem* 286: 37849-37857.

- Smirnova, G. V. und O. N. Oktyabrsky (2005).** Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Mosc)* 70: 1199-1211.
- Solioz, M. und A. Odermatt (1995).** Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* 270: 9217-9221.
- Solioz, M. und C. Vulpe (1996).** CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* 21: 237-241.
- Southam, G. und T. J. Beveridge (1994).** The in-vitro formation of placer gold by bacteria. *Geochim Cosmochim Acta* 58: 4527-4530.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Speisky, H., M. Gomez, F. Burgos-Bravo, C. Lopez-Alarcon, C. Jullian, C. Olea-Azar und M. E. Aliaga (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., M. R. Taheri, D. Sieburth und C. T. Martin (1995).** Identification of essential amino acids within the proposed Cu_A binding site in subunit II of cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem* 270: 25363-25369.
- Spurr, A. R. (1969).** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26: 31-43.
- Srinivasan, V., A. J. Pierik und R. Lill (2014).** Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* 343: 1137-1140.
- Stadtman, E. R. (1992).** Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224.
- Steglich, A. (2012).** Die kupfertransportierenden P-Typ ATPasen RdxI und CupA aus *C. metallidurans*. *Bachelorarbeit* Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Steglich, A. (2014).** Charakterisierung des *gig*-Clusters aus *Cupriavidus metallidurans*. *Bachelorarbeit* Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Stoys, S. J. und D. Bagchi (1995).** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321-336.
- Stoyanov, J. V. und N. L. Brown (2003a).** The *Escherichia coli* copper-responsive *copA* promoter is activated by gold. *J Biol Chem* 278: 1407-1410.
- Stoyanov, J. V., D. Magnani und M. Solioz (2003b).** 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 Lett* 546: 391-394.
- Strieker, M., A. Tanovic und M. A. Marahiel (2010).** Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 20: 234-240.

- Su, C. C., F. Yang, F. Long, D. Reyon, M. D. Routh, D. W. Kuo, A. K. Mokhtari, J. D. Van Ornam, K. L. Rabe, J. A. Hoy, Y. J. Lee, K. R. Rajashankar und E. W. Yu (2009).** Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 393: 342-355.
- Su, C. C., F. Long, M. T. Zimmermann, K. R. Rajashankar, R. L. Jernigan und E. W. Yu (2011).** Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature* 470: 558-562.
- Taghavi, S., M. Mergeay und D. van der Lelie (1997).** Genetic and physical maps of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid* 37: 22-34.
- Taghavi, S., C. Lesaulnier, S. Monchy, R. Wattiez, M. Mergeay und D. van der Lelie (2009).** Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96: 171-182.
- Taudte, N. und G. Grass (2010).** Point mutations change specificity and kinetics of metal uptake by ZupT from *Escherichia coli*. *Biometals* 23: 643-656.
- Tetaz, T. J. und R. K. Luke (1983).** Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 154: 1263-1268.
- Thieme, D., P. Neubauer, D. H. Nies und G. Grass (2008).** Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions. *Appl Environ Microbiol* 74: 7463-7470.
- Thorgersen, M. P. und D. M. Downs (2007).** Cobalt targets multiple metabolic processes in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 189: 7774-7781.
- Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau und M. H. Saier, 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.
- Van Houdt, R., S. Monchy, N. Leys und M. Mergeay (2009).** New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Anton Leeuw Int J G* 96: 205-226.
- Vandamme, P. und T. Coenye (2004).** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2285-2289.
- Vanechoutte, M., P. Kampfer, T. De Baere, E. Falsen und G. Verschraegen (2004).** *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 317-327.
- Vatamaniuk, O. K., S. Mari, Y. P. Lu und P. A. Rea (2000).** Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* 275: 31451-31459.

- Velasco, L., S. Mesa, M. J. Delgado und E. J. Bedmar (2001).** Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta* 1521: 130-134.
- Vlassopoulos, D., S. A. Wood und A. Mucci (1990).** Gold speciation in natural waters: II. The importance of organic complexing-Experiments with some simple model ligands. *Geochim Cosmochim Acta* 54: 1575-1586.
- Volentini, S. I., R. N. Farias, L. Rodriguez-Montelongo und V. A. Rapisarda (2011).** Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *Biometals* 24: 827-835.
- Voloudakis, A. E., C. L. Bender und D. A. Cooksey (1993).** Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1627-1634.
- von Rozycki, T. und D. H. Nies (2009).** *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96: 115-139.
- Waldron, K. J. und N. J. Robinson (2009).** How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* 7: 25-35.
- Waldron, K. J., J. C. Rutherford, D. Ford und N. J. Robinson (2009).** Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460: 823-830.
- Weast, R. C. (1984).** CRC handbook of chemistry and physics 64 edn. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA*.
- Weber, K. und M. Osborn (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-4412.
- Wiesemann, N., J. Mohr, C. Grosse, M. Herzberg, G. Hause, F. Reith und D. H. Nies (2013).** Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Bacteriol* 195: 2298-2308.
- Williams-Jones, A. E., R. J. Powell und A. A. Migdisov (2009).** Gold in solution. *Elements* 5: 281-287.
- Wilmot, C. M., J. M. Murray, G. Alton, M. R. Parsons, M. A. Convery, V. Blakeley, A. S. Corner, M. M. Palcic, P. F. Knowles, M. J. McPherson und S. E. Phillips (1997).** Catalytic mechanism of the quinoenzyme amine oxidase from *Escherichia coli*: exploring the reductive half-reaction. *Biochemistry* 36: 1608-1620.
- Witkiewicz, P. L. und C. F. Shaw (1981).** Oxidative cleavage of peptide and protein disulfide bonds by gold(III): a mechanism for gold toxicity. *J Chem Soc Chem Comm*: 1111-1114.
- Wunderli-Ye, H. und M. Solioz (2001).** Purification and functional analysis of the copper ATPase CopA of *Enterococcus hirae*. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 713-719.

- Xu, Y., B. Y. Yun, S. H. Sim, K. Lee und N. C. Ha (2009).** Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Escherichia coli* CusB. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65: 743-745.
- Yang, C. H., J. A. Menge und D. A. Cooksey (1993).** Role of copper resistance in competitive survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Appl Environ Microbiol* 59: 580-584.
- Yang, X. und K. Ma (2010).** Characterization of a thioredoxin-thioredoxin reductase system from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* 192: 1370-1376.
- Zakim, D. und A. W. Scotto (1989).** Spontaneous insertion of integral membrane proteins into preformed unilamellar vesicles. *Methods Enzymol* 171: 253-264.
- Zumft, W. G. (2005).** Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem* 99: 194-215.

7 Anhang

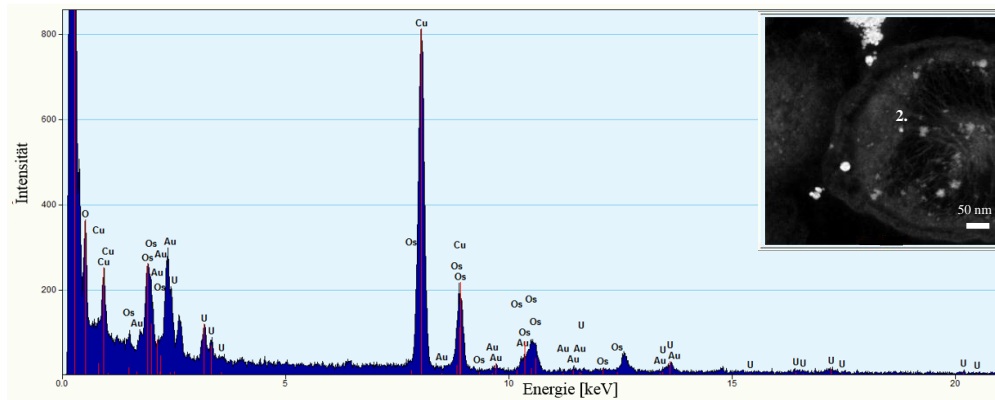


Abb. 36: Transmissionselektronenmikroskopie eines *C. metallidurans* Dünnschnittes mit EDX-Analyse. EDX-Analyse eines im Cytoplasma lokalisierten Goldnanopartikels. Die weiße Zahl im STEM-Bild zeigt die Nanostruktur, die während der EDX-Analyse gescannt wurden. Bei dem 8 nm großen Partikel im Cytoplasma konnte Gold als Bestandteil identifiziert werden. Daneben konnten die Fixierungsreagenzien Osmium und Uran sowie Kupfer vom Trägernetzchen detektiert werden. Die technische Betreuung des Gerätes wurde von Lutz Berthold vorgenommen (Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik, Halle).

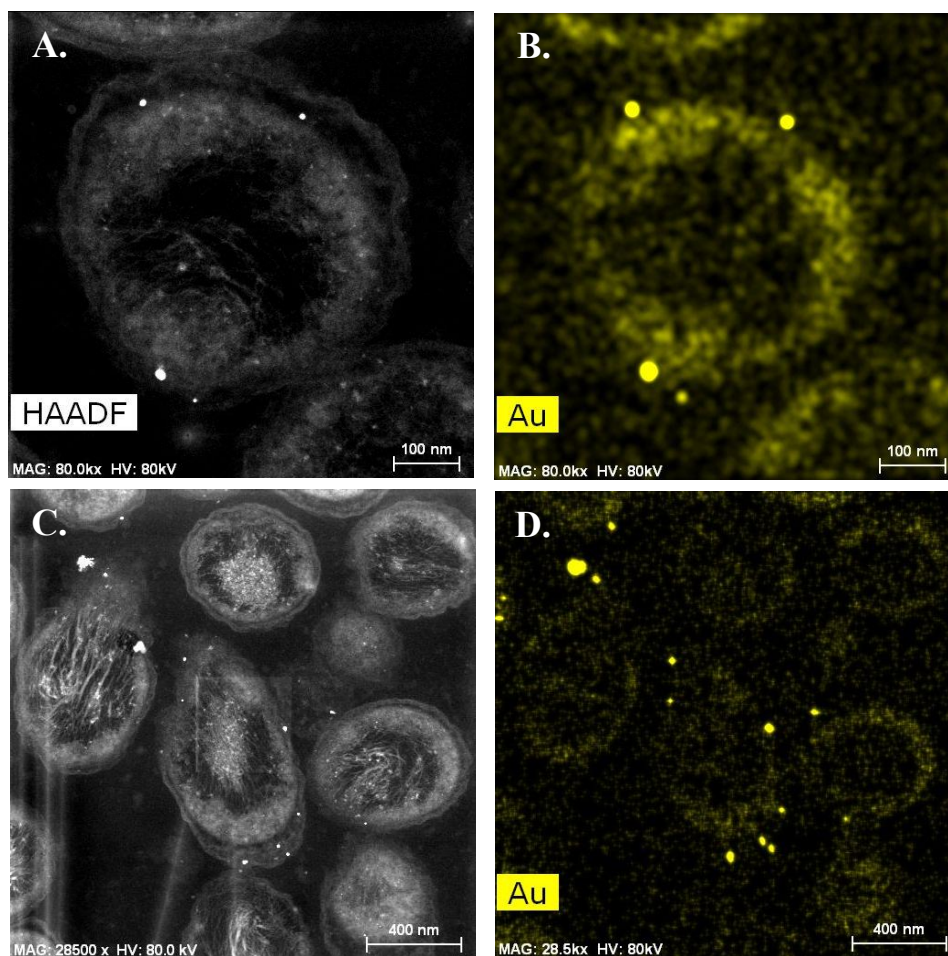


Abb. 37: Inkubation von AE104 mit AuHCl₄. Der Stamm AE104 wurde mit 50 μ M AuHCl₄ für 72 h kultiviert. A./C. STEM-Aufnahme mit HAADF-Detektor, B./D. HAADF-STEM kombiniert mit EDX-Nanoanalytik um eine direkte Korrelation der Abbildung mit der lokalen Goldzusammensetzung zu erhalten (XEDS-energy dispersive X-ray spectrometry, Goldkanal [La₁] in gelb gezeigt). Die Aufnahmen und die Auswertungen erfolgten durch Lutz Berthold (Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik, Halle).

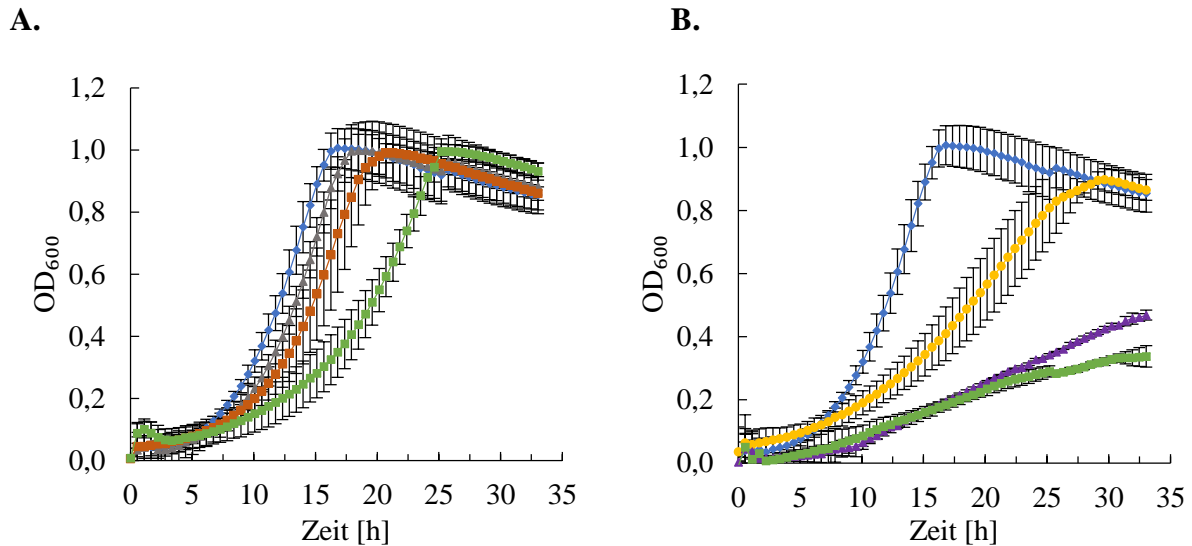


Abb. 38: Zeitabhängiges Wachstumsverhalten von CH34 zeigte den Einfluss einer Vorinkubation mit CuCl_2 auf die Goldresistenz. Aus einer Vorkultur der frühen stationären Phase wurde eine zweite Vorkultur 5%ig in frischem Medium verdünnt und ohne bzw. mit CuCl_2 für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wurde 2%ig in frischem Tris-MM verdünnt und in Anwesenheit von A. $5 \mu\text{M AuHCl}_4$ oder B. $10 \mu\text{M AuHCl}_4$ inkubiert. Das Zellwachstum wurde bis zum Erreichen der stationären Phase im TECAN Infinite 200 PRO reader verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

A. \blacklozenge CH34, \blacktriangle $5 \mu\text{M AuHCl}_4$, \blacklozenge Vorinkubation mit $5 \mu\text{M CuCl}_2$ oder \blacklozenge Vorinkubation mit $200 \mu\text{M CuCl}_2$
 B. \blacklozenge CH34, \bullet $10 \mu\text{M AuHCl}_4$, \blacklozenge Vorinkubation mit $50 \mu\text{M CuCl}_2$ oder \blacklozenge Vorinkubation mit $200 \mu\text{M CuCl}_2$

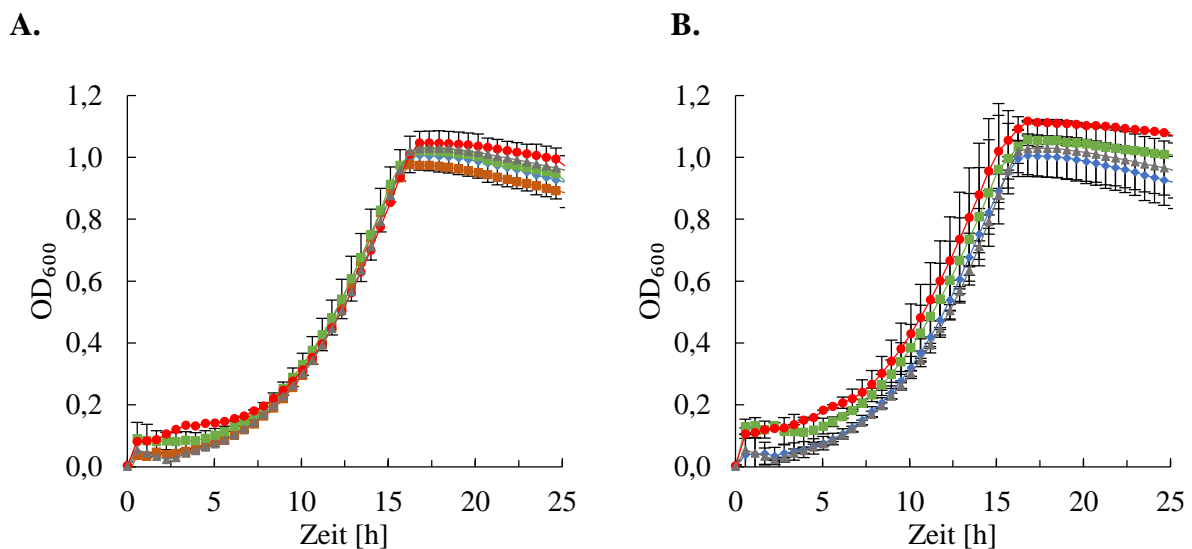


Abb. 39: Zeitabhängiges Wachstumsverhalten von CH34 zeigte keinen Einfluss einer Vorinkubation mit AuHCl_4 auf die Kupferresistenz. Aus einer Vorkultur der frühen stationären Phase wurde eine Mittelkultur 5%ig in frischem Medium verdünnt und ohne bzw. mit A. $2,5 \mu\text{M AuHCl}_4$ und B. $5 \mu\text{M AuHCl}_4$ für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wurde 2%ig in frischem Tris-MM verdünnt und in Anwesenheit von CuCl_2 inkubiert. Das Zellwachstum wurde bis zum Erreichen der stationären Phase im Tecan Infiniti 200 PRO reader verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten. \blacklozenge CH34, \blacktriangle $500 \mu\text{M CuCl}_2$, Vorinkubation mit A. $2,5 \mu\text{M AuHCl}_4$ und B. $5 \mu\text{M AuHCl}_4$; \blacklozenge $100 \mu\text{M CuCl}_2$, \blacklozenge $200 \mu\text{M CuCl}_2$, \bullet $500 \mu\text{M CuCl}_2$

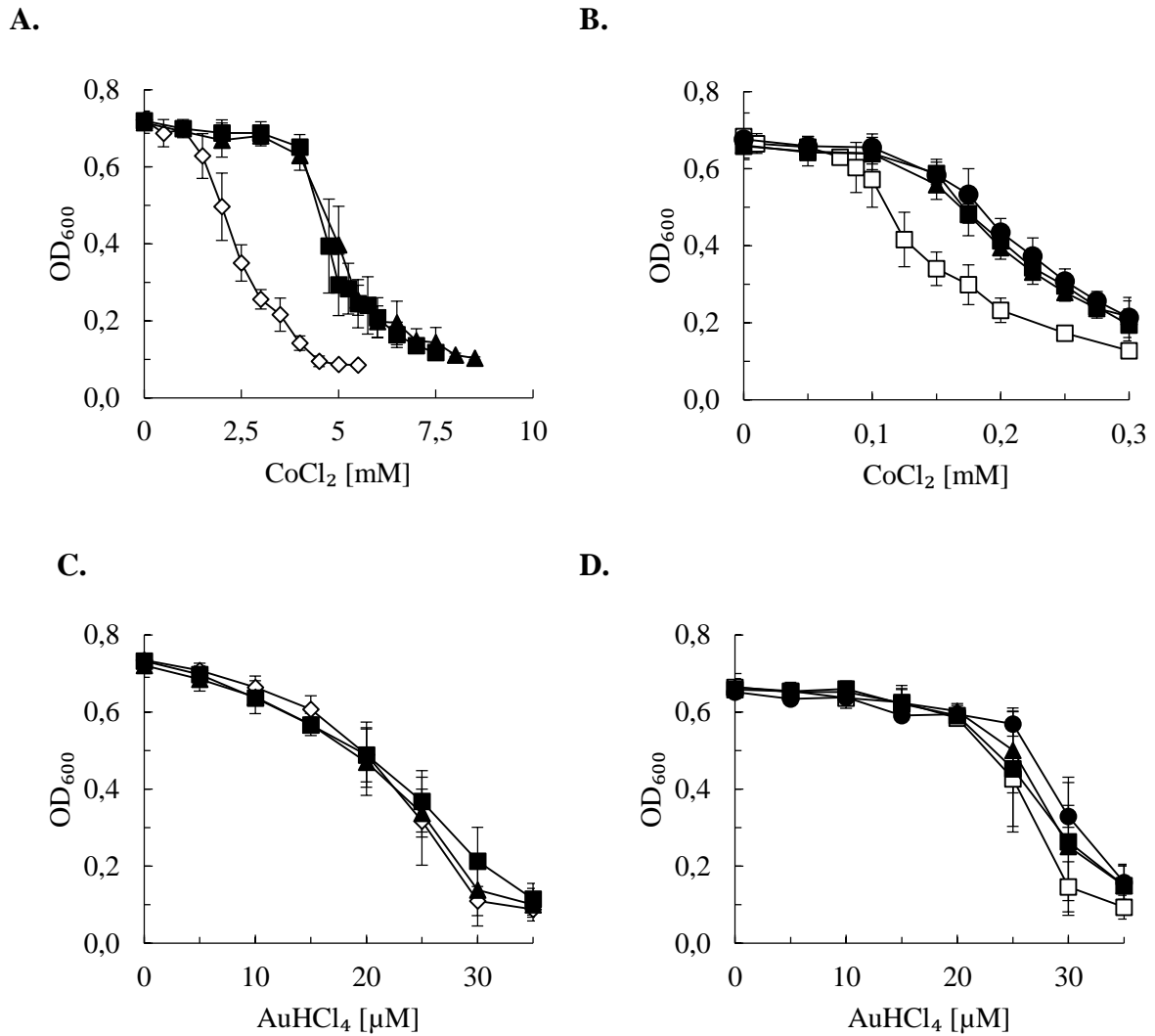


Abb. 40: Einfluss einer Kobaltvorinkubation auf die Kobalt- und Goldresistenz von CH34 (A.,C.) und AE104 (B., D.). Die Zellen von *C. metallidurans* wurden bis zur frühen stationären Phase in Tris-MM bei 30°C unter Schütteln kultiviert, anschließend eine zweite Vorkultur 5%ig in frischem Tris-MM verdünnt, mit verschiedenen Konzentrationen an CoCl_2 versetzt und für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an CoCl_2 oder AuHCl_4 bei 30°C inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten. A./C.: CH34 (\diamond), Vorinkubation mit 100 μM CoCl_2 (\blacksquare) und 200 μM CoCl_2 (\blacktriangle); B./D.: AE104 (\square), Vorinkubation mit 2,5 μM CoCl_2 (\blacksquare), 5 μM CoCl_2 (\blacktriangle) und 10 μM CoCl_2 (\bullet).

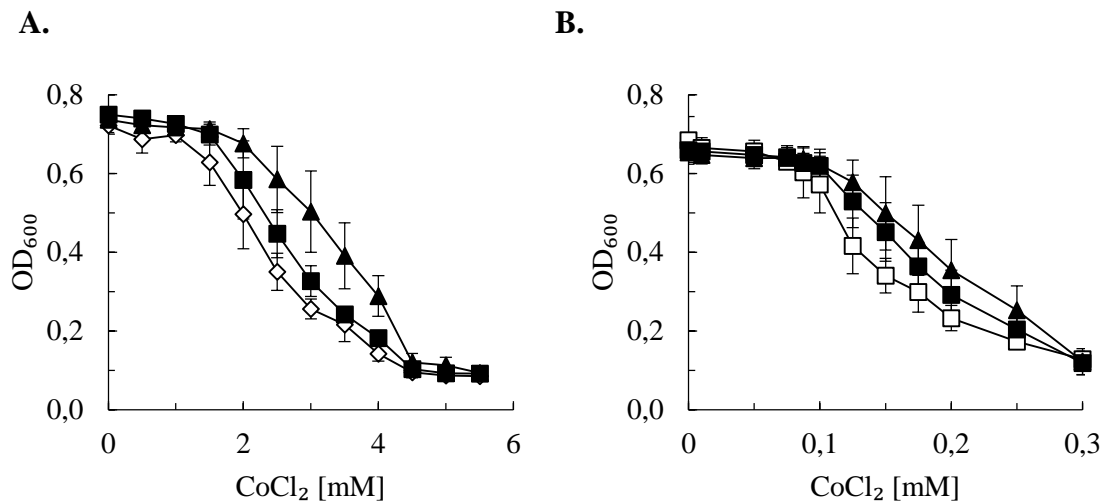


Abb. 41: Einfluss einer Goldvorinkubation auf die Kobaltresistenz von CH34 (A.) und AE104 (B.). Die Zellen von *C. metallidurans* wurden bis zur frühen stationären Phase in Tris-MM bei 30°C unter Schütteln kultiviert, anschließend eine zweite Vorkultur 5%ig in frischem Tris-MM verdünnt, mit verschiedenen Konzentrationen an AuHCl₄ versetzt und für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wurde 10%ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an CoCl₂ bei 30°C inkubiert. Die Optische Dichte wurde bei 600 nm nach 20 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten. A.: CH34 (◇), B.: AE104 (□), Vorinkubation mit 2,5 μM AuHCl₄ (■) und 5 μM AuHCl₄ (▲).

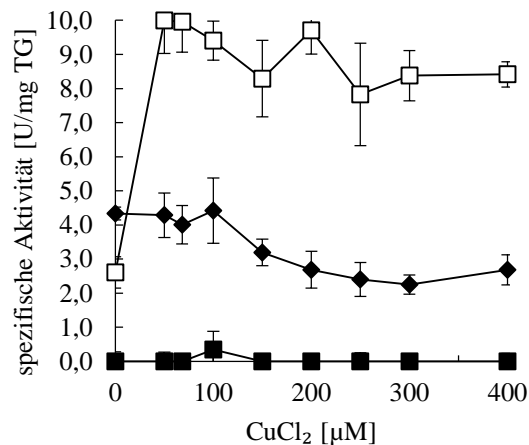
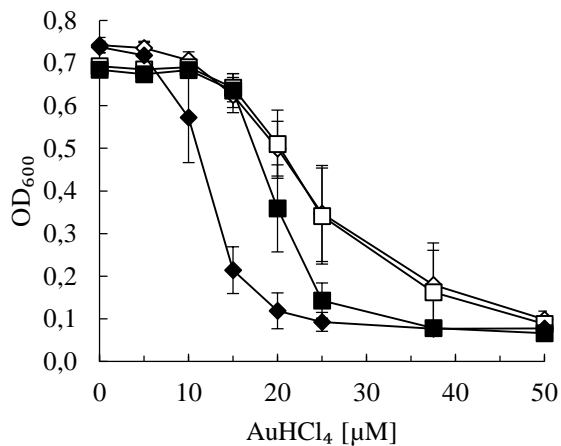


Abb. 42: Induktion einer *cusF-lacZ*- und *copD-lacZ*-Fusion durch CuCl₂ in verschiedenen *C. metallidurans* Stämmen. AE104(φ(*copD-lacZ*)) (◆) und AE104(φ(*cusF-lacZ*)) (□) sowie die Deletionsmutante DN729(Δ*cusCFBA*, φ(*copD-lacZ*)) (■) wurden in Tris-MM bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30°C angezogen, um anschließend eine Hauptkultur zu 30 Klett zu inokulieren. Nach Erreichen der Verdopplung wurden die Kulturen nachfolgend zur Induktion der Genexpression für weitere 3 h bei 1300 rpm mit verschiedenen Konzentrationen an CuCl₂ inkubiert. Die gewonnenen Zellpellets dieser Kulturen wurden zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

A.

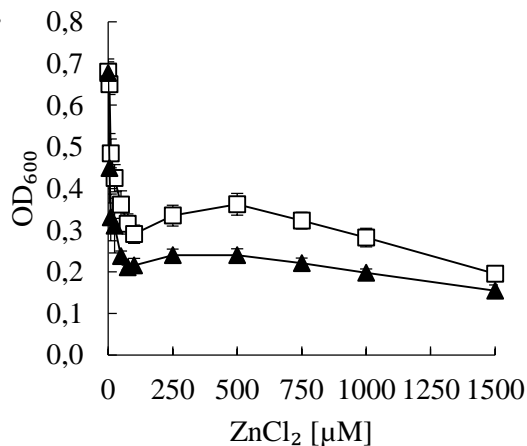


B.

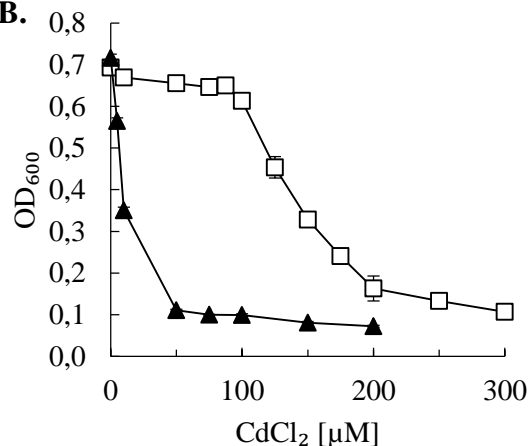
Stamm	Genotyp	MIC	
		AuHCl ₄ [µM]	CuCl ₂ [mM]
CH34		0,8	2,0±0,06
DN685	$\Delta copABCD$	0,7	1,875
AE104		0,8	1,81±0,06
DN686	$\Delta copABCD$	0,7	1,125

Abb. 43: Goldresistenz der *C. metallidurans* $\Delta copABCD$ -Deletionsmutanten. A. Wachstumsendpunktbestimmungen, die wie unter 2.5.1.3 durchgeführt wurden und B. Bestimmung der MIC von AuHCl₄ und CuCl₂ auf Festmedium, durchgeführt wie unter 2.5.2 beschrieben. A. CH34 (◇), AE104 (□), DN685(CH34 $\Delta copABCD$) (◆), DN686(AE104 $\Delta copABCD$) (■). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens sieben unabhängigen Experimenten.

A.



B.



C.

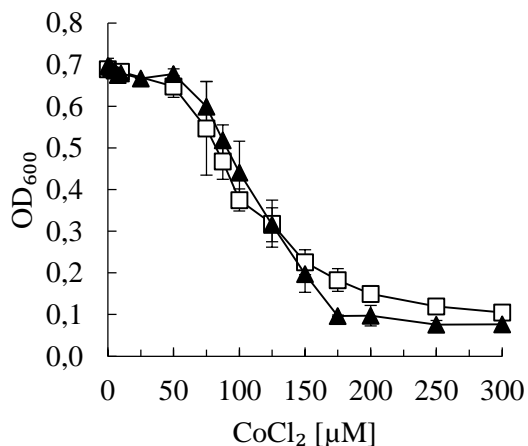
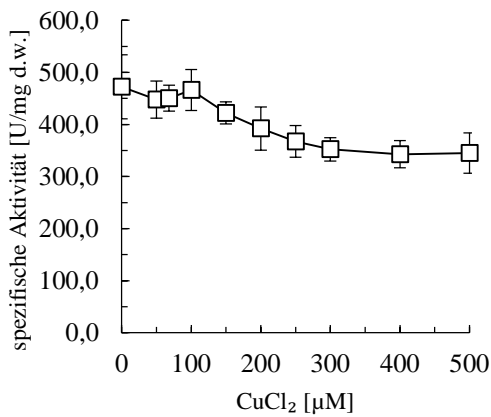


Abb. 44: Schwermetallresistenz der Stämme AE104 und DN710($\Delta gshA$). Die Zellen des Stammes AE104 (□) und DN710($\Delta gshA$) (▲) wurden bei 30°C in Tris-MM bis zur frühen stationären Phase kultiviert, 5%ig in frischem Tris-MM verdünnt und für weitere 24 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur 10%ig in Tris-MM angeimpft, mit verschiedenen Konzentrationen an A. ZnCl₂, B. CdCl₂ und C. CoCl₂ inkubiert und nach 20 h die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

A.



B.

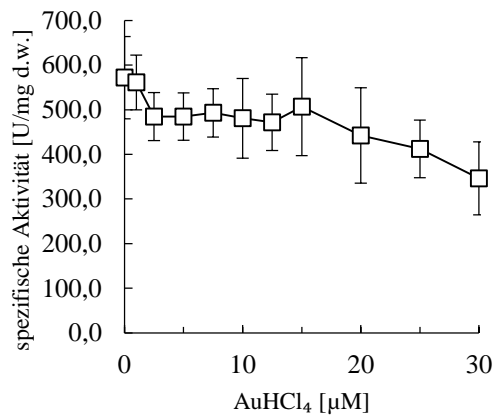
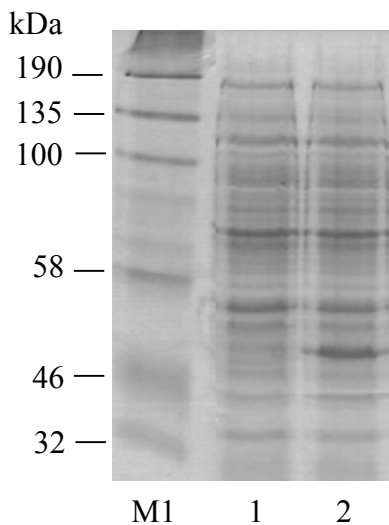


Abb. 45: Induktion einer *gshB-lacZ*-Fusion durch CuCl_2 und AuHCl_4 . AE104(ϕ (*gshB-lacZ*)) (\square) wurde in Tris-MM bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30°C angezogen, um anschließend eine Hauptkultur zu 30 Klett zu inokulieren. Nach Erreichen der Verdopplung wurden die Kulturen nachfolgend zur Induktion der Genexpression für weitere 3 h bei 1300 rpm mit verschiedenen Konzentrationen an A. CuCl_2 und B. AuHCl_4 inkubiert. Die gewonnenen Zellpellets dieser Kulturen wurden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

A.



B.

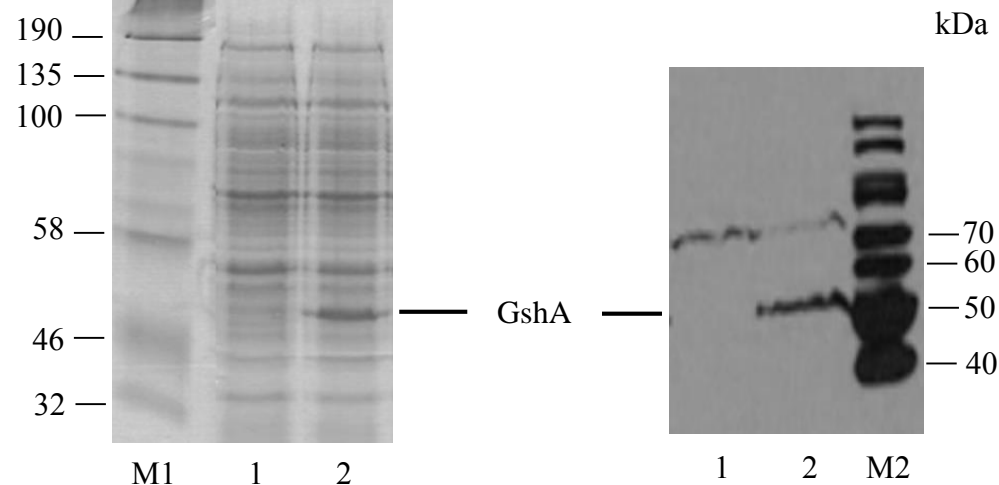
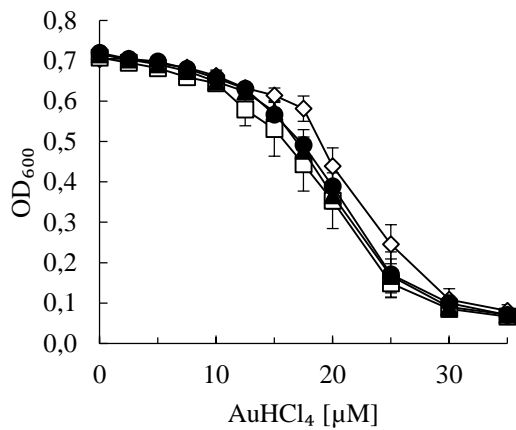


Abb. 46: Nachweis von GshA in dem Komplementationsstamm DN710(Δ *gshA*, pECD1231). Die Anzucht der Stämme erfolgte in einer Vor- und Mittelkultur wie unter 2.5.1.3 beschrieben. In einer Hauptkultur mit Tris-MM wurden die Stämme für 20 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Es wurden A. 50 μg Proteingehalt für die unspezifische Färbung mit Coomassie-Blau und B. 75 μg Proteingehalt für den immunologischen Nachweis von GshA mittels *StrepTactin*-Peroxidase-Konjugat nach Western-Blot aufgetragen. 1. DN710(Δ *gshA*, pBBR1-MCS2) 2. DN710(Δ *gshA*, pECD1231). Zur Größenbestimmung wurden die Proteinmarker (M1) *Blue Protein Standard broad Range Ladder* (#P7706) (NEB GmbH, Frankfurt am Main) und (M2) *PageRuler Unstained Protein Ladder* (#SM26614) (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

A.



B.

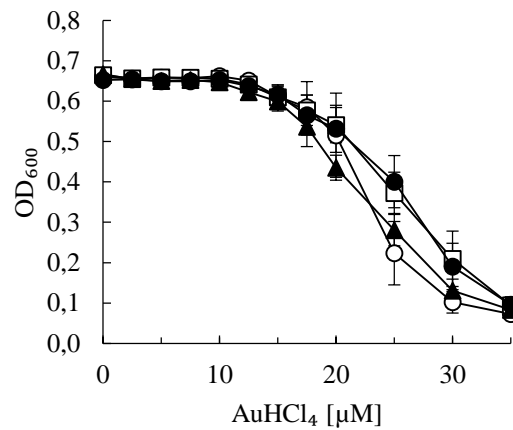


Abb. 47: Schwermetallresistenz der Reduktase-Disruptionsmutanten. Die Zellen wurden bei 30°C in Tris-MM bis zur frühen stationären Phase kultiviert, 5% ig in frischem Tris-MM verdünnt und für weitere 24 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur 10% ig in Tris-MM angeimpft und mit verschiedenen Konzentrationen an AuHCl₄ inkubiert und nach 20 h die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

A. CH34 (◇), DN689(Δdisr.*merA4*) (●), DN691(Δdisr. *arsC1*) (□), DN693(Δdisr. *arsC2*) (▲)

B. AE104 (○), DN690(Δdisr. *merA4*) (●), DN692 (Δdisr. *arsC1*) (□), DN694(Δdis. *arsC2*) (▲)

Tab. 14: Analyse der Schwermetallgehalte von 187 Bodenproben und deren Relevanz für die Existenz der Plasmide pMOL28 und pMOL30.

1.

Element	$\mu\text{g/g}^{\text{a}}$				Min	MIC ^b CH34 [μM]	MIC ^c [$\mu\text{g Metall/g TMM}$]	Max/MIC ^d
	Mittelwert	Median	Max	Min				
Ni	25,44	11,89	428,40	3,28	5500	3228,50	0,13	
Cu	20,77	13,58	105,88	1,04	2000	1271,00	0,08	
Zn	27,08	9,60	90,40	4,80	13000	8499,40	0,01	
Co	11,76	5,45	43,37	0,01 ^e	12500	7366,25	0,01	
Ag	0,06	0,02	0,72	0,02 ^e	0,4	0,43	1,67	
Au	0,12	0,08	1,10	0,01 ^e	1	1,97	0,56	

2.

Element	$\mu\text{g/g}^{\text{a}}$				Min	MIC ^b AE104 [μM]	MIC ^c [$\mu\text{g Metall/g TMM}$]	Max/MIC ^d
	Mittelwert	Median	Max	Min				
Ni	25,44	11,89	428,40	3,28	360±83	211,32±48,72	2,10±0,5	
Cu	20,77	13,58	105,88	1,04	2000	1271	0,08	
Zn	27,08	9,60	90,40	4,80	125	81,73	1,11	
Co	11,76	5,45	43,37	0,01 ^e	500±100	294,65±58,93	0,15±0,03	
Ag	0,06	0,02	0,72	0,02 ^e	0,4	0,43	1,67	
Au	0,12	0,08	1,10	0,01 ^e	1	1,97	0,56	

^aAus den geochemischen Daten der 187 Bodenproben aus vier goldhaltigen Standorten (Old Pirate, Tomakin Park, Wildcat, Humpback) (Reith *et al.*, 2012) wurde der Mittelwert kalkuliert, sowie das Maximum und Minimum der Elemente angegeben. ^b MIC von *C. metallidurans* CH34 (Grosse *et al.*, 2007; Wiesemann *et al.*, 2013) und ^{2b} MIC von AE104 (Grosse *et al.*, 2007; Kirsten *et al.*, 2011; Wiesemann *et al.*, 2013) auf TMM-Agarplatten wurde mit der Atommasse des spezifischen Metalls multipliziert, woraus sich ^c Die MIC in der Einheit $\mu\text{g Metall pro g TMM}$ ergab. ^d Der maximale Gehalt wurde durch diese MIC-Werte dividiert. ^e Detektionsgrenze

Tab. 15: Analyse der Schwermetallgehalte an vier australischen Goldminen und die Relevanz für *E. coli*.

Element	$\mu\text{g/g}^a$					MIC ^b <i>E.coli</i> [μM]	MIC ^c [$\mu\text{g Metall/g TMM}$]	Max/MIC ^d
	Mittelwert	Median	Max	Min				
Ni	25,44	11,89	428,40	3,28	1000	58,7	7,30	
Cu	20,77	13,58	105,88	1,04	1000	63,55	1,67	
Zn	27,08	9,60	90,40	4,80	1000	65,38	1,38	
Co	11,76	5,45	43,37	0,01 ^e	1000	58,93	0,74	
Ag	0,06	0,02	0,72	0,02 ^e	20	2,1574	0,33	
Au	0,12	0,08	1,10	0,01 ^e	20	3,9394	0,28	

^aAus den geochemischen Daten der 187 Bodenproben aus vier goldhaltigen Standorten (Old Pirate, Tomakin Park, Wildcat, Humpback) (Reith *et al.*, 2012) wurde der Mittelwert kalkuliert, sowie das Maximum und Minimum der Elemente angegeben. ^b MIC von *E. coli* auf TMM-Agarplatten (Nies, 2000) wurde mit der Atommasse des spezifischen Metalls multipliziert, woraus sich ^c Die MIC in der Einheit $\mu\text{g Metall pro g Tris-Minimalmedium}$ ergab. ^d Der maximale Gehalt wurde durch diese MIC-Werte dividiert. ^e Detektionsgrenze

Tab. 16: Geochemische Daten der 187 goldhaltigen Bodenproben an vier australischen Goldminen (Reith *et al.*, 2012).

Elemente	Old Pirate [$\mu\text{g/g}$]		Tomakin Park [$\mu\text{g/g}$]		Wildcat [$\mu\text{g/g}$]		Humpback [$\mu\text{g/g}$]	
	Mittelwert	Max	Mittelwert	Max	Mittelwert	Max	Mittelwert	Max
Ni	19,06	428,40	8,04	15,60	48,85	274,54	25,82	40,46
Cu	8,91	39,20	5,63	11,38	47,93	105,88	20,63	55,36
Zn	12,25	90,40	27,47	60,06	45,90	83,15	22,72	35,22
Mn	161,18	339,90	187,27	505,00	595,56	828,89	285,56	797,09
Co	4,69	35,88	11,25	25,00	22,66	43,37	8,46	22,37
As	19,30	205,60	67,95	240,00	3,47	11,10	3,67	5,40
Ag	0,09	0,08	n.d.	n.d.	0,03	0,07	0,04	0,46
Au	0,09	0,30	0,27	0,68	0,03	0,11	0,09	0,60

^e Detektionsgrenze

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. D.H. Nies für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, vorallem aber für die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung dieses Themas, die konstruktiven Vorschläge, die stetige Diskussionsbereitschaft und das große Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Vielen Dank für die Aufnahme in Ihrer Arbeitsgruppe.

Dr. F. Reith möchte ich an dieser Stelle für die interdisziplinäre Kooperation danken, für das Interesse an meiner Arbeit und die finanzielle Unterstützung, die das Beenden dieser Arbeit erst ermöglichte.

Dr. Dr. G. Hause danke ich für die Möglichkeit der Elektronenmikroskopie meiner so zahlreichen Proben.

Lutz Berthold vom Fraunhofer Institut danke ich für die schnelle unkomplizierte und aufschlussreiche Kooperation zur Analyse der Goldnanopartikel.

Bedanken möchte ich mich auch bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie für die angenehme Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft (so z.B. Lucy, Anja, Christopher, Falk). Martin dir danke ich für die Unterstützung bei der ICP-MS, den zahlreichen Diskussionen und der guten Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt auch Grit Schleuder für ihre Hinweise und Hilfen im Laboralltag.

Allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung im Laboralltag.

Meinen Eltern, Janine und Thomas verdanke ich es, dass ich nun fast mein großes Ziel erreicht habe. Ich bin unendlich dankbar, dass ihr mir in allen Lebenslagen zur Seite steht, mich unterstützt und mir den nötigen Halt gebt. Ich danke euch dafür, dass ihr immer an mich glaubt und ihr es mir ermöglicht habt, meine Träume jederzeit verwirklichen zu können. Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen. Danke, dass ich euch habe!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Nicole Wieseemann
Geburtsdatum 31.10.1985
Geburtsort Stendal

Promotion

01/2011-10/2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften, Institut für Biologie, Institutsbereich Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie von Prof. Dr. D.H. Nies der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/2014 Beendigung der Dissertationsarbeit mit dem Thema: „Mechanismus der Goldresistenz in *C. metallidurans*“

Schulische und Akademische Ausbildung

10/2008-11/2010 Masterstudium der Molekularen Lebenswissenschaften an der Humboldt-Universität zu Berlin
Schwerpunkte in Mikrobiologie, Bakterienphysiologie, Virologie, Parasitologie, Genetik
Masterarbeit zum Thema „Mutationsanalysen an ABC-Transportern zur Aufnahme positiv geladener Aminosäuren“ in der Arbeitsgruppe Bakterienphysiologie von Prof. Dr. E. Schneider
10/2005-09/2008 Bachelorstudium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin
Schwerpunkte in Mikrobiologie, Bakterienphysiologie
Bachelorarbeit zum Thema „Der Einfluss von Amphipathen auf das Cpx-Sensor-Regulator-System“ in der Arbeitsgruppe Bakterienphysiologie von Prof. Dr. E. Schneider/ Prof. Dr. S. Hunke
07/1996-07/2005 Abitur am Winckelmann-Gymnasium in Stendal
09/1992-06/1996 Grundschule Juri-Gagarin in Stendal

Halle(Saale), April 2015

.....
Nicole Wieseemann

Teile der Arbeit wurden publiziert

Wiesemann, N., J. Mohr, C. Grosse, M. Herzberg, G. Hause, F. Reith und D. H. Nies (2013). Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Bacteriol* 195: 2298-2308.

Wiesemann, N., G. Hause, L. Berthold, B. Etschmann, J. Brugger, G. Martinez-Criado, M. Herzberg, D. Dobritsch, S. Baginsky, F. Reith und D.H. Nies (2015). Synergistic gold-copper detoxification initiates gold grain (trans)formation. (eingereicht).

Eidesstattliche Erklärung

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), April 2015

.....

Nicole Wiesemann