

Untersuchungen zum Mechanismus der Chromatentgiftung

in *Ralstonia metallidurans*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susanne Doris Juhnke

geboren am 28. Juli 1974 in Stendal

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. H. Nies, Martin-Luther-Universität Halle
2. PD Dr. S. Clemens, IPB, Halle
3. PD Dr. M. Hagemann, Universität Rostock

Halle/Saale, 18. März 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006692

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006692>]

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN.....	5
2.1. Bakterienstämme und Plasmide.....	5
2.2. Kultivierungsbedingungen für Bakterien.....	7
2.2.1. Verwendete Nährmedien und Zusätze.....	7
2.2.2. Anzucht und Zellernte.....	9
2.2.3. Stammhaltung.....	10
2.2.4. Anreicherungskulturen aus Bodenproben.....	11
2.3. Molekulargenetische Arbeiten.....	11
2.3.1. Isolierung von DNA.....	11
2.3.1.1. Isolation von Gesamt-DNA nach Marmur (Johnson, 1981).....	11
2.3.1.2. Analytische Megaplasmidisolierung (Nies <i>et al.</i> , 1987).....	12
2.3.1.3. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994).....	13
2.3.1.4. Miniplasmidisolierung (verändert nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	13
2.3.1.5. Plasmidisolierung mittels Quiaprep-Säulen (Quiagen GmbH, Hilden).....	13
2.3.2. Standard-DNA-Techniken.....	14
2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	14
2.3.2.2. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	14
2.3.2.3. Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	14
2.3.2.4. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	15
2.3.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten.....	15
2.3.2.6. Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode.....	15
2.3.2.7. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation (nach Dower <i>et al.</i> , 1988).....	16
2.3.2.8. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> – Klone.....	16
2.3.2.9. Plasmidtransfer in <i>R. metallidurans</i> durch Konjugation.....	17
2.3.2.10. Selektion von rekombinanten <i>R. metallidurans</i> - Klonen bei der homologen Rekombination mit dem Suizidvektor pLO2.....	17
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion.....	18
2.3.3.1. Auswahl der Primer.....	18
2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.3.4. DNA-Sequenzierung.....	22
2.3.5. Taxonomische Einordnung von Bakterien aufgrund der 16S rDNA- Sequenz.....	24
2.4. Versuche zum Zellwachstum.....	24
2.4.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien.....	24
2.4.1.1. Das Klett-Summerson-Colorimeter [Klett MFG Co., New York, USA].....	24
2.4.1.2. Zellanzucht von <i>R. metallidurans</i> -Stämmen bei Wachstumsversuchen.....	24
2.4.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Chromat.....	25
2.5. Enzymologische Methoden.....	25
2.5.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Miller, 1992).....	25
2.5.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte.....	25
2.5.1.2. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	26
2.5.2. Untersuchung der Lokalisierung von Proteinen (nach Rensing <i>et al.</i> , 1997).....	26
2.5.2.1. Zellanzucht, Induktion und Zellernte.....	26
2.5.2.2. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.....	27
2.5.3. Bestimmung der Superoxid-Dismutase Aktivität nach Fridovich.....	27
2.5.4. Bestimmung der Chromatreduktase-Aktivität im Rohextrakt von <i>R. metallidurans</i>	28

2.6. Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.6.1. Proteinexpression und -reinigung über das <i>Strep</i> TagII [®] Protein Purification System (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen).....	28
2.6.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte.....	28
2.6.1.2. Zellaufschluss und Fraktionierung.....	29
2.6.1.3. Native Proteinreinigung mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie.....	30
2.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	30
2.6.2.1. Proteinbestimmung von Membranproteinen (nach Lowry <i>et al.</i> , 1951).....	30
2.6.2.2. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm.....	31
2.6.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford, 1976.....	31
2.6.3. Fällung von Proteinen.....	31
2.6.3.1. Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984).....	31
2.6.3.2. TCA-Fällung.....	32
2.6.4. Elektrophoretische Methoden.....	32
2.6.4.1. Lineare SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970).....	32
2.6.4.2. Native PAGE.....	33
2.6.4.3. Gelshift - Experimente mittels Nativer PAGE (nach Rech <i>et al.</i> , 1996).....	33
2.6.4.4. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot).....	33
2.6.4.5. <i>Strep</i> TagII [®] Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen).....	34
2.6.4.6. Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation auf PVDF-Membranen (nach Blake <i>et al.</i> , 1984).....	34
2.6.5. Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	35
2.6.5.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (nach Weber und Osborn, 1969).....	35
2.6.5.2. Silberfärbung (Rabilloud <i>et al.</i> , 1988; Nesterenko <i>et al.</i> , 1994).....	35
2.6.5.3. Aktivitätsfärbung der SOD in der Nativen PAGE.....	36
2.6.6. <i>In vitro</i> Crosslinking - Experimente.....	36
2.6.6.1. Vernetzung mit Glutaraldehyd.....	36
2.6.6.2. Vernetzung mit Tris - 2,2' - bipyridylruthenium(II)chlorid.....	36
2.7. Transportstudien mit radioaktivem [⁵¹Cr]-Chromat.....	37
2.7.1. Rekonstitutionsexperimente.....	37
2.7.1.1. Herstellung von Liposomen (nach Reidlinger, 1994).....	37
2.7.1.2. Herstellung von Proteoliposomen (nach Racker, 1979).....	37
2.7.1.3. Nachweis eines künstlichen Protonengradienten durch Fluoreszenzlöschung.....	37
2.7.1.4. Aufnahme von [⁵¹ Cr]-Chromat in Proteoliposomen.....	38
2.7.2 Aufnahme von [⁵¹ Cr]-Chromat in Zellen von <i>R. metallidurans</i>	38
2.8. Spektroskopische und Analytische Methoden.....	39
2.8.1. Fluoreszenzspektroskopie.....	39
2.8.1.1. Fluoreszenzspektrum von Proteinen nach Anregung der aromatischen Aminosäuren.....	39
2.8.1.2. Refraktrometrische Konzentrationsbestimmung von GdmHCl.....	39
2.8.2. Circular Dichroismus.....	39
2.8.3. Analytische Elektronenmikroskopie – EDX.....	40
2.8.4. Analytische Ultrazentrifugation.....	40
2.8.5. Elementaranalyse mittels ICP-AES (inductively coupled plasma - atom - emission spectrometrie).....	41
2.8.6. Kolorimetrischer Nachweis von Chrom(VI) in zellfreien Lösungen.....	41
3. ERGEBNISSE.....	42
3.1. <i>Ralstonia metallidurans</i> besitzt die Fähigkeit, Chromat zu reduzieren.....	42
3.1.1. Die Fähigkeit, Chromat zu reduzieren, ist chromosomal kodiert und wird durch die Anwesenheit des Megaplasmids pMOL28 beeinflusst.....	42
3.1.2. Die Chromatreduktion ist nicht durch Chromat induzierbar.....	44
3.1.3. In <i>R. metallidurans</i> AE126 ist die Chromatreduktion sulfatabhängig.....	44
3.1.4. <i>R. metallidurans</i> besitzt eine lösliche, NADH-abhängige Chromat-reduktase-Aktivität.....	46
3.2. <i>R. metallidurans</i> besitzt mindestens zwei Genregionen, die für die Ausbildung einer Chromatresistenz verantwortlich sind.....	47
3.2.1. Die Genorganisation der <i>chr</i> ₁ -Determinante auf pMOL28.....	47

3.2.2. Die chromosomal kodierte <i>chr</i> ₂ -Genregion zeigte hohe Homologie zur Chromatresistenz-Determinante <i>chr</i> ₁	49
3.2.3. Konstruktion von Deletionsmutanten in den <i>chr</i> -Genregionen	49
3.2.4. Einfluss der <i>chr</i> -Gene auf die Chromatresistenz	51
3.2.5. Die Transkription der <i>chr</i> -Genregionen ist durch Chromat induzierbar	53
3.2.6. Der konstitutive <i>chrA</i> ₁ <i>p</i> - und der spezifisch chromatinduzierbare <i>chrB</i> ₁ <i>p</i> Promotor sind für die Transkription der zentralen Gene der <i>chr</i> ₁ Determinante verantwortlich	56
3.3. Nähere Charakterisierung der Chromatresistenz-Determinante <i>chr</i>₁ und der dazugehörigen Genprodukte.....	60
3.3.1. Das ChrA ₁ -Protein, Chromattransporter und zentrales Strukturprotein	60
3.3.1.1. Überexpression und Reinigung des ChrA ₁ -Proteins als N-terminale <i>Strep</i> TagII-Fusion	60
3.3.1.2. Charakterisierung des ChrA ₁ -Proteins mittels spektraler Eigenschaften	61
3.3.1.3. Kann ChrA ₁ als potentieller Chromattransporter Chromat binden?	62
3.3.1.4. Der transmembrane Transport von Chromat durch das ChrA ₁ -Protein konnte nicht nachgewiesen werden	63
3.3.1.5. Ist der Transport von Chromat in <i>R. metallidurans</i> von einem Protonengradienten abhängig?	65
3.3.1.6. ChrA ₁ vermittelt erhöhte Chromat-Sensitivität in <i>E. coli</i> BL21-RP	66
3.3.2. Das ChrB ₁ -Protein – ein neuartiges Protein mit bisher unbekannter Funktion	67
3.3.2.1. Eine Reporterfusion mit Alkalischer Phosphatase zeigte die cytoplasmatische Lokalisation des ChrB ₁ -Proteins	67
3.3.2.2. Überexpression und Reinigung des ChrB ₁ -Proteins als N-terminale <i>Strep</i> TagII Fusion - ChrB ₁ ist membranassoziiert	69
3.3.2.3. Das ChrB ₁ -Protein vermag Chromat zu binden	71
3.3.3. Die membrangebundenen Proteine ChrA ₁ und ChrB ₁ zeigten keine Tendenz zur Oligomerisierung in <i>Crosslinking</i> -Experimenten	73
3.3.4. Das ChrC-Protein ist eine Superoxid-Dismutase	74
3.3.4.1. Überexpression und Reinigung von ChrC als <i>Strep</i> TagII-Fusion	75
3.3.4.2. Das ChrC-Protein ist eine homotetramere, eisenabhängige Superoxid-Dismutase	75
3.4. Anreicherung Chromattoleranter Mikroorganismen aus Bodenproben.....	79
4. DISKUSSION	81
4.1. Chromatresistenz und ihre Verbreitung in Mikroorganismen	81
4.2. Enzymvermittelte Reduktion von Chromat	84
4.3. Die Vermittlung von Chromatresistenz in <i>Ralstonia metallidurans</i>	87
4.4. Der Chromattransporter ChrA ₁ - Das zentrale Strukturprotein der Chromatresistenz-Determinante <i>chr</i> ₁	91
4.5. ChrB- und ChrF- Proteine besitzen eine bei Bakterien und Archaea	98
4.6. Die Funktion des ChrC-Protein bei der Entgiftung von Chromat.....	101
4.7. ChrE ist ein Protein mit Homologie zu Rhodanese-Domänen	104
4.8. Wie wird die Chromatresistenz in <i>R. metallidurans</i> reguliert?.....	106
4.9. Ausblick	110
5. ZUSAMMENFASSUNG	112
6. LITERATURVERZEICHNIS	114
ANHANG	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BLAST	<i>Basic Logic Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
CD	Circular Dichroismus
CDF	<i>cation diffusion facilitator</i> , (Proteinfamilie)
CHAPS	Cholamidopropyldiethyl-ammoniopropan-sulfonat
Ci	Curie
CMC	<i>critical micellar concentration</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
⁵¹ Cr	radioaktives Chrom-Isotop, Halbwertszeit 27.8 Tage
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-terminal	Carboxyterminal
d	Tag
DIN	Deutsche Industrienorm
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dw	Trockengewicht
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	energy dispersive X-ray analysis
ESR	Elektronenspin-Resonanz
EtBr	Ethidiumbromid
FCCP	Carbonylcyanid (p-trifluoromethoxy)phenylhydrazon
g	Gramm
G	Guanin
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Reinstwasser
ICP-AES	Atomemissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IgG	Immunglobulin G

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
M	Molarität
MFP	<i>membrane fusion protein</i> , (Proteinfamilie)
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
min	Minute
ml	Milliliter
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NB	Nährboullion
NBT	Nitrotetrazoliumblau
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
OMF	<i>outer membrane factor</i> , (Proteinfamilie)
ONPG	o-Nitrophenylgalactopyranosid
ORF	offener Leserahmen
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Membran)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RBS	Ribosomenbindestelle
<i>R. metallidurans</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>
RNase	Ribonuclease
RND	<i>resistance, nodulation, cell division</i> , (Proteinfamilie)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOO	Superoxid-Oxidase
SOR	Superoxid-Reduktase
spez.	spezifisch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-HCl/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
WHO	World Health Organisation
U	Unit

UV/VIS	<i>ultraviolett/visible</i>
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt (Leistung)
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
X-Phosphat	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat

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

Chrom wurde 1797 von dem französischen Chemiker Vauquelin im Rotbleierz entdeckt. Der Name leitet sich aus dem Griechischen (*chromos* = Farbe) ab und liegt in der charakteristischen Farbvielfalt von Chromverbindungen begründet. Der Anteil von Chrom am Aufbau der Erdkruste liegt bei 0.005 Gewichtsprozenten. Dies ist mit den Übergangsmetallen Vanadium, Nickel, Kupfer und Zink vergleichbar (Holleman & Wiberg, 1985).

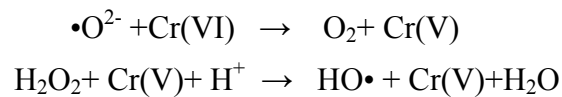
Chrom ist ein Element von großer industrieller Bedeutung. Es lässt sich trotz aller umwelthygienischen Bedenken als „Schlüsselmetall“ in der modernen Werkstofftechnologie nicht mehr wegdenken. Von den jährlich weltweit mehr als elf Millionen Tonnen geförderter Chromerze geht der überwiegende Teil in die metallverarbeitende Industrie, die es als Legierungsbestandteil bei der Stahlherstellung und für galvanisch erzeugte Korrosionsschutzüberzüge einsetzt (Harzdorf, 1990). Weiterhin werden Chromverbindungen häufig in der Keramik-, der Katalysator- sowie der Farbenindustrie und als Fungizide im Gerbereigewerbe verwendet. In der chemischen Industrie dient Cr(VI) als Oxidationsmittel (Stern, 1982).

Chrom kommt hauptsächlich in den Oxidationsstufen III [Cr_2O_3 , $\text{Cr}(\text{OH})_3$] und VI [CrO_4^{2-} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$] vor, die sich in ihren chemischen Eigenschaften stark unterscheiden (McGrath & Smith, 1990). Sowohl die biologische Relevanz als auch die toxische Wirkung von Chrom lassen sich nur im Zusammenhang mit der Oxidationsstufe des Elementes verstehen.

In Mikroorganismen und Pflanzen ist bisher keine biologische Funktion von Chrom bekannt, während Cr(III) in Säugetieren als Spurenelement im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel von Bedeutung ist (Schwarz & Mertz, 1959). Das Oligopeptid Chromodulin bindet vier Cr^{3+} -Ionen und aktiviert die Tyrosinkinase-Aktivität des Insulinrezeptors (Vincent, 1999). Der Transport von Cr^{3+} -Ionen wird von Eisen-Transferrinen übernommen (Clodfelder *et al.*, 2001). Chromodulin und Transferrin sind bisher die einzigen bekannten, biologisch aktiven Chromverbindungen. Chrom-Mangelsymptome sind verminderte Glucosetoleranz und Gewichtsverlust (Anderson, 1995). Mittlerweile gilt es als erwiesen, dass Cr(III) keinen karzinogenen Effekt auf tierische Zellen ausübt, die Toxizität ist vernachlässigbar gering (McCarty, 1997; Dartsch *et al.*, 1998).

Chromat (CrO_4^{2-}) dagegen wirkt bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch, hautallergen und wird als kanzerogen eingestuft (Florez & Perez, 1999). Zwischen der toxischen Wirkung von Chromat und dessen Wirkung als Oxidationsmittel in der Zelle besteht ein direkter Zusammenhang. Chromat wird durch freie thiolhaltige Verbindungen, Pentosen, Glutathion und Flavoenzyme reduziert (Shi *et al.*, 1999). Cr(V)-Intermediate bilden Schlüsselverbindungen bei der Initiation von DNA-Schäden wie Einzelstrangbrüchen und

crosslinks zwischen verschiedenen DNA-Strängen bzw. zwischen DNA und Proteinen (Kawanishi *et al.*, 1986; Zhitkovich *et al.*, 1998; Sudgen & Stearns, 2000). Des Weiteren vermag Chromat die Bildung von Hydroxylradikalen über Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktionen zu katalysieren (Shi & Dalal, 1992), die im Folgenden dargestellt sind:



Die entstehenden Hydroxylradikale können, im Gegensatz zu Superoxidradikalen, nicht enzymatisch entgiftet werden. Damit können sie den Ablauf von Radikalreaktionen in der Zelle initiieren.

Wie kann sich die Zelle vor toxischen Effekten von Schwermetallen schützen? Schwermetallkationen werden in Eukaryoten durch Komplexierung entgiftet: in Tieren und Pilzen durch Metallothioneine (Furey *et al.*, 1986), in Pflanzen und Pilzen durch Phytochelatine (Grill, 1989). Auch in Bakterien wurden Metallothioneine, z. B. SmtA aus *Synechococcus*, beschrieben (Silver & Phung, 1996; Blindauer *et al.*, 2002) und die Bindung von Schwermetallen an Polyphosphate diskutiert (Ogawa *et al.*, 2000). Da Mikroorganismen im Allgemeinen über keine intrazytoplasmatische Kompartimentierung verfügen, kann eine effektive Entgiftung nur über den aktiven Efflux von Schwermetallkationen erfolgen. Der Transport von Metallkationen wird durch verschiedene Proteinfamilien realisiert (Nies, 2003). Eine wichtige Rolle spielen so genannte CPx-Typ-ATPasen, die durch die Hydrolyse von ATP angetrieben werden (Rensing *et al.*, 1999). CDF-Transporter [*cation diffusion facilitator*] sind in die Schwermetall-Homöostase der Zelle involviert (Paulsen & Saier, 1997). Eine weitere wichtige Proteinfamilie bilden die RND-Proteine [*resistance, nodulation, cell division*], die durch die *Proton Motive Force* angetrieben werden (Paulsen *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1999). Sie bilden zusammen mit MFP-Proteinen [*membrane fusion protein*] (Zgurskaya & Nikaido, 2000) und OMF-Proteinen [*outer membrane factor*] (Paulsen *et al.*, 1998) einen membrangebundenen Effluxkomplex. Diese Komplexe katalysieren einen „*transenvelope transport*“ über Zytoplasmamembran, Periplasma und äußere Membran hinweg. Sie können verschiedene Schwermetallresistenzen vermitteln, wie z.B. die CzcCBA-vermittelte Kobalt-Zink-Kadmium-Resistenz (Nies *et al.*, 1987; Nies & Silver, 1989) oder die CnrCBA-vermittelte Kobalt-Nickel-Resistenz in *R. metallidurans* (Grass, 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Schwermetallentgiftung in Mikroorganismen ist die Reduktion. Quecksilberionen (Hg^{2+}) werden zu elementarem Quecksilber reduziert. Dieses kann aufgrund seiner Flüchtigkeit und Lipidlöslichkeit ohne Effluxsysteme durch Zellmembranen nach außen diffundieren (Schiering *et al.*, 1991; Barkey *et al.*, 2003).

Reduktionsprozesse spielen auch bei Schwermetall-Oxyanionen wie Wolframat, Molybdat, Chromat und Selenat eine große Rolle. Die Reduktion kann unter anaeroben und aeroben Bedingungen stattfinden und mit dissimilatorischem Energiegewinn verbunden sein (Lloyd, 2003). Ein gut untersuchtes System ist die Arsenatresistenz in *E. coli*, in dem Reduktion und Efflux eines Anions kombiniert sind. In einem ersten Schritt wird Arsenat durch das ArsC-Protein Glutathion-abhängig zu Arsenit reduziert (Shi *et al.*, 1999). Arsenit wird durch den ArsAB Komplex aus der Zelle transportiert. Dieser Transport wird durch ATP-Hydrolyse energetisiert (Dey & Rosen, 1995; Zhou & Rosen, 1997). Ein spezifischer Efflux von Arsenit ist für die Zelle günstig, da Arsenit intrazellulär nicht mit Phosphat als Strukturanalogon konkurriert.

Im Gegensatz zu den beschriebenen bakteriellen Schwermetallresistenzen gibt es wenig detaillierte Untersuchungen zur Detoxifikation von Chromat. Die Dekontamination von Chromat ist von allgemeinem Interesse, da bei vielen industriellen Prozessen chromhaltiges Aerosol in die Umgebungsluft, oder über Abwässer in die Umwelt gelangt. Die Angaben über den jährlichen globalen Eintrag vor allem anthropogener Emissionen in die Atmosphäre schwanken zwischen 74 und 152×10^3 Tonnen (WHO, 1988). Darüber hinaus gibt es natürliche Kontaminationen. In Serpentin-Böden beispielsweise kommt Nickel als Leitmetall gewöhnlich mit Kobalt und Chromat assoziiert vor. An diesen Schwermetallstress haben sich vor allem Mikroorganismen durch Resistenzsysteme angepasst (Mergeay *et al.*, 1985; Diels & Mergeay, 1990; Nies, 2003).

Mikrobielle Resistenzen gegenüber Chromat beruhen auf Reduktion oder aktivem Efflux. Chromat wird durch Reduktion in das mindertoxische, schwerlösliche Cr(III) überführt, was eine erhöhte Chromattoleranz zur Folge hat. Zur Chromatreduktion ist ein breites Spektrum an Bakterien befähigt (Megharaj *et al.*, 2002; Francisco *et al.*, 2002). Aus *Pseudomonas ambigua* und *Pseudomonas putida* wurden Chromatreduktasen gereinigt und charakterisiert (Suzuki *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2000).

Aktiver Efflux von Chromat über die Zytoplasmamembran wird durch Proteine der CHR-Familie katalysiert (Nies *et al.*, 1998). Vertreter dieser Proteinfamilie sind sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten verbreitet. Näher charakterisiert sind bisher nur die plasmidkodierte ChrA-Proteine aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Ralstonia metallidurans*. Diese sind essentielle Bestandteile von Chromatresistenz-Determinanten (Cervantes *et al.*, 1990; Nies *et al.*, 1990). Für ChrA aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein protonenabhängiger Chromattransport nachgewiesen (Alvarez *et al.*, 1999; Pimentel *et al.*, 2002). In *Ralstonia metallidurans* wurde eine ChrA-abhängige verminderte Akkumulation von radioaktivem Chrom in der Zelle gezeigt (Nies & Silver, 1989).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Chromatmetabolismus in *Ralstonia metallidurans* CH34 näher untersucht. *R. metallidurans* CH34 ist ein β -Proteobakterium, das 1978 aus einem Zinkdekantationstank in Belgien isoliert wurde (Mergeay *et al.*, 1985; Goris *et al.*, 2001). Der Stamm verfügt über eine Vielzahl an Schwermetallresistenz-Systemen gegenüber Zink, Kobalt, Kadmium, Nickel, Kupfer, Quecksilber, Blei und Chromat. Diese Resistenzsysteme verteilen sich auf die zwei Megaplasmide pMOL28 (180 kb, Taghavi *et al.*, 1997) und pMOL30 (238 kb, Mergeay *et al.*, 1985) sowie das Bakterienchromosom. Das Megaplasmid pMOL28 kodiert für eine Resistenz gegen Kobalt und Nickel (*cnr*; Siddiqui *et al.*, 1988; Liesegang *et al.*, 1993; Grass *et al.*, 2000). In unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich die Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ (Nies *et al.*, 1989; Juhnke *et al.*, 2002). Diese Nachbarschaft von *cnr*- und *chr*-Determinante könnte eine Anpassung an die Schwermetallbelastung in Serpentinböden sein, in denen Nickel, Kobalt und Chromat gemeinsam vorkommen (Baker, 1987).

R. metallidurans ist ein geeignetes Untersuchungsobjekt für den Chromatmetabolismus in Mikroorganismen. Der Organismus ist an schwermetallbelastete Standorte angepasst und sowohl zur Chromatreduktion als auch zur verminderten Akkumulation von Chrom befähigt. Die Sequenzierung von *R. metallidurans* CH34 am DOE Joint-Genome Institute im Jahr 2001 führte zu einem enormen Datenzuwachs über Gene, die möglicherweise in die Metallhomöostase des Bakteriums involviert sind (Nies, 2003; Mergeay *et al.*, 2003). So wurde z.B. auf dem Chromosom eine weitere Chromatresistenz-Determinante identifiziert, die hohe Homologie zu *chr*₁ auf pMOL28 aufweist und mit *chr*₂ bezeichnet wurde (Juhnke *et al.*, 2002). Insgesamt besitzt *R. metallidurans* vier Gene, die für ein Transportprotein der CHR-Familie kodieren.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Chromatentgiftung in *R. metallidurans*, die sich aus dem Zusammenspiel von Chromatreduktion und Chromatefflux ergibt. Um die Interaktion der Resistenzdeterminanten untereinander besser zu verstehen, sollte außerdem die Regulation ihrer Transkription untersucht werden. Dazu waren die Genregionen zu identifizieren und charakterisieren, die an der Ausprägung der Chromatresistenz in *R. metallidurans* beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

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

Tabelle 1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>Escherichia coli</i>			
JM83		<i>ara</i> , $\Delta(lac - proAB)$, <i>rpsL</i> , (<i>str</i> ^r), <i>thi</i> , $\Phi 80$, <i>lacZ</i> Δ M15	Yanisch & Perron, 1985
K12		Wildtypstamm, DSM No. 30083	DSZM, Braunschweig
XL1-Blue MRF' kan		$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMRmrr)$ 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^r Δ M15, Tn5 (<i>kan</i> ^r)]	Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue		<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^r Δ M15, Tn10 (<i>tet</i> ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987, Stratagene GmbH, Heidelberg
	pGEM [®] -T Easy	<i>amp</i> ^r , <i>lacPOZ'</i> , zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, WI-USA
	pLO2	Suizid-Rekombinationsvektor in <i>Ralstonia metallidurans</i> , <i>sacB</i> , (<i>kan</i> ^r)	Lenz <i>et al.</i> , 1994
	pLO2-lacZ	Basierend auf pLO2, promotorloses <i>lacZ</i> -Gen	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
	pVDZ'2	IncP1, <i>lacZ'</i> , <i>Mob</i> ⁺ , <i>Tra</i> ⁻ , (<i>tet</i> ^r)	Deretic <i>et al.</i> , 1987
EC206	pDNA206	30 kb-Region aus pMOL28 in pVK102, (<i>tet</i> ^r), (<i>kan</i> ^r), <i>Chr</i> ^r , <i>CobA</i> ^r	Nies <i>et al.</i> , 1989
ECA75	pDNA388	200 bp upstream von <i>chrA₁</i> (Promotorbereich <i>chrA_{1p}</i>) in Transkriptionsfusion mit <i>lacZ</i> , Derivat von pVDZ'2	diese Arbeit
ECA76	pDNA389	200 bp upstream von <i>chrB₁</i> (Promotorbereich <i>chrB_{1p}</i>) in Transkriptionsfusion mit <i>lacZ</i> , Derivat von pVDZ'2	diese Arbeit
BL21	pLys3	F ⁻ <i>dcm</i> , <i>omp</i> , <i>hsdS</i> , (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>lon</i> ⁻ , <i>gal</i> λ , DE3, [pLysS, (<i>cam</i> ^r)], Überexpressionsstamm für <i>StrepTagII</i> [®] -System	Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21-Codon-Plus-RP	pACYC-basiert	<i>argU</i> , <i>proL</i> , (<i>cam</i> ^r), Überexpressionsstamm für <i>StrepTagII</i> [®] -System	Stratagene GmbH, Heidelberg
	pASK-IBA7	Expressionsvektor mit <i>StrepTagII</i> [®] (N-terminal) unter Kontrolle von <i>tetAp</i> , (<i>amp</i> ^r)	IBA GmbH, Göttingen

Fortsetzung Tabelle 1:

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
ECA77	pECD803	<i>chrA</i> ₁ -Gen als <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I-Fragment mit N-terminalem <i>Strep</i> TagII, Expressionsvektor, Derivat von pASK7	diese Arbeit
ECA78	pECD804	<i>chrB</i> ₁ -Gen als <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I-Fragment mit N-terminalem <i>Strep</i> TagII, Expressionsvektor, Derivat von pASK7	diese Arbeit
ECA79	pECD805	<i>chrB</i> ₁ - <i>chrA</i> ₁ -Region als <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I-Fragment mit N-terminalem <i>Strep</i> TagII, Expressionsvektor, Derivat von pASK7	diese Arbeit
ECA80	pECD806	<i>chrC</i> -Gen als <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I-Fragment mit N-terminalem <i>Strep</i> TagII, Expressionsvektor, Derivat von pASK7	diese Arbeit
CC118	pGP1-2	<i>araD</i> 139, (<i>ara-leu</i>)7697, <i>lacX</i> 74, <i>recA</i> 1, <i>rpsE</i> , <i>phoA</i> 20, <i>galE</i> 15, <i>galk</i> 16, <i>thi</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), Stamm zur T7-Expression von Reporterfusionen (<i>kan</i> ^r)	Manoil & Beckwith, 1985; Tabor & Richardson, 1985
	pECD637	pGEM [®] - T Easy-Derivat für Translationsfusionen mit ' <i>phoA</i> ' unter Kontrolle von p _{T7} (<i>amp</i> ^r , <i>kan</i> ^r),	Goldberg <i>et al.</i> , 1999
	pECD618	' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> ', verkürztes <i>blaM</i> ohne Signalsequenz in pECD637 (<i>amp</i> ^r), cytoplasmatische PhoA-Kontrolle, pGEM [®] -T Easy-Derivat	Pribyl, 2001
	pECD619	<i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> ', verkürztes <i>blaM</i> mit Signalsequenz in pECD637 (<i>amp</i> ^r), periplasmatische PhoA-Kontrolle, pGEM [®] -T Easy-Derivat	Pribyl, 2001
ECA81	pECD807	230 bp des 5'-kodierenden Bereichs von <i>chrB</i> ₁ als Translationsfusion mit ' <i>phoA</i> ', Derivat von pECD637	diese Arbeit
<i>R. metallidurans</i>			
AE126	pMOL28	(Chr ^r , Ni ^r , CobA ^r , Mer ^r)	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN421	pMOL28-11	Δ <i>chrI</i> , <i>chrI</i> ::pLO2	Hübener, 2000
DN452	pMOL28-12	Δ <i>chrB</i> ₁	diese Arbeit
DN453	pMOL28-13	Δ <i>chrC</i>	diese Arbeit
DN454	pMOL28-14	Δ <i>chrF</i> ₁ , Φ (<i>chrF</i> ₁ - <i>lacZ</i>), <i>chrF</i> ₁ ::pLO2- <i>lacZ</i>	diese Arbeit
DN459	pMOL28	Δ <i>rpoH</i> (Chromosom), <i>rpoH</i> ::pLO2	diese Arbeit
DN461	pMOL28-15	Φ (<i>chrE</i> - <i>lacZ</i>), <i>chrE</i> ::pLO2- <i>lacZ</i>	diese Arbeit
AE104	plasmidfrei	metallsensitiv	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
DN455	plasmidfrei	Δ <i>chrR</i> , <i>chrR</i> ::pLO2	diese Arbeit
DN456	plasmidfrei	Δ <i>chrB</i> ₂ , <i>chrB</i> ₂ ::pLO2	diese Arbeit
DN457	plasmidfrei	Δ <i>chrA</i> ₂ , <i>chrA</i> ₂ ::pLO2	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 1:

Stamm	Plasmid	wichtige Charakteristika	Referenz/ Herkunft
DN458	plasmidfrei	$\Delta chrF_2$, $\Phi(chrF_2-lacZ)$, $chrF_2::pLO2-lacZ$	diese Arbeit
DN460	plasmidfrei	$\Phi(chrB_2-lacZ)$, $chrB_2::pLO2-lacZ$	diese Arbeit
<u>andere Bakterien</u>			
<i>B. subtilis</i>		Wildtypstamm, DSM No. 10	DSZM, Braunschweig
Isolat 1		Höchste Homologie zu <i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	diese Arbeit
Isolat 2		Höchste Homologie zu <i>Clavibacter luteum</i>	diese Arbeit
Isolat 3		Höchste Homologie zu <i>Exiguobacterium eurantiacum</i>	diese Arbeit
Isolat 4		Höchste Homologie zu <i>Staphylococcus succinus</i>	diese Arbeit
Isolat 5		Höchste Homologie zu <i>Bacillus pseudofirmus</i>	diese Arbeit
Isolat 6		Höchste Homologie zu <i>Bacillus macroides</i>	diese Arbeit
Isolat 7		Höchste Homologie zu <i>Pseudomonas spec.</i>	diese Arbeit
Isolat 8		Höchste Homologie zu <i>Pseudomonas gessardi</i>	diese Arbeit

2.2. Kultivierungsbedingungen für Bakterien

2.2.1. Verwendete Nährmedien und Zusätze

A) Nährbouillon I (NB) (SIFIN GmbH, Berlin)

25 g Nährbouillon I, ad 1 l H₂O_{bidest}

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

B) Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g Natriumchlorid ad 1 l H₂O_{bidest}

Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Dieses Komplexmedium diente der Zellanzucht von *E. coli* - Stämmen.

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

20 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 0.5 g NaCl
 10 ml 0.25 M KCl ad 1 l H₂O_{bidest}

SOB-Medium wurde für die Anzucht von *E. coli* zur Gewinnung elektrokompenter Zellen eingesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in SOC-Medium aufgenommen. Um

dieses zu erhalten, wurden MgSO_4 (5 μl 1 M MgSO_4 / ml) und Glucose (20 μl 1 M Glucose / ml) zu SOB-Medium zugegeben.

D) Spurenelementlösung SL6 (10 fach) nach Pfennig (1974)

900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

0.1 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0.03 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

0.3 g H_3BO_3

0.2 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0.01 g $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0.188 g $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0.03 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

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

Komponente A (20 fach):

800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

121.1 g Tris-HCl

HCl ad pH 7.0

danach Zugabe von:

93.6 g NaCl

29.8 g KCl

21.4 g NH_4Cl

4.0 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0.60 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0.024 g Eisen-Ammonium-Citrat

2 ml Spurenelementlösung SL6 (10 fach) ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Komponente B (20 fach):

900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

19.5 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{H}_2\text{O}$

4.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Komponente B (20 fach) für Tris-low sulfate Medium:

900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

0.2 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{H}_2\text{O}$

4.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Die Komponenten A und B wurden zur Anzucht von *R. metallidurans* im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die einfache Konzentration verdünnt. Bei Anzucht unter Sulfatmangelbedingungen wurde Komponente B für Tris-low sulfate Medium verwendet. Als Kohlenstoffquelle wurden 0.2% (w/v) Natriumgluconat zugesetzt. Für Tris-Minimal-Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 1.5% (w/v), und bei Zugabe von Chromat 2% (w/v) Bacto[®]-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt.

F) GGSY-Medium

Dieses Tris-gepufferte Medium wurde zur Anreicherung chromatresistenter Bakterien genutzt. Dazu wurden die Komponenten A und B (s. 2.2.1., Abschnitt E) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf einfache Konzentration verdünnt. Als Kohlenstoffquelle wurden dem Medium 0.05% Gluconat, 0.05% Succinat, 0.05% Glucose und 0.1% Hefeextrakt zugesetzt.

G) GSP-Medium, *Pseudomonaden*-Selektivagar nach Kielwein (1969)

Natrium-(L+)-glutamat	10 g	
Stärke, wasserlöslich	20 g	
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g	
Magnesiumsulfat	0.5 g	
Phenolrot	0.36 g	
Agar-Agar	12 g	ad 1 l H ₂ O _{bidest}

Zur Selektion wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 100000 i.E. Penicillin-G-Natrium zugesetzt. Das Medium wurde zur Anreicherung von chromatresistenten *Pseudomonaden* aus Bodenproben eingesetzt.

H) Weitere Medienzusätze**Chromatsalze, andere Oxyanionsalze**

Die Salze K₂CrO₄, Na₂MoO₄, Na₂WO₄, K₂MnO₄, Na₂VO₄ lagen als 1 M wässrige Stammlösungen vor. Die Stammlösung wurde in sterilem Medium auf die beschriebenen Endkonzentrationen verdünnt.

Antibiotika und andere Medienzusätze

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

Tabelle 2: Stammlösungen sowie deren Endkonzentration im Medium

Antibiotikum / Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 g/l H ₂ O _{bidest}	125 mg/l
Kanamycin	25 g/l H ₂ O _{bidest}	25 mg/l
Tetracyclin	12.5 g/l 50 % Ethanol	12.5 mg/l
Chloramphenicol	20 g/l Ethanol (96 %)	20 mg/l
IPTG	200 g/l H ₂ O _{bidest}	40 mg/l
X-Gal	200 g/l DMF	48 mg/l
Cycloheximid	5 g/l H ₂ O _{bidest}	50 mg/l

2.2.2. Anzucht und Zellernte

R. metallidurans

Die Anzucht von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte in Tris-gepuffertem Medium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 0.2 % (w/v) Natriumgluconat zugesetzt wurde.

Als Kulturgefäße für die Anzuchten aller Stämme dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei das Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß maximal 1:5 betrug. Die Zugabe von Schwermetallsalzen erfolgte in den beschriebenen Konzentrationen. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C (Brutraum) auf einem

Rotationsschüttler (*HI*, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. Für Wachstumsversuche erfolgte die Zellanzucht in einem Wasserbadschüttler (*Gyrotory G76*, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey) bei 30 °C und 200 rpm. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung mit einem *Klett-Summerson-Colorimeter* (Klett MFG Co., USA) in Kletteinheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30 °C für 1-5 Tage inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder durch Zentrifugation in der *Universal 30 RF*-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen, 4 °C, 5000 rpm, 10 min) oder in der Sigma-Laborzentrifuge (*Sigma 2K15*, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, 4 °C, 12000 rpm).

E. coli

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in NB- oder LB-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben und Seitenarmkolben, wobei auf ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet wurde. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C oder 37 °C (Brutraum) in schräg eingespannten Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler (*HS500*, IKA Labortechnik) oder auf einem Rotationsschüttler (*HI*, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (*Ultraspec II*, LKB Biochrom Ltd., England) oder mit dem *Klett-Summerson-Colorimeter* (Klett MFG Co., USA) in Kletteinheiten (KE) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 30 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert. Die Zellernte erfolgte entweder in der Hettich-Zentrifuge, in der Sigma-Laborzentrifuge oder in der Sigma-Tischzentrifuge wie für *R. metallidurans* beschrieben.

2.2.3. Stammhaltung

Die Kultivierung von *R. metallidurans*-Stämmen erfolgte auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten, wobei den plasmidtragenden Stämmen Schwermetalle zur Selektion zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden alle vier Wochen überimpft, so dass zu jedem Zeitpunkt frisches Koloniematerial zur Verfügung stand.

E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar- bzw. Nähragar-Platten mit Antibiotikum kultiviert. Die Stämme wurden alle vier Wochen auf frische Platten überimpft. Nach der Inkubation bei 30 °C bzw. 37 °C wurden alle Platten im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

Außerdem wurden von Stämmen mit neu konstruierten Plasmiden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden die Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase (200 bis 250 Klett) geerntet, mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.4. Anreicherungskulturen aus Bodenproben

Zur Anreicherung chromattoleranter Mikroorganismen wurden zwei verschiedene Inokuli verwendet. Die erste Probe bestand aus Saalesediment vom Uferbereich der Wilden Saale Höhe Weinbergweg, Halle/S. Die zweite Probe war Bauschutt einer ehemaligen Druckerei (Optima Erfurt), der von der Entsorgungsfirma RST Thale GmbH erhalten wurde und laut Gutachten einen extrem überhöhten Chromatgehalt aufwies. Die Anreicherung erfolgte aerob in Flüssigkulturen bei 30°C für zwei bis sechs Tage. Folgende Medien wurden verwendet:

- GSSY-Medium - ca. 1% Inokulum, 1 mM bzw. 2 mM Chromat
- LB-Medium – nach Pasteurisierung der Bodenprobe (10 min, 80°C) zur Anreicherung von Gram-positiven Sporenbildnern, ca. 1% Inokulum und 1 mM bzw. 2 mM Chromat
- GSP-Medium – zur selektiven Anreicherung von Pseudomonaden, ca. 1% Inokulum, 300 µM Chromat

Die Anreicherungskulturen wurden über mehrere Passagen, die zwischen Flüssigkultur und Agarplatte wechselten, bis zu einem makroskopisch und mikroskopisch einheitlichen Koloniebild gereinigt. Einzelkolonien wurden dann isoliert und zur taxonomischen Einordnung durch Bestimmung der 16S rDNA eingesetzt.

2.3. Molekulargenetische Arbeiten

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 % Ethanol abgerieben, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

2.3.1.1. Isolation von Gesamt-DNA nach Marmur (Johnson, 1981)

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Isolation von Gesamt-DNA, wie sie in abgewandelter Form für viele Bakterien durchführbar ist. Die Methode diente der Isolation genomischer DNA von *Ralstonia metallidurans* AE104, die als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt wurde.

7.5 ml einer Übernachtskultur wurden für 15 min bei 4°C und 4500 rpm abzentrifugiert (Hettich, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde in 7.5 ml Phosphatpuffer [10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8] gewaschen und erneut wie angegeben zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 0.85 ml eiskalter Saccharose-Lösung [250 g/l Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] resuspendiert und dann auf Eis gelagert. Nach vorsichtigem Einmischen von 0.1 ml Lysozym-Lösung [10 g/l Lysozym, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0),

1 mM EDTA] verblieb der Ansatz für 15 min bei 30°C im Wasserbad. Es wurden 1.25 ml Saccharose-Lösung, 0.1 ml Proteinase-K-Lösung [2.5 g/l Proteinase K, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] und 1.25 ml SDS-Lösung [15 g/l] zugegeben, für 3 h bei 37°C und anschließend 15 min bei 55°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden folgende Chemikalien eingemischt: 0.94 ml Natriumperchlorat-Lösung [5 M in sterilem H₂O_{bidest}], 1.25 ml Phenol/NaCl und 1.25 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:1). Nach Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge, Hettich GmbH, Tuttlingen, 5000 rpm, 20°C, 20 min) wurde die Oberphase abgenommen und in ein neues steriles Greinerröhrchen überführt. Die stark viskose Lösung wurde mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (1:1)(v/v) von Phenolresten befreit. Nach erneuter Zentrifugation (s. o., 10min) wurde die wässrige Oberphase abgenommen und in ein neues steriles Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe von 120 µl 10 %iger steriler Essigsäure zur Neutralisation der Lösung. Es schloss sich die Extraktion mit 6 ml Diethylether an. Nach Zentrifugation (s. o., 4°C, 10 min) wurde die Unterphase in ein neues steriles Röhrchen überführt und zum Abdampfen der Diethyletherreste bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 6 ml Ethanol (96 %) bei -20°C über Nacht, wurde dann abzentrifugiert (s. o., 4°C, 30 min) und das erhaltene Pellet in 500 µl sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert. Es schloss sich eine zweite Fällung nach Zugabe von 10 µl steriler 5 M NaCl-Lösung und 1 ml 96% Ethanol für 2 h bei -20°C an. Nach einer Zentrifugation (s. o., 1 h, 12000 rpm, 4°C) wurde das erhaltene Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, dann im Vakuum (Speed Vac SVC 100, Savant) getrocknet und in 250 µl sterilem H₂O_{bidest} bei 50°C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.1.2. Analytische Megaplasmidisolierung (Nies *et al.*, 1987)

Es wurden 25 ml einer *R. metallidurans*- Übernachtskultur abzentrifugiert und in 2 ml E-Puffer [75 mM Tris-Acetat (pH 7.3), 1 mM EDTA] resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lysispuffer [5 Teile 1 N NaOH + 6 Teile 200 g/l SDS + 9 Teile H₂O.] wurde 1 h bei 68 °C inkubiert. Es wurden 400 µl 5 M NaCl und 6 ml Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) auf die heiße Probe gegeben und diese 20mal kräftig aus dem Handgelenk geschwenkt. Um durch Kopräzipitation mit SDS die Proteine besser abzutrennen, wurde der Ansatz anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die wässrige Oberphase 1 h bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die wässrige Phase mit 100 µl 10 %iger Essigsäure neutralisiert und mit 6 ml Diethylether extrahiert. Zur vollständigen Phasentrennung wurde 5 min zentrifugiert. Ether- und Interphase wurden verworfen und verbliebene Etherreste bei 60 °C (10-20 min) verdampft. Die Megaplasmid-DNA wurde mit 6 ml eiskaltem 96 % Ethanol bei -70 °C für 30 min gefällt. Eine anschließende Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge, 5000 rpm, 30 min, 4 °C) führte zur Sedimentation der DNA, die dann in 500 µl H₂O resuspendiert wurde. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl 5 M NaCl und 1 ml 96 % (v/v) Ethanol gefällt (30 min bei -70 °C), mit 70 % Ethanol

gewaschen und getrocknet. Das Megaplasmid-DNA Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und 1 h bei 50 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.3.1.3. Mikroplasmidpräparation (nach Akada, 1994)

Diese Methode diente der Größenabschätzung rekombinanter Plasmide. Auf Grund des geringen Aufwandes konnten so eine Vielzahl von Klonen relativ einfach überprüft werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone wurden in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) sowie 10 µl Stop-Mix [40 % Glycerin (v/v), 1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, 2.5 g/l BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels Vortex Shaker (Vortex Genie2TM, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) für 10 s und Zentrifugation (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, 12000 rpm, 3 min) wurden ca. 25 µl des wässrigen Überstandes im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.3.1.4. Miniplasmidisolation (verändert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Diese Methode diente der schnellen Analyse von Plasmid-DNA, deren Reinheit für Restriktionsanalysen und PCR ausreichend war.

1.5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, 12000 rpm, 3 min, 4°C). Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Lösung I [50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA] vollständig resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung II [0.2 M NaOH, 10 g/l SDS]. Es wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III [3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure] zugesetzt, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation (s. o., 10 min) an. Das Protein-Präzipitat wurde mittels sterilen Zahnstochers entfernt. Der Überstand wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) (v/v) extrahiert, und zur Phasentrennung zentrifugiert (s. o., 10 min). Der wässrige Überstand wurde in ein neues steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol. Nach dem Mischen wurde zentrifugiert (s. o., 1 h, 20°C). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum (Speed Vac SVC 100, Savant) getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem H₂O_{bidest} [mit 0.1 g RNaseA/l] aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.1.5. Plasmidisolation mittels Quiaprep-Spin Säulen (Quiagen GmbH, Hilden)

Diese Methode diente der Gewinnung hochreiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung und zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde. Die DNA wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H₂O_{bidest} eluiert.

Es wurden 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* bei 12000 rpm pelletiert (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.2. Standard-DNA-Techniken

2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen (*Easy Cast™ Elektrophoresis System*). Dabei variierte die Gelkonzentration von 0.8 – 4% Agarose. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)] eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.2 Volumen Stop-Lösung [40 % (v/v) Glycerin, 0.1 g/l SDS, 0.1 M EDTA, ± 2.5 g/l Bromphenolblau] versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Grösse und -Konzentration und betrug 1-10 µl (analytische Gele) bzw. 20-50 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V (PHERO-stab. 300, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen), bis die gesuchten Fragmente genügend aufgetrennt waren. Die Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht (UV-Transilluminator, Appligene, Illkirch), die Dokumentation mittels Image-Master (Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe käuflich erworbener DNA-Größenmarker (MBI Fermentas, St. Leonrot).

2.3.2.2. 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 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Nach Überprüfung auf vollständige Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Enzyme durch Hitzebehandlung (10 min bei 75°C) inaktiviert.

2.3.2.3. Reinigung und Konzentrierung von DNA

QIAquick PCR Purifikation Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)

Die Reinigung basiert auf der selektiven Adsorption von DNA an eine Silika-Gel-Membran bei hohen Salzkonzentrationen, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift, erfolgte die Elution der DNA mittels sterilem H₂O_{bidest} (niedrige Salzkonzentration). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die DNA mit 50 µl sterilem H₂O_{bidest} eluiert. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten, wurde aber auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

Phenol-Extraktion und Fällung

Zur Entfernung von Proteinen wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)] extrahiert und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde mit 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) oder 5 M NaCl-Lösung versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2.5 Vol. eiskaltem 96 %igem (v/v) Ethanol für 1 h bei -20 °C. Nach einer Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für 15 min wurde die DNA mit 0.5 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut kurz zentrifugiert. Die Trocknung des Sediments erfolgte im Vakuum (*SpeedVac[®] SVC 100*, Savant). Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA] oder sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen.

Mikrodialyse

Um die DNA-Lösung zu entsalzen oder den Puffer zu wechseln wurde eine Mikrodialyse durchgeführt. Dazu wurden ca. 25 ml steriles H₂O_{bidest} in eine Petrischale gefüllt und ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0.025 µm (Millipore GmbH, Eschborn) auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die DNA-Probe wurde auf den Filter aufgetropft und nach ca. 30 min wieder abgenommen.

2.3.2.4. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen EtBr-Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment rasch aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des Protokolls des *QIAquick Gel Extraction Kit* (*QIAGEN GmbH, Hilden*) konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

2.3.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Das Verhältnis Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:5. Vektor- und Fragment-DNA wurden zur Freilegung kohäsiver Enden 5 min bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Für die Ligation von PCR-Produkten in pGEM[®]-T Easy wurde 0.5 µl Vektor-DNA eingesetzt und Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase des Ligationskits (Promega, Madison, WI) verwendet. Die Ligation wurden über Nacht (pGEM[®]-T Easy) bzw. für 2-3 Tage (andere Vektoren) bei 4°C inkubiert.

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

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel & Higa, 1970). Die Transformation wurde in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Von dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine Vorkultur über Nacht angezogen. Diese wurde 1:100 in einer 100 ml Hauptkultur verdünnt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.3 kultiviert. Die Zellen wurden zuerst 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte dann eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4°C (Hettich Universal, RF, Tuttlingen). Das Pellet wurde 10 ml eiskalter 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert (auf Eis) und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und im Eisbad bis zur Transformation aufbewahrt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden mit Glycerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt und bei -80°C gelagert.

Je 200 µl $CaCl_2$ -kompetente Zellen 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 an, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis gekühlt wurden (2 min). Nach Zugabe von 0.8 ml LB-Medium und Inkubation für 45 min bei 37°C/30°C wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C/ 30°C inkubiert.

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

A) Herstellung kompetenter Zellen

200 ml SOB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis 100 Klett kultiviert. Die Kultur wurde nach Abkühlung auf Eis (15 min) zentrifugiert (15 min 5000 rpm, 4°C) und das Zellpellet dreimal mit je 50 ml eiskaltem Glycerin (10 %) gewaschen, und die Zellen nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4°C) in 500 µl Glycerin [10 % (v/v)] aufgenommen. Die elektrokompetenten Zellen wurden als 40 µl Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

B) Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser der Fa. Biorad (München). Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 1.8 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12.5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3.5 bis 4.5 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 30°C/37°C inkubiert. 50-200 µl des Ansatzes wurden auf Selektionsagar ausplattiert.

2.3.2.8. Selektion rekombinanter *E. coli* – Klone

Die Transformanten wurden auf Nähragar- oder LB-Agar-Platten mit IPTG und X-Gal unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums selektiert. Rekombinante Klone konnten in der Regel durch Test auf α-Komplementation identifiziert werden. Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α-Komplementation der β-Galaktosidase durch im Plasmid integrierte Fremd-DNA und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal (weiße Kolonien) zugrunde.

2.3.2.9. Plasmidtransfer in *R. metallidurans* durch Konjugation

Der konjugative Plasmidtransfer wurde mit *E. coli*-Zellen (Stamm S17/1) und *R. metallidurans*-Zellen jeweils aus einer Übernachtskultur durchgeführt. Je 100 µl der zu konjugierenden Stämme wurden auf einer Nähragar-Platte zusammen ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Konjuganten wurden direkt mit einer Impföse von der bewachsenen Platte genommen und auf Tris-Minimalmedium-Agarplatten mit Tetracyclin bzw. 1.5 mg/ml Kanamycin ausplattiert. Ein Wachstum von *E. coli*-Zellen wird auf diesen Medien aufgrund von Auxotrophien fehlender Antibiotikaresistenz verhindert.

2.3.2.10. Selektion von rekombinanten *R. metallidurans* - Klonen bei der homologen Rekombination mit dem Suizidvektor pLO2

Hierzu wurde eine Methode von Lenz *et al.*, 1994 in leicht veränderter Form eingesetzt. Der DNA-Sequenzbereich, welcher zur homologen Rekombination in *R. metallidurans* eingesetzt werden sollte wurde in den Vektor pLO2 kloniert. Dieser Vektor kann nur in *E. coli*, aber nicht in *R. metallidurans* replizieren. Er trägt zum einen eine Kanamycin-Kassette als Selektionsmarker und zum anderen das *sacB*-Gen. Ist Saccharose im Medium, sorgt das *sacB*-Genprodukt dafür, dass die Zellen absterben, da das Periplasma mit dem aus Zucker synthetisierten Levan-Polymer verstopft wird.

Das Plasmid ist mobilisierbar und kann in einem geeigneten *E. coli*-Stamm (S17-1) mit *R. metallidurans* konjugiert werden. Es kommt zu Rekombinationsereignissen zwischen den homologen Sequenzen, was die Bildung von Kointegraten zur Folge hat. Diese können durch Selektion auf Kanamycin identifiziert werden. In Stämmen mit Kointegrat ist das Gen, in dessen Mitte die homologe Rekombination stattgefunden hat, zerstört (DN454-DN459). Außerdem ist es möglich das Kointegrat so zu konstruieren, dass gleichzeitig eine Transkriptionsfusion mit einem auf pLO2 befindlichen *lacZ*-Gen entsteht (DN454, DN458, DN460, DN461). Diese Klone wurden für Induktions-Untersuchungen eingesetzt.

In einem zweiten Rekombinationsschritt kann weiterhin die Auflösung der Kointegrate erzwungen werden. Dazu wurden die Zellen zwei Tage in Tris-Minimalmedium angezogen, wobei die Kointegrate ein zweites Mal homolog rekombinierten und es dabei zur Plasmid-Exzision kam. Dann wurden die Kulturen in Doppelcross-Medium (Tris-Minimalmedium mit 150 g/l Saccharose, 1 g/l Hefeextrakt, 0.5 mM NiCl₂) überführt, das zum einen durch Nickel (0.5 mM) auf pMOL28 selektierte, zum anderen durch die Zugabe von Rohrzucker die Kointegrate abtötete. Nach fünf Passagen konnten die gewünschten Doppel-Rekombinanten durch Negativselektion auf Kanamycin identifiziert werden. Zur zusätzlichen Überprüfung wurde eine analytische PCR auf das ausgetauschte DNA-Fragment durchgeführt.

2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion

2.3.3.1. Auswahl der Primer

Die Ableitung der Primer erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms OLIGO aus bekannten Sequenzen. Die verwendeten Primer (Tabelle 3) wurden von kommerziellen Anbietern (Gibco BRL, Eggenstein; Metabion GmbH, Martinsried) bezogen. Sie wurden in sterilem H₂O_{bidest} gelöst, und auf eine Endkonzentration von ca. 10 pmol/μl verdünnt.

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Primer

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
<u>Sequenzüberprüfungen in der <i>chr</i>₁-Determinante</u>		
Cont.712 <i>up</i>	→ CAT CCA CTG GCA ACG GGC	Überprüfung der Lokalisation der <i>chr</i> ₁ -Genregion auf den Contigs 712 und 660
Cont.712 <i>down</i>	← GCT GAA GGG CCG GAT TCT CG	
Cont.660 <i>down</i>	← ACG CCC AGA TGG ACG TTC TCG	
<i>chrB</i> ₁ – right <i>up</i> + <i>chrB</i> ₁ – right <i>down</i> Sequenz s. unten		Sequenzkorrektur innerhalb des <i>chrB</i> ₁ -Gens
<u>pLO₂-<i>lacZ</i> Konstrukte</u>		
<i>chrE</i> pLO ₂ - <i>lacZ</i> 5'	→ AA <u>ACTGCAGC</u> GCCACATCTTCCTTGGAAAC	direkt <i>downstream</i> von <i>chrE</i> ; Amplifikation eines ca. 320 bp-Fragmentes für die homologe Rekombination in AE126
<i>chrE</i> pLO ₂ - <i>lacZ</i> 3'	← AAATCTAGATCCATTTTCATGGCTCTATCCG	
<i>chrF</i> ₁ pLO ₂ - <i>lacZ</i> 5'	→ AA <u>ACTGCAGT</u> GCCCATGGCTGATCGC	Amplifikation eines 320 bp-Fragmentes innerhalb von <i>chrF</i> ₁ für die homologe Rekombination in AE126
<i>chrF</i> ₁ pLO ₂ - <i>lacZ</i> 3'	← AAATCTAGACGTGAAGACATGAGAAAGCCCT	
<i>chrB</i> ₂ pLO ₂ - <i>lacZ</i> 5'	→ AA <u>ACTGCAGC</u> CAATCCGGCCGACTGC	direkt <i>downstream</i> von <i>chrB</i> ₂ , Amplifikation eines ca. 320 bp-Fragmentes für die homologe Rekombination in AE104
<i>chrB</i> ₂ pLO ₂ - <i>lacZ</i> 3'	← AAATCTAGAGTCTTATGGTTTCCGGTTGCC	

Fortsetzung Tabelle 3:

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
<i>chrF₂</i> pLO2- <i>lacZ</i> 5'	→ AAAT <u>CTGACG</u> CTCTACGTGCCACCCGACG	Amplifikation eines 320 bp-Fragmentes innerhalb von <i>chrF₂</i> für die homologe Rekombination in AE104
<i>chrF₂</i> pLO2- <i>lacZ</i> 3'	← AAAT <u>CTAGAC</u> CCAGGCGTAGAGCGCGTC	
<u>Deletionen</u>		
<i>chrB₂</i> <i>crash up</i>	→ AAAT <u>CTAGAC</u> GAGCAGGCCATGCAGTTG	Amplifikation eines 600 bp-Fragmentes innerhalb von <i>chrB₂</i> für die homologe Rekombination in AE104
<i>chrB₂</i> <i>crash</i> <i>down</i>	← AAAT <u>CTAGAC</u> GATCGTCATCGGCCAGTC	
<i>chrA₂</i> <i>crash up</i>	→ AAAT <u>CTAGAC</u> ACACTGGTCGGCATCGCC	Amplifikation eines 600 bp-Fragmentes innerhalb von <i>chrA₂</i> für die homologe Rekombination in AE104
<i>chrA₂</i> <i>crash</i> <i>down</i>	← AAAT <u>CTAGAC</u> GCAGGCAGGATGGTGAAGA	
<i>chrR</i> <i>crash up</i>	→ AAAT <u>CTAGAC</u> ACCACTTGCATCGCACGG	Amplifikation eines 600 bp-Fragmentes innerhalb von <i>chrR₂</i> für die homologe Rekombination in AE104
<i>chrR</i> <i>crash</i> <i>down</i>	← AAAT <u>CTAGAT</u> TTCGGACGATCGCTTGCCAC	
<i>chrH</i> <i>crash up</i>	→ AAAT <u>CTAGAC</u> ATTTCAGGCTGTCCACCGC	Amplifikation eines 600 bp-Fragmentes innerhalb von <i>chrH</i> für die homologe Rekombination in AE104
<i>chrH</i> <i>crash</i> <i>down</i>	← AAAT <u>CTAGAC</u> AGCGCGCCTCGATGATG	
<i>chrB₁</i> - <i>left up</i>	→ AAAT <u>CTAGA</u> ACAAGAACGATGGCCCGGA	Amplifikation eines ca. 320 bp-Fragmentes <i>upstream</i> von <i>chrB₁</i> für die homologe Rekombi- nation in AE126, enthält die ersten bp von <i>chrB₁</i>
<i>chrB₁</i> - <i>left</i> <i>down</i>	← AAACAATTG <u>TAGCC</u> AGGCAGTCTCGGGAG	

Fortsetzung Tabelle 3:

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
<i>chrB₁</i> – right up	→ AAACAATTGATCTTGCTTTCGCCCGGC	Amplifikation eines ca. 320 bp-Fragmentes downstream von <i>chrB₁</i> für die homologe Rekombination in AE126, enthält die letzten bp von <i>chrB₁</i>
<i>chrB₁</i> – right down	← AAATCTAGAGATCATCTGGCCGAGGCG	
<i>chrC</i> – left up	→ AAATCTAGACCGTCCTACCCGCCCCAT	Amplifikation eines ca. 320 bp-Fragmentes upstream von <i>chrC</i> für die homologe Rekombination in AE126, enthält die ersten bp von <i>chrC</i>
<i>chrC</i> – left down	← AAACAATTGGGAGAGGCCAGTCAGCTTCG	
<i>chrC</i> – right up	→ AAACAATTGCAGGTCAGCCAGGACTGCG	Amplifikation eines ca. 320 bp-Fragmentes downstream von <i>chrC</i> für die homologe Rekombination in AE126, enthält die letzten bp von <i>chrC</i>
<i>chrC</i> – right down	← AAATCTAGACCGGCGATCTCACGTCCC	
<u>Promotor-Konstrukte</u>		
Prom B up	→ AAAGGATCCGCTCTGTCGTATGCGCAGGG	Amplifikation eines 220 bp-Fragmentes direkt vor Start von <i>chrB₁</i> , das den Promotor <i>chrB₁p</i> enthält
Prom B down	← AAAGGATCCAGCTTAGCGGGCTGTATGCG	
Prom A up	→ AAAGAATCCCTCGGCCAGATGATCCATGTT	Amplifikation eines 220 bp-Fragmentes direkt vor Start von <i>chrA₁</i> , das den Promotor <i>chrA₁p</i> enthält
Prom A down	← AAAGGATCCGCTTCTTTGTTGATTGGCAAC G	
<u>Topologie von ChrB₁</u>		
<i>chrB-KpnI</i> up	→ AAAGGTACCAGGAGG _{RBS} GTCTGCATGAAC GCTCTCCA	Amplifikation von <i>chrB₁</i> für die Konstruktion einer Translationsfusion mit <i>phoA</i> , künstliche Ribosomenbindestelle
<i>chrB-XbaI</i> down	← TTATAAATCTAGACCCATAGATGCTGGCGG GTCG	

Fortsetzung Tabelle 3:

Primer-Name / Orientierung	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
<i>chrB'</i> - <i>Xba</i> I <i>down</i>	← TATAAATCTAGAAGCGGCCAGTACGGACA GCAT	Zusammen mit Primer <i>chr-Kpn</i> up Amplifikation der ersten 230 bp von <i>chrB</i> ₁ für die Konstruktion einer Translationsfusion mit <i>phoA</i>
<u>Überexpression</u>		
<i>ChrA</i> - <i>Bam</i> HI- <i>up</i>	→ AAAGGATCCAACCTCGCCCCAACCCACCC	Amplifikation des <i>chrA</i> ₁ -Gens zur Klonierung in den Expressionsvektor pASK7
<i>ChrA</i> - <i>Sal</i> I- <i>down</i>	← AAAGTCGACGTGATGCAACAACGGATAGG	
SOD- <i>Bam</i> HI- <i>up</i>	→ AAAGGATCCCTCTACGAAATGAAGCCGC	Amplifikation des <i>chrC</i> -Gens zur Klonierung in den Expressionsvektor pASK7
SOD- <i>Sal</i> I- <i>down</i>	← AAAGTCGACGTCCCGCACGGCAGCCGC	
<i>ChrB</i> - <i>Eco</i> RI- <i>up</i>	→ AAAGAATTCAACGCTCTCCCATCCTCTCCC	Amplifikation des <i>chrB</i> ₁ -Gens zur Klonierung in den Expressionsvektor pASK7
<i>ChrB</i> - <i>Pst</i> I- <i>down</i>	← AAAGTGCAGGCGTTTGC GCGGGCTTGA	
<u>16S rDNA-Analyse</u>		
fD1	→ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Amplifikation hoch homologer Bereiche der 16S rDNA von Bakterien
rP2	← ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
<u>Sequenzierungsprimer</u>		
<i>Strep</i> Tag <i>up</i>	← ATTTTTCGAACTGCGGGTGGC	Sequenzierprimer (ABI) für pASK-IBA3 Konstrukte
<i>Strep</i> Tag <i>down</i>	→ GGCGCCGAGACCGCTTTGAACGTATCATT	
pGEM rev	← ATATGGTCGACCTGCAGGCG	<i>reverse</i> Sequenzierprimer (ALF) für pGEM-T-Easy - Konstrukte
pGEM fwd	→ GCGAAAGGGGGATGTGCTGC	<i>forward</i> Sequenzierprimer (ALF) für pGEM-T-Easy - Konstrukte

Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die teilweise neu eingeführt wurden, wurden unterstrichen dargestellt.

2.3.3.2. Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von durch Transformation erzeugten Klonen.

Für präparative Zwecke wurde eine Polymerase mit 3'-5'-*proof-reading*-Aktivität [*Pwo* (Roche, Mannheim)] oder das *Taq/Pwo*-Gemisch [*Expand™ Long Template PCR System* (Roche, Mannheim)] eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde *Taq*-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet.

Reaktionsansatz:	5 µl	10 x PCR Puffer
	3-5 µl	Mg ²⁺ -Stammlösung (2.5 mM)
	1 µl	20 mM dNTP-Mix
	je 1 µl	Primer (10pmol/µl)
	1 µl	Template-DNA (ca.100 ng /µl)
	ad 50 µl	steriles H ₂ O _{bidest}

Der Ansatz wurde zum Schutz vor Verdunstung mit 35 µl Mineralöl überschichtet. Die Reaktionen wurden als *Hot-Start*-Reaktionen im PCR-Block (Trio-Thermoblock, Biometra) nach folgendem Protokoll gefahren:

1.	2 min	96°C	<i>Hot-Start</i>
2.	20 s	96°C	Denaturierung
3.	20 s	x°C	<i>Annealing</i>
4.	1 min/kb	68/72°C	<i>Extension (Pwo/Taq)</i>
	Schritt 2-4:	25-30 Zyklen	
5.	5 min	68/72°C	Nachsynthese (<i>Pwo/Taq</i>)
6.	Pause	4°C	

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

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.

Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des dRhodamine Termination Cycle Sequencing-Kits (Perkin-Elmer, Weiterstadt). Für die Sequenzreaktion, die im Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) stattfand, wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

Plasmid-DNA (0.5 µg)	1 - 6 µl
Primer (4 pM)	2 µl
ABI-Sequencing-Mix	2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

Die Ansätze wurden zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet und die Polymerase-Reaktion gestartet:

1)	Denaturierung	95°C	1 min
2)	Denaturierung	95°C	1 min
3)	Annealing (je nach Primer)	46-60°C	30 s
4)	Extension	60°C	2 min
Schritt 2 bis 4:	30 Zyklen		
5)	Pause	4°C	

Nach Ablauf des Programms wurde die DNA zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide gefällt, indem 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 30 µl Ethanol zugegeben wurden. Nach einer Zentrifugation (20 min, RT, 14000 rpm) und anschließendem 5 min Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und war bei -20°C bis zur Sequenzierung stabil. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 4 µl Gelpuffer [Gemisch aus 5 Vol. Formamid und 1 Vol. 25 mM EDTA (pH 8.0)] aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert.

Auswertung der Sequenzdaten

Die primäre Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung Programms *Sequencher*. Editierte und prozessierte Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen Clone 4 (*Clone Manager*-Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, USA) und DNasis (Version V5.00) ausgewertet. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom *Nation Center For Biotechnology Information* (NCBI) bereitgestellten Internet-Programm *Basic Logic Alignment Search Tool* (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm ClustalW vom *European Biotechnology Institut* (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen *Simple Modular Architecture Research* (SMART, Schultz *et al.*, 2000), Peptid-Mass (<http://www.expasy.ch/peptide-mass.html>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) und ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) des *Expaty Molecular Biology Server* (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

2.3.5. Taxonomische Einordnung von Bakterien aufgrund der 16S rDNA-Sequenz

Für die Klonierung von 16S rDNA aus Isolaten chromattoleranter Bakterien wurden Primer aus hochkonservierten Regionen der 16S rRNA in der PCR eingesetzt (fD1, rP2). Für den Einsatz in der PCR wurden jeweils Zellen einer Einzelkolonie in 50 µl Wasser resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde alternativ mittels folgender Methoden durchgeführt:

1. 3 min Ultraschall
2. 10min Inkubation bei 100°C
3. dreimaliges abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Inkubation bei 100°C für 3 min

Die amplifizierte DNA hatte eine Größe von ca. 1.6 kbp. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM Teasy kloniert. Mit zehn positiven XLI-Blue Klonen wurde weitergearbeitet. Die Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen *MspI* und *RsaI* verdaut und die entstandenen Fragmente in einem 4%igen Agarosegel überprüft. Das Insert eines Plasmids, welches das am häufigsten auftretende Restriktionsmuster repräsentierte, wurde sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mittels BLAST-Analyse taxonomisch eingeordnet.

2.4. Versuche zum Zellwachstum

2.4.1. Wachstumsversuche in Flüssigmedien

2.4.1.1. Das Klett-Summerson-Colorimeter [Klett MFG Co., New York, USA]

Das Gerät diente der Messung der Optischen Dichte wachsender Bakterienkulturen in Flüssigmedien. Es wurde der Filter Nr. 54 eingesetzt, der im verwendeten Wellenlängenbereich (520-580 nm) die größte Lichtausbeute liefert. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde unbeimpftes Medium (Nullwert) verwendet. Aus den erhaltenen Klett-Einheiten (KE) konnte unter Verwendung eines auf einer Eichkurve basierenden Programms das Zelltrockengewicht bzw. die Konzentration der Zellsuspension ermittelt werden (Schwuchow, 1995). Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass durch die Verwendung von Seitenarmkolben bei der Kultivierung der Bakterien keine Probennahme zur Messung notwendig war und somit eine Kontamination der Kultur vermieden wurde.

2.4.1.2. Zellanzucht von *R. metallidurans*-Stämmen bei Wachstumsversuchen

Die Versuche wurden in Tris-gepuffertem Minimalmedium mit 0.2 % (w/v) Natriumgluconat als Kohlenstoffquelle und Kaliumchromat unterschiedlicher Konzentration durchgeführt. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und im Inkubationsschüttler bei 30°C und

140 rpm bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert (ca. 48 h). Als Anzuchtgefäße für die Vorkulturen dienten 100 ml-Erlenmeyerkolben.

Für die Anzucht der Hauptkultur wurden Seitenarmkolben verwendet. Es wurden 20 ml Tris-Minimalmedium [0.2 % (w/v) Natriumgluconat, Kaliumchromat] mit der entsprechenden Vorkultur ca. 1 %ig beimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 30°C unter ständigem Schütteln in einem Gyrotory-Wasserbad oder im 30°C Brutraum inkubiert. Das Zellwachstum wurde mit dem Klett-Summerson-Colorimeter verfolgt.

2.4.2. Ermittlung der Minimalen Inhibitor Konzentration (MIC) von Chromat

Als MIC wird die niedrigste Metallkonzentration bezeichnet, bei der ein Stamm kein Wachstum mehr zeigt. Die Ermittlung der MIC erfolgte bei *R. metallidurans*-Stämmen auf Tris-Minimal-Agar (Mergeay *et al.*, 1985). Es wurden Platten mit steigender Konzentration an Chromat gegossen. Als Inokulum dienten Flüssig-Vorkulturen. Die entsprechenden Stämme wurden auf den Platten in Sektoren ausgestrichen und bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert. Bei *E. coli*-Stämmen wurde die MIC auf LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Chromatkonzentrationen bestimmt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 30/37 °C.

2.5. Enzymologische Methoden

2.5.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Miller, 1992)

2.5.1.1. Zellwachstum, Induktion und Zellernte

Die für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität verwendeten Stämme von *R. metallidurans* wurden in Tris-Minimalmedium mit 3 mM bzw. 30 μ M Sulfat angezogen. Aus einer 48 h-Vorkultur in Tris-Minimalmedium wurden 20 ml-Hauptkulturen angeimpft und bis zu einer Zelldichte von ca. 70 Klett (Klett-Summerson-Colorimeter) inkubiert. Bei dieser Zelldichte wurden die Kulturen geteilt und die eine Hälfte induziert. Als Proben für den Enzymtest zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden je 0.2 ml Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 4°C, 12000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Zelldichte zu diesem Zeitpunkt erfolgte als Optische Dichte bei 600 nm.

2.5.1.2. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Das Zellpellet wurde in 950 μ l Z-Puffer [0.6 M Na_2HPO_4 , 0.4 M NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 0.5 M Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 50 μ l Permeabilisierungspuffer [2.5 g/l CTAB, 5 g/l Natriumdesoxycholat] permeabilisiert. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Substratlösung [4 g/l o-Nitrophenylgalactopyranosid (ONPG) in Z-Puffer] zugegeben, der Ansatz gemischt und bis zur Gelbfärbung bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Farbreaktion ist auf die Umsetzung des ONPG zu o-Nitrophenol durch die β -Galaktosidase zurückzuführen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt. Natriumcarbonat erhöht den pH-Wert des Reaktionsansatzes auf 11, wodurch die β -Galaktosidase inaktiviert wird. Der Ansatz wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial. Mit Hilfe der Extinktion [E_{420}] und der Reaktionszeit [= Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion] konnte die β -Galaktosidase-Aktivität in Miller-Units nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U]} = (1000 * E_{420}) / (\text{Reaktionszeit} * \text{Probenvolumen} * \text{OD}_{600})$$

2.5.2. Untersuchung der Lokalisierung von Proteinen (nach Rensing *et al.*, 1997)

Zur Bestimmung der Lage der C-Termini im Cytoplasma oder Periplasma wurden die zu untersuchenden Proteine C-terminal mit der Alkalischen Phosphatase (PhoA') ohne *leader*-Sequenz fusioniert. Für die Enzymaktivität von PhoA' ist eine Lokalisierung im Periplasma notwendig. Nur wenn der C-Terminus mit dem PhoA'-Anteil des Fusionsproteins ins Periplasma transportiert wird, kann durch einen Enzymtest eine Aktivität nachgewiesen werden.

2.5.2.1. Zellanzucht, Induktion und Zellernte

Vorkulturen der *E. coli* CC118-Stämme mit Fusionsplasmiden (und Kontrollen) wurden über Nacht bei 30°C in 3 ml LB-Medium mit Antibiotika (Ampicillin und Kanamycin) unter Schütteln angezogen. 20 ml Hauptkulturen wurden 3 %ig aus den Vorkulturen angeimpft und ca. 2 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Induktion des T7-Promotors (Temperaturerhöhung auf 42°C für 30 min) gestartet und über einen Zeitraum von einer weiteren Stunde bei 37°C fortgeführt. Bei einer optischen Dichte von etwa 100 Klett wurde eine Probe von 1 ml Kultur geerntet und 2 min bei 4°C und 12000 rpm abzentrifugiert.

2.5.2.2. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Das Zellpellet wurde in 500 µl Waschpuffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgSO₄ und 1 mM Jodazetamid (nach dem Autoklavieren zugeben)] resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 1 ml Assay-Puffer [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM ZnCl₂ und 1 mM Jodazetamid] resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 50 µl 1 g/l SDS-Lösung und 50 µl Chloroform permeabilisiert. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Substratlösung [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.4% Paranitrophenol, immer frisch herstellen] und Mischen gestartet. Die Zeit bis sich die Probe bei 37°C im Wasserbad durch Nitrophenolbildung leicht gelb färbte, wurde bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von 120 µl Stoppmix [1 M KH₂PO₄ (5 Teile), 0.5 mM EDTA (pH 8.0) (1 Teil)] und Inkubation auf Eis beendet. Der Ansatz wurde 4 min bei 4°C und 12000 rpm pelletiert, der Überstand vorsichtig in eine Küvette gegossen und die Extinktion bei 420 nm an einem UV/VIS-Spektrophotometer (UVIKON, Eching) gemessen. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit Hilfe der Extinktion [E₄₂₀] und der Reaktionszeit [= Zeit von der Substratzugabe bis zum Abstoppen der Reaktion] nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U]} = 72.131 * E_{240} / \text{Reaktionszeit}$$

Dabei ist 1 U definiert als pro min bei 37°C gebildetes Nitrophenol (in nmol). Die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch Division der errechneten Gesamtaktivität durch die Zelltrockenmasse des Reaktionsansatzes bestimmt. Die Zelltrockenmasse wurde aus der Zelldichte nach Schwuchow (1995) berechnet.

2.5.3. Bestimmung der Superoxid-Dismutase Aktivität nach Fridovich

Die Superoxid-Dismutase-Aktivität wurde mittels des Cytochrom C – Reduktionstests bestimmt (Flohé *et al.*, 1988). O₂⁻ Radikale als Substrat für die SOD-Reaktion werden dabei durch die Xanthinoxidase-Reaktion bereitgestellt. Die Reduktion von Cytochrom C wird dabei durch die SOD inhibiert und kann bei λ=550 nm verfolgt werden. Die Menge an SOD, welche eine 50%ige Inhibierung der Cytochrom C-Reduktion bewirkt, ist als 1 Fridovich Unit definiert. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Lösung A: 50 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.8, 50 µM Xanthin, 0.1 mM EDTA

Lösung B: Xanthin-Oxidase, für eine Grundreaktion ΔE von 0.025/min

2 ml Lösung A werden mit mit 50 µl Probe gemischt und bei 25°C äquilibriert. Die Reaktion wird mit 50 µl Lösung B gestartet und die Absorption bei 550 nm über 2 min gemessen und der Anstieg berechnet.

2.5.4. Bestimmung der Chromatreduktase-Aktivität im Rohextrakt von *R. metallidurans*

R. metallidurans wurde in Tris-Minimalmedium mit 4 g/l Natriumgluconat angezogen und bei einer Zelldichte von $OD_{600}=1.5$ geerntet. Das Zellpellet wurde in Tr50-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (10 min, 50%). Die Chromatreduktion wurde in folgendem Ansatz gemessen:

NADH 0.5 mM
K-Chromat 50 µM
Rohextrakt 50 µl Tr50-Puffer ad 1ml

Der Ansatz wurde für 5 min bei 30°C inkubiert. Die Bestimmung des Cr(VI)-Gehaltes erfolgte mit der unter 2.8.6. beschriebenen Diphenylcarbazid-Methode.

2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.6.1. Proteinexpression und -reinigung über das *StrepTagII*[®] Protein Purification System (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Mittels des *StrepTagII*[®] Überexpressionssystems können exprimierte Proteine in einer Affinitätschromatographie zur Homogenität gereinigt werden. Zur Reinigung des Target-Proteins wird N- oder C-terminal ein *tag* eingefügt, der aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK) besteht. Dieser *StrepTagII*[®] bindet spezifisch an StrepTactin, das an das Säulenmaterial gekoppelt war. Weiterhin beeinflusst dieser kurze *tag* weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Das Expressionssystem ist aufgrund der dichten Repression des inserierten Gens auch für toxische Membranproteine besonders geeignet. Die Induktion der cytoplasmatischen Expression erfolgt mittels AHT (Anhydrotetracyclin), da der zu exprimierende ORF hinter einen *tet_p*-Promotor kloniert wird. Unspezifisch bindende Proteine können während eines Waschschrilles entfernt werden, während das *Target*-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule eluiert wird.

2.6.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Die Plasmidkonstrukte wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21-Codon-Plus-RP transformiert. Die Vorkultur, die über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, wurde 1%ig in frisches LB-Medium überführt. Die Hauptkulturen zur Überexpression wurden

schüttelnd bei 30°C inkubiert, bis sie eine Optische Dichte von $OD_{600} = 0.5-0.8$ erreicht hatten. Die Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von 200 µg/l AHT induziert. Anschließend wurden die Kulturen weitere 3 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 5000 rpm und 4°C (Sorvall, Tuttingen) sedimentiert und das Medium sorgfältig abgenommen. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

2.6.1.2. Zellaufschluss und Fraktionierung

Gewinnung des periplasmatischen Extraktes

Zur Gewinnung des periplasmatischen Extraktes von *E. coli* wurde nach den Anweisungen des *StrepTagII*-Benutzerhandbuches vorgegangen. Nach der Zellernte wurde das Pellet in 1/100 Vol. eiskalten Puffer P [100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM Saccharose] resuspendiert, in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der Spheroplasten wurde die Suspension zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 15 min). Der klare Überstand (periplasmatischer Extrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stand nun für weitere Arbeiten zur Verfügung.

Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes

Das Zellpellet wurde in Puffer W [100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF, 10 mg/ml DNaseI] resuspendiert.

Ultraschallaufschluss

Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Uniequip Laborgerätebau UW60) 10x in 20 s-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Aufschluss mittels *French*-Presse

Die Zellsuspension wurde in einer *French*-Presse (Amicon, Silver Springs, Maryland, USA) bei 2000 psi (140 kg/cm²) in mehreren Durchgängen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (10000 rpm, 30 min, 4°C) wurde der Überstand (Rohextrakt) auf Eis gelagert.

Membranpräparation und Solubilisierung

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der Rohextrakt einer Ultrazentrifugation (100000 x g, 1.5 h, 4°C) unterzogen. Das so gewonnene Membranpellet wurde in Puffer W [100 mM Tris-HCl, pH 8.0] aufgenommen und einer Membranproteinbestimmung nach Lowry unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde dann auf 10 mg/ml eingestellt. Die so gewonnene Membranfraktion wurde mit 1% Zwittergent 3-14 bzw. 1.5 mg N-Dodecyl-β-D-Maltosid/ mg Membranprotein für 30 min auf Eis solubilisiert. Nach erfolgter Solubilisierung wurden ungelöste Membranreste durch eine weitere Ultrazentrifugation (100000 g, 30 min,

4°C) pelletiert. Das so gewonnene Solubilisat wurde dann für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

2.6.1.3. Native Proteinreinigung mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie

Eine Einweg-Säule (Polypropylene Column 1 ml – 10 ml, QIAGEN, Hilden) wurde mit 1-3 ml Säulenmaterial (StrepTactin) gepackt und mit 5 Vol. Puffer W [100 mM Tris-HCl, pH 8.0] äquilibriert. Die Zellextrakte, welche das gewünschte *Strep*TagII-Fusionsprotein enthielten, wurden auf die Säule aufgetragen, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band, unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 5 Vol. Puffer W mit 1 M NaCl und 10 Vol. Puffer W entfernt.

Das Target-Protein wurde mittels Puffer E [100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM Desthiobiotin] eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch das Spülen mit 10 Vol. Puffer R [100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM HABA] regeneriert. Für die Reinigung von Membranproteinen enthielten alle verwendeten Puffer 0.05 % des zur Solubilisierung eingesetzten Detergenzes.

2.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.6.2.1. Proteinbestimmung von Membranproteinen (nach Lowry *et al.*, 1951)

Um die Konzentration membranassoziierter Proteine in Lösungen zu bestimmen, wurde eine modifizierte Lowry-Methode angewandt (Lowry *et al.*, 1951, 1976, Hess & Lees, 1978). Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

1. 10 % (w/v) Natriumdesoxycholat (frisch hergestellt)
 2. 24 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
 3. 0.8 M NaOH
 4. Reagenz A:
 - 0.2 g Dinatrium-Tartrat
 - 10 g Na₂CO₃
 - 68 ml 0.8 M NaOH ad 100 ml H₂O_{bidest}
 5. Reagenz B:
 - 2 g Dinatrium-Tartrat
 - 1 g CuSO₄
 - 12.5 ml 0.8 M NaOH ad 100 ml H₂O_{bidest} (lichtgeschützt)
- Mix: 25 Vol. Reagenz A und 2 Vol. Reagenz B
Reagenz C: 1 Vol. Folin Ciocalteu Reagenz mit 2 Vol. H₂O_{bidest}

Der Reagenzmix und Reagenz C wurden jeweils vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Die Proben wurden mit Puffer auf 600 µl verdünnt, mit 10 µl 10% iger (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung versetzt und nach Durchmischung 15 min bei RT inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 200 µl 24 % (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation 7 min, 12000 rpm und bei 4°C in einer Tischzentrifuge (Sigma 112, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) wurden die Überstände sorgfältig entfernt und das Pellet

mit 450 µl Reagenzmix versetzt. Nachdem alle Sedimente resuspendiert waren, wurden den Proben 2 x 300 µl Reagenz C zugesetzt, wobei jeweils sofort gemischt wurde. Die Proben wurden 30-60 min lichtgeschützt bei RT inkubiert, bevor die Extinktion bei 750 nm gegen einen Nullwert gemessen wurde. Zu jeder Messreihe wurde eine Eichkurve im Bereich von 5-60 µg Protein pro Ansatz mit BSA aufgenommen.

2.6.2.2. Proteinbestimmung mittels Absorption bei 280 nm

Um die Konzentration von gereinigten Proteinen zu bestimmen, wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm gemessen und nach folgender Gleichung die Proteinkonzentration bestimmt, wobei l die Länge des Lichtweges durch die Küvette in cm angibt (Standardküvette $l=1$ cm):

$$C = \frac{E_{280}}{\epsilon_{\text{Protein}} \cdot l}$$

Dabei wurde der theoretische Extinktionskoeffizient nach folgender Gleichung für die untersuchten Proteine berechnet, wobei n die Anzahl vorhandener AS-Reste darstellt:

$$\epsilon = 5400 \cdot n_{\text{Trp}} + 1790 \cdot n_{\text{Tyr}} + 152 \cdot n_{\text{S-S}}$$

2.6.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford, 1976

Für die Proteinbestimmung wurden 20 µl der zu vermessenden Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 594 nm.

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Eichgerade, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml-BSA-Stammlösung erstellt wurde.

Die Herstellung der Bradford-Lösung erfolgte, indem 70 mg Serva Blue G-250 in 50 ml 96 % Ethanol 1 h gerührt und anschließend filtriert wurden. Danach wurden langsam 100 ml 85 %ige *o*-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei RT im Dunkeln.

2.6.3. Fällung von Proteinen

2.6.3.1. Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984)

Die Chloroform-Methanol-Fällung wurde angewandt, um Membranproteine aus verdünnten Lösungen für die Auftragung auf die SDS-PAGE aufzukonzentrieren.

Dazu wurden 100 µl Proteinprobe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt, 300 µl H₂O_{bidest} zugegeben und nach Schütteln für 2 min in einer Tischzentrifuge bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und verworfen.

Nach erneuter Zugabe von 300 µl Methanol wurde wieder kräftig geschüttelt und erneut für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und im entsprechenden Volumen H₂O_{bidest} und Probenpuffer aufgenommen.

2.6.3.2. TCA-Fällung

Die TCA-Fällung wurde angewandt, um aus Lösungen aufzukonzentrieren. Es wurden ca. 600 µl Proteinprobe mit 200 µl 24% (w/v) TCA-Lösung versetzt [Endkonzentration ca. 3-6% (w/v) TCA], gemischt und 7 min bei 4°C und 12000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden sorgfältig entfernt und das Proteinpellet zur Beseitigung von TCA-Resten 2-3x mit 500 µl absolutem Ethanol gewaschen und abschließend im Vakuum (*SpeedVac[®] SVC 100*, Savant) getrocknet.

2.6.4. Elektrophoretische Methoden

Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Fa. Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt.

2.6.4.1. Lineare SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 10 - 17.5 %ige Gele zum Einsatz.

Trenngel:	10 %	12.5 %	15 %	17.5 %
30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacylamid				
Stammlösung	2.0 ml	2.5 ml	3.0	3.5 ml
1.88 M Tris-HCl, pH 8.8	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
5 g/l SDS	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml	1.2 ml
H ₂ O _{bidest}	1.6 ml	1.1 ml	0.6 ml	0.1 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
APS (10 %ig)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Sammelgel:	30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacylamid			
Stammlösung		0.33 ml		
0.625 M Tris-HCl (pH 8.8)		0.4 ml		
5 g/l SDS		0.4 ml		
H ₂ O _{bidest}		0.87 ml		
TEMED		2 µl		
APS (10 %ig)		10 µl		

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer [0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 20 g/l SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0.5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau] gemischt und 5 min bei 96°C denaturiert.

Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) auf das Gel.

Als Elektrodenpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet [2 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M Glycin, 10 g/l SDS]. Die Elektrophorese wurde bei maximaler Stromstärke und 150 – 200 V durchgeführt.

2.6.4.2. Native PAGE

Mit dieser PAGE wurde die native Auftrennung von ChrC-Protein für die anschließende Aktivitätsfärbung durchgeführt. Weiterhin wurden für ChrA₁ und ChrB₁ Gelshift-Experimente in der Nativen PAGE untersucht.

Die Proben wurden vor der Auftragung auf ein Gel mit 0.2 Vol. 5x Beschwerungslösung [20 % (w/v) Saccharose; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und I_{\max} im Kühlraum durchgeführt.

Elektrodenpuffer: 12.1 g Tris, 7.5 g Glycin, ad 1 l H₂O_{bidest}

Gelzusammensetzung:	Sammelgel		
	8%	10%	12,5%
40 % (w/v) Acrylamid/			
Bisacrylamid 29:1 (in ml)	0.4	1.5	1.875
2.5 M Tris-HCl, pH 8.5 (in ml)	0.2	0.6	0.6
H ₂ O _{bidest} (in ml)	1.4	3.9	3.525
TEMED (in μ l)	2	5	5
10 % (w/v) APS (in μ l)	15	40	40

2.6.4.3. Gelshift - Experimente mittels Nativer PAGE (nach Rech *et al.*, 1996)

Erste Hinweise zur Bindung von Chromat an das ChrB₁-Protein wurden durch die Inkubation des Proteins mit Chromat und anderen Oxyanionen erhalten. Nach der Inkubation von 5 μ g Protein mit 1 mM verschiedener Oxyanionen für 30 min auf Eis wurde die Veränderung des Laufverhaltens in der Nativen PAGE im Vergleich zu unbehandeltem Protein untersucht.

2.6.4.4. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Membran, Fa. Millipore, Eschwege) mittels Semi-Dry-Blot.

Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol, H₂O_{bidest} und 10 min in TOWBIN-Puffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol] geschwenkt. Sechs Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und mit TOWBIN-Puffer getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung beim Transfer störender Salze

ebenfalls in CAPS-Puffer geschwenkt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 25 V (1 mA/cm² Gelfläche) über eine halbe bis eine Stunde. Danach erfolgte der Protein-Nachweis durch Doppelimmunpräzipitation bzw. mittels *StrepTagII* Detektionssystem.

2.6.4.5. *StrepTagII*[®] Detektionssystem (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

Der spezifische Nachweis *StrepTagII*[®]-haltiger Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mittels *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat.

Die Blot-Membran wurde in 15 ml Inkubationspuffer SI 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Es wurden 3.7 µl *StrepTactin*[®]-Peroxidase-Konjugat zugegeben und weitere 30 min bei RT geschüttelt. Die Membran wurde mit H₂O_{bidest} abgespült und dann 2 x 2 min in Puffer W [100 mM Tris-HCl, pH 8.0] anschließend 2 min in H₂O_{bidest} gewaschen. Der Nachweis erfolgte über eine Lichtreaktion oder Färbereaktion für Peroxidase-Konjugate (s. u.).

2.6.4.6. Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation auf PVDF-Membranen (nach Blake *et al.*, 1984)

Der Proteinnachweis mittels Doppelimmunpräzipitation beruht auf der Kreuzreaktion eines primären Antikörpers (IgG) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzymaktivität (alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase) ermöglicht den Nachweis der gebildeten Protein/IgG/Anti-IgG-Komplexe durch eine Farbreaktion bzw. Lichtreaktion, d.h. Schwärzung eines Röntgenfilms durch Lichtemission.

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei RT und unter Schütteln durchgeführt. Die PVDF-Membran mit den darauf transferierten Proteine wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in Blockierungspuffer [PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl) + 5 % „Glücksklee“-Magermilchpulver] inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschen der Membran für 3 x 5 min mit PBS-Tween [0.1 % Tween 20 (v/v)]. Danach wurde die Membran in PBS-Tween mit dem gegen das nachzuweisende Antigen-Protein gerichteten 1. Antikörper (Anti-PhoA-AK, Maus IgG, Verdünnung 1:5000) für 1 h inkubiert. Der Antikörper-Inkubation folgte 3 x 15 min Waschen der Membran in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Darauf wurde die Membran mit einem Anti-IgG-Antikörper (monoklonal, Anti-Maus-AK-Alkalische Phosphatase Konjugat [Sigma-Aldrich, Deisenhofen]) für 1 h inkubiert, der 1:50000 in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den darauf folgenden Waschschritten (3 x 15 min in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunkomplexe an.

Farbreaktion für Alkalische Phosphatase-Konjugate

Bei der Nachweisreaktion wurde die PVDF-Membran bis zu 30 min in 20 ml Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.8; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) mit 60 µl 5 % (w/v) X-Phosphat in DMF und 10 µl 7.5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) DMF bis zur Violettfärbung der Immunokomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O_{bidest} gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

Lichtreaktion für Peroxidase-Konjugate

Zum Nachweis wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 10 ml frische Detektionslösung I [0.1 M Tris-HCl, pH 8.5; 5.5 mM H₂O₂] und frische Detektionslösung II [0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 2.5 mM Luminol (Stammlösung in DMSO), 0.4 mM p-Cumarsäure (Stammlösung in DMSO)] gegeben, durch Schwenken gemischt und ca. 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Detektionslösung abgegossen, die feuchte Membran in eine aufgeschnittene Plastetüte gepackt und ein Röntgenfilm [*HyperfilmTM ECLTM* von Amersham Life Science, Little Chalfont (England)] 30 s bis 2 min exponiert. Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm ca. 30-90 s entwickelt, kurz in einem Wasserbad abgespült, für 3-6 min fixiert und abschließend 10 min in Wasser gespült.

Farbreaktion für Peroxidase-Konjugate

Diese Detektionsmethode wurde für den Nachweis *StrepTagII*[®]-haltiger Proteine durchgeführt. Die Blot-Membran wurde in 20 ml frisch hergestellter Reaktionslösung [0.1 M Tris-HCl, pH 8.5; 8.8 mM H₂O₂; 0.02 % (w/v) 4-Chlornaphtol (Chromogen-Stammlösung in Methanol)] bis zu 30 min zur Färbung der Immunokomplexe inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen mit H₂O_{bidest} gestoppt und die Membran luftgetrocknet.

2.6.5. Färbung von Polyacrylamid-Gelen

2.6.5.1. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (nach Weber und Osborn, 1969)

Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mindestens 30 min oder über Nacht leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung [2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0.5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O_{bidest}] inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärberlösung [40 % Ethanol, 7.5 % Essigsäure]. Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O_{bidest} aufbewahrt.

2.6.5.2. Silberfärbung (Rabilloud *et al.*, 1988; Nesterenko *et al.*, 1994)

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 100 ml Fixierlösung [50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Ethanol] für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Gel für eine Minute in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und für zwei Minuten in 100 ml Vorbehandlungslösung [40 mg Natriumthiosulfat in H₂O_{bidest}] inkubiert. Bevor das Gel für

20 min imprägniert wurde [200 mg Silbernitrat und 50 µl 37 % (v/v) Formaldehyd in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$], wurde es dreimal 20 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. An einen erneuten kurzen Waschschrift mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ schloss sich die Entwicklung [6 g Na_2CO_3 , 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und 70 µl Formaldehyd in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$] an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem nacheinander zweimal 2 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 50 ml Methanol [50 % (v/v)]-Essigsäure [12 % (v/v)]-Gemisch und 100 ml 50 % Methanol (v/v) gewaschen wurde. Anschließend konnte das Gel in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufbewahrt oder getrocknet werden.

2.6.5.3. Aktivitätsfärbung der SOD in der Nativen PAGE

Die SOD-Aktivitätsfärbung in der Nativen PAGE beruht auf der Nitrobluetetrazolium (NBT)-Methode. TEMED als Radikalstarter bewirkt am Licht die Oxidation von Riboflavin. Im Verlauf dieser Reaktion werden $\text{O}_2^{\cdot -}$ Radikale freigesetzt, die einen Farbumschlag des NBT von gelb nach blau-schwarz bewirken. Die SOD konkurriert mit NBT um die Radikale und verhindert dadurch eine Schwarzfärbung des Gels.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Native Gel 20 min im Dunkeln mit Lösung A [12.5 mg NBT, 5 mg Riboflavin in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$] inkubiert. Danach wurden 150 µl TEMED zugegeben und das Gel am Tageslicht inkubiert. Das schwarzgefärbte Gel mit ungefärbten Bereichen, die den SOD-Banden entsprechen, wurde bei Erreichen eines guten Kontrastes in Wasser gespült und die Reaktion damit abgestoppt.

2.6.6. *In vitro* Crosslinking - Experimente

2.6.6.1. Vernetzung mit Glutardialdehyd

Zur Untersuchung des oligomeren Zustandes der membranassoziierten Proteine ChrA₁ und ChrB₁ wurde das *in vitro* Crosslinking gewählt. Dabei wurde Glutardialdehyd als sehr reaktiver, relativ unspezifischer Crosslinker verwendet (Cheung & Nimni, 1982).

Zu einem Reaktionsansatz mit 100µg/ml Protein wurde 5 – 50 mM Glutardialdehyd zugegeben und bei RT inkubiert. Im Zeitraum von 0 – 30 min wurden je 20 µl Proben genommen, die mit 10 µl SDS-Probenpuffer [0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 20 g/l SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0.5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.01 g/l Bromphenolblau] abgestoppt und in einer SDS-PAGE analysiert wurden.

2.6.6.2. Vernetzung mit Tris - 2,2' - bipyridylruthenium(II)chlorid

Eine weitere Methode ist das *in vitro* Crosslinking mit Tris - 2,2' - bipyridylruthenium(II)-chlorid (Fancy & Kodadek, 1999). Für die Reaktion mit diesem relativ spezifischen, photoaktiven Crosslinker wurden 5 µg Protein in 9 µl Puffer W [100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Detergenz] mit 1 µl 50 mM APS und 10 µl Crosslink-Puffer [30 mM Na-Phosphat,

pH 7.5, 0.3 M NaCl, 250 μ M Tris - 2,2' - bipyridylruthenium(II)chlorid] versetzt. Alle Schritte erfolgten in der Dunkelheit, die Reaktion wurde unter einer Laborlampe für 0 – 30 s induziert und durch Zugabe von 10 μ l SDS-Probenpuffer abgestoppt. Proben mit eventuell entstandenen Oligomeren wurden in der SDS-PAGE analysiert.

2.7. Transportstudien mit radioaktivem [⁵¹Cr]-Chromat

2.7.1. Rekonstitutionsexperimente

Zur Herstellung von Proteoliposomen wurde das Dialyseverfahren nach Racker (1979) ausgewählt. Diese Methode ist zwar zeitaufwändiger als andere Verfahren, hat jedoch den Vorteil, dass Membranproteine aufgrund des langsamen Entzugs von Detergenzien häufig in einer definierten Orientierung in die Detergenz –destabilisierten vorgeformten Liposomen eingebaut werden (Casey *et al.*, 1982). Voraussetzung ist ein dialysierbares Detergenz mit hoher CMC (critical micelle concentration) . Dies war bei der Verwendung von CHAPS der Fall.

2.7.1.1. Herstellung von Liposomen (nach Reidlinger, 1994)

Zur Herstellung von Liposomen wurde Phosphatidylcholin Typ II-S (Fa. Sigma) verwendet. Das Lipidgemisch (50 mg/ml) wurde in Tris-Puffer [20 mM Tris-HCL, pH 7.0, 2 mM DTT] aufgenommen und zur Ultraschallung eingesetzt. Die Suspension wurde in einer Eis-NaCl-Mischung gekühlt und solange für je 30 s bei 60 W mit Ultraschall behandelt, bis die zunächst trübe Lösung transluzierend war.

2.7.1.2. Herstellung von Proteoliposomen (nach Racker, 1979)

Die vorgeformten Liposomen (s. 2.7.1.1.) wurden auf eine Lipidkonzentration von 10 mg/ml eingestellt und mit CHAPS (Endkonzentration 11 mM) versetzt. Das gereinigte ChrA₁-*Strep*TagII-Protein wurde zu dem Lipid/Detergenz – Gemisch gegeben und anschließend für 72 h gegen Tris – Puffer [20 mM Tris-HCL, pH 7.0, 2 mM DTT] unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Das Lipid : Protein – Verhältnis wurde dabei auf 100 : 1 (w/w) eingestellt. Nach der Dialyse wurden die Proteoliposomen durch Ultrazentrifugation (100000 g, 15 min, 4°C) pelletiert, in Tris – Puffer resuspendiert, aliquotiert, und bei -80°C gelagert. Als Kontrolle wurden Liposomen ohne Zusatz von Protein der gleichen Behandlung unterzogen.

2.7.1.3. Nachweis eines künstlichen Protonengradienten durch Fluoreszenzlöschung

Werden Liposomen oder Proteoliposomen mit NH₄Cl geladen und anschließend in einem NH₄Cl – freien Puffer gleicher Osmolarität verdünnt, entsteht aufgrund der Dissoziation von

NH_4^+ und der Membranpermeabilität von NH_3 ein Protonengradient über der Membran. Dieser Protonengradient kann über die Fluoreszenzlöschung des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange nachgewiesen werden (Schuldiner *et al.*, 1972).

Das Laden der Liposomen geschah durch 30minütige Inkubation in 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.0 in Gegenwart von 0.5 M NH_4Cl auf Eis. Das Messen der Fluoreszenzlöschung erfolgte mit einem Spectrofluorometer (SFM25, Fa. Kontron, Eching) in Quenching - Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M Cholinchlorid, 5 mM MgCl_2 , 2 μM Acridinorange] bei einer Anregungswellenlänge von 493 nm und einer Emission bei 530 nm. Die Fluoreszenzintensität des Quenching-Puffers wurde gleich 100% gesetzt, dann erfolgte die Zugabe von 1 μl (Proteo)Liposomen. Dabei war ein Fluoreszenz-Quench auf ca. 40% der Ausgangsintensität zu beobachten, dann erfolgte ein langsamer Anstieg der Fluoreszenzintensität. Für die radioaktiven Aufnahmestudien wurden nur (Proteo)Liposomen mit stabilem pH-Gradienten verwendet, die innerhalb von 10 min höchstens 80% der Ausgangsfluoreszenz wieder erreicht hatten.

2.7.1.4. Aufnahme von [^{51}Cr]-Chromat in Proteoliposomen

Die mit ChrA_1 -Protein rekonstituierten Proteoliposomen wurden durch einen Protonengradienten energetisiert, dies erfolgte durch Inkubation mit 0.5 M NH_4Cl . Die Aufnahmeexperimente mit [^{51}Cr]-Chromat erfolgten mittels der Filtrationsmethode. Die vorgeladenen Proteoliposomen wurden in Cholinchlorid-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.5 M Cholinchlorid] verdünnt.

Nach einer Minute wurde die Aufnahmemessung durch Zugabe von ca. 200 nCi [^{51}Cr] (Amersham, spez. Akt. 497.4 Ci/g) pro Experiment gestartet. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 μl wurde bei 30°C inkubiert und in zeitlichen Abständen wurden Aliquots von je 5 μl durch einen Filter mit der Porengröße 0.45 μm (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) gesaugt. Die Filter wurden mit 0.3 ml Cholinchlorid-Puffer (0.2 M Cholinchlorid, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) gewaschen und die Radioaktivität in cpm in einem Scintillationsmessgerät (LS6500, Beckman, München, Deutschland) ausgezählt. Als Kontrolle dienten mit Ammoniumchlorid geladene Liposomen.

2.7.2 Aufnahme von [^{51}Cr]-Chromat in Zellen von *R. metallidurans*

20 ml Tris-Minimalmedium wurden 2%ig aus einer 48 h-Vorkultur angeimpft. Nach Zugabe von [^{51}Cr]-Chromat (Amersham, spez. Akt. 497.4 Ci/g) wurde die Kultur 24 h schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Es wurden 3 ml Zellen und 30 μl 20 % (w/v) Na-Gluconat vorgelegt und 1 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach definierten Zeiten wurden Proben (300 μl) entnommen und filtriert (Membranfilter NC45) sowie die Zelldichte der Kultur im Klett-Sommersens-Colorimeter bestimmt. Die Filter wurden 2 x mit 3 ml Waschpuffer [10 mM Tris pH 7.0, 10 mM MgCl_2] gewaschen. Nach Zugabe von 4 ml Ready Safe™ wurde die

Radioaktivität des Isotops im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt. Die Zählzeit betrug 5 min, die Radioaktivität wurde in cpm angegeben. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Ansatz wurden 100 µl Probe entnommen und direkt mit 4 ml Ready Safe™ gemischt und gemessen.

2.8. Spektroskopische und Analytische Methoden

2.8.1. Fluoreszenzspektroskopie

2.8.1.1. Fluoreszenzspektrum von Proteinen nach Anregung der aromatischen Aminosäuren

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind verantwortlich für die 'intrinsische Fluoreszenz' von Proteinen. Das Fluoreszenzverhalten von Proteinen, die alle drei Aminosäuren enthalten, wird hauptsächlich von Tryptophan bestimmt, da dessen Absorption und Emission wesentlich höher ist, als die der anderen Aromaten. Die Fluoreszenzemission ist sehr sensitiv für Änderungen in der Umgebung der Chromophoren und daher eine hervorragende Methode zur Untersuchung von Konformationsänderungen. Typisches Emissionsmaximum für Tryptophan ist $\lambda=348$ nm bei einer Anregung von $\lambda=280$ nm (Schmid, 1996). Im gefalteten Protein kann das Maximum zu kürzeren Wellenlängen verschoben sein, falls die Reste im Inneren, also in hydrophober Umgebung angeordnet sind.

Fluoreszenzmessungen wurden beim ChrA₁-Protein zur Untersuchung der Entfaltung in GdmHCl verwendet. Die Emissionspektren wurden zwischen 300 nm und 400 nm analysiert ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm) und für 24 h bei 20°C temperiert.

2.8.1.2. Refraktrometrische Konzentrationsbestimmung von GdmHCl

Auch bei genauem Einwiegen ist es schwierig, hochkonzentrierte GdmHCl-Lösungen exakt herzustellen. Die tatsächlichen Konzentrationen dieser Lösungen wurden deshalb refraktrometrisch bestimmt und nach folgender Gleichung berechnet (Pace, 1986):

$$[\text{GdmHCl}] = 57.147 * \Delta n + 38.68 * \Delta n^2 - 91.6 * \Delta n^3$$

[GdmHCl]: Konzentration an GdmHCl in mol/l

Δn : Brechungsindexdifferenz der Lösungen mit und ohne GdmHCl

2.8.2. Circular Dichroismus

Das Phänomen des Circular dichroismus beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links- und rechts-circular polarisiertem Licht durch optisch aktive Substanzen. Die molare Elliptizität kann nach folgender Gleichung aus der gemessenen Elliptizität berechnet werden:

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \theta * 100 * \text{MRW} / (c * d) \text{ [Grad * cm}^2 * \text{dmol}^{-1}\text{]}$$

Das CD-Signal liefert Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins. Die CD-Technik wurde zur Beobachtung struktureller Veränderungen bei der Bindung von Chromat an das ChrA₁ und ChrB₁-Protein verwendet.

2.8.3. Analytische Elektronenmikroskopie – EDX

Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse wurde am IPB Halle/Saale von Herrn Dr. D. Neumann durchgeführt. Die EDX – Technik (energy dispersive X-ray analysis) liefert Aussagen zur Elementar-Zusammensetzung des ChrC-Proteins, und damit zur Natur des Metall-Kofaktors.

Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende Probe mit energiereichen Elektronen bestrahlt. Diese Primärelektronen stoßen Elektronen aus kernnahen Energieniveaus der Probenatome heraus. Die entstehende Lücke füllen Elektronen höherer Energieniveaus, wobei elementspezifische Röntgenstrahlung als Energiedifferenz emittiert wird.

Als Probe wurde gereinigtes ChrC-Protein eingesetzt, welches mittels TCA-Fällung vorbereitet wurde.

2.8.4. Analytische Ultrazentrifugation

In einem hohen Zentrifugalfeld wandern die Proben vom Meniskus zum Boden. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird als Sedimentationskoeffizient bezeichnet und in Svedbergeinheiten (S) angegeben, wobei 1 S 10^{-13} s entspricht. Der Sedimentationskoeffizient eines Proteins ist vom Molekulargewicht und der Gestalt des Moleküls abhängig. Die analytische Ultrazentrifugation kann also genutzt werden um anhand des Sedimentationskoeffizienten das apparente Molekulargewicht eines Proteins und damit seinen oligomeren Zustand abzuschätzen.

Das Molekulargewicht von gereinigtem ChrC *Strep*TagII-Fusionsprotein wurde im Labor von Dr. Hauke Lilie am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle bestimmt.

2.8.5. Elementaranalyse mittels ICP-AES (inductively coupled plasma - atom - emission spectrometrie)

ICP-AES (Atomemissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) ist eine Analysemethode zur quantitativen Bestimmung von Elementen im Spurenbereich. In der ICP-AES werden freie Atome und Ionen durch Stossanregung (thermische Energie) zur Emission elektromagnetischer Strahlung angeregt. Dabei werden für analytische Zwecke die Linienspektren von Valenzelektronen genutzt, wobei die Wellenlänge (qualitative Analyse) und die Intensität der Strahlung (quantitative Analyse) Aussage über die Konzentration bestimmter Elemente in der Probe geben. Als Anregungsquelle werden thermische Plasmen (5000-10000 K) verwendet. Die Probe wird zur Ionisierung als Aerosol in die Plasmafackel eingeblasen.

Die Analyse des Metall-Kofaktors des ChrC-Proteins wurde im Labor von Dr. Ute Krämer am MPI in Golm durchgeführt.

2.8.6. Kolorimetrischer Nachweis von Chrom(VI) in zellfreien Lösungen

Chrom(VI) wurde kolorimetrisch unter Verwendung von 1,5-Diphenylcarbazid (in Anlehnung an das Verfahren DIN 38 405 – D 24, Deutsche Einheitsverfahren zur Abwasser- und Schlammuntersuchung) nachgewiesen.

Eine zellfreie Probe (1 ml) wurde mit 40 µl 60 %iger *o*-Phosphorsäure versetzt. Danach wurden 40 µl einer 1 %igen Diphenylcarbazid-Lösung [0.5 g/ 50 ml Aceton, 1 Tropfen Eisessig, nach Gebrauch mit Stickstoff begasen] zugegeben, der Ansatz gründlich gemischt und 10 min zur Ausprägung der rotvioletten Färbung bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 550 nm bestimmt.

Zur Beseitigung reduzierend wirkender Ionen wurde 1ml Probe mit 30 µl Schwefelsäure und 30 µl 7 %igem Natriumhypochlorit versetzt. Oxidierend wirkende Ionen wurden durch Zugabe von 250 µl 10 % Na₂HPO₄, 100 µl 2 M NaOH und 100 µl Methanol entfernt. Die Probe wurde mit H₂O_{bidest} auf 5 ml aufgefüllt und 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die kolorimetrische Reaktion wie bereits beschrieben durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. *Ralstonia metallidurans* besitzt die Fähigkeit, Chromat zu reduzieren

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass in einer mit Chromat versetzten Flüssigkultur von *Ralstonia metallidurans* die Menge an Chromat im zellfreien Überstand abnimmt (Peitzsch, 1999). Diese Abnahme war nicht allein durch eine Aufnahme von Chromat in die Zellen zu erklären, so dass man eine Reduktion von Chromat annehmen konnte. Ein weiteres Indiz für Reduktionsvorgänge war der beobachtete Farbumschlag in chromathaltigen Flüssigkulturen von *R. metallidurans*. Dieser erfolgte von gelb (Cr[VI]) nach grün (Cr[III]).

Zu Beginn dieser Arbeit war weiterhin bekannt, dass auf dem Megaplasmid pMOL28 eine Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ kodiert ist. So hat der *R. metallidurans* Stamm AE126(pMOL28) eine erhöhte Resistenz gegenüber Chromat, verglichen mit Stamm AE104(megaplasmidfrei). Diese Resistenz beruht auf verringerter Akkumulation von Chromat (Nies & Silver, 1989). In den folgenden Untersuchungen sollte das Zusammenspiel zwischen Reduktion und verminderter Akkumulation von Chromat näher untersucht werden.

3.1.1. Die Fähigkeit, Chromat zu reduzieren, ist chromosomal kodiert und wird durch die Anwesenheit des Megaplasmid pMOL28 beeinflusst

Zur Untersuchung der Chromatreduktion in *R. metallidurans* wurden Flüssigkulturen der Stämme AE104 und AE126(pMOL28) verwendet. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde über einen Zeitraum von 5 Stunden die Menge an Chromat im zellfreien Überstand bestimmt. Dazu wurde ein kolorimetrischer Test genutzt, der auf der Oxidation von 1,5-Diphenylcarbazid zu 1,5-Diphenylcarbazon durch Cr(VI)-Ionen beruht. Um die Reduktion von Chromat nachweisen zu können, musste eine Abnahme von Chromat gegenüber dem Gesamtchromgehalt gezeigt werden. Die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtchromgehaltes nach der Oxidation aller Chrom-Spezies zu Cr(VI) erwies sich allerdings als wenig sensitiv und konnte daher nicht genutzt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Deshalb wurde mittels [⁵¹Cr] die Aufnahme von Chromat in die Zellen untersucht, und damit der Gehalt an zellgebundenem Chrom bestimmt (Abb.1B). Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit 50 µM Kalium-[⁵¹Cr]-chromat versetzt. Der Stamm AE126 zeigte wegen der auf pMOL28 lokalisierten Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ verminderte Akkumulation von Chromat gegenüber dem Stamm AE104. Die Messungen ergaben nach 5 h eine Akkumulation von 1 ± 0.2 µmol [⁵¹Cr]/g dw für Stamm AE104 und

von $0.32 \pm 0.06 \mu\text{mol/g dw}$ für Stamm AE126. Da sich also im Messzeitraum immer mindestens 98% des eingesetzten Chromats im zellfreien Überstand befanden, konnte das zellgebundene Chrom für die Untersuchung der Chromatreduktion vernachlässigt werden.

Zur Untersuchung des Reduktionsverhaltens wurde der chromatsensitive Stamm *R. metallidurans* AE104 in der spätexponentiellen Phase mit $50 \mu\text{M}$ Kaliumchromat versetzt und die Abnahme von Cr(VI) im zellfreien Überstand gemessen. Nach 5 Stunden ergab sich eine Abnahme um $11 \mu\text{mol/g dw}$ (Abb.1A). Da der plasmidfreie Stamm AE104 zur Reduktion von Chromat befähigt war, konnte davon ausgegangen werden, dass die dazugehörigen Gene chromosomal kodiert sind.

Stamm AE126 konnte nach 5 h nur $4.5 \mu\text{mol/g dw}$ Chromat reduzieren. Die Anwesenheit von Megaplasmid pMOL28 bewirkte eine stark verringerte Reduktionsrate (Abb. 1A).

R. metallidurans ist also unabhängig von der auf pMOL28 lokalisierten Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ zur Chromatreduktion fähig. Auf pMOL28 befinden sich allerdings Faktoren, die die Chromatreduktion beeinflussen.

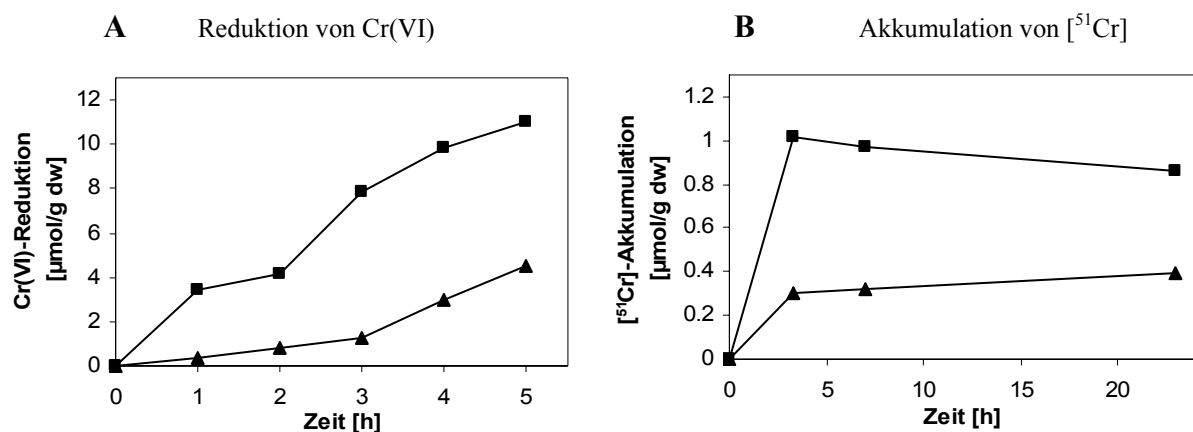


Abb. 1: Reduktion von Cr(VI) und Akkumulation von ^{51}Cr durch verschiedene *R. metallidurans*-Stämme. Die Zellen der Stämme AE104 (■) und AE126 (▲) wurden in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat kultiviert, in der spätexponentiellen Phase auf eine Zelldichte von $800 \mu\text{g dw/ml}$ eingestellt und mit $50 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 bzw. ^{51}Cr -Chromat versetzt. Die Menge an zellgebundenem ^{51}Cr [A] und die Abnahme von Cr(VI) im zellfreien Überstand als Maß für die Cr(VI)-Reduktion durch die Zellen [B] wurden in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

3.1.2. Die Chromatreduktion ist nicht durch Chromat induzierbar

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der Chromatreduktase-Aktivität wurden mit Chromat vorinkubierte Zellen verwendet. Dazu wurden Vorkulturen von *R. metallidurans* AE104 und AE126 über Nacht mit 0 bzw. 50 μM Kaliumchromat angezogen, in Tris-Minimalmedium auf eine Zelldichte von 800 $\mu\text{g dw/ml}$ eingestellt und die Chromatreduktion gemessen. Dabei zeigte sich, dass sich das Reduktionsverhalten mit Chromat vorinduzierter Zellen nicht von dem der uninduzierten Kontrollen unterschied (Abb. 2).

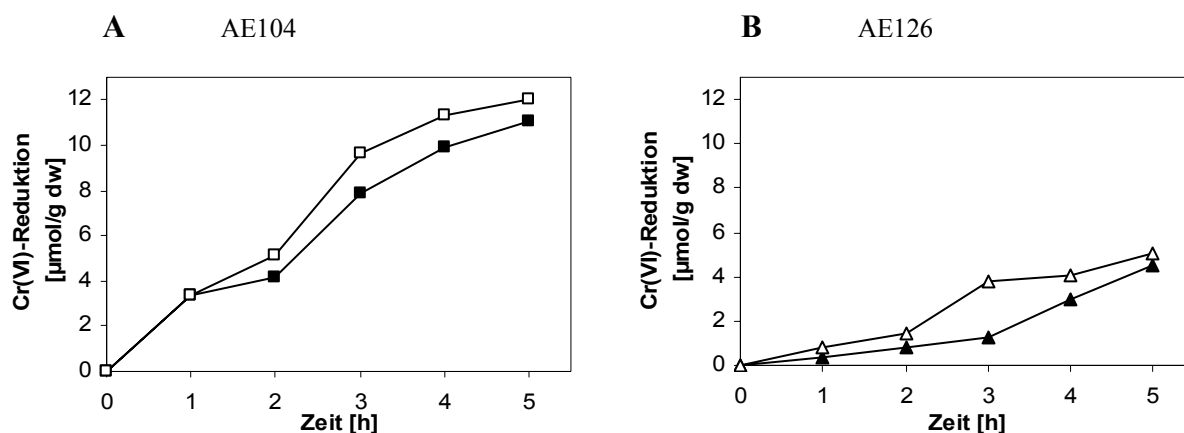


Abb. 2: Reduktion von Cr(VI) durch *R. metallidurans*-Stämme nach Induktion mit Chromat. Zellen der Stämme AE104 [A] und AE126 [B] wurden in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat ohne Chromat (uninduziert: ■, ▲) bzw. mit 50 μM Chromat (vorinduziert: □, △) angezogen. Die Hauptkultur wurde in der spätexponentiellen Phase auf eine Zelldichte von 800 $\mu\text{g dw/ml}$ eingestellt und mit 50 μM K_2CrO_4 versetzt. Die Reduktion von Chromat durch die Zellen wurde in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

3.1.3. In *R. metallidurans* AE126 ist die Chromatreduktion sulfatabhängig

Aus vorangegangenen Arbeiten war bereits bekannt, dass die *chr*₁-vermittelte Chromatresistenz abhängig vom Sulfatgehalt des Tris-Minimalmediums war (Peitzsch, 1999). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch die Chromatreduktase-Aktivität von *R. metallidurans* mit dem Sulfatmetabolismus der Zelle in Zusammenhang steht.

Vorkulturen der Stämme AE104 und AE126 wurden in der spätexponentiellen Phase in frischem Medium auf eine Zelldichte von 800 $\mu\text{g dw/ml}$ eingestellt. Dazu wurde Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat (sulfatgesättigt) und 30 μM Sulfat (sulfatlimitiert) verwendet und der Chromatreduktase-Assay durchgeführt.

Der plasmidfreie Stamm AE104 zeigte eine nahezu unveränderte Reduktion von Chromat unter Sulfatlimitation (Abb. 3A). Im Gegensatz dazu stieg die Reduktionsrate in Stamm AE126 bei 30 μM Sulfat auf das Dreifache und erreichte damit das Niveau von AE104 (Abb. 3B).

Die Anwesenheit von pMOL28 bewirkte bei Sulfatsättigung einen Abfall der Reduktionsrate von 2.37 ± 0.37 auf 0.73 ± 0.53 $\mu\text{mol}/[\text{g dw} \cdot \text{h}]$ Chromat. Bei Sulfatmangel hingegen waren die Reduktionsraten von AE104 und AE126 vergleichbar (Tab. 4). In Anwesenheit von pMOL28 ist die Chromatreduktion in *R. metallidurans* sulfatabhängig. Diese Tatsache lässt einen Zusammenhang zwischen Chromatreduktion, Sulfatmetabolismus und der auf pMOL28 lokalisierten Chromatresistenz vermuten.

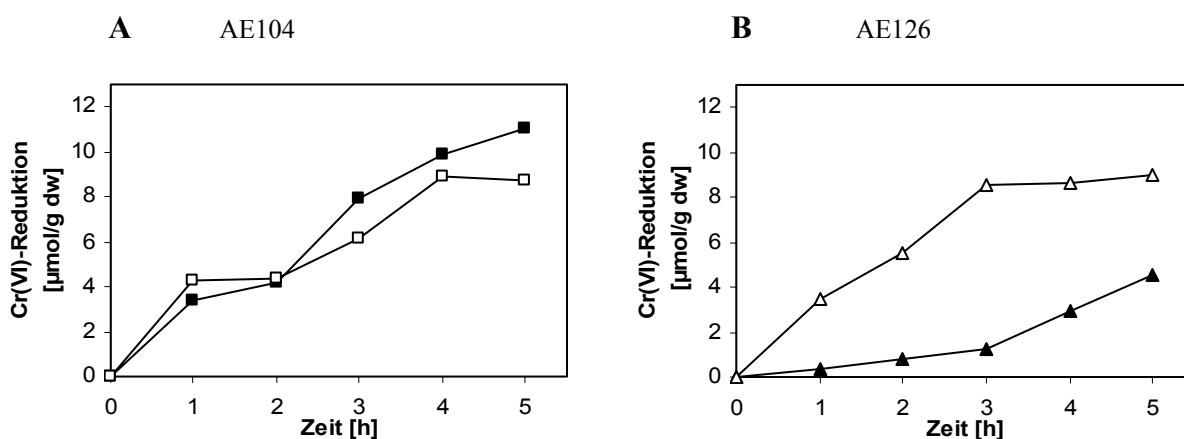


Abb. 3: Abhängigkeit der Chromatreduktion in *R. metallidurans* vom Sulfatgehalt im Medium. Die Kultivierung der Stämme AE104 [A] und AE126 [B] erfolgte in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat [■, ▲] und 30 μM Sulfat [□, △]. In der spätexponentiellen Phase wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 800 $\mu\text{g dw/ml}$ eingestellt und mit 50 μM K_2CrO_4 versetzt. Die Reduktion von Chromat durch die Zellen wurde in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Tabelle 4: Chromatreduktionsraten der Stämme AE104 und AE126

Wachstumsbedingungen	Reduktionsrate von Chromat [$\mu\text{mol}/(\text{g dw} \cdot \text{h})$]	
	AE104	AE126
Tris-Minimalmedium, 3 mM Sulfat	2.37 ± 0.37	0.73 ± 0.53
Tris-Minimalmedium, 3 mM Sulfat, Induktion mit 50 μM Chromat	2.69 ± 0.18	1.02 ± 0.24
Tris-Minimalmedium, 30 μM Sulfat	2.01 ± 1.46	2.17 ± 1.85

Die Messwerte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Induktion durch Chromat wurde nur in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat untersucht.

3.1.4. *R. metallidurans* besitzt eine lösliche, NADH-abhängige Chromat-reduktase-Aktivität

Um die Chromatreduktase-Aktivität aus *R. metallidurans* näher zu charakterisieren, wurden Rohextrakte der Stämme AE104 und AE126(pMOL28) untersucht. Die Zellen wurden in Tris-Minimalmedium mit 4 g/l Natriumgluconat angezogen und bei einer Zelldichte von $OD_{600}=1.5$ geerntet. Im Rohextrakt wurde eine NADH-abhängige Chromatreduktase-Aktivität identifiziert (Abb. 4). Nach Abtrennung der Membranfraktion durch Ultrazentrifugation konnte die Aktivität vollständig in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der verwendete Chromatreduktase-Assay enthielt Rohextrakt, Chromat (Oxidationsmittel) und NADH (Reduktionsmittel). Um zu zeigen, dass eine enzymabhängige Chromatreduktion stattfindet, war die Blindreaktion der Reduktion von Chromat durch NADH zu berücksichtigen. Eine Reduktion von Chromat durch den Rohextrakt fand unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht statt (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Reduktase-Assay wurde optimiert und die Messungen mit 50 μ M Chromat, 0.5 mM NADH und 50 μ l Rohextrakt (ca. 5 mg/ml Gesamtprotein) im Testansatz durchgeführt. Unter diesen Versuchsbedingungen hatte die Reduktion von Chromat durch NADH eine spezifische Aktivität von 0.35 μ mol/min (Blindreaktion ohne Rohextrakt).

Die verwendeten Rohextrakte hatten eine spezifische Aktivität von 19.5 nmol/[μ g*min] für AE104 und von 13 nmol/[μ g*min] für AE126. Mit steigender Proteinmenge wurden steigende Chromatmengen reduziert, so dass man von einer Enzymaktivität ausgehen konnte (Abb. 4).

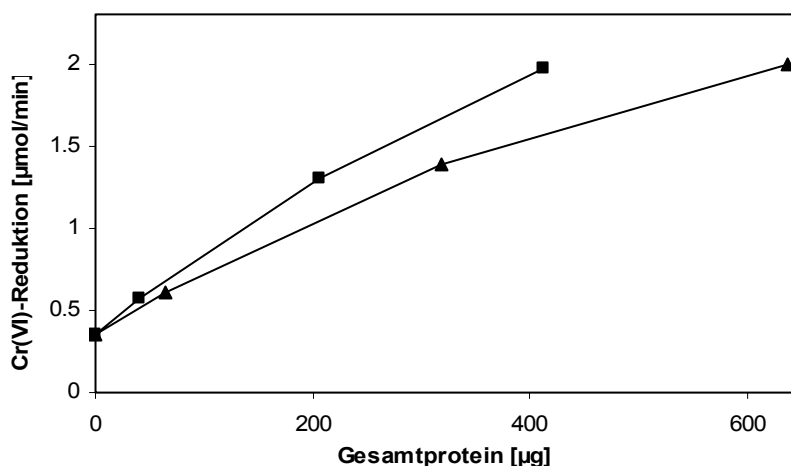


Abb. 4: NADH-abhängige Chromatreduktase-Aktivität im Rohextrakt von *R. metallidurans*. Die Cr(VI)-Reduktion wurde in den Stämmen AE104 (■) und AE126 (▲) getestet. Dazu wurden Zellen der spätexponentiellen Phase in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) mit 0.5 mM NADH und 50 μ M Chromat versetzt. Der Cr(VI)-Gehalt wurde nach einer Inkubation von 5 min bei 30°C gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.

Der Umsatz von NADH in Gegenwart von Chromat konnte spektroskopisch nicht gezeigt werden, da NADH und Chromat in demselben Wellenlängenbereich Licht absorbieren. Eine Einschränkung der Rohextrakt-Proportionalität kam durch NADH-Verbrauch anderer NADH-abhängiger Enzyme im Rohextrakt zustande.

Chromat ist ein kompetitiver Inhibitor der Sulfataufnahme in *R. metallidurans* (Nies & Silver, 1989a). Die Sulfatverfügbarkeit im Medium hatte Einfluss auf die Chromatreduktion durch AE126 (Abb. 3). Eine Hemmung der Chromatreduktase-Aktivität durch Sulfat im Konzentrationsbereich von 10 bis 200 μM wurde allerdings nicht festgestellt (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2. *R. metallidurans* besitzt mindestens zwei Genregionen, die für die Ausbildung einer Chromatresistenz verantwortlich sind

3.2.1. Die Genorganisation der *chr*₁-Determinante auf pMOL28

Die Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ wurde ursprünglich als Teil einer partiellen *EcoRI* / *XhoI* – Genbank des Megaplasמידs pMOL28 kloniert (Cosmid pDNA 206). Das für die Ausbildung der Chromatresistenz essentielle 2.6 kb-*EcoRI*-Fragment (Abb. 5A) enthielt die Gene *chrB*, *chrA*, das 5'-Ende von *chrC* und einen ORF136 (Nies *et al.*, 1990). Zusammen mit der von Liesegang *et al.* (1993) sequenzierten *upstream*-Region und dem von Peitzsch (1999) bestimmten *downstream* liegenden Sequenzbereich ergab sich zu Beginn dieser Arbeit das in Abbildung 5A dargestellte Bild der *chr*₁-Region.

Stromaufwärts von *chrB*₁ befanden sich zwei weitere ORFs, deren Einfluss auf die Chromatresistenz ungeklärt war. In der Sequenz stromabwärts von *chrA*₁ wurden mehrere Gene identifiziert. Die Transkription der Gene *chrC* und *rpoH* war durch Chromat induzierbar (Juhnke *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass die *chr*₁-Genregion umfangreicher als das ursprünglich identifizierte 2.6 kb-Fragment ist.

Nach der vollständigen Sequenzierung von *R. metallidurans* am DOE Joint-Genome Institute wurden vorläufige Sequenzdaten unter http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/ralstonia/ralston_homepage.html erhalten und mit den bereits vorhandenen Sequenzdaten abgeglichen. Dabei wurde die *chr*₁-Determinante auf Contig 712 der Datenbank des DOE JGI identifiziert. Bereiche mit Sequenzabweichungen wurden kontrolliert. Dazu wurden diese Sequenzbereiche mittels PCR amplifiziert, in den Vektor pGEM-Teasy kloniert und sequenziert. Die korrigierte *chr*₁-Genregion ist in Abbildung 5B1 dargestellt und umfasst die folgenden Änderungen:

Im 5'-Bereich der Determinante wurde das Gen *chrI* identifiziert. Dieses Gen wurde in Gegenrichtung transkribiert und umfasste Bereiche der ehemaligen ORFs 85 und 136b. Durch

Korrektur zweier Sequenzfehler vergrößerte sich *chrB*₁ von 591 bp auf 972 bp, worauf sich direkt das *chrA*₁-Gen anschloss. Eine Korrektur in *chrC* führte zu einer Verkürzung des Gens von 903 bp auf 591 bp.

Direkt an einer *XhoI*-site stromabwärts von *chrC* brach die Homologie der Sequenz zu Contig 712 ab und wurde in Contig 660 weitergeführt. Mittels PCR wurde die Lokalisation von *chr*₁ aufgeklärt. Ein PCR-Produkt konnte nur mit pMOL28-DNA als Template und der Kombination eines 5'-Primers in *chrC* (Abb. 5A, Primer 1) mit einem 3'-Primer auf Contig 712 (Primer 2) amplifiziert werden. Befand sich der 3'-Primer auf Contig 660 (Primer 3), wurde kein PCR-Produkt erhalten (Daten nicht gezeigt). Damit wurde gezeigt, dass die Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ sich auf dem Megaplasmid pMOL28 befindet. Der Sequenzbereich befindet sich auf Contig 712.

Direkt stromabwärts von *chrC* wurden auf Contig 712 zwei weitere ORF's identifiziert, die für putative Proteine mit einer Größe von 113 aa und 140 aa kodierten. Die Gene wurden mit *chrE* und *chrF*₁ bezeichnet. Der nächste stromabwärts liegende ORF war mehr als 400 bp vom 3'-Ende von *chrF*₁ entfernt und wurde daher in die folgenden Untersuchungen nicht mit einbezogen.

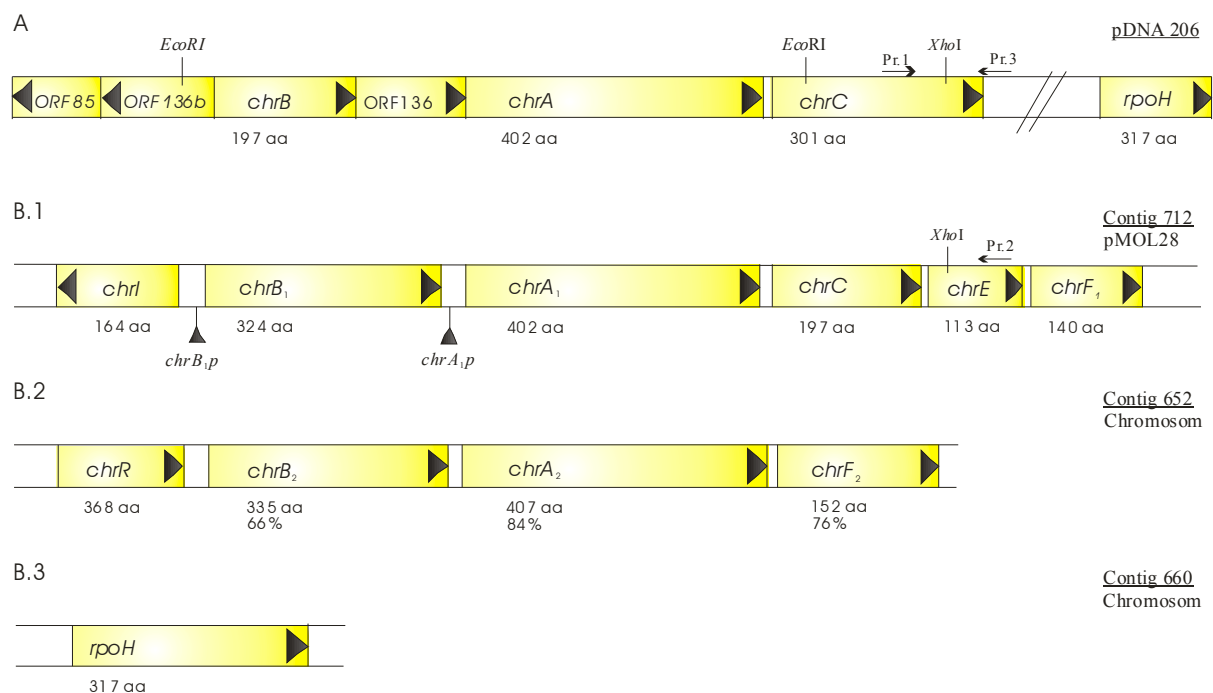


Abb. 5: Genorganisation der Chromatresistenz-Determinanten in *R. metallidurans* CH34. Physikalische Karte der in die Chromatresistenz involvierten Regionen auf pMOL28 [B.1] und dem Bakterienchromosom [B.2, B.3]. Die ursprüngliche Klonierungsregion im Cosmid pDNA206 ist in [A] gezeigt. Gene sind mit den Pfeilen in Transkriptionsrichtung dargestellt. Die Anzahl der Aminosäuren (aa) der vorhergesagten Proteine wird unterhalb der Gene gezeigt, in [B.2] ist die Identität zum homologen Protein auf pMOL28 in Prozent angegeben. In [A] ist die Lage der für die Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen von *EcoRI* und *XhoI* angegeben. In [A] und [B.1] kennzeichnen dünne Pfeile (Pr.1 – Contig 712 up, Pr.2 – Contig 712 down, Pr.3 – Contig 660 down) die Lage der Primer, die zur Zuordnung der Gene zu den Contigs verwendet wurden.

Das ursprünglich auf pDNA206 klonierte *rpoH* - Gen war durch Chromat induzierbar (Peitzsch, 1999) und sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden. Mittels PCR konnte *rpoH* aus der chromosomalen DNA von Stamm AE104(plasmidfrei) amplifiziert werden. Das *rpoH*-Gen befand sich also nicht wie ursprünglich angenommen auf pMOL28, sondern auf dem Bakterienchromosom. Die Sequenz lag auf Contig 660 (Abb. 5B.3).

3.2.2. Die chromosomal kodierte *chr₂*-Genregion zeigte hohe Homologie zur Chromatresistenz-Determinante *chr₁*

Eine weitere Analyse der Genomsequenz von *R. metallidurans* führte zur Identifizierung einer zu *chr₁* homologen Genregion auf Contig 652. Diese zweite Genregion wurde mit *chr₂* bezeichnet. Die Gene dieser Determinante konnten erfolgreich aus der Gesamt-DNA des Stammes AE104 amplifiziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Damit wurde die chromosomale Lokalisation von *chr₂* demonstriert.

Diese *chr₂*-Determinante besteht aus *chrB₂* (ChrB₂, 66% Identität zu ChrB₁), *chrA₂* (ChrA₂, 84% Identität zu ChrA₁) und *chrF₂* (ChrF₂, 76% Identität zu ChrF₁). Alle Gene wiesen dieselbe Transkriptionsrichtung auf (Abb. 5B.2). Stromaufwärts von *chrB₂* befand sich ein weiterer ORF, der in Gegenrichtung transkribiert wurde, keine Homologien zur *chr₁*-Region aufwies, und mit *chrR* bezeichnet wurde. Weitere flankierende ORFs stehen wahrscheinlich nicht in Verbindung zur Chromatresistenz und wurden daher nicht weiter untersucht. Sie wiesen Homologien zu einer Cytochrom P₄₅₀ Hydroxylase aus *Bacillus halodurans* bzw. zu einem Inhibitor der Replikations-Initiation aus *P. aeruginosa* auf.

3.2.3. Konstruktion von Deletionsmutanten in den *chr*-Genregionen

Zunächst war die Frage nach der Involvierung von *chr₂* in die Ausbildung der Chromatresistenz von *R. metallidurans* zu klären. Des Weiteren sollte die Rolle einzelner Gene der *chr*-Genregionen näher charakterisiert werden. Dazu wurden verschiedene Deletionsmutanten in den Stämmen AE104 und AE126(pMOL28) hergestellt. Es wurden *in frame*-Deletionen konstruiert, die kurze Bereiche vom 5'-Ende und vom 3'-Ende des jeweiligen Gens enthielten. Durch die Expression eines Restpeptids ohne Funktion sollten mögliche polare Effekte auf die stromabwärts liegenden Gene verhindert werden.

Zur Herstellung dieser Deletionen wurden zwei Genbereiche von ca. 300 bp amplifiziert, die den 5'-Bereich sowie den 3'-Bereich des ORFs enthielten. Diese Fragmente wurden über eine zusätzlich eingeführte *MunI*-Schnittstelle zusammen in den Vektor pGEM-Teasy kloniert.

Nach Überprüfung durch Sequenzierung wurden die Konstrukte in den Vektor pLO2 kloniert. Dieser Suizidvektor kann in *R. metallidurans* nicht replizieren, sondern nur aufgrund homologer Bereiche in das Megaplasmid oder Chromosom rekombinieren. Die Selektion auf Rekombinante erfolgte mittels einer Kanamycin-Resistenz. Das Plasmid pLO2 trägt außerdem das Gen der Leavansucrase (*sacB*). Dies ermöglichte die Selektion auf eine erfolgte Doppelaustausch-Rekombination in saccharosehaltigem Medium. Nach diesem Protokoll (Lenz *et al.*, 1994) wurden Deletionen der Gene *chrB*₁ und *chrC* erhalten (Abb. 6A).

Andere Gene wurden durch Insertion der Vektoren pLO2 bzw. pLO2-*lacZ* zerstört. Dabei wurde das intakte Gen in zwei unvollständige ORFs aufgespalten. Ein zentraler Bereich des Gens von ca. 300 bp wurde amplifiziert, in die Vektoren pLO2 bzw. pLO2-*lacZ* kloniert und für die homologe Rekombination in *R. metallidurans* eingesetzt. Dabei entstanden Vektorinsertionen der Gene *chrA*₂, *chrR*, *chrB*₂, *rpoH* (mit pLO2) und *chrF*₁, *chrF*₂ (mit pLO2-*lacZ*) (Abb. 6B). Bei Insertion des Vektors pLO2-*lacZ* wurde zusätzlich eine Transkriptionsfusion mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen geschaffen, die für weitere Untersuchungen genutzt wurde. Der von Hübener (2000) konstruierte Stamm DN421 (Deletion von ORF85, alte Nomenklatur, Abb. 5A) erwies sich als korrekter Deletionsstamm für *chrI* und wurde in die folgenden Untersuchungen einbezogen.

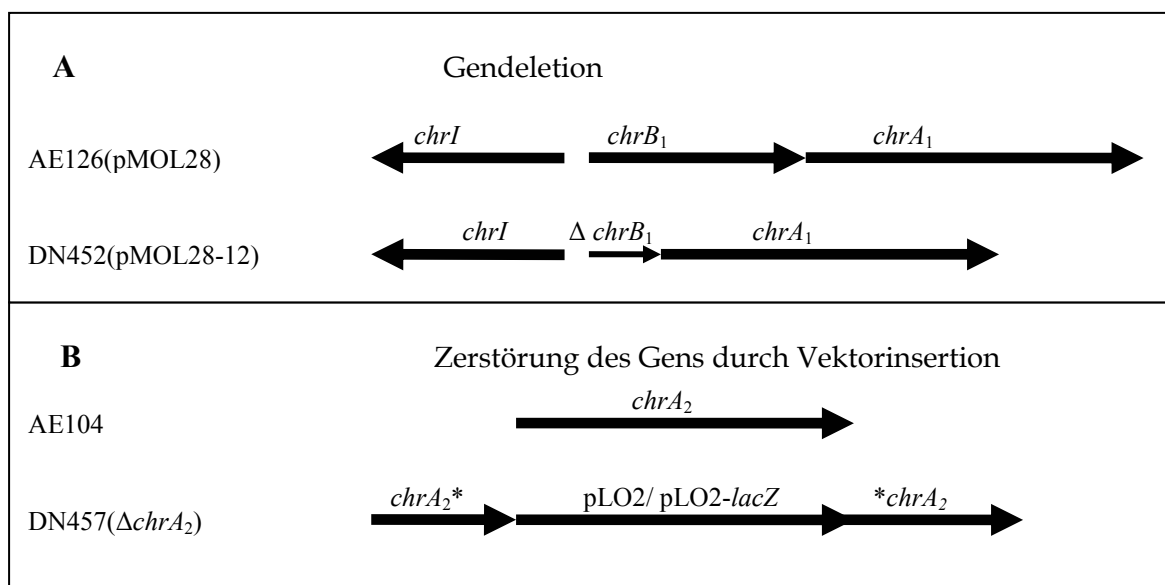


Abb. 6: Generierung der Deletionsstämmen in den beiden *chr*-Genregionen. [A] Durch Verkürzung der Gene auf ein ca. 54 bp-Fragment wurden die Stämme AE126(pMOL28-12) Δ *chrB*₁ und AE126(pMOL28-13) Δ *chrC* konstruiert. [B] Eine Zerstörung der Gene durch Insertion von pLO2 führte zu den Stämmen AE126(pMOL28-11, Δ *chrI*), AE104(Δ *chrA*₂), AE104(Δ *chrB*₂), AE104(Δ *chrR*), AE126(Δ *rpoH*). Die Insertion von pLO2-*lacZ* führte zu den Stämmen AE126(pMOL28-14, Δ *chrF*₁) und AE104(Δ *chrF*₂).

3.2.4. Einfluss der *chr*-Gene auf die Chromatresistenz

Für alle Deletionsmutanten wurde die Minimale Inhibitor-Konzentration (MIC) gegenüber Chromat bestimmt. Die Charakterisierung der Stämme erfolgte in Tris-Minimalmedium mit einem Gehalt von 3 mM bzw. 30 μ M Natriumsulfat. Die Untersuchung der Chromatresistenz in Abhängigkeit vom Sulfatgehalt des Mediums erfolgte aus mehreren Gründen. Chromat wird über Sulfataufnahmesysteme in die Zelle von *R. metallidurans* transportiert. Bei Wachstum unter Sulfatmangelbedingungen sollte auch die Aufnahme von Chromat in die Zelle verstärkt sein. Nies & Silver (1989a) stellten fest, dass 30 μ M Sulfat im Medium zu einer Induktion der Sulfataufnahme-Systeme führen.

Tatsächlich konnte für AE126(pMOL28) und AE104 gezeigt werden, dass Chromat unter Sulfatmangelbedingungen stärker toxisch wirkt als bei Sulfatsättigung (Tab. 5). Eine Deletion von *chrA*₁ führte zum vollständigen Verlust der pMOL28-vermittelten Resistenz (Nies *et al.*, 1990). Dagegen führten die Deletionen von *chrC*, *chrI* und *chrF*₁ nur zu einem geringfügigen Verlust an Resistenz. Die Deletion von *chrB*₁ zeigte keinen Effekt auf die Chromatresistenz (Tab. 5). Bei der Untersuchung der *chr*₂-Determinante in Stamm AE104 bewirkten die Deletionen von *chrA*₂ bzw. *chrB*₂ einen starken Resistenzverlust. Die Deletion von *chrF*₂ zeigte einen schwachen Einfluss, eine Deletion von *chrR* dagegen keinen Einfluss auf die Chromatresistenz.

Die Inaktivierung des alternativen Sigmafaktors *rpoH* bewirkte keinen veränderten Phänotyp. Trotz *rpoH*-homologer Promotorsequenzen (Peitzsch, 1999) werden die *chr*-Determinanten in *R. metallidurans* also nicht, oder nicht ausschließlich durch eine RpoH-abhängige RNA-Polymerase transkribiert.

Auffällig war, dass der Verlust von *chrB*₂ in AE104 zum vollständigen Resistenzverlust führte, während eine Deletion von *chrB*₁ in AE126(pMOL28) keinen Effekt hatte. Dies war ein Hinweis darauf, dass ChrB₂ die Funktion des fehlenden ChrB₁-Proteins ersetzen kann. Es konnte damit erstmals gezeigt werden, dass ChrB-Proteine an der Ausbildung der Chromatresistenz in *R. metallidurans* beteiligt sind.

Tabelle 5: Minimale Inhibitor-Konzentrationen (MIC) von Chromat in verschiedenen *R. metallidurans* Stämmen ^{a)}

Stamm	Genotyp	MIC-Werte [μ M Chromat]	
		3 mM Sulfat	30 μ M Sulfat
AE126	pMOL28	350	40
DN452	pMOL28-12 ($\Delta chrB_1$)	350	40
DN453	pMOL28-13 ($\Delta chrC$)	300	35
DN421	pMOL28-11 ($\Delta chrI$)	300	35
DN454	pMOL28-14 ($\Delta chrF_1$)	300	35
DN459	$\Delta rpoH$, pMOL28	350	40
	$\Delta chrA_2$, pMOL28	350	40
	$\Delta chrB_2$, pMOL28	350	40
	$\Delta chrR$, pMOL28	350	40
	$\Delta chrF_2$, pMOL28	350	40
AE104	plasmidfrei	150	20
DN455	$\Delta chrR$	175	20
DN457	$\Delta chrA_2$	70	10
DN456	$\Delta chrB_2$	70	10
DN458	$\Delta chrF_2$	125	20

^{a)} Die Minimale Inhibitorkonzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der nach 3 d bei 30°C kein Wachstum mehr sichtbar war. *R. metallidurans* wurde auf Tris-Minimalagar mit 3 mM bzw. 30 μ M Sulfat und verschiedenen Konzentrationen an Chromat kultiviert.

Die *chrA*-Deletionen bewirkten einen massiven Resistenzverlust im jeweiligen *chr*-System. Die Anwesenheit jedes ChrA-Proteins führte zu einer Verdopplung der Chromatresistenz im Vergleich zur Mutante. Damit sollten beide Proteine an der Entgiftung von Chromat beteiligt sein. Dieser Dosisseffekt konnte mit Toxizitätskurven genauer beschrieben werden (Abb. 7).

Deletionen der Gene der chromosomal kodierten *chr2*-Determinante in Stamm AE126(pMOL28) zeigten Wildtypresistenz (Tab. 5). Dies bewies, dass die beiden Genregionen nicht gleichwertig an der Ausprägung der Chromatresistenz beteiligt sind. Bei Anwesenheit von pMOL28 bewirkte die *chr2*-Determinante keine weitere Steigerung der Chromatresistenz, so das *chr1* für das ausgebildete Resistenzlevel allein ausreichend war. Das *chr2*-System scheint also als *Backup*-System zu fungieren.

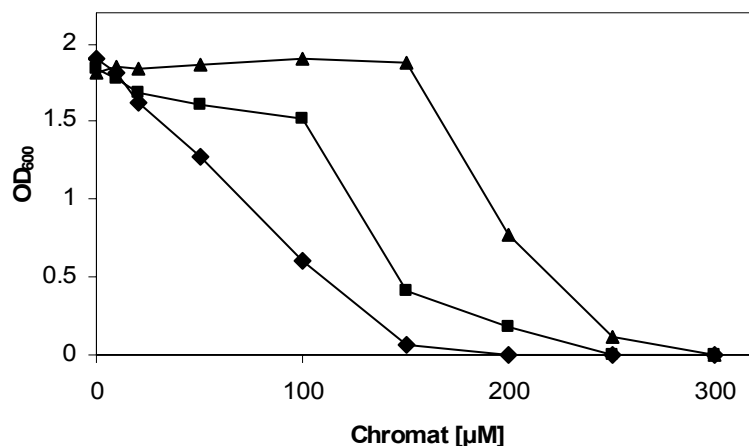


Abb. 7: Wachstum von AE126(*chrA*₁⁺, *chrA*₂⁺) [▲], AE104(*chrA*₂⁺, *chrA*₁⁻) [■], DN457(*chrA*₁⁻, *chrA*₂⁻) [◆] unter Chromatstress. Zellen wurden aus einer 48 h Vorkultur, gefolgt von einer 3 h Zwischenkultur, 1:50 in eine Hauptkultur verdünnt. Das Wachstum in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat nach 35 h bei 30°C wurde als Zelldichte [OD₆₀₀] gegen die Chromatkonzentration im Medium aufgetragen. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

3.2.5. Die Transkription der *chr*-Genregionen ist durch Chromat induzierbar

Die chromatabhängige Transkription des 5'-Bereichs der *chr*₁-Determinante (*chrB*₁, *chrA*₁, *chrC*) sowie von *rpoH* wurde bereits gezeigt (Juhnke *et al.*, 2002). Ergänzend sollte nun sowohl die Induzierbarkeit der neu identifizierten Gene *chrE* und *chrF*₁ (pMOL28) als auch der chromosomal kodierten *chr*₂-Determinante untersucht werden (Abb. 5B1, B2).

Durch Insertion des Vektors pLO2-*lacZ* wurden Transkriptionsfusionen der verschiedenen Gene mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen in AE104 und AE126 konstruiert. Dabei entstanden die Stämme DN461[pMOL28-15, Φ(*chrE-lacZ*)], DN454[pMOL28-14, Φ(*chrF*₁'-*lacZ*)], DN460[Φ(*chrB*₂-*lacZ*)], DN458[Φ(*chrF*₂'-*lacZ*)], DN463[pMOL28, Φ(*chrB*₂-*lacZ*)] sowie DN462[pMOL28, Φ(*chrF*₂'-*lacZ*)]. Die in *R. metallidurans* natürlicherweise nicht vorhandene β-Galaktosidase-Aktivität wurde als Maß für induktive Ereignisse genutzt. Tatsächlich konnte die Induzierbarkeit mit Chromat für die neu identifizierten Gene der *chr*₁-Genregion gezeigt werden (Abb. 8). So zeigten die Gene *chrE* und *chrF*₁ ein ähnliches Induktionsprofil bei verschiedenen Chromatkonzentrationen. In Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat war ein deutlicher Anstieg der β-Galaktosidase-Aktivität bei Induktion mit 2 µM Chromat zu messen. Bei 20 µM Chromat war die Aktivität mit dem 6-7fachen Level auf ihrem Maximum im Vergleich zu uninduzierten Zellen (Abb. 8A). Bei höheren Konzentrationen war ein leichter Abfall des Induktionsfaktors zu beobachten.

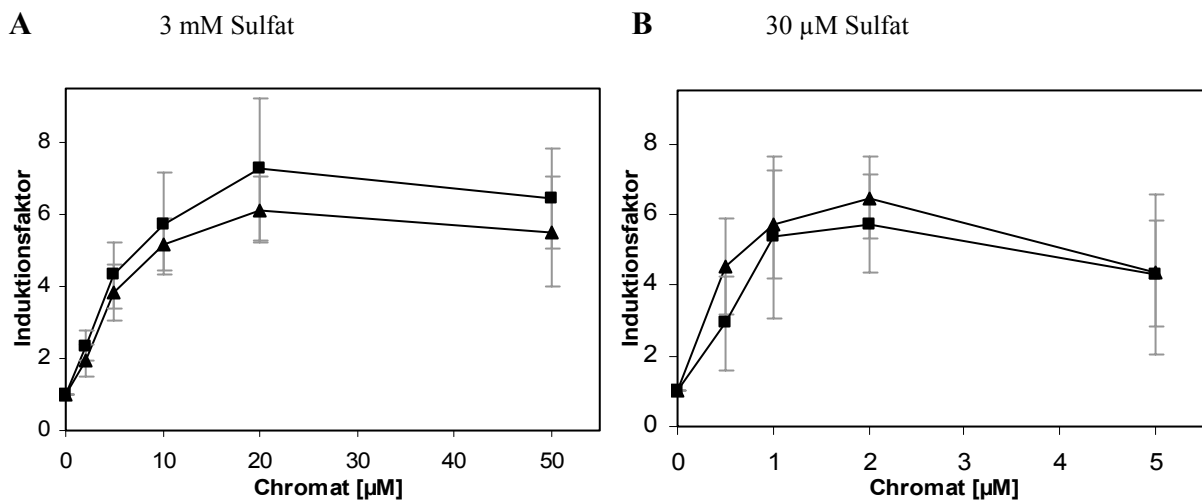


Abb. 8: Induktion von Genen der chr_1 -Determinante in den Transkriptionsfusionen DN461[pMOL28-15, $\Phi(\text{chrE-lacZ})$] (▲) und DN454[pMOL28-14, $\Phi(\text{chrF}_1\text{'-lacZ})$] (■) mit Chromat. Die Induktion von $lacZ$ -Fusionen wurde in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat [A] und 30 μM Sulfat [B] untersucht. Nach Erreichen der exponentiellen Phase (70-100 Klett) wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Chromat induziert. Nach 180 min wurde in einem Probevolumen von 200 μl die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Das Verhältnis der Aktivität der induzierten Probe zur uninduzierten Kontrolle (0 μM Chromat) wurde als Induktionsfaktor bezeichnet und gegen die Chromatkonzentration aufgetragen.

Doch das Induktionsverhalten von DN461[pMOL28-15, $\Phi(\text{chrE-lacZ})$] und DN454[pMOL28-14, $\Phi(\text{chrF}_1\text{'-lacZ})$] war auch vom Sulfatgehalt des Mediums abhängig. Bei Sulfatmangel im Medium war das Induktionsprofil beider Stämme zwar unverändert, aber das Maximum der β -Galaktosidase-Aktivität war bereits bei 2 μM Chromat erreicht (Abb. 8B). Dies veranschaulichte wieder die stark erhöhte Toxizität von Chromat bei Sulfatmangel im Medium.

Der Sulfatgehalt des Mediums beeinflusste die Induzierbarkeit der Stämme DN461[pMOL28-15, $\Phi(\text{chrE-lacZ})$] und DN454[pMOL28-14, $\Phi(\text{chrF}_1\text{'-lacZ})$] durch Chromat. Sulfat war allerdings kein Induktor. Im Bereich von 0 bis 30 mM Sulfat war keine Induzierbarkeit der Transkription der oben genannten Stämme zu ermitteln (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Induktion der chromosomal kodierte chr_2 -Determinante wurde beispielhaft anhand von Transkriptionsfusionen der Gene $chrB_2$ und $chrF_2$ in Stamm AE104 untersucht. Die dafür konstruierten Stämme DN460[$\Phi(\text{chrB}_2\text{-lacZ})$] und DN458[$\Phi(\text{chrF}_2\text{'-lacZ})$] waren eindeutig durch Chromat (Abb. 9), aber nicht durch Sulfat (Ergebnisse nicht gezeigt) induzierbar. Das Maximum der β -Galaktosidase-Aktivität in sulfatgesättigtem Medium war bei Induktion mit 10 bis 20 μM Chromat erreicht (Abb. 9A). Unter Sulfatmangel war DN458[$\Phi(\text{chrF}_2\text{'-lacZ})$] schwächer induzierbar als DN460[$\Phi(\text{chrB}_2\text{-lacZ})$]. Die Induktionsprofile der chr_2 -Determinante in Stamm AE104 entsprachen denen der chr_1 -Determinante in Stamm AE126.

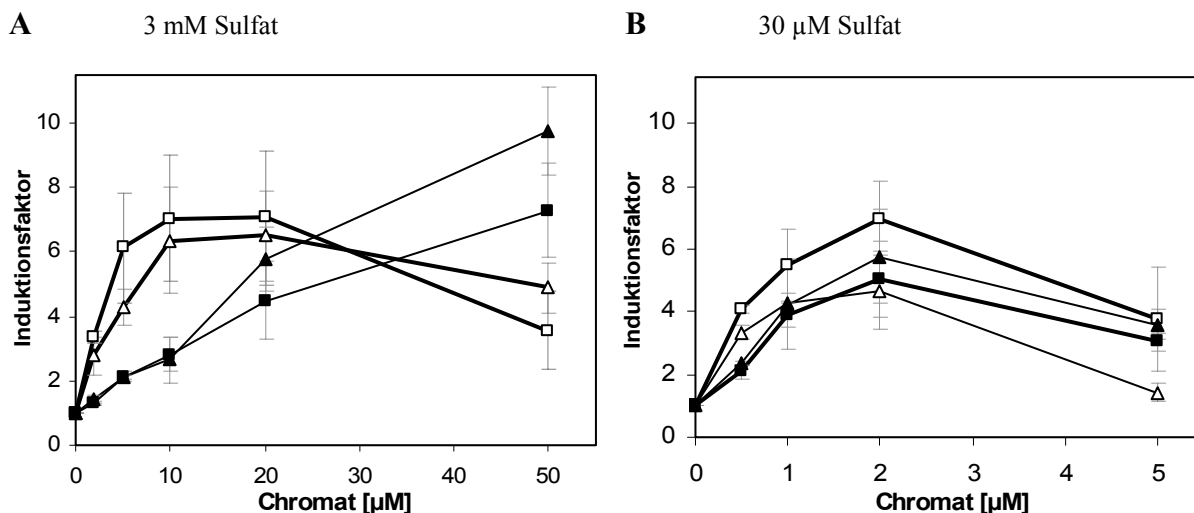


Abb. 9: Induktion von Genen der *chr₂*-Determinante in den Transkriptionsfusionen DN460[$\Phi(\text{chrB}_2\text{-lacZ})$] (■), DN458[$\Phi(\text{chrF}_2'\text{-lacZ})$] (▲), DN463[pMOL28, $\Phi(\text{chrB}_2\text{-lacZ})$] (□) sowie DN462[pMOL28, $\Phi(\text{chrF}_2'\text{-lacZ})$] (A) mit Chromat. Die Induktion wurde in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat [A] und 30 μM Sulfat [B] untersucht. Nach Erreichen der exponentiellen Phase (70-100 Klett) wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Chromat induziert. Nach 180 min wurde in einem Probevolumen von 200 μl die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Das Verhältnis der Aktivität der induzierten Probe zur uninduzierten Kontrolle (0 μM Chromat) wurde als Induktionsfaktor bezeichnet und gegen die Chromatkonzentration aufgetragen.

Um die wechselseitige Beeinflussung der beiden paralogen Genregionen näher zu betrachten, wurde nun die Induktion der chromosomalen *chr₂*-Determinante in Anwesenheit von pMOL28 untersucht. Bei Sulfatmangel hatte pMOL28 keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit von *chr₂*. Die Stämme DN463[pMOL28, $\Phi(\text{chrB}_2\text{-lacZ})$] sowie DN462[pMOL28, $\Phi(\text{chrF}_2'\text{-lacZ})$] zeigten bei Sulfatmangel keine wesentlichen Unterschiede im Induktionsprofil (Abb. 9B). In Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat hatte die Anwesenheit von pMOL28 jedoch eine Verschiebung des Maximums der β -Galaktosidase-Aktivität auf $\geq 50 \mu\text{M}$ Chromat zur Folge. Zusätzlich dazu stieg die Aktivität auf das 7 bis 10fache der uninduzierten Kontrolle. Im Wildtypstamm AE126 wurde also die chromosomale Determinante *chr₂* erst bei höheren Chromatkonzentrationen induziert als die plasmidkodierte *chr₁*-Determinante. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Funktion von *chr₂* als *backup*-Resistenzsystem.

3.2.6. Der konstitutive *chrA₁p*- und der spezifisch chromatinduzierbare *chrB₁p* Promotor sind für die Transkription der zentralen Gene der *chr₁* Determinante verantwortlich

Mittels *primer extension*-Analysen waren bereits die Transkriptionsstartpunkte der Gene *chrB₁* und *chrA₁* identifiziert worden (Juhnke *et al.*, 2002). Ein Sequenzvergleich der 5'-flankierenden Bereiche der Gene ergab mögliche Promotorsequenzen, die Ähnlichkeit zu RpoH-abhängigen Promotoren aufwiesen. Diese putativen Promotoren sollten nun bestätigt und ihre Induzierbarkeit untersucht werden. Mittels PCR wurden jeweils 200 bp-Fragmente amplifiziert, die stromaufwärts von *chrA₁* bzw. *chrB₁* lagen und den putativen Promotorbereich enthielten. Diese Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft und dann so in den Weitwirtbereichsvektor pVDZ'2 kloniert, dass sie eine Transkriptionsfusion mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen bildeten. Der Vektor pVDZ'2 besitzt eine niedrige Kopienzahl in der Zelle und kann durch Konjugation in *R. metallidurans* eingeführt werden. Die resultierenden pVDZ'2-Konstrukte pDNA388[Φ(*chrA₁p-lacZ*)] und pDNA389[Φ(*chrB₁p-lacZ*)] wurden in die Stämme AE104 und AE126 konjugiert, die Transkonjuganten für β-Galaktosidase Enzymtests eingesetzt.

Die Fusion von Promotor *chrA₁p* (pDNA388) war weder in Stamm AE104 noch in Stamm AE126 mit Chromat induzierbar (Abb. 10). In AE126 zeigte die Fusion ein erhöhtes Grundlevel an β-Galaktosidase-Aktivität (t=0 min) von 180±39 U/mg dw im Gegensatz zu 54±23 U/mg dw in der Transkonjugante AE126[pMOL28, Φ(*chrB₁p-lacZ*)].

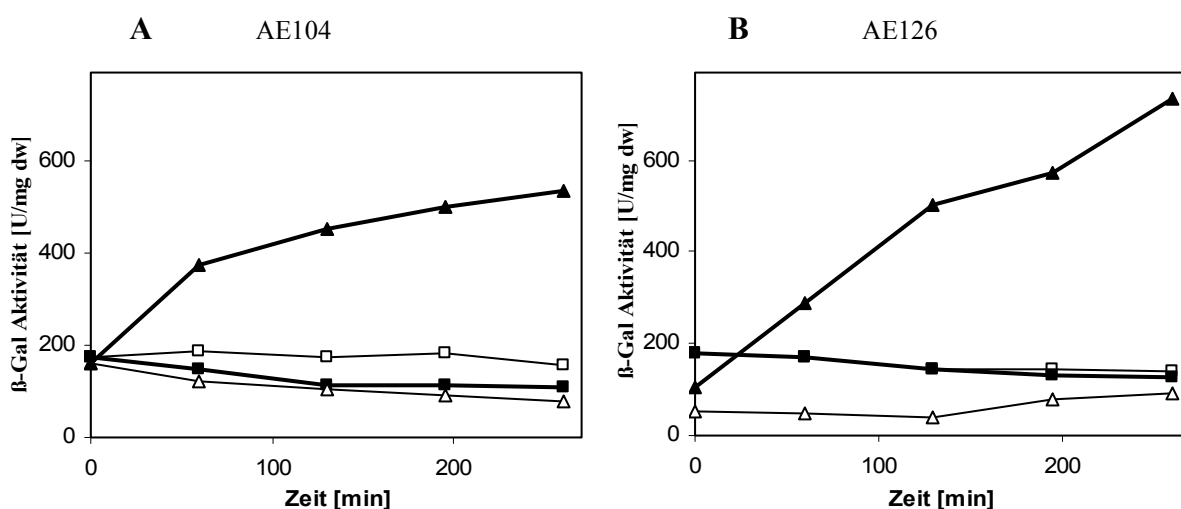


Abb. 10: β-Galaktosidase-Aktivität der Promotorfusionen pDNA388[Φ(*chrA₁p-lacZ*)] und pDNA389[Φ(*chrB₁p-lacZ*)] in *R. metallidurans*. Die Promotorfusionen wurden in den Stämmen AE104 (A) und AE126 (B) untersucht. Zellen der Transkonjuganten AE104(pDNA388) und AE126(pDNA388) (■), bzw. AE104(pDNA389) und AE126(pDNA389) (▲) wurden in Tris-Minimalmedium mit 3 mM Sulfat angezogen und in der exponentiellen Phase (70-100 Klett) mit 50 μM Chromat versetzt (t=0 min). Danach wurden die Zellen über 4 h bei 30°C inkubiert und die β-Galaktosidase-Aktivität zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Die mitgeführten uninduzierten Kontrollen wurden nicht mit Chromat versetzt und sind offenen Symbolen dargestellt (Δ, □).

Der Promotor *chrA₁p* ist daher als konstitutiv und nicht chromatinduzierbar zu betrachten. Er wurde im Folgenden nicht weiter untersucht.

Die β -Galaktosidase-Aktivität der Fusion $\Phi(\textit{chrB}_1\textit{p-lacZ})$ war hingegen sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit des Megaplasmids pMOL28 mit 50 μM Chromat induzierbar (Abb. 10). Der *chrB₁p*-Promotor ist also der mit Chromat induzierbare Promotor der *chr₁*-Determinante, welcher die Regulation der Expression des Chromattransporters ChrA₁ ermöglicht.

Im Folgenden wurden mögliche weitere Induktoren des *chrB₁p*-Promotors gesucht. So wurde die Induktion mit anderen Oxyanionen wie Wolframat, Molybdat, Sulfat, Vanadat und Permanganat getestet. Diese wirkten genau wie Chrom in Form von Cr(III)chlorid nicht als Induktor. Andere Stressfaktoren wie Ethanol, Wasserstoffperoxid und Paraquat vermochten ebenfalls nicht den *chrB₁p*-Promotor zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Die Induktion dieses Promotors, und damit der *chr₁*-Determinante, erfolgte also sehr spezifisch durch Chromat.

Eine nähere Charakterisierung des Induktionsprofils von $\Phi(\textit{chrB}_1\textit{p-lacZ})$ mit Chromat zeigte einen Einfluss von pMOL28 auf den *chrB₁p* Promotor (Abb. 11). Bei Anwesenheit von pMOL28 war die maximale β -Galaktosidaseaktivität doppelt so hoch wie in Abwesenheit des Megaplasmids und wurde bei Induktion mit 50-100 μM Chromat erreicht. In AE104(pDNA389) dagegen fiel nach einem Maximum bei 20 μM Chromat die β -Galaktosidaseaktivität, und damit die Induzierbarkeit durch Chromat, wieder ab.

Es existieren demzufolge sowohl chromosomale als auch pMOL28-kodierte Faktoren, welche die Induktion des *chrB₁p*-Promotors durch Chromat beeinflussen und regulieren.

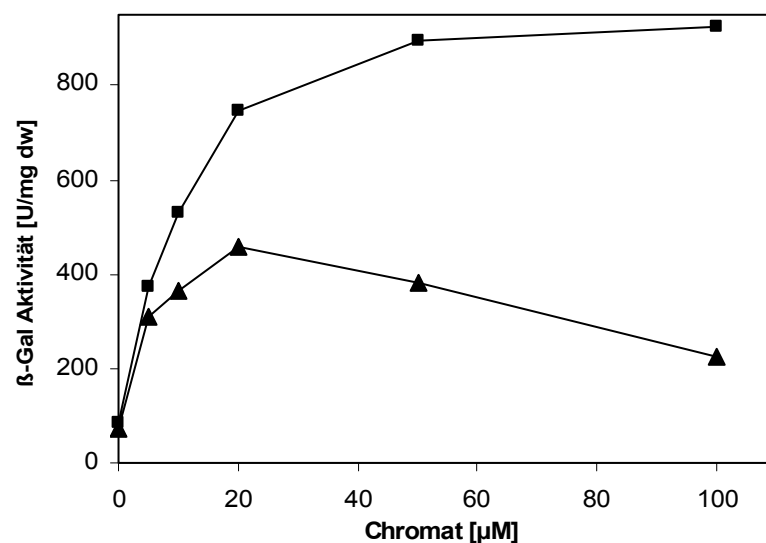


Abb. 11: Induktionsprofil der Promotorfusion $\Phi(\textit{chrB}_1\textit{p-lacZ})$ mit Chromat. Die Transkonjuganten AE104(pDNA389) (▲) und AE126(pMOL28, pDNA389) (■) wurden in Tris-Minimalmedium mit 3mM Sulfat angezogen und in der exponentiellen Phase mit Chromat (0 - 100 μM) versetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 30°C wurde die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

Die $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$ Fusion wurde deshalb als Reportersystem für die Identifizierung chromatabhängiger Regulatoren eingesetzt. Dazu wurde das Plasmid pDNA389[$\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$] in die konstruierten Deletionsstämme von *R. metallidurans* konjugiert. In den Transkonjuganten wurde die *lacZ*-Aktivität bei Induktion mit Chromat untersucht und mit den Wildtypstämmen AE104 und AE126 verglichen. Die Chromatinduktion wurde bei Sulfatsättigung (3 mM Sulfat) und unter Sulfatmangel (30 μ M Sulfat) untersucht.

Betrachtet man zunächst die Induktion von $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$ in den Stämmen AE104 und AE126, so sieht man Folgendes: Unter Sulfatmangel war der Induktionsfaktor IF-1 in AE104 und AE126 vergleichbar (Tab. 6). Unter diesen Bedingungen hatte also die Anwesenheit von pMOL28 keinen Einfluss auf $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$. Bei Sulfatsättigung war der Induktionsfaktor IF-1 in AE126 auf das Doppelte im Gegensatz zu AE104 gestiegen. Die Anwesenheit von pMOL28 bewirkte also einen veränderten Einfluss von Sulfat auf die Induzierbarkeit von $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$.

Der Einfluss der pMOL28-kodierten Gene auf die Induktion des *chrB₁p* Promotors war abhängig vom Sulfatgehalt des Mediums. Deletionen von *chrB₁* und *chrI* (Stämme DN452, DN421) führten zu einer Erhöhung der chromatabhängigen Induktion ausschließlich bei Sulfatmangel (Tab. 6). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von *chrC* (DN453) nur bei Sulfatsättigung zu einer erhöhten Induktion von $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$.

Der Einfluss der chromosomal kodierten Gene zeigte sich sulfatunabhängig. Die Deletion von *chrB₂* (DN456) führte zum Verlust der chromatabhängigen Induktion von $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$ (Tab. 6). Die Deletionen von *chrR* und *rpoH* (DN455, DN459) bedingten einen starken Anstieg der Induzierbarkeit auf 210-490%, während *chrF₂* keinen Einfluss auf den *chrB₁p*-Promotor hatte.

Mittels der Reporterfusion $\Phi(\text{chr}B_1p\text{-lacZ})$ konnten also erste Hinweise auf die Genprodukte ChrB₁/B₂ und ChrR als mögliche Regulatoren der *chr₁*-Determinante identifiziert werden.

Tabelle 6: Aktivität der $\Phi(\text{chrB}_1\text{-lacZ})$ Fusion in Deletionsstämmen von *R. metallidurans* AE126 und AE104.

Stamm	Relevanter Genotyp $\Phi(\text{chrB}_1\text{-lacZ})$	3 mM Sulfat, 50 μM Chromat Sulfatsättigung		
		Basal-Aktivität ohne Chromat [U/mg dw]	IF-1 ^{a)}	% IF ^{b)} (Vergleichsstamm)
AE126	pMOL28	183±33	4,88	100
DN452	pMOL28-12, ΔchrB_1	176±136	4,46	90
DN453	pMOL28-13, ΔchrC	101±19	10,4	210
DN421	pMOL28-11, ΔchrI	154±62	4,32	90
DN459	pMOL28, ΔrpoH	100±7	15,1	300
AE104	megaplasmidfrei	53,7±2,0	2,2	100
DN456	ΔchrB_2	80,6±25,8	1,02	50
DN455	ΔchrR	85,9±11,0	10,5	480
DN458	ΔchrF_2	181±12	2,5	110
		30 μM Sulfat, 20 μM Chromat Sulfatmangel		
AE126	pMOL28	70,9±1,5	1,90	100
DN452	pMOL28-12, ΔchrB_1	94,5±31,0	3,24	170
DN453	pMOL28-13, ΔchrC	120	1,83	100
DN421	pMOL28-11, ΔchrI	76,1±13	5,52	290
DN459	pMOL28, ΔrpoH	107±0,4	9,42	490
AE104	megaplasmidfrei	101±33	1,77	100
DN456	ΔchrB_2	76,3±22,7	1,03	60
DN455	ΔchrR	54,9±5,4	3,84	210
DN458	ΔchrF_2	291±27	1,7	100

Die Zellen wurden in Tris-Minimalmedium mit 3 mM / 30 μM Sulfat angezogen. In der exponentiellen Phase wurde die Basal-Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt und die Kultur geteilt. Eine Hälfte wurde mit 50 μM bzw. 20 μM Chromat induziert. Die andere Hälfte diente als uninduzierte Kontrolle. Die Kulturen wurden für 3 h bei 30°C inkubiert. Danach wurde erneut die β -Galaktosidase-Aktivität beider Kulturen bestimmt.

^{a)} β -Gal-Aktivität der induzierten Kultur geteilt durch Basal-Aktivität

^{b)} %IF = IF-1 (Stamm) / IF-1 (entspr. Wildtypstamm) * 100%

3.3. Nähere Charakterisierung der Chromatresistenz-Determinante *chr*₁ und der dazugehörigen Genprodukte

3.3.1. Das ChrA₁-Protein, Chromattransporter und zentrales Strukturprotein

3.3.1.1. Überexpression und Reinigung des ChrA₁-Proteins als N-terminale *StrepTagII*-Fusion

Zur Herstellung von ChrA₁-Protein wurden verschiedene Expressionssysteme getestet. Dabei wurden Fusionen mit dem maltosebindenden Protein MalE (Vektoren pMAL-c2/-p2, p_{Tac}-Promotor), 6 x HIS-tag Fusionen (pQE30/60, *lac*-T7-Promotor, pTrc99A, p_{Trc}-Promotor) und Inteinfusionen (pTYB2/12, T7-Promotor) konstruiert, die in keinem Fall zur Expression des Proteins führten.

Die erfolgreiche Herstellung von rekombinantem ChrA₁-Protein gelang mit dem *StrepTagII*-System. Dabei erfolgte die Expression unter Kontrolle des stringent kontrollierten Tetracyclin-Promotor/Operators und wurde mit geringen, nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen Anhydrotetracyclin (200 µg/l Kultur) induziert. Die Reinigung des Proteins erfolgte als Einschnitt-Affinitätsreinigung unter physiologischen Bedingungen und nutzte die selektive Bindung zwischen dem *StrepTagII*-Peptid (NH₂-WSHPQFEK-COOH) und Streptactin.

Um ChrA₁ mit diesem System reinigen zu können, wurde das *chrA*₁-Gen mit den Primern ChrA-*BamHI-up* und ChrA-*Sall-down* von pMOL28 amplifiziert und in den Vektor pGEM-*Teasy* kloniert. Nach Kontrolle durch Sequenzierung wurde das Konstrukt in den Vektor pASK7 umklontiert (pECD803) und dadurch N-terminal mit dem *StrepTagII* fusioniert.

Die Expressionrate in *E. coli* BL21 war so gering, dass das ChrA₁-Protein nur über den *StrepTag* im Western Blot nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Eine Steigerung der Expression gelang im Stamm BL21-RP, welcher die für *E. coli* seltenen tRNAs *argU* und *proL* auf einem *low-copy*-Plasmid konstitutiv koexprimiert. Das *chrA*₁-Gen enthält allein sieben *proL*-abhängige Codone (CCC).

Die Anzucht zur Überexpression des *chrA*₁-Gens wurde in LB-Medium bei 30°C durchgeführt. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0.5 wurde mit AHT induziert und für 3 h weiter inkubiert. Als Inokulum diente immer eine frisch transformierte Kolonie, da eine einmalige Passage zum Verlust der Expressionsfähigkeit führte.

Pro Liter Expressionskultur konnten ca. 240 mg Membranproteine isoliert werden. ChrA₁ wurde mit 1% (w/v) Zwittergent 3-14 oder mit 1,5 g n-Dodecyl-β-D-Maltosid/g Membranprotein solubilisiert. Das Solubilisat wurde für die Reinigung über Affinitätschromatographie eingesetzt. Pro Liter Expressionskultur konnten ca. 200 µg ChrA₁ gereinigt werden (Abb. 12).

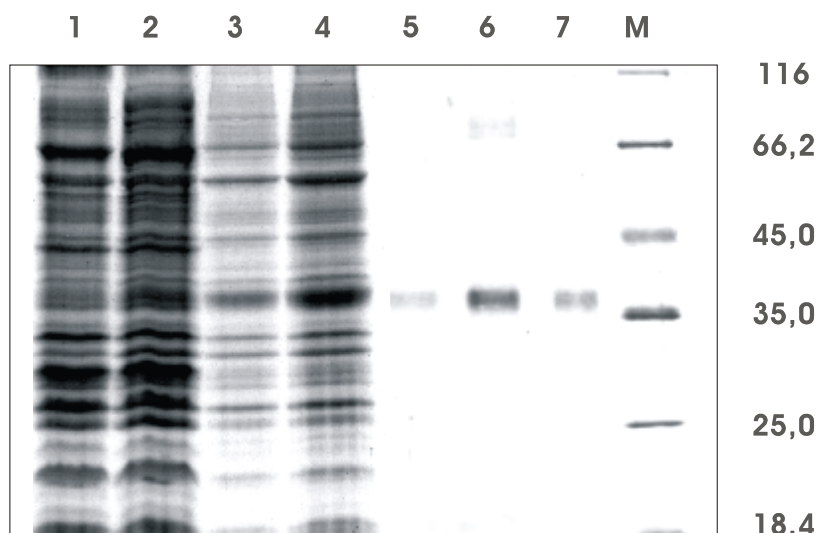


Abb. 12: Reinigung von ChrA₁ als *StrepTagII*-Fusion. 12,5%iges SDS-PAA-Gel der Reinigung nach Expression in BL21-RP (pECD803). **1:** Rohextrakt vor Induktion, **2:** Rohextrakt 3 h nach Induktion mit 200 µg/l AHT, **3:** Membranfraktion, **4:** Solubilisat mit Zwittergent 3-14, **5,6,7:** Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie mit ChrA₁-*StrepTagII*-Fusionsprotein, **M:** Marker, Grössenangaben in kDa.

Die theoretische Größe des ChrA₁-Proteins beträgt 45 kDa. Allerdings hatte das Protein in der SDS-PAGE ein atypisches Laufverhalten und zeigte eine Bande bei ca. 38 kDa. Das gereinigte ChrA₁-Protein wurde im Western Blot mit einem *StrepTagII* spezifischen Streptactin-Konjugat nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.2. Charakterisierung des ChrA₁-Proteins mittels spektraler Eigenschaften

Das nach Überexpression gereinigte ChrA₁-*StrepTagII*-Fusionsprotein sollte in seiner Faltung näher charakterisiert werden. Dazu wurden Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen.

ChrA₁ enthält als stark hydrophobes Membranprotein viele aromatische Aminosäuren als Chromophore. Die Fluoreszenzeigenschaften werden hauptsächlich von 11 Tryptophanen bestimmt, daneben enthält das Protein noch je 24 Tyrosine und Phenylalanine.

Die Fluoreszenzspektren im Bereich von 300 bis 400 nm wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen. Für das native Protein zeigte sich ein Emissionsmaximum bei $\lambda=332$ nm (Abb. 13). Reine Tryptophanlösungen zeigen eine Emission bei $\lambda=348$ nm, diese kann jedoch zu niedrigeren Wellenlängen hinverschoben werden, falls die Tryptophane in hydrophober Umgebung – wie im Inneren von nativen Proteinen – vorkommen (Schmid, 1996).

Nach der Entfaltung des Proteins in 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (GdmHCl) wurden die Chromophore dem Lösungsmittel ausgesetzt. Das Emissionsmaximum für den völlig entfalteten Zustand von ChrA₁ lag bei $\lambda=348$ nm, was dem von freiem Tryptophan in wässriger Lösung entsprach (Abb. 13). Gleichzeitig kam es zu einem ca. 50%igen Abfall in

der Fluoreszenz-Intensität. Natives und denaturiertes Spektrum wiesen deutliche Unterschiede auf, es kann also davon ausgegangen werden, dass ChrA₁ nach der Reinigung in einem gefalteten Zustand vorlag.

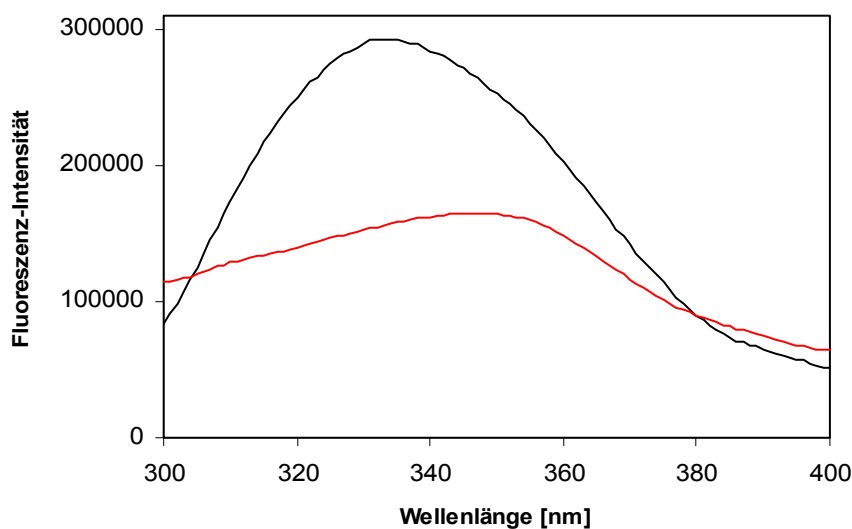


Abb. 13: Fluoreszenzemissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$) von nativem (—) und denaturiertem (—) ChrA₁-Protein. Natives Protein in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Zwittergent 3-14, 20°C. Denaturiertes Protein in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Zwittergent 3-14 + 6 M GdmHCl, 20°C. Die Proben wurden gegen den Puffer korrigiert und waren vor der Messung 24 h inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 20 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.1.3. Kann ChrA₁ als potentieller Chromatransporter Chromat binden?

Als Funktion des ChrA₁-Proteins wird die Rolle als zentraler Chromatransporter diskutiert (Nies *et al.*, 1998). Daher sollte untersucht werden, ob Chromat als Substrat an das Protein gebunden werden kann. Dazu wurde zuerst gereinigtes ChrA₁-Protein auf eine PVDF-Membran geblottet und nach einem Waschschriff mit [⁵¹Cr]-Chromat inkubiert. Durch einen erneuten Waschschriff wurde ungebundenes [⁵¹Cr]-Chromat entfernt und die Membran anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Der ChrA₁-Proteinbande konnte kein spezifisches Signal zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Bindung an denaturiertes Protein konnte damit in der SDS-PAGE nicht gezeigt werden. Um einen eventuellen Verlust der Bindungsstelle für Chromat durch Denaturierung auszuschließen, wurden daraufhin Gelshift-Assays in der Nativen PAGE durchgeführt. Hier war keine Änderung des Laufverhaltens im Gel durch Inkubation mit Chromat zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Eine andere Fragestellung war die Beeinflussung der Struktur des ChrA₁-Proteins durch eine Bindung des Chromat-Oxyanions.

Fern-UV-CD-Spektren geben Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins, wenn Peptidbindungen in geordneten asymmetrischen Konformationen vorliegen. Das ChrA₁-Protein zeigte ein typisches Spektrum für ein Protein mit hohem α -Helix-Gehalt (Schmid, 1996). Charakteristisch war das Minimum bei 208 nm. Nach 30 minütiger Inkubation mit 50 μ M Chromat – die Bedingungen wurden analog zum Gelshift-Assay gewählt – zeigte sich im CD-Spektrum keine signifikante Veränderung (Abb. 14). Eine eventuelle Bindung von Chromat an ChrA₁ ging also nicht mit einer im CD-Spektrum sichtbaren Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins einher.

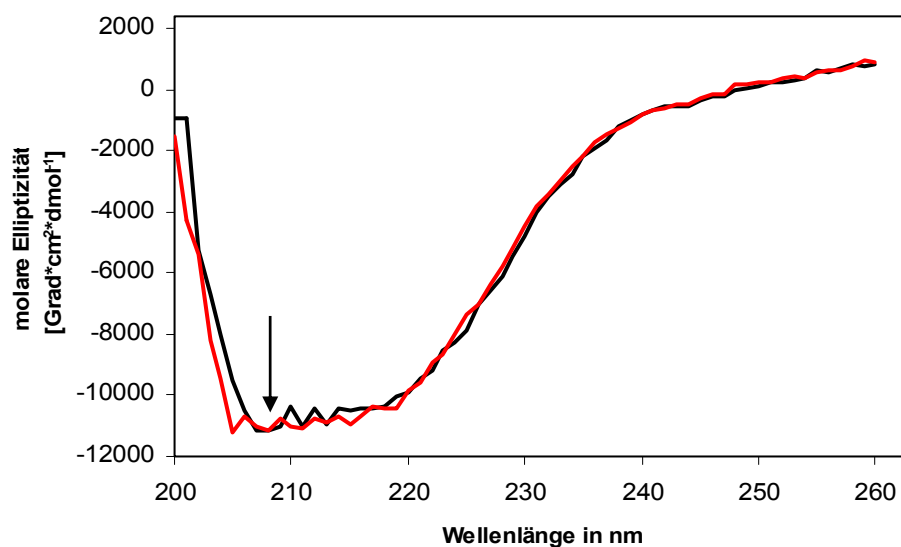


Abb. 14: CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von ChrA₁ mit (—) und ohne (—) Chromat. ChrA₁-Protein wurde 30 min mit 0 bzw. 50 μ M Chromat inkubiert. Die Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml und 20°C aufgenommen und gegen den entsprechenden Puffer korrigiert. Der Pfeil zeigt das Minimum bei 208 nm. Puffer: 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.05% n-Dodecyl- β -D-Maltosid. Schichtdicke: 0.1 cm. Spaltbreite: 1 nm. Die Spektren wurden aus je 12 Messungen gemittelt.

3.3.1.4. Der transmembrane Transport von Chromat durch das ChrA₁-Protein konnte nicht nachgewiesen werden

Zur Durchführung von Transportmessungen wurde mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid solubilisiertes, gereinigtes ChrA₁-Protein verwendet. Dieses wurde in Detergenzdestabilisierte Liposomen rekonstituiert. Die Energetisierung der Proteoliposomen erfolgte durch das Anlegen eines Ammonium-Diffusionspotentials und den dadurch forcierten Aufbau eines Protonengradienten. Durch Fluoreszenzquenching-Messungen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenz-Farbstoff Acridinorange wurde sichergestellt, dass der pH-Gradient über der

Liposomenmembran im Messzeitraum stabil war (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle bei den Aufnahmemessungen dienten einfache Liposomen, die kein Protein enthielten.

Die Liposomen und Proteoliposomen wurden zuerst in einem Cholinchlorid-Puffer verdünnt und dann mit $[^{51}\text{Cr}]$ -Chromat versetzt. Dann wurden im Zeitraum von 0 bis 160 s Proben genommen und der Anteil, der an die Liposomen gebundenen Radioaktivität, bestimmt. Die Proteoliposomen nahmen nur ca. 2-3% der eingesetzten Radioaktivität auf. Dabei waren keine Unterschiede zwischen energetisierten (Abb. 15B) und nicht energetisierten Proteoliposomen (Abb. 15A) zu erkennen.

Die mit ChrA_1 rekonstituierten Proteoliposomen verhielten sich wie Kontroll-Liposomen. Auch eine Variation der eingesetzten $[^{51}\text{Cr}]$ -Chromat-Konzentrationen im Bereich von 25 bis 600 μM brachte keine Differenzierung der Proteoliposomen von den Kontroll-Liposomen.

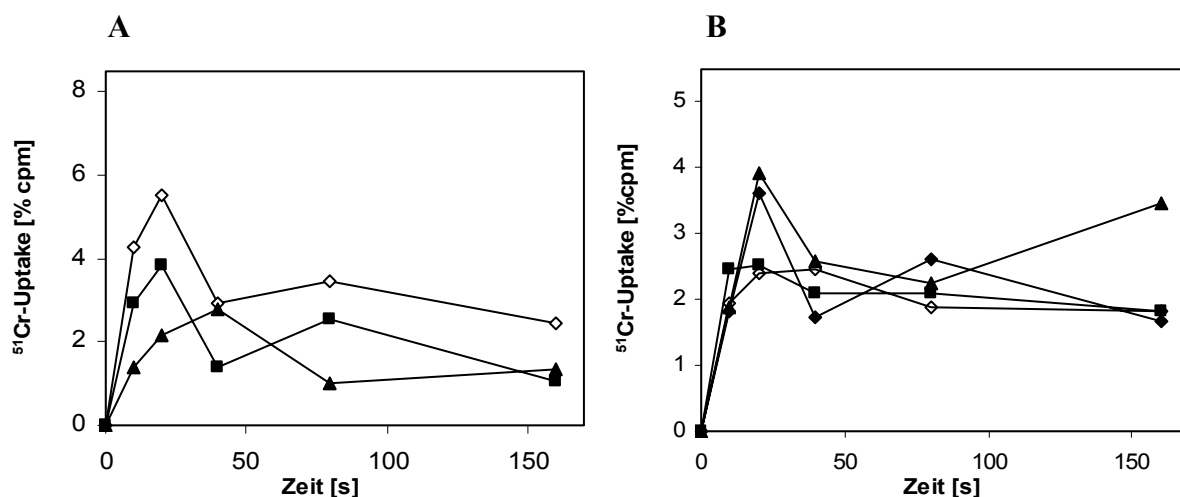


Abb. 15: Aufnahme von $[^{51}\text{Cr}]$ -Chromat durch Proteoliposomen mit ChrA_1 -Protein. Aufgetragen wurde der Anteil der eingesetzten Gesamtradioaktivität in cpm, der sich nach Waschen in den (Proteo)Liposomen befand. [A] (Proteo)Liposomen wurden in *Uptake*-Puffer (0.5 M Cholinchlorid, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0) verdünnt und mit 25 μM (▲) bzw. 50 μM (■) $[^{51}\text{Cr}]$ -Chromat versetzt. Kontroll-Liposomen (◇) wurden mit 50 μM $[^{51}\text{Cr}]$ -Chromat versetzt. [B] (Proteo)Liposomen wurden 30 min mit Ammoniumchlorid geladen (0.5 M NH_4Cl , 20 mM Tris/HCl, pH 7.0) und dann wie in [A] beschrieben weiterbehandelt (Zusätzliche Messreihe mit 600 μM Chromat (◆)). Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei parallelen Messungen.

3.3.1.5. Ist der Transport von Chromat in *R. metallidurans* von einem Protonengradienten abhängig?

Da der Chromattransport durch gereinigtes ChrA₁-Protein bisher nicht gezeigt werden konnte, sollte die Fragestellung der Energetisierung des Transports von Chromat an *R. metallidurans*-Zellen untersucht werden. Die verminderte Akkumulation von [⁵¹Cr] durch Stamm AE126 gegenüber AE104 war bereits von Nies & Silver (1989) gezeigt worden. Nun wurde die Aufnahme von [⁵¹Cr] in Zellen bei Störung des Protonengradienten über der Zellmembran gemessen. Die Transportmessungen wurden nach der Filtrationsmethode durchgeführt und die intrazelluläre Chromatkonzentration im Flüssigszintillationszähler ausgezählt.

Dazu wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit 50 μM [⁵¹Cr]-Chromat versetzt (t=0 min) und nach 20 min 10 μM FCCP zugegeben, um damit den Protonengradienten über der Membran zu entkoppeln. Innerhalb von 100 min stieg die intrazelluläre [⁵¹Cr]-Menge in Stamm AE126 auf 171% im Vergleich zu nicht entkoppelten Zellen. Im plasmidfreien Stamm AE104 stieg die [⁵¹Cr]-Menge noch auf 132% an (Abb. 16).

Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Chromattransport in *R. metallidurans* von einem Protonengradienten über der Membran abhängig sein könnte. Die in AE104 erhöhte Chromataufnahme zeigte, dass es zusätzlich zu ChrA₁ noch chromosomal kodierte Chromattransporter geben muss.

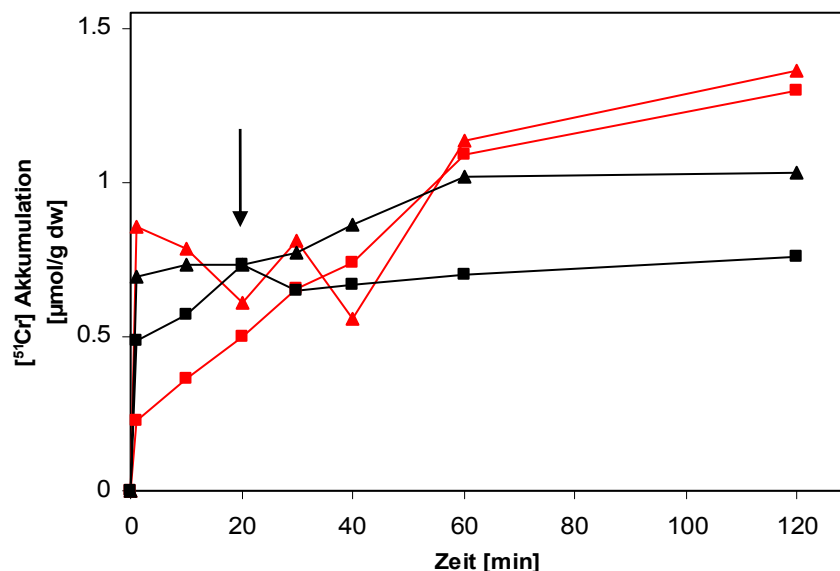


Abb. 16: Transportmessungen mit [⁵¹Cr]-Chromat in *R. metallidurans*-Zellen. Zellen von AE104 (▲) und AE126 (■) wurden in Tris-Minimalmedium angezogen und in der exponentiellen Phase mit 20 μM [⁵¹Cr]-Chromat versetzt. Eine Parallelkultur von jedem Stamm (▲), (■) wurde bei t= 20 min mit 10 μM FCCP versetzt. Der Pfeil zeigt die Zugabe von FCCP an. Das Experiment wurde mit einer Zweifach-Bestimmung durchgeführt.

3.3.1.6. ChrA₁ vermittelt erhöhte Chromat-Sensitivität in *E.coli* BL21-RP

Bei der Untersuchung des ChrA₁-exprimierenden Stammes BL21-RP (pECD803) fiel neben allgemeinem Wachstumsstress während der Expression auch eine erhöhte Chromatsensitivität auf. Dies steht ganz im Gegensatz zu einer erwarteten Chromattoleranz durch die heterologe Expression von ChrA₁. Um den Effekt näher zu untersuchen, wurde zusätzlich das mit *chrA*₁ in Transkriptionskopplung stehende Gen *chrB*₁ analog in den Expressionsvektor pASK7 kloniert (pECD804). Außerdem wurde die gemeinsame Expression von ChrB₁ und ChrA₁ im Vektor pECD805 ermöglicht (N-terminale *StrepTagII*-Fusion mit ChrB₁). Der Expressionsnachweis für die genannten Plasmide erfolgte im Western Blot mittels eines *StrepTagII*-spezifischen Streptactin-Konjugats (Abb. 17).

Bei Wachstumsversuchen auf LB-Medium mit verschiedenen Chromatkonzentrationen fiel auf, dass eine erhöhte Chromatsensitivität nur bei alleiniger Expression von ChrA₁ auftrat (Abb. 18). Bei Koexpression und bei alleiniger Expression von ChrB₁ hatte Chromat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Bei den mit [⁵¹Cr]-Chromat durchgeführten *Uptake*-Experimenten an ganzen Zellen konnte ein verändertes Aufnahmeverhalten von BL21-RP (pECD803) nicht reproduzierbar nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).



Abb. 17: Expressionsnachweis der *StrepTag*-Fusionsproteine erfolgte mittels Westernblot. M: Marker, 1: BL21-RP (pASK7), 2: BL21-RP (pECD803, ChrA₁), 3: BL21-RP (pECD804, ChrB₁), 4: BL21-RP (pECD805, ChrA₁, ChrB₁).

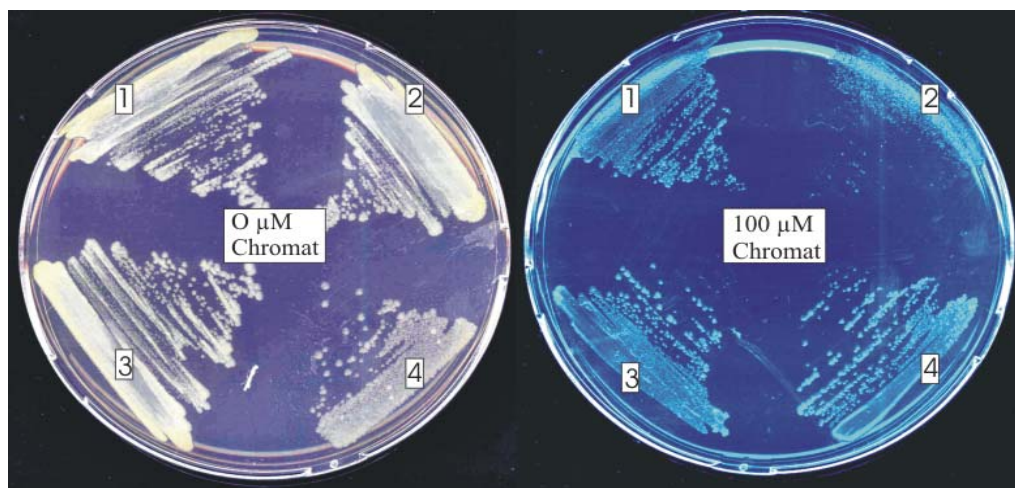


Abb. 18: Wachstum der *chrA₁/chrB₁*-exprimierenden Stämme von *E. coli* BL21-RP. Flüssigkulturen der Stämme BL21-RP mit den Expressionsvektoren pASK7 [1], pECD803 (*chrA₁*) [2], pECD804 (*chrB₁*) [3] und pECD805 (*chrB₁*, *chrA₁*) [4] wurden auf LB-Platten mit unterschiedlichen Chromatkonzentrationen und 25 µg/l AHT zur Induktion ausplattiert. Nach 16 h bei 30°C wurde das Wachstum ausgewertet.

3.3.2. Das ChrB₁-Protein – ein neuartiges Protein mit bisher unbekannter Funktion

Sequenzvergleiche von ChrB₁ in Datenbanken brachten sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Proteinebene keinerlei Hinweise auf bereits experimentell untersuchte, verwandte Proteine. Zwar existieren einige wenige ChrB-homologe Proteine, deren Sequenzen aus mikrobiellen Genomprojekten zugänglich wurden, doch fehlte bisher jeglicher Funktionshinweis. Aus den eigenen Untersuchungen ging eine direkte Beteiligung von ChrB-Proteinen an der Ausbildung der Chromatresistenz in *R. metallidurans* hervor. Daher hatte diese Arbeit eine nähere Charakterisierung des Proteins ChrB₁ zum Inhalt.

3.3.2.1. Eine Reporterfusion mit Alkalischer Phosphatase zeigte die cytoplasmatische Lokalisation des ChrB₁-Proteins

Zunächst sollte die Lokalisation des ChrB₁-Proteins in der Zelle untersucht werden. Computeranalysen mit verschiedenen Programmen brachten unterschiedliche Vorhersagen zur Lokalisation des Proteins. Am N-Terminus des Proteins befindet sich ein stark hydrophober Bereich (Abb. 19A), der als Signalpeptid fungieren könnte. Als mögliche Spaltstelle wurde mit Hilfe des Programms SignalP das Motiv ALG₅₉₋₆₀AT berechnet (Abb. 19B).

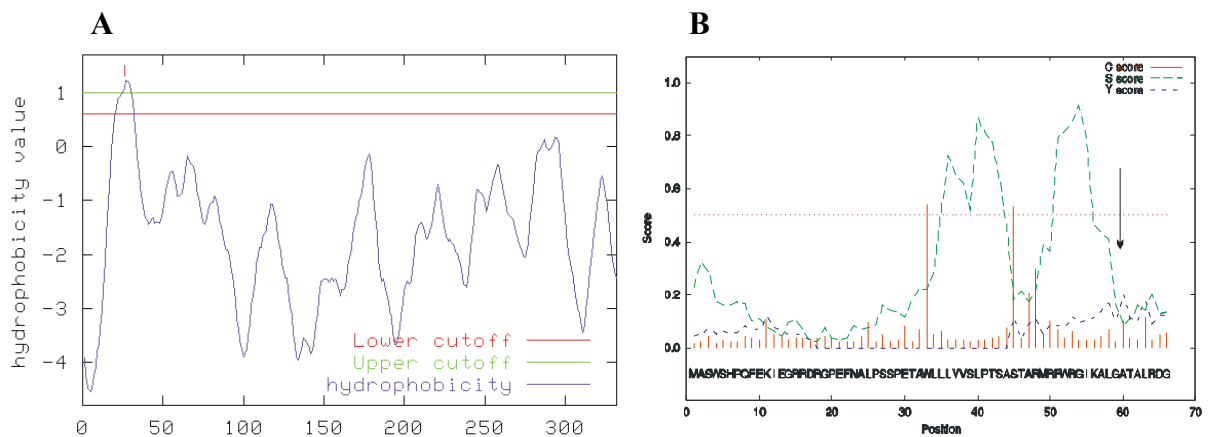


Abb. 19: Hydrophathie-Plot [A] und mögliches Signalpeptid [B] von ChrB₁. Mittels Computeranalyse wurde ein Hydrophathie-Profil von ChrB₁ erstellt (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) [A]. Die Spaltstelle einer möglichen Signalsequenz wurde nach Aminosäure 59 mit dem Motiv ALG-AT berechnet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [B] und wird durch den Pfeil angezeigt.

Um einen möglichen Export des Proteins in das Periplasma zu zeigen, wurden Reporterfusionen von *chrB*₁ in translationaler Kopplung mit Alkalischer Phosphatase konstruiert. Es wurde zum einen das gesamte *chrB*₁-Gen mit den Primern ChrB-*Kpn* und ChrB-*Xba*, des Weiteren ca. 230 bp des 5'- Bereichs von *chrB*₁ mit den Primern ChrB-*Kpn* und ChrB'-*Xba* von pMOL28 amplifiziert. Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Produkte in den Vektor pECD637 (Fusion mit '*phoA*') kloniert.

Im verwendeten '*phoA*'-Gen war der für das Signalpeptid kodierende Bereich deletiert. Da die Alkalische Phosphatase nur im Periplasma aktiv ist, kann eine Aktivität nur dann gemessen werden, wenn durch die Fusion mit dem Zielgen ein Export verbunden ist. Als Kontrollen wurden die Plasmide pECD619 (*bla*'-'*phoA*) und pECD618 ('*bla*'-'*phoA*) verwendet, welche Fusionsproteine der β -Lactamase mit und ohne Signalpeptid kodieren.

Die Fusion mit dem gesamten *chrB*₁-Gen zeigte keine stabile Expression und konnte daher nicht weiter untersucht werden. Die Fusion ChrB₁'-'PhoA (pECD807) wurde auf ihre Alkalische Phosphatase-Aktivität untersucht. Dabei befand sich die Aktivität der Proteinfusion im Bereich der Negativkontrolle (Tab. 7). Daraufhin lässt sich für ChrB₁ entgegen den Vorhersagen eine cytoplasmatische und keine periplasmatische Lokalisation annehmen.

Das Plasmid pECD807 exprimierte ein Fusionsprotein, das im Western Blot mittels PhoA-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden konnte (Abb. 20). Dabei war die Expression der periplasmatischen Positivkontrolle (pECD619) wesentlich stärker als die der cytoplasmatischen Negativkontrolle (pECD618) und der ChrB₁'-'PhoA-Fusion (pECD807). Cytoplasmatische PhoA-Fusionen sind nicht korrekt gefaltet und werden deshalb schnell durch Proteasen abgebaut.

Tabelle 7: Lokalisation von ChrB₁ durch Reporterfusion mit Alkalischer Phosphatase ¹⁾

Plasmid	Relevanter Genotyp	Spez. Aktivität [U/mg dw]
pECD619 (Positivkontrolle)	<i>bla-'phoA</i>	5.82±0.76
pECD618 (Negativkontrolle)	' <i>bla-'phoA</i>	0.67±0.14
pECD807	<i>chrB₁'-'phoA</i>	0.82±0.06

¹⁾ Die verwendeten Konstrukte wurden in *E.coli* CC118(pGP1-2) exprimiert. Die Induktion der T7-Polymerase erfolgte bei 42°C für 30min. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet und die Enzymaktivität in U/mg dw (1 U=1 nmol/min) bestimmt.

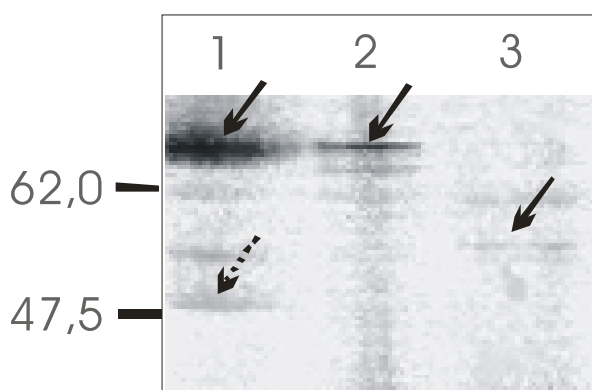


Abb. 20: Nachweis der PhoA-Fusionen im Western Blot. Western Blot einer 12.5%igen SDS-PAGE. Es wurde Rohextrakt aller Konstrukte nach der Zellernte aufgetragen. Die PVDF-Membran wurde mit einem Antikörper gegen Alkalische Phosphatase behandelt. 1: pECD619 (71 kDa), 2: pECD618 (68 kDa), 3: pECD807 (57 kDa). Die Pfeile zeigen die Fusionsproteine, der durchbrochene Pfeil ein Hauptabbauprodukt, die abgespaltene PhoA-Domäne (47 kDa).

3.3.2.2. Überexpression und Reinigung des ChrB₁-Proteins als N-terminale StrepTagII Fusion - ChrB₁ ist membranassoziiert

Die Überexpression und Reinigung erfolgte auch für das ChrB₁-Protein mit dem *StrepTagII*-System. Dazu wurde das *chrB₁*-Gen mit den Primern *chrB*-pASK-*up* und *chrB*-pASK-*down* von pMOL28 amplifiziert und in den Vektor pGEM-Teasy kloniert. Nach Kontrollsequenzierung wurde das Fragment in die Vektoren pASK3 (C-terminale *StrepTagII* Fusion) und pASK7 kloniert und im Stamm *E.coli* BL21-RP exprimiert. Eine erfolgreiche Expression erfolgte nur als N-terminale *StrepTagII*-Fusion (Vektor pECD804), wobei das Fusionsprotein im Western Blot mittels eines *StrepTagII*-spezifischen Streptactin-Konjugats nachgewiesen wurde. Die Expression wurde bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0.7 mit 200 µg/l AHT induziert und erfolgte für 3 h bei 30°C. Die Reinigung durch Affinitätschromatographie gelang aus dem Rohextrakt nur mit verschwindend geringer Ausbeute.

Daraufhin wurde die Lokalisierung des Proteins erneut untersucht. Nach der Expression wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Es erfolgte die Trennung von periplasmatischer Fraktion, Membranfraktion und löslicher zytoplasmatischer Fraktion. Proben der so erhaltenen Fraktionen wurden im Western Blot mit einem *StrepTagII*-spezifischen Konjugat untersucht. Das ChrB₁-Protein hat eine theoretische Größe von ca. 39 kDa. Die für ChrB₁ spezifische, ca. 39 kDa große Bande zeigte sich überraschenderweise in der Membranfraktion (Abb. 21A). In der löslichen Fraktion konnte ein schwaches, in der periplasmatischen Fraktion kein Signal detektiert werden. Das ChrB₁-Protein ist also mit der Zytoplasmamembran assoziiert.

Die Reinigung des Proteins erfolgte daraufhin aus der Membran. Dazu wurde ChrB₁ mit 1% Zwittergent 3-14 solubilisiert und dann mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 21B). Aus einem Liter Expressionskultur konnten ca. 400 µg ChrB₁-Protein aufgereinigt werden.

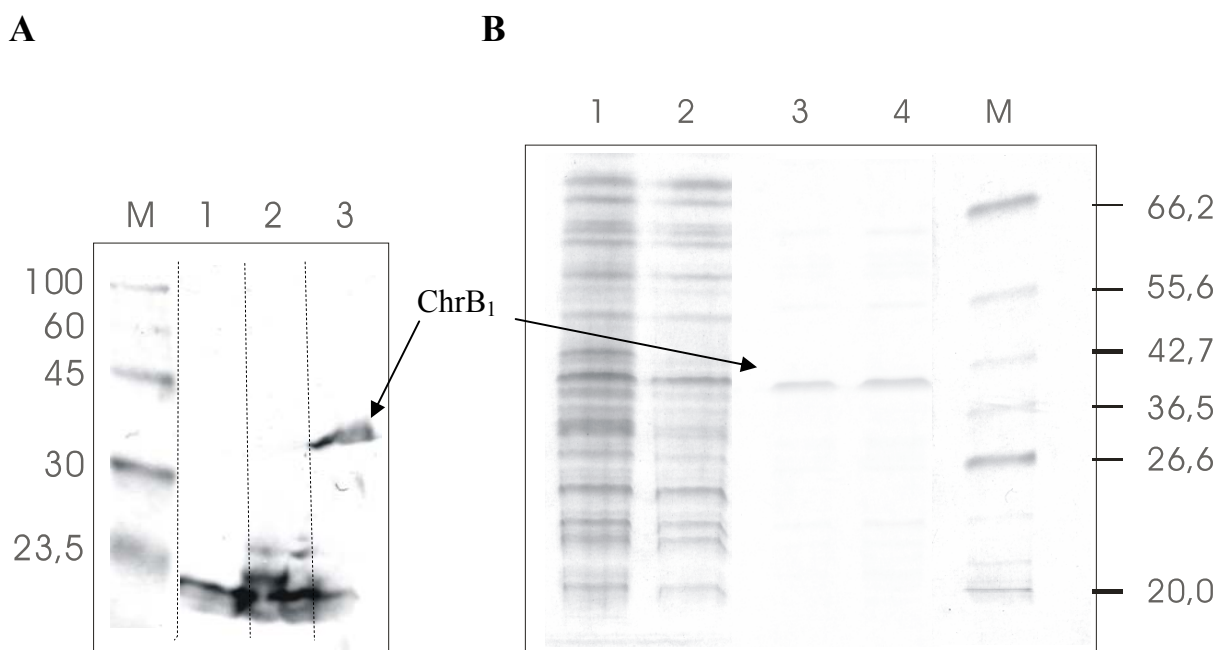


Abb. 21: Lokalisierung und Reinigung des ChrB₁-Protein als *StrepTagII*-Fusion. [A] Nach Expression von ChrB₁ in BL21-RP (pECD804) erfolgte eine Zellfraktionierung. Jeweils 20 µg Gesamtprotein jeder Fraktion wurden in einer 12.5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit *StrepTagII*-spezifischem Streptactin-Konjugat nachgewiesen. M: Marker, 1: periplasmatischer Extrakt, 2: zytosolische Proteine, 3: Membranfraktion. [B] 12.5%ige SDS-PAGE der Reinigung ChrB₁-*StrepTagII*-Fusion. 1: Rohextrakt nach Zellernte, 2: Membranfraktion, 3,4: Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie, ChrB₁, M: Marker. Das bei ca. 20 kDa in den Spuren 1 und 2 auftretende Signal zeigt das Biotin-Carrier-Protein aus *E. coli*, dass auch an das verwendete Streptactin-Konjugat bindet.

3.3.2.3. Das ChrB₁-Protein vermag Chromat zu binden

Das ChrB₁-*Strep*TagII Fusionsprotein wurde für Bindungsstudien eingesetzt. Dabei wurde die Bindung von Chromat und strukturverwandten Oxyanionen an das ChrB₁-Protein untersucht. In einem Gelshift-*assay* wurden je 5 µg gereinigtes Protein mit 1 mM der verschiedenen Oxyanionen versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde das elektrophoretische Laufverhalten des Proteins in der Nativen PAGE untersucht (Abb. 22).

Obwohl das Laufverhalten des Membranproteins durch seine stark hydrophoben Eigenschaften und den Zusatz von Detergenz beeinträchtigt war, konnten zwei verschiedene Lauffronten im Gel unterschieden werden. So wurde ChrB₁ nach Inkubation mit Chromat, Wolframat und Molybdat im Nativen Gel gegenüber dem unbehandelten Protein retardiert. Vanadat, Permanganat und Sulfat zeigten keinen Einfluss auf das Laufverhalten. Dies ist ein erster Hinweis auf eine selektive Bindung von Chromat gegenüber Sulfat. Aber auch eine mögliche Bindung von Wolframat und Molybdat ist denkbar und muss weiter untersucht werden.

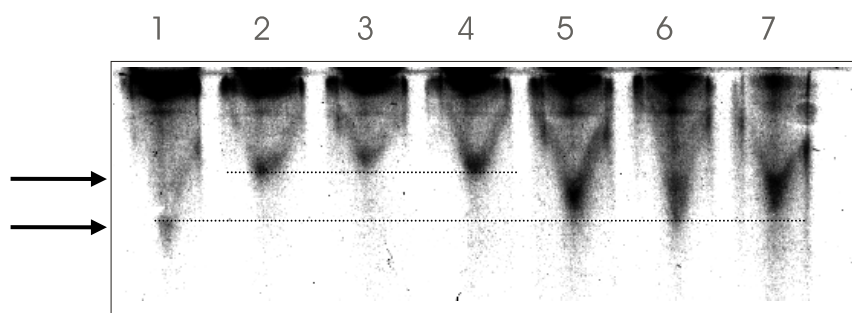


Abb. 22: Gelshift-Assay von ChrB₁ nach Inkubation mit verschiedenen Oxyanionen. 12,5%ige Native PAGE. Jeweils 5 µg Protein wurden mit 1 mM verschiedener Oxyanionen versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Analyse in der nativen PAGE. **1:** ChrB₁, unbehandelte Kontrolle, **2:** + Chromat, **3:** + Molybdat, **4:** + Wolframat, **5:** + Vanadat, **6:** + Permanganat, **7:** + Sulfat. Die Pfeile kennzeichnen die zwei verschiedenen Lauffronten des ChrB₁-Proteins.

Des Weiteren wurde die Beeinflussung der Sekundärstruktur von ChrB₁ durch Bindung von Chromat mit Hilfe von CD-Spektren untersucht (Abb. 23).

ChrB₁-Protein wurde in Anlehnung an die Bedingungen des Gelshift-*assays* mit 50 µM Chromat für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden CD-Spektren des Proteins mit und ohne Zusatz von Chromat aufgenommen (Abb. 23). Im Spektrum des nativen Proteins zeigte sich ein Minimum bei 208 nm mit einer molaren Elliptizität von ca. 5000 [Grad*cm²*dmol⁻¹]. Die Zugabe von Chromat bewirkte eine deutliche Änderung im Spektrum (Abb. 23A). Das in Abbildung 23B dargestellte Differenzspektrum weist ein Minimum bei 198 nm und ein Maximum bei 212 nm auf. Diese Änderungen im CD-

Spektrum sind ein weiterer Hinweis auf Chromatbindung durch das ChrB₁-Protein, wobei die Bindung eine Strukturänderung des Proteins zur Folge haben könnte.

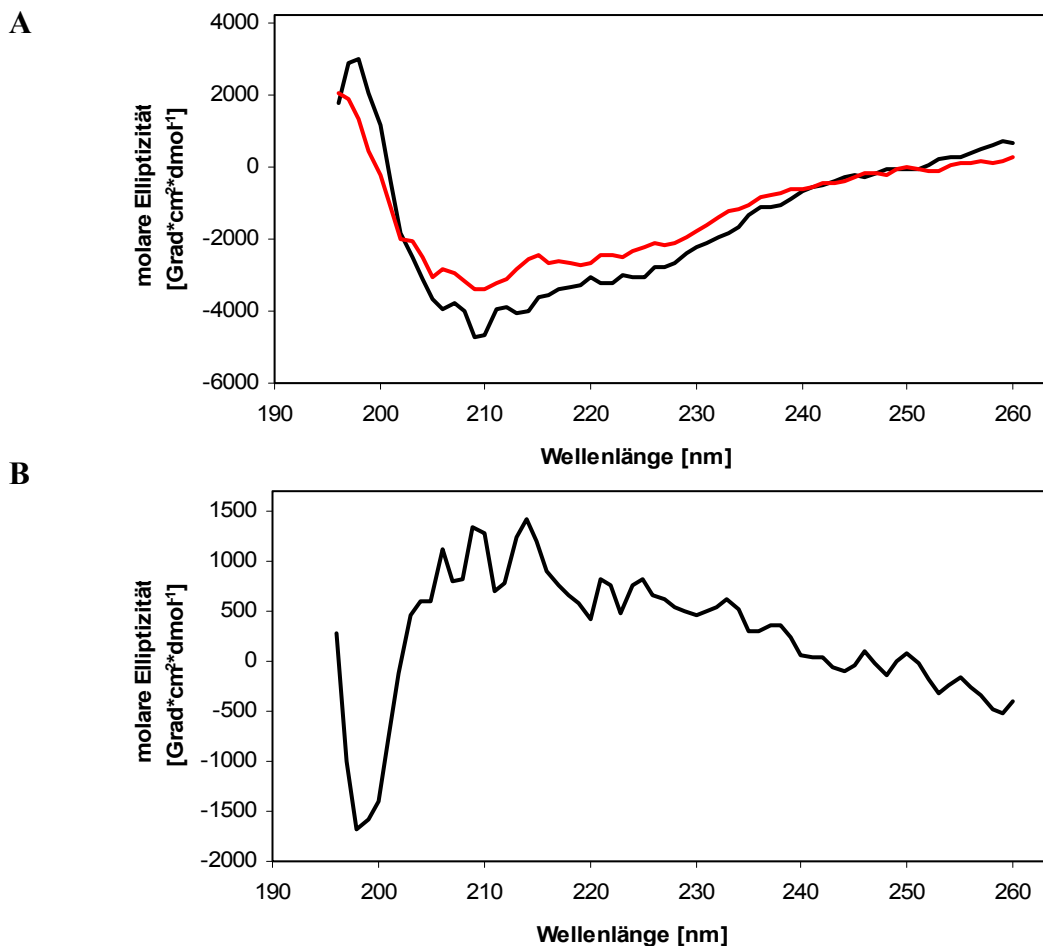


Abb.23: CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von ChrB₁ mit (—) und ohne (—) Chromat. [A] ChrB₁ wurde mit 50 μM Chromat inkubiert. Die Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 600 μg/ml und 20°C aufgenommen und gegen den entsprechenden Puffer korrigiert. Puffer: 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.05% Zwittergent 3-14. Schichtdicke: 0.1 cm. Spaltbreite 1 nm. Die Spektren wurden aus je 12 Messungen gemittelt. [B] Diese Darstellung zeigt das Differenzspektrum der in [A] gezeigten Spektren von ChrB₁ mit und ohne Chromat.

3.3.3. Die membrangebundenen Proteine ChrA₁ und ChrB₁ zeigten keine Tendenz zur Oligomerisierung in *Crosslinking*-Experimenten

Im Anschluss sollte nun der oligomere Zustand der membrangebundenen Proteine ChrA₁ und ChrB₁ untersucht werden. Methoden wie analytische Gelfiltrationschromatographie oder analytische Ultrazentrifugation konnten nicht zum Einsatz kommen, da sich die Proteine in detergenzhaltigem Puffer befanden. Deshalb sollte die Tendenz zur Bildung von Oligomeren durch *Crosslinking*-Experimente abgeschätzt werden. Es gibt verschiedene Substanzen, die für das chemische Quervernetzen von Proteinen eingesetzt werden können.

In diesem Fall wurden die *Crosslinker* Tris-2,2-bispyridyl-ruthenium(II)chlorid und Glutardialdehyd ausgewählt. Von diesen war bereits bekannt, dass sie in den verwendeten detergenzhaltigen Puffern aktiv sind (Anton, 2001). Tris-2,2-bispyridyl-ruthenium(II)chlorid ist ein photoaktiver, spezifischer *Crosslinker* (Fancy & Kodadek, 1999). Bei einer Konzentration von 125 µM *Crosslinker* konnte weder für ChrA₁ noch für ChrB₁ eine Oligomerisierung beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Daraufhin wurde die Quervernetzung mit dem sehr reaktiven *Crosslinker* Glutardialdehyd getestet (Cheung & Nimni, 1982). In den hier durchgeführten Experimenten zeigten die Proteine ChrA₁ bzw. ChrB₁ mit 5 mM bzw. 50 mM Glutardialdehyd im Zeitraum 0 bis 20 min keinerlei Tendenz zur Oligomerisierung (Abb. 24A,B).

Da beide Proteine an der Membran lokalisiert sind, wurde auch eine mögliche Interaktion getestet. Eine *in vitro* Quervernetzung der Proteine war mit Glutardialdehyd bis 50 mM nicht möglich (Abb. 24C).

Aus den *Crosslinking*-Experimenten ergab sich keinerlei Hinweis auf einen oligomeren Zustand von ChrA₁ oder ChrB₁. Eine Interaktion beider Proteine konnte *in vitro* nicht gezeigt werden.

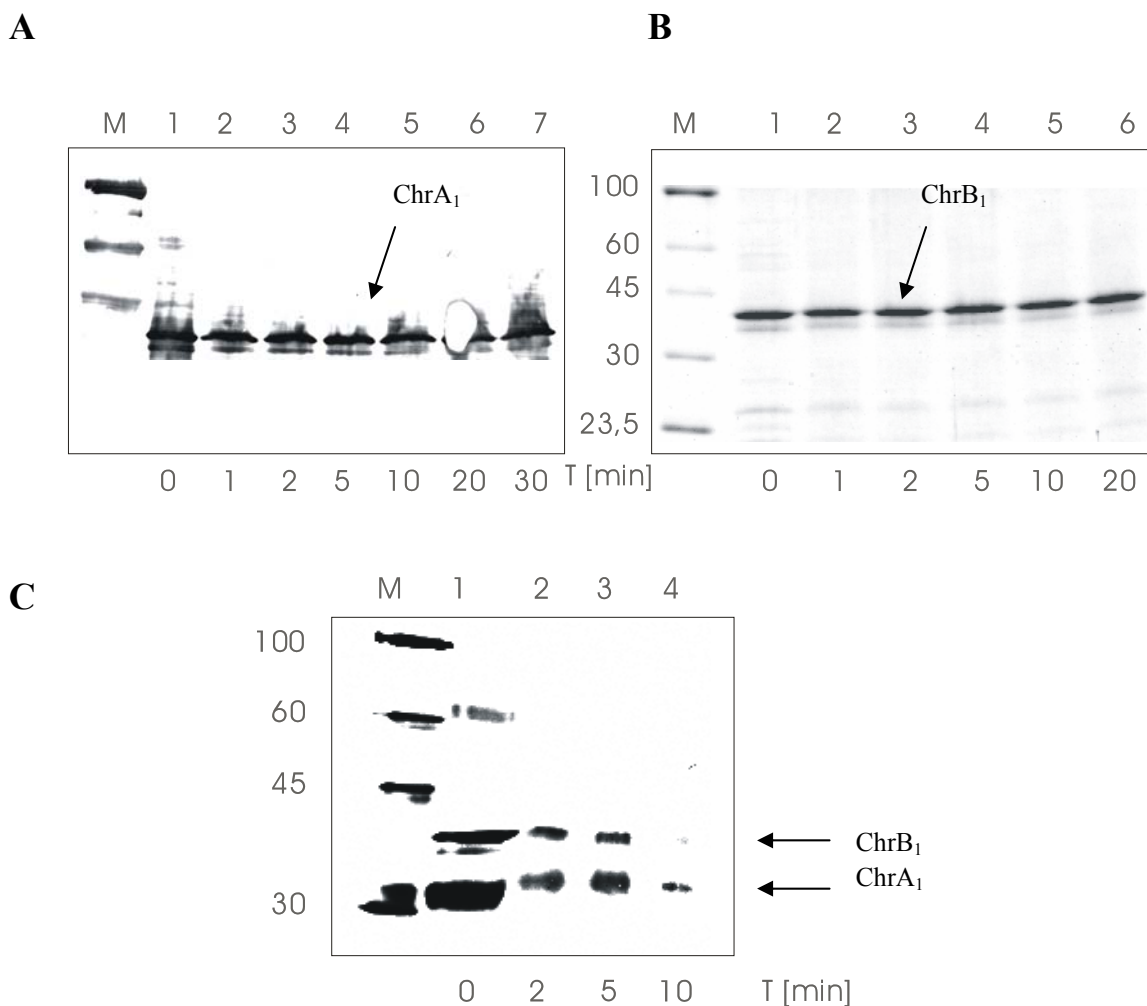


Abb. 24: Quervernetzungsexperimente mit ChrA₁ [A], ChrB₁ [B], ChrA₁/ChrB₁ [C] mittels Glutar-dialdehyd. 12,5%ige SDS-PAGE, Western-Blot mit Nachweis des *Strep*TagII. Jeweils 5 µg Protein wurden mit 5 mM [A,B] bzw. 50 mM [C] Glutar-dialdehyd versetzt und die Reaktion nach den aufgeführten Zeiten abgestoppt.

3.3.4. Das ChrC-Protein ist eine Superoxid-Dismutase

Die Deletion des *chrC*-Gens in *R. metallidurans* bewirkte nur eine geringfügige Verringerung der Chromatresistenz. Das *chrC*-Gen kodiert für ein Protein mit einer Größe von 197 Aminosäuren. Sequenzvergleiche des ChrC-Proteins in den Datenbanken ergaben eine Homologie zu Superoxid-Dismutasen (SOD) mit Mangan oder Eisen im aktiven Zentrum. Die nächste Verwandtschaft ergab sich zu einer Fe²⁺-abhängigen SOD aus *Aquifex pyrophilus* mit 32% Identität.

3.3.4.1. Überexpression und Reinigung von ChrC als *StrepTagII*-Fusion

Das *chrC*-Gen wurde mit den Primern SOD-*Bam*HI-up und SOD-*Sal*I-down von pMOL28 amplifiziert und zur Expression - wie bereits für *chrA*₁ und *chrB*₁ beschrieben – in den Vektor pASK7 kloniert. Damit wurde das Plasmid pECD806 (ChrC mit N-terminalem *StrepTagII*) konstruiert, welches zur Expression in *E.coli* BL21-RP transformiert wurde. Die Expression in LB-Medium wurde bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0.8 mit 200 µg/l AHT induziert. Das ca. 25 kDa große Protein wurde aus dem Rohextrakt gereinigt (Abb. 25). Aus einem Liter Expressionskultur konnten ca. 1.5 mg Protein isoliert werden.

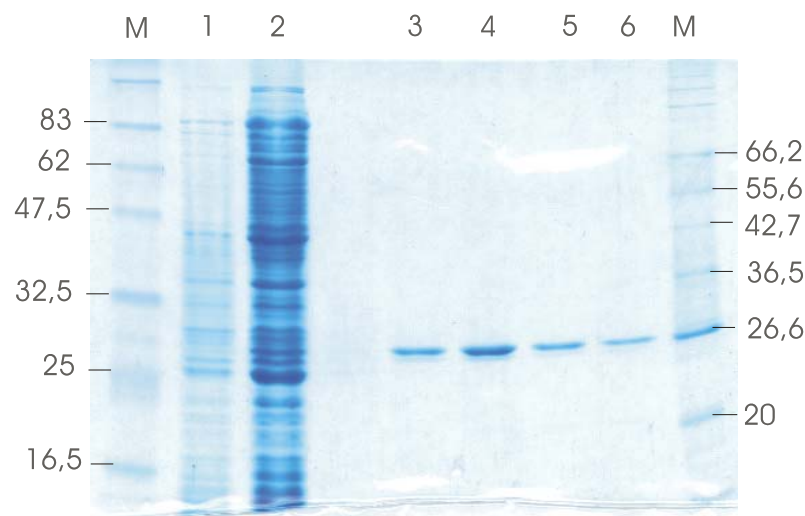


Abb. 25: Reinigung des ChrC-Proteins als *StrepTagII*-Fusion. 12.5%ige SDS-PAGE der Reinigung. M: Marker, 1: Rohextrakt vor Induktion, 2: Rohextrakt 3 h nach Induktion mit 200 µg/l AHT. 3-6: Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose.

3.3.4.2. Das ChrC-Protein ist eine homotetramere, eisenabhängige Superoxid-Dismutase

Das überexprimierte ChrC-Protein wurde zunächst auf seine Aktivität als Superoxid-Dismutase hin untersucht. Der Term SOD steht für eine Vielzahl von Metalloenzymen, die die folgende Reaktion katalysieren: $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Die primäre Schwierigkeit eines SOD-Assays besteht in der Radikalnatur des Substrates, welches dem Assay nicht definiert zugesetzt werden kann. Die spezifische SOD-Aktivität von ChrC wurde mittels des Cytochrom C-Reduktions-Tests bestimmt (Flohé *et al.*, 1988) (Abb. 26A). Dabei wird die Aktivität der SOD als Hemmung der Xanthin-Oxidase (XOD) - Aktivität beschrieben. Die Menge an SOD, welche eine 50%ige Hemmung der XOD-Aktivität im Testansatz bewirkt, ist als 1 Fridovich Unit definiert.

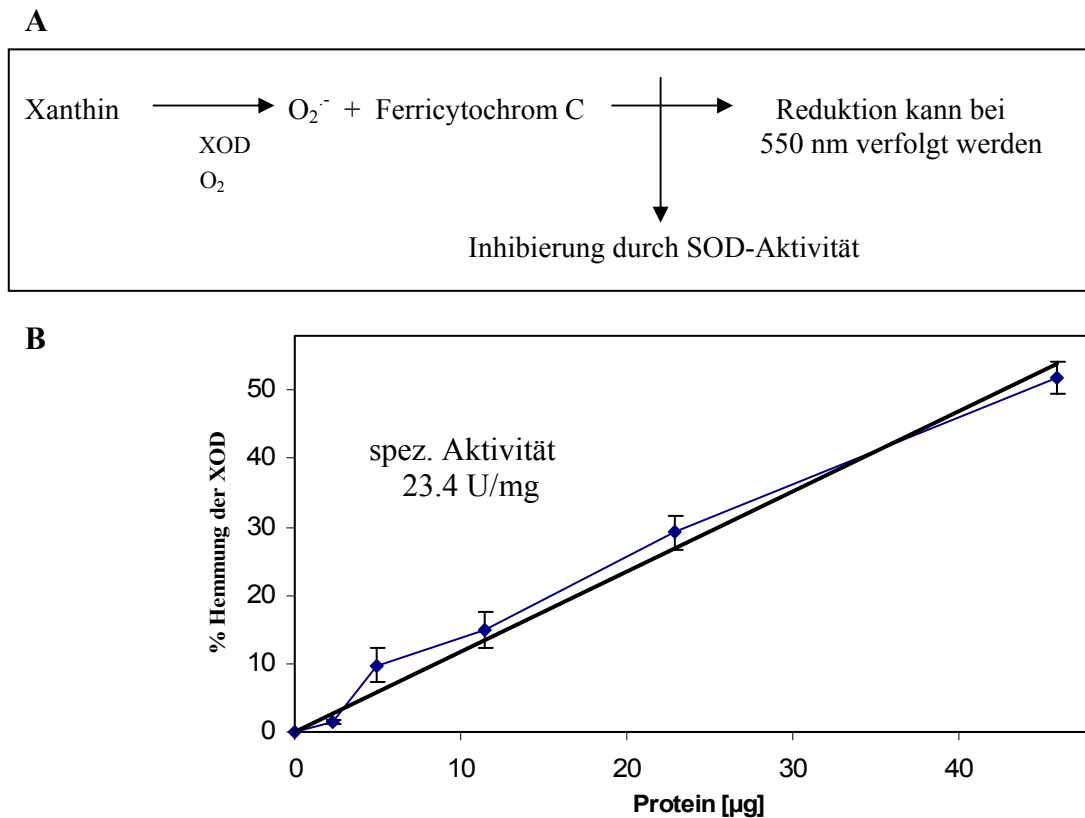


Abb. 26: Bestimmung der spezifischen SOD-Aktivität von ChrC in Fridovich Units. [A] Testprinzip nach Fridovich. [B] Verschiedene Mengen ChrC-Protein wurden im Cytochrom C-Reduktionstest eingesetzt und die Hemmung der Xanthin-Oxidase (XOD)-Aktivität bei 20°C bestimmt. Die Messpunkte wurden in einer linearen Regression angepasst.

Das ChrC-Protein zeigte in diesem Test eine spezifische Aktivität von 23.4 U/mg (Abb. 26B). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei ChrC tatsächlich um eine Superoxid-Dismutase handelt.

Da die Aktivität des gereinigten ChrC-Proteins sehr gering erschien, wurden weitere Untersuchungen angeschlossen. Durch eine Aktivitätsfärbung in der Nativen PAGE konnte die SOD-Aktivität des ChrC-*Strep*TagII-Fusionsprotein bestätigt werden (Abb. 27, d→). Allerdings konnte diese Aktivität im Rohextrakt von *R. metallidurans* AE126 – auch nach Induktion der Zellen mit 50 μM Chromat – nicht identifiziert werden (Abb. 27, Spur 4). Dies spricht auch für eine geringe *in vivo* SOD-Aktivität von ChrC.

Die in *R. metallidurans* konstitutiv exprimierte Fe-SOD ist ein Dimer mit einer Größe von 46 kDa (Abb. 27, c→) (Roux & Coves, 2002). Für das ChrC-Protein wurde hingegen mittels Analytischer Ultrazentrifugation bei drei verschiedenen Proteinkonzentrationen ein apparentes Molekulargewicht von 98.17 kDa bestimmt. Unter denaturierenden Bedingungen zeigte ChrC eine Bande bei ca. 25 kDa (Abb. 25). Das ChrC-Protein ist also ein Homotetramer.

Hemmstudien in der Nativen PAGE zeigten für das ChrC-Protein ein typisches Verhalten: das Protein wurde durch H_2O_2 , aber nicht durch KCN gehemmt – ein erwartetes Charakteristikum

für eine eisenabhängige SOD (Abb. 27) (Roux & Coves, 2002). Rohextrakte von *E. coli* K12 und *R. metallidurans* AE126 wurden als Positivkontrollen parallel untersucht, um die selektive Inhibierung durch H_2O_2 , abhängig vom SOD-Metall-Kofaktor, zu zeigen.

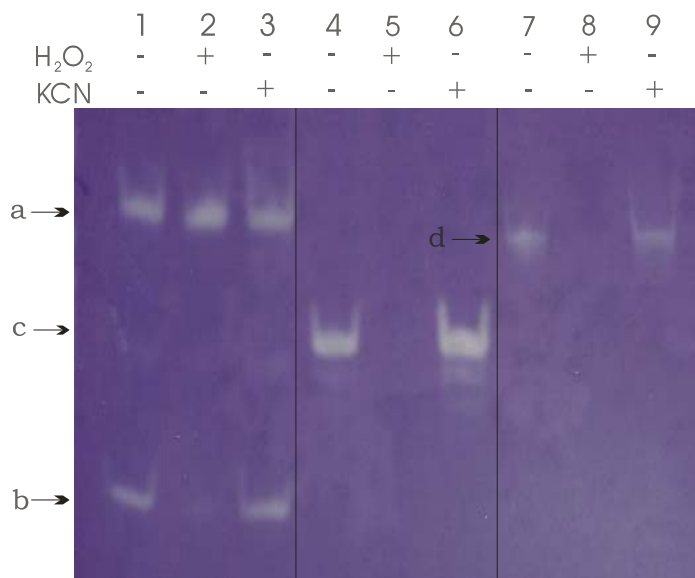


Abb. 27: Aktivitätsfärbung einer Nativen PAGE von ChrC zum Nachweis der SOD-Aktivität und eines Eisen-Kofaktors. 12.5%ige Native PAGE, SOD Aktivitätsfärbung. Rohextrakt von *E. coli* K12 [1-3], *R. metallidurans* AE126 (Zellen mit 50 μ M Chromat induziert) [4-6] und gereinigtes ChrC-Protein [7-9] wurden mit 0.5g/l H_2O_2 und 10 mM KCN behandelt. Die Pfeile zeigen die Mn-SOD aus *E. coli* (a), die Fe-SOD aus *E. coli* (b), SOD aus *R. metallidurans* (c) und gereinigtes ChrC-Protein aus *R. metallidurans* (d).

Der Metallgehalt des gereinigten ChrC-Proteins wurde weiterhin mittels Analytischer Elektronenmikroskopie untersucht. In den aufgenommenen EDX-Spektren wurde ein signifikantes Signal für Eisen erhalten. Mangan oder Zink waren in der Protein-Probe nicht enthalten, allerdings zeigte sich ein kleines Kupfer-spezifisches Signal (Abb. 28).

Da die EDX-Spektren zwar qualitativ, nicht aber quantitativ auswertbar waren, wurde eine zusätzliche Analyse des Metallgehaltes von ChrC mittels Atomemissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES) durchgeführt. Aus der Messung wurde die Konzentration der Elemente in der Probe erhalten. Daraus wurde das Verhältnis

Metall : Protein, und damit die Sättigung des Proteins mit dem Metall berechnet (Tab. 8). Eisen konnte mit einer Sättigung von 74% als Metall-Kofaktor des Proteins nachgewiesen werden. Mangan, Zink und auch Kupfer waren im Protein nicht gebunden.

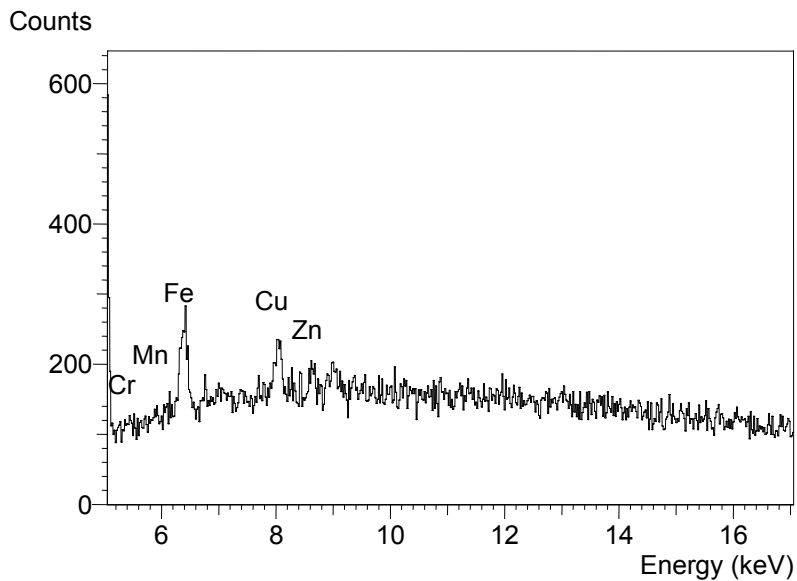


Abb. 28: Elementverteilung im EDX-Spektrum des ChrC-Proteins.

Tabelle 8: ICP-AES Messungen mit gereinigtem ChrC-Protein.

Metall	Konzentration in mg/l	Sättigung des ChrC-Proteins in % ^{a)}
Kadmium	0.00255	0.04
Kupfer	0.0082	0.26
Eisen	2.074	74
Mangan	0.0406	1.48
Nickel	0.0118	0.4
Zink	0.09	2.75

a) Für die Metall-Bestimmung wurde eine 50 µM Proteinlösung eingesetzt. Aus dem Verhältnis der Konzentrationen von Protein und Metall wurde die Sättigung des Proteins in % errechnet.

3.4. Anreicherung chromattoleranter Mikroorganismen aus Bodenproben

Die Chromatresistenz-Determinante *chr₁* von *R. metallidurans* AE126 ermöglicht dem Organismus das Wachstum bei Konzentrationen bis zu 350 µM Chromat (Tris-Minimalmedium). Gegenüber dem sensitiven Stamm AE104 bedeutet das eine Steigerung auf das 2-3fache. Um die Chromatresistenz von *R. metallidurans* im Vergleich zu anderen Mikroorganismen einzuordnen, wurden aus zwei verschiedenen Bodenproben chromat-tolerante Mikroorganismen isoliert.

Probe 1 stammte aus Chromatbelastetem Bauschutt einer ehemaligen Druckerei, die zweite Probe aus Saale-Sediment. Ohne speziellen Selektionsdruck auf bestimmte Mikroorganismen-Gruppen wurde in GSSY-Medium mit 1 bis 2 mM Chromat angereichert. (Tab. 9, Isolate 1,2). Eine selektive Anreicherung Gram-positiver, sporenbildender Organismen erfolgte nach Pasteurisierung in LB-Medium mit 1-2 mM Chromat (Tab. 9, Isolate 3-6). Als Vertreter der Gram-negativen Organismen wurden *Pseudomonaden* in GSP-Medium (*Pseudomonaden*-spezifisches Anreicherungsmedium) isoliert (Tab. 9, Isolate 7,8). Dabei wurde in der Anreicherungskultur Wachstum nur bis zu einer Konzentration von 300 µM Chromat beobachtet.

Die Isolate wurden aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenz eingeordnet (Weisburg *et al.*, 1991). Die rRNA kodierenden Gene sind hochkonserviert, so dass die Untersuchung der entsprechenden 16S rDNA für die Identifikation der Gattungen und Arten der Bakterien als Standardmethode etabliert wurde. Die 16S rDNA der Isolate wurde mit Primern aus hoch konservierten Regionen (fD1, rP2) (Amann *et al.*, 1995) amplifiziert und in den Vektor pGEM-Teasy kloniert. Die Plasmid-DNA von 8 positiven Klonen wurde mit den Restriktionsenzymen *MspI* und *RsaI* geschnitten. Das Insert eines Plasmids, welches das am häufigsten auftretende Restriktionsmuster zeigte, wurde sequenziert. Der Organismus, dessen 16S rDNA die höchste Homologie zu der des untersuchten Isolates zeigte, wurde in Tabelle 9 aufgelistet.

Aus Probe 1 konnten ausschließlich coryneforme Bakterien der Gattungen *Arthrobacter* und *Clavibacter* isoliert werden. Aus Probe 2 wurden Gram-positive *Bacillaceae* isoliert. Gram-negative Organismen wurden interessanterweise ohne speziellen Selektionsdruck nicht auf chromathaltigem Medium angereichert. So konnten die *Pseudomonaden* der Isolate 7 und 8 nur unter dem speziellen Selektionsdruck des GSP-Mediums mit geringen Chromatkonzentrationen angereichert werden. Ein Vergleich der MIC-Werte der verschiedenen Isolate gegenüber Chromat trennte Gram-positive und Gram-negative eindeutig in zwei verschiedene Klassen. Die Gram-positiven Isolate 1 bis 6 wiesen MIC-Werte von 4-7 mM Chromat auf, während die isolierten *Pseudomonas*-Stämme nur bei Chromatkonzentrationen bis zu 500 µM Chromat wachsen konnten. Ein Vergleich mit den

MIC-Werten der Gram-negativen Kontrollstämme *R. metallidurans* und *E. coli* (350-400 µM Chromat) sowie dem Gram-positiven Stamm *B. subtilis* (3 mM Chromat) bestätigten dies. So scheinen Gram-positive Organismen eine ca. 10fach höhere Toleranz gegenüber Chromat im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien zu besitzen. Die auf chromathaltigen Medien angereicherten Neuisolate besaßen gegenüber den Kontrollstämmen aber nur eine geringfügig gesteigerte Chromattoleranz. Diese Steigerung lag ganz in dem bei *R. metallidurans* CH34 untersuchten Bereich. Ein neues, bisher nicht untersuchtes Gebiet stellen daher die Chromatresistenz-Mechanismen bei Gram-positiven Bakterien dar.

Tabelle 9: Anreicherung von chromattoleranten Mikroorganismen

Isolat	Anreicherungs-medium	Organismus mit der höchsten Homologie der 16S rDNA	% Identität der 16S rDNA	MIC-Werte [mM Chromat] ^{a)}
<u>Probe 1: Bauschutt aus ehemaligem Druckereigelände (Optima Erfurt)</u>				
1		<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	98%	4.5
2	GSSY	<i>Clavibacter luteum</i>	98%	4
3		<i>Staphylococcus succinus</i>	98%	6
<u>Probe 2: Saale-Sediment aus dem Uferbereich, Halle/S.</u>				
4	LB, nach	<i>Exiguobacterium eurantiacum</i>	98%	7
5	Pasteurisierung	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	97%	5
6		<i>Bacillus macroides</i>	99%	5
7		<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	0.5
8	GSP	<i>Pseudomonas gessardi</i>	98%	0.5
<u>Kontrollstämme</u>				
		<i>R. metallidurans</i> AE104		0.35
		<i>E.coli</i> K12		0.4
		<i>B. subtilis</i>		3

^{a)} Die Minimale Inhibitorkonzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der nach 3 d Inkubation bei 30°C kein Wachstum mehr sichtbar war. Die Stämme wurden auf Agarplatten mit dem jeweiligen Anreicherungsmedium und verschiedenen Konzentrationen an Chromat kultiviert.

4. Diskussion

4.1. Chromatresistenz und ihre Verbreitung in Mikroorganismen

Chrom ist für Mikroorganismen und Pflanzen ein hochtoxisches, nichtessentielles Metall. Wegen seiner weit verbreiteten industriellen Nutzung ist Chrom zu einem ernst zu nehmenden Umweltgift geworden. Die hexavalente Form des Metalls ist weitaus toxischer als die in Wasser schwerlösliche, weniger mobile Cr(III)-Form. Die Präsenz von Chrom in der Umwelt hat die Selektion von Mikroorganismen und Pflanzenarten gefördert, die fähig sind, hohe Konzentrationen an Chromverbindungen zu tolerieren. Diverse Chrom-Resistenzmechanismen beinhalten verminderte Akkumulation, Reduktion von Cr(VI) zu Cr(III) und aktiven Chromatefflux (Cervantes *et al.*, 2001).

Chromat wird in Prokaryoten (Dreyfuss, 1964) und Eukaryoten (Alexander & Aashet, 1995) aktiv über biologische Membranen transportiert. Innerhalb der Zelle wird Cr(VI) wahrscheinlich über instabile Cr(V) und Cr(IV)-Formen zu Cr(III) reduziert (Arslan *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu sind die meisten Zellmembranen impermeabel für Cr(III).

Der Transport von Chromat über Sulfattransport-Systeme wurde zuerst an *Salmonella typhimurium* (Dreyfuss, 1964), später in *Escherichia coli* (Hryniewicz *et al.*, 1990), *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake *et al.*, 1987) und *Ralstonia metallidurans* (Nies *et al.*, 1989) gezeigt. In Hefen wird Chromat durch eine unspezifische Permease aufgenommen, die unterschiedliche Anionen wie Sulfat und Phosphat transportiert (Borst-Pauwels, 1981). Auch in Pflanzen gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Sulfattransport-Systemen an der Aufnahme von Chromat und auf eine davon unabhängige Aufnahme von Cr(III) (Shewry & Peterson, 1974, Mishra *et al.*, 1995).

Eine nahe liegende Strategie zur Erhöhung der Chromattoleranz ist die verminderte Akkumulation von Chromat durch verringerte Aufnahme des Ions in die Zelle. Diese einmalige Anpassungsleistung zur Erhöhung der Chromattoleranz realisiert die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Der Organismus besitzt eine stark eingeschränkte Sulfataufnahme und damit eine verringerte Menge an freiem Schwefel in der Zelle. In der Zelle akkumuliert gleichzeitig weniger Chromat, da dieses über dieselben Sulfatpermeasen transportiert wird. Scheibel *et al.* (1997) berichten über einen signifikant geringeren Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren in Hefeproteinen im Vergleich zu anderen Eukaryoten. An zwei Beispielen konnte explizit gezeigt werden, dass diese Proteine nur strukturell oder funktionell essentielle Cysteine enthalten.

Bei Bakterien wurden wiederholt vermeintliche Chromatresistenz-*loci* im Genom beschrieben, die sich bei näherer Untersuchung als Mutationen in Genen des

Sulfatstoffwechsels herausstellten. So bewirken z. B. in *E. coli* Mutationen in den Genen *cysA* (ATP-bindende Untereinheit eines Sulfattransporters), *cysB* (Transkriptionsregulator für das Cystein-Regulon), *cysI* (NAD(P)H-abhängige Sulfitreduktase), *cysL* (Cysteinsynthase) den Phänotyp einer Chromatresistenz (Neidhardt, 1996). Auch hier geht eine verminderte Akkumulation von Sulfat und Chromat mit der Erhöhung der Chromattoleranz einher. An dieser Stelle deutet sich eine enge Kopplung von Chromatresistenz und Sulfatstoffwechsel an. Auch bei vielen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Einfluss der Sulfatverfügbarkeit auf den Chromatmetabolismus in *R. metallidurans*.

Die Resistenz einiger chromatresistenter Bakterienisolate, insbesondere *Pseudomonaden*, wurde als plasmidgebunden beschrieben. Dazu gehören *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake *et al.*, 1987), *Ralstonia metallidurans* (Nies *et al.*, 1989); *Pseudomonas mendocina* (Dhakephalkar *et al.*, 1996) und *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes *et al.*, 1990). Zwei dieser Chromatresistenzsysteme wurden bisher auf molekularer Ebene analysiert. Sie werden auf den Megaplasmiden pUM505 aus *P. aeruginosa* und pMOL28 aus *R. metallidurans* kodiert. Beide Systeme realisieren die bereits erwähnte Möglichkeit der verminderten Akkumulation von Chromat durch aktiven Efflux des Oxyanions aus der Zelle. Dieser Chromatefflux wird dabei durch einen ChrA-Chromattransporter der CHR-Proteinfamilie realisiert (Nies *et al.*, 1998).

Die dritte, weitverbreitete Möglichkeit der Detoxifikation von Chromat ist die Reduktion des Oxyanions zu Cr(III). Diese Möglichkeit bietet das größte Potential der Bioremediation chromatbelasteter Böden und Gewässer, da Cr(III) ca. um den Faktor 100 weniger toxisch ist und in Form schwer löslicher Hydroxide aus dem löslichen Gleichgewicht ausscheidet.

Bei der Anreicherung von Organismen aus chromatbelastetem Boden einer ehemaligen Druckerei sowie aus Saalesediment wurden hauptsächlich Gram-positive Bakterien isoliert. Mittels 16S rDNA – Analyse konnte die Zuordnung einiger Isolate zu den Gattungen *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium* und *Bacillus* getroffen werden. Die Sequenz der 16S rDNA wird dazu genutzt, evolutionäre und phylogenetische Beziehungen zwischen Organismen aufzuklären. Eine genaue Bestimmung der Art ist mit dieser Methode allein nicht möglich, da die Sequenz der 16S rDNA innerhalb einer Gattung hochkonserviert ist und Identitäten von 98-99% aufweist (Weisburg *et al.*, 1991). Außerdem kann ein Organismus mehrere 16S rRNA Operone enthalten (Young & Cole, 1993).

Die Isolate dieser Arbeit gehörten zum einen zu den coryneformen *Actinomyceten* (*Arthrobacter*, *Clavibacter*) – typischen aeroben Bodenbewohnern mit hohem (G+C) – Gehalt der DNA. Zum anderen wurden nach Pasteurisierung der Bodenproben Bakterien aus der Verwandtschaft der Bacillen angereichert (*Bacillus sp.*, *Exiguobacterium*). Diese Isolate konnten in Medien mit 4 bis 7 mM Chromat kultiviert werden. Gram-negative Organismen konnten nur in einem speziellen Anreicherungsmedium für *Pseudomonaden* und bei

geringeren Chromatkonzentrationen isoliert werden. Dabei erreichten die näher untersuchten *Pseudomonas* – Stämme MIC-Werte gegenüber Chromat von 500 μM .

Megharaj *et al.* (2002) reicherten Organismen aus chromatbelasteten Böden ehemaliger Gerbereien an. Dabei wurden *Arthrobacter*- und *Bacillus*-Stämme charakterisiert. Auch bei Anreicherungen durch Pattanapitpaisal *et al.* (2002) und Francisco *et al.* (2002) wurden chromattolerante *Bacillus*-, *Exiguobacterium*-, *Actinomyceten*- und *Coryneforme* – Stämme beschrieben. Die beschriebenen Gram-negativen Bakterien gehören zu den γ - und β -*Proteobakterien*, meist zur Verwandtschaft der *Pseudomonaden* (Tab. 10).

Tab. 10: Beschriebene chromatresistente/ -tolerante Mikroorganismen

Gattung	MIC-Werte gegenüber Chromat	Zitat
Gram-negativ		
<i>Pseudomonas</i> (versch. Arten)	250 μM -(20 mM) ¹⁾	Ohtake <i>et al.</i> , 1987 ; Dhakephalkar <i>et al.</i> , 1996 ; Cervantes <i>et al.</i> , 1990 ; Pattanapitpaisal <i>et al.</i> , 2002 ; Suzuki <i>et al.</i> , 1992 ; Park <i>et al.</i> , 1999
<i>Ralstonia</i>	350 μM	Nies <i>et al.</i> , 1989
<i>Shewanella</i>	≥ 40 μM	Viamajala <i>et al.</i> , 2003
<i>Enterobacter</i>	500 μM	Ohtake <i>et al.</i> , 1990 ; Clark, 1994
Gram-positiv		
<i>Bacillus</i>	250 μM – 1 mM	Megharaj <i>et al.</i> , 2002, Campos <i>et al.</i> , 1995, Pattanapitpaisal <i>et al.</i> , 2002 ; Garbisu <i>et al.</i> , 1998
<i>Arthrobacter</i>	≥ 1 mM	Megharaj <i>et al.</i> , 2002
<i>Corynebacterium</i>	≥ 2 mM	Francisco <i>et al.</i> , 2002
<i>Exiguobacterium</i>	-	Pattanapitpaisal <i>et al.</i> , 2002
<i>Clavibacter</i>	≥ 1 mM	Francisco <i>et al.</i> , 2002
<i>Cellulomonas</i>	1 mM	Francisco <i>et al.</i> , 2002

Das Spektrum der kultivierbaren chromattoleranten Bakterien dieser Arbeit stimmte mit Kultivierungen aus anderen chromatbelasteten Standorten überein. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass die in dieser Arbeit angereicherten Gram-positiven Organismen eine viel höhere natürliche Chromattoleranz aufwiesen, als die Gram-negativen (Tab. 9), auch unabhängig von einer vorherigen Chromatexposition. Diese Tatsache ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden, so dass über die Gründe dieser hohen Toleranz nur spekuliert werden kann.

So könnte z.B. die spezielle Zellwandphysiologie einen Anteil an dem Phänomen besitzen. Die in der Literatur beschriebenen Isolate wurden aber bisher ausschließlich durch ihre Fähigkeit zur Chromatreduktion charakterisiert (Megharaj *et al.*, 2002; Pattanapitpaisal *et al.*, 2002; Francisco *et al.*, 2002).

Unklar ist, ob Gram-positive auch Resistenzmechanismen besitzen, die auf aktivem Efflux von Chromat beruhen. Einen Hinweis darauf könnte das Vorhandensein eines Chromattransporters der CHR-Proteinfamilie geben. Mittels BLAST-Analyse wurde in *Exiguobacterium sp.* ein Protein mit 27% Identität zu ChrA₁ aus *R. metallidurans* gefunden. *Bacillus subtilis* enthält zwei homologe Proteine, eines mit 27% Identität zum N-terminalen Teil, eines mit 26% Identität zum C-terminalen Teil des ChrA₁-Proteins (Nies *et al.*, 1998). In coryneformen Bakterien und *Actinomyceten* wurden bisher keine ChrA-homologen Proteine identifiziert. Eine Beteiligung dieser ChrA-ähnlichen Proteine an der Ausbildung von Chromatresistenz muss noch untersucht werden.

4.2. Enzymvermittelte Reduktion von Chromat

Die mikrobielle Reduktion von Metallen ist von generellem Interesse, da solche Prozesse Bedeutung im Stoffkreislauf von Ökosystemen besitzen. Sie bilden eine Grundlage für die biotechnologische Remediation von schwermetallbelasteten Standorten (Lloyd, 2003).

Reduktionsvorgänge können Bestandteil bakterieller Schwermetall-Resistenzsysteme sein. Die reduktive Änderung des Oxidationszustandes des Metalls ist in diesem Fall Bestandteil des Resistenzsystems. Gut untersuchte Beispiele dafür sind die Resistenz gegen Hg(II) (Barkay *et al.*, 2003) und As(V) (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

Quecksilberionen werden spezifisch in die Zelle aufgenommen und durch die zytoplasmatische NAD(P)H-abhängige Reduktase MerA zu elementarem Quecksilber reduziert. Das flüchtige und chemisch relativ inerte Hg⁰ diffundiert aus der Zelle (Summers & Sugarman, 1974). Der Reduktion von As(V) zu As(III) durch die ArsC-Reduktase folgt ein Efflux von As(III) aus der Zelle. Die ArsC-vermittelte Reduktion ist abhängig von reduziertem Glutathion und nicht energiekonservierend (Liu & Rosen, 1997).

Oxyanionen von Schwermetallen wie Vanadat, Molybdat, Arsenat, Chromat und Technetium(VII) werden durch eine Vielzahl von Bakterien auch unabhängig von einer Resistenzvermittlung reduziert. Die Reduktionsvorgänge finden an anaeroben und aeroben Standorten, mit und ohne dissimilatorischen Energiegewinn, statt.

Die Reduktion von Vanadat zu V(III) ist bei den fakultativ chemolithotrophen Organismen *Pseudomonas vanadiumreductans* und *Pseudomonas isachenkovii* gut untersucht (Yurkova & Lyalikova, 1991). Die Fähigkeit zur Molybdatreduktion wurde sowohl im sulfatreduzierenden *Desulfovibrio desulfuricans* (Tucker *et al.*, 1997) als auch in *Pseudomonaden* und *Micrococcus*-Spezies (Bautista & Alexander, 1972) identifiziert. *Escherichia coli* vermag Technetium(VII) durch eine periplasmatische Hydrogenase zu reduzieren (Lloyd *et al.*, 1999).

Dissimilatorische Reduktion von Arsenat wurde dagegen bei *Chrysiogenes arsenatis* (Macy *et al.*, 1996) und *Sulfurospirillum arsenophilum* (Oremland & Stolz, 2000) beschrieben.

Die Fähigkeit, Chromat zu reduzieren, ist im gesamten Reich der Bakterien vertreten. Ein breites Spektrum von fakultativ Anaeroben, einschließlich *E. coli*, verschiedener *Pseudomonaden* und *Aeromonaden* (Wang, 2000) sind zur Chromatreduktion befähigt. Anaerobe Chromatreduktion wurde für etliche sulfatreduzierende Bakterien (*Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*) beschrieben (Michel *et al.*, 2001). Einige sulfatreduzierende Bakterien sind zur dissimilatorische Chromatreduktion befähigt und nutzen Cr(VI) als terminalen Elektronenakzeptor (Tebo & Obratsova, 1998).

Die anaerobe Reduktion von Chromat ist membrangebunden (Lovley & Phillips, 1994), scheint aber nicht durch spezifische Chromatreduktasen, sondern unter Beteiligung von Cytochromen und Hydrogenasen katalysiert zu werden (Tab. 11). Die *c*-Cytochrome sind durch ein niedriges Redoxpotential von -200 bis -400 mV charakterisiert, während die Metallzentren der Hydrogenasen Redoxpotentiale von +100 bis -350 mV aufweisen (Chardin *et al.*, 2003). Dadurch sind diese Enzyme zur Metallreduktion befähigt.

Anaerobe Bedingungen sind für die Chromatreduktion optimal, es gibt aber auch Enzymsysteme, die diese Reaktion unter aeroben Bedingungen katalysieren (Lloyd, 2003). So sind lösliche, NAD(P)H-abhängige Reduktasen aus *Pseudomonas ambigua* G-1 (Suzuki *et al.*, 1992) und *Pseudomonas putida* (Park *et al.*, 2000) gereinigt und beschrieben worden. Mittels ESR-Studien wurde während der enzymatischen Reaktion ein Cr(V)-Intermediat identifiziert. Als katalytischen Mechanismus schlugen Suzuki *et al.* (1992) ein Zwei-Schritt-Reduktionsmodell vor: Zuerst katalysiert die Reduktase einen Ein-Elektronen-Transfer von NADH auf Cr(VI), wobei das Cr(V)-Intermediat gebildet wird. In einem weiteren Schritt werden zwei Elektronen von NADH auf das Cr(V)-Intermediat übertragen und Cr(III) gebildet. Alle bisher beschriebenen aeroben Chromatreduktasen sind NAD(P)H-abhängige Enzyme (Tab. 11).

Tabelle 11: Enzyme mit Cr(VI)-Reduktase-Aktivität

Enzym	Organismus	Zitat
Membrangebunden (anaerob)		
Cytochrom c_3	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Lovley & Phillips, 1994
	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Michel <i>et al.</i> , 2001
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Wang <i>et al.</i> , 1989
Cytochrom c_7	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	Michel <i>et al.</i> , 2001
Cytochrome b, d	<i>E.coli</i>	Shen & Wang, 1993
Fe-Hydrogenase	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Michel <i>et al.</i> , 2001
Ni-Fe-Se-Hydrogenase	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Michel <i>et al.</i> , 2001
Ni-Fe-Hydrogenase	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	Chardin <i>et al.</i> , 2003
Löslich (aerob)		
NAD(P)H-abh. Chromatreduktase, keine andere <i>in vivo</i> -Funktion bekannt	<i>Pseudomonas putida</i>	Park <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pseudomonas ambigua</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1992
	<i>Bacillus subtilis</i>	Campos-Garcia <i>et al.</i> , 1997, Garbisu <i>et al.</i> , 1998
	<i>E. coli</i>	Shen & Wang, 1993
NADH - abh. Glutathion-Reduktase Flavin-Reduktase (Fre)	<i>R. metallidurans</i>	DIESE ARBEIT
	<i>E.coli</i>	Shi & Dalal, 1990
NADH-abhängige Nitroreduktasen	<i>E.coli</i>	Puzon <i>et al.</i> , 2002
	Hinweise aus <i>Enterobacter aerogenes</i> ,	Clark, 1994
	<i>Pseudomonas ambigua</i> <i>Vibrio harveyi</i>	eigene Sequenzanalysen Kwak <i>et al.</i> , 2003

Auch der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Ralstonia metallidurans* zeigte eine NADH-abhängige Chromatreduktase-Aktivität. Doch wie ist nun die Spezifität solcher als Chromatreduktasen beschriebenen Enzyme einzuschätzen?

Ohtake & Silver (1994) schlagen die Reduktion von Cr(VI) zum weniger toxischen Cr(III) als zusätzlichen Chromatresistenz-Mechanismus vor. Diese Vermutung kann durch die eigenen Arbeiten für *R. metallidurans* nicht gestützt werden. Die Chromatreduktase-Aktivität von *R. metallidurans* ist auch im chromatensitiven Stamm AE104 vorhanden. Die Reduktionsraten im chromatresistenten Stamm AE126 waren niedriger als in AE104. Dies ist mit dem auf pMOL28 kodierten Chromatefflux-System zu erklären. Dadurch ist die intrazelluläre Chromatkonzentration in AE126 vermindert (Nies *et al.*, 1989).

Eine zusätzliche Steigerung der Chromatreduktase-Aktivität durch Chromat als Induktor war nicht zu beobachten. Es ergab sich damit kein Hinweis auf eine Spezifität der Reduktion für Chromat.

Der einzige beschriebene Organismus, dessen Chromatresistenz ursprünglich mit einer Chromatreduktase-Aktivität zusammenhängt, ist *Pseudomonas ambigua* (Suzuki *et al.*, 1992). In diesem Organismus geht ein Verlust der Chromatreduktase-Aktivität mit dem Verlust der Chromatresistenz einher. Besitzt dieser Organismus nun eine spezifische Chromatreduktase? Eine Sequenzanalyse der Chromatreduktase erbrachte überraschenderweise die Verwandtschaft zu NAD(P)H-abhängigen Nitroreduktasen aus verschiedensten Organismen. Die mit 52% höchste Identität zeigte die NAD(P)H-abhängige Nitroreduktase aus *Bacillus cereus*. Dass auch NAD(P)H-abhängige Nitroreduktasen eine Chromatreduktase-Aktivität besitzen können, wird durch die Beobachtung von Clark (1994) gestützt, dass die Chromatreduktase aus *Enterobacter aerogenes* durch Nitrit induziert und durch Nitrat gehemmt wird. Erst kürzlich wurde von Kwak *et al.* (2003) die Chromatreduktase-Aktivität der gereinigten Nitroreduktase aus *Vibrio harvey* gezeigt, und damit ein Beweis für die vorangegangenen Vermutungen erbracht.

Die eigentliche Rolle von löslichen Chromatreduktasen in der bakteriellen Physiologie ist noch nicht untersucht. Bisher ist keine einzige spezifische Chromatreduktase bekannt. Chromatreduktase-Aktivitäten, wie die in dieser Arbeit in *R. metallidurans* untersuchte, könnten Nebenaktivitäten von Reduktasen sein, die eine völlig andere physiologische Funktion ausüben.

4.3. Die Vermittlung von Chromatresistenz in *Ralstonia metallidurans* erfolgt über zwei *chr*-Genregionen

Der Chromatstoffwechsel von *R. metallidurans* erwies sich als weitaus komplexer als zu Beginn dieser Arbeit angenommen. So besitzt der Organismus zur Ausprägung der Chromatresistenz neben der bereits bekannten, pMOL28-kodierten *chr*₁-Genregion eine weitere, chromosomal kodierte *chr*₂-Genregion. Eine Übersicht über den Aufbau der beiden Genregionen ist in Abbildung 29 dargestellt.

Den Hauptanteil an der Ausprägung der pMOL28-kodierten Chromatresistenz tragen *chrB*₁ und *chrA*₁. Wurden beide Gene *in trans* auf dem *low-copy* Plasmid pVDZ'2 in den plasmidfreien Stamm AE104 konjugiert, dann erreichte der Stamm einen MIC-Wert gegenüber Chromat, der dem von Stamm AE126(pMOL28) entsprach (Nies *et al.*, 1989). Durch Peitzsch (1999) wurde außerdem die Transkription der *chr*₁-Genregion (*chrB*₁, *chrA*₁, *chrC*) unter Chromatstress gezeigt. Die *chr*₁-Determinante umfasst neben den bereits aus vorangegangenen Arbeiten bekannten Strukturgenen *chrB*₁, *chrA*₁ und *chrC* noch weitere Gene (*chrI*, *chrE* und *chrF*₁), die im Verlauf dieser Arbeit identifiziert und deren Charakterisierung begonnen wurde. Bei Deletion der akzessorischen Gene *chrI*, *chrC* und

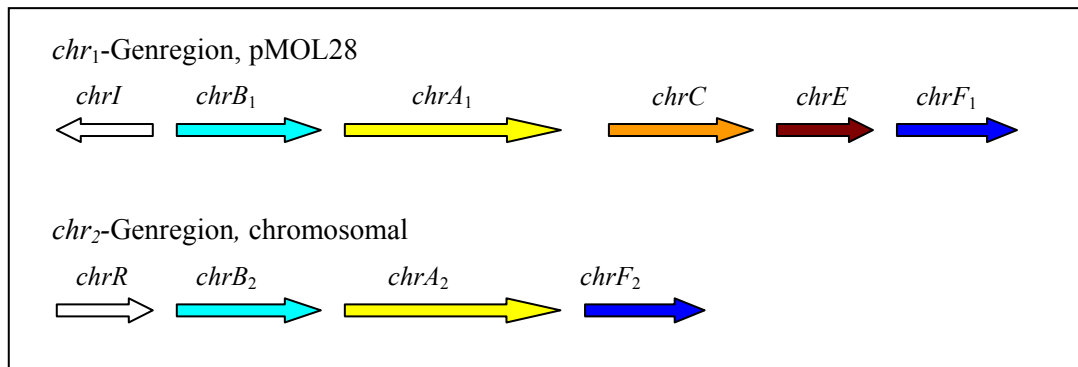


Abb. 29: Genorganisation der *chr1*- und *chr2*-Genregionen in *Ralstonia metallidurans*.

chrF1 zeigte sich eine Verminderung der MIC gegenüber Chromat. Die im 3'-Bereich neu identifizierten Gene *chrE* und *chrF1* waren spezifisch durch Chromat induzierbar.

Die chromosomal kodierte *chr2*-Determinante wurde im Rahmen dieser Arbeit identifiziert. Diese Genregion besteht zum einen aus den zur *chr1*-Genregion homologen Genen *chrB2*, *chrA2* und *chrF2*. Deletionen dieser Gene führen zu einer gesteigerten Chromatsensitivität in *R. metallidurans* AE104. Eine Deletion des im 5'-Bereich der *chr2*-Determinante lokalisierten *chrR*-Gens führte zu keinem Phänotyp in Bezug auf die Chromattoleranz von AE104. ChrR übte aber einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription der *chr1*-Genregion aus. Auch für die *chr2*-Genregion konnte eine spezifische Induktion durch Chromat gezeigt werden.

Die Involvierung aller Gene der *chr*-Determinanten in die Ausprägung einer Chromatresistenz wurde also gezeigt. Dies geschah sowohl durch deren Einfluss auf die MIC gegenüber Chromat und/oder durch Induktion der Transkription durch Chromat.

Jede *chr*-Determinante erhöht die Resistenz gegenüber Chromat um das ca. 2,5fache. In Anwesenheit beider Determinanten ist die Resistenz um das 4 bis 5fache erhöht. Dies sind verglichen mit anderen Metallresistenz-Systemen von *R. metallidurans* sehr kleine Effekte. So erhöht die *czc*-Determinante die MIC-Werte gegenüber Kobalt, Zink und Kadmium um das 100fache (Nies *et al.*, 1989a). Die auf pMOL28, direkt stromaufwärts von *chr1* kodierte *cnr*-Determinante erhöht die MIC-Werte von *R. metallidurans* gegenüber Nickel und Kobalt um das 7 bzw. 15fache (Liesegang *et al.*, 1993, Grass, 2000).

Zusätzlich dazu ist die Chromatresistenz stark vom Sulfatgehalt des Mediums abhängig. Bei Sulfatsättigung (3 mM) ist *R. metallidurans* 10fach resistenter gegenüber Chromat als bei Sulfatmangel (30 μ M). Dies ist ein Effekt verminderter Chromatakkumulation, der durch verminderte Aufnahme in die Zelle erklärt werden kann. Chromat wird über Sulfataufnahmesysteme in die Zelle transportiert, wobei Sulfatmangelbedingungen zu einer 10fach gesteigerten Chromatakkumulation in der Zelle führen (Nies & Silver, 1989a). Bei

Sulfatsättigung ist die Sulfataufnahme reprimiert und in Übereinstimmung damit die MIC-Werte gegenüber Chromat erhöht.

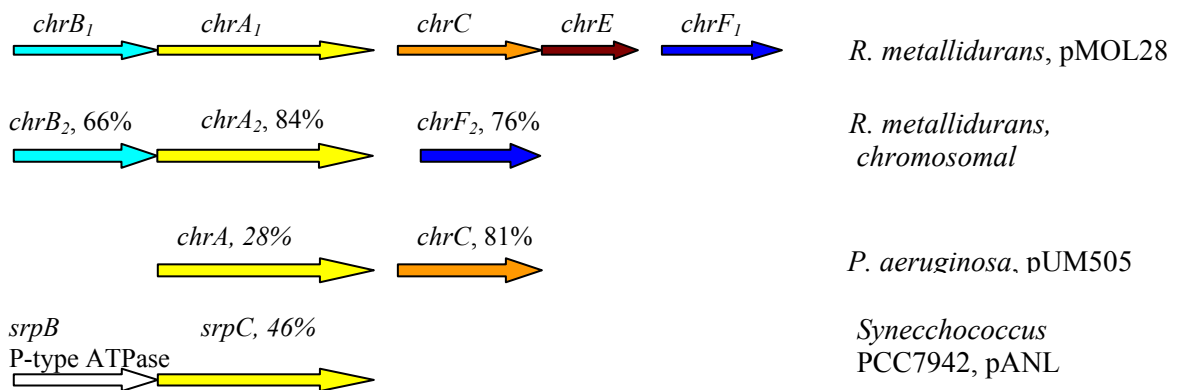
Warum leistet sich *R. metallidurans* ein komplexes Resistenzsystem gegen Chromat, das scheinbar so wenig effizient ist? Aufgrund seines hohen Redoxpotentials ($E_0[\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}] = +1.36$) ist Chromat eines der stärksten Oxidationsmittel in der Zelle. Es interagiert mit vielen Zellkomponenten unter Bildung von Cr(V)-Addukten und wird zu Cr(III) reduziert. Möglicherweise ist aus diesem Grund intrazelluläres Chromat den Effluxpumpen nicht so leicht zugänglich wie Metallkationen. *R. metallidurans* ist ein an schwermetallbelastete Standorte hochangepasster Organismus, der über eine Vielzahl von Resistenzsystemen verfügt. Die *chr*-Determinanten verhelfen *R. metallidurans* sicherlich nicht zu einer Dominanz an stark chromatbelasteten Standorten – von solchen Standorten wurden chromatresistente Mikroorganismen der Gram-positiven Gattungen *Arthrobacter* und *Bacillus* isoliert. Allerdings bringt die Chromatresistenz einen zusätzlichen Vorteil an schwermetallbelasteten Standorten, an denen auch Chromat vorkommt, so z.B. Serpentinböden.

Die Aufklärung der Physiologie des Chromatstoffwechsels in *R. metallidurans* wird erschwert durch die Vielzahl der beteiligten Genprodukte und die Tatsache, dass bisher kein vergleichbares Resistenzsystem in Mikroorganismen bekannt ist oder charakterisiert wurde.

In *Pseudomonas aeruginosa* wurde auf dem Plasmid pUM505 eine Chromatresistenz beschrieben (Cervantes *et al.*, 1990). Diese plasmidkodierte Resistenzdeterminante kodiert ein ChrA-homologes Protein (28% Identität zu ChrA₁ aus *R. metallidurans*) und ein ChrC-homologes Protein, das im N-terminalen Bereich 81% Identität zum entsprechenden Protein aus *R. metallidurans* besitzt (Abb. 30A). Allerdings ist die Transkription dieser Genregion nicht durch Chromat induzierbar, sondern konstitutiv. Hinweise auf weitere Komponenten des Resistenzsystems gibt es nicht. Da aber bisher nur ein kleiner Ausschnitt des pUM505-Plasmids sequenziert wurde, kann man die Existenz eines *chrB*-Gens und anderer Komponenten der *chr*-Genregion nicht völlig ausschließen. Aus *Synechococcus* wurde das ChrA-homologe Protein SrpC beschrieben (46% Identität zu ChrA₁). Das Protein gehört zu einer Genregion, die unter Sulfatmangel im Medium induziert wird, vermittelt aber keine Chromatresistenz (Nicholson & Laudenbach, 1995). Weitere *chr*-homologe Gene sind bisher nicht untersucht worden.

Um einen Eindruck über die Verbreitung von *chr*-Genregionen im Mikroorganismenreich zu gewinnen, wurden 169 sequenzierte Genome mittels BLAST-Analyse auf das Vorkommen von *chrA*-homologen Genen durchsucht. Die Umgebung der *chrA*-Gene wurde bei einigen ausgewählten Vertretern untersucht und mit den *chr*-Genregionen von *R. metallidurans* verglichen (Abb. 30B).

A



B

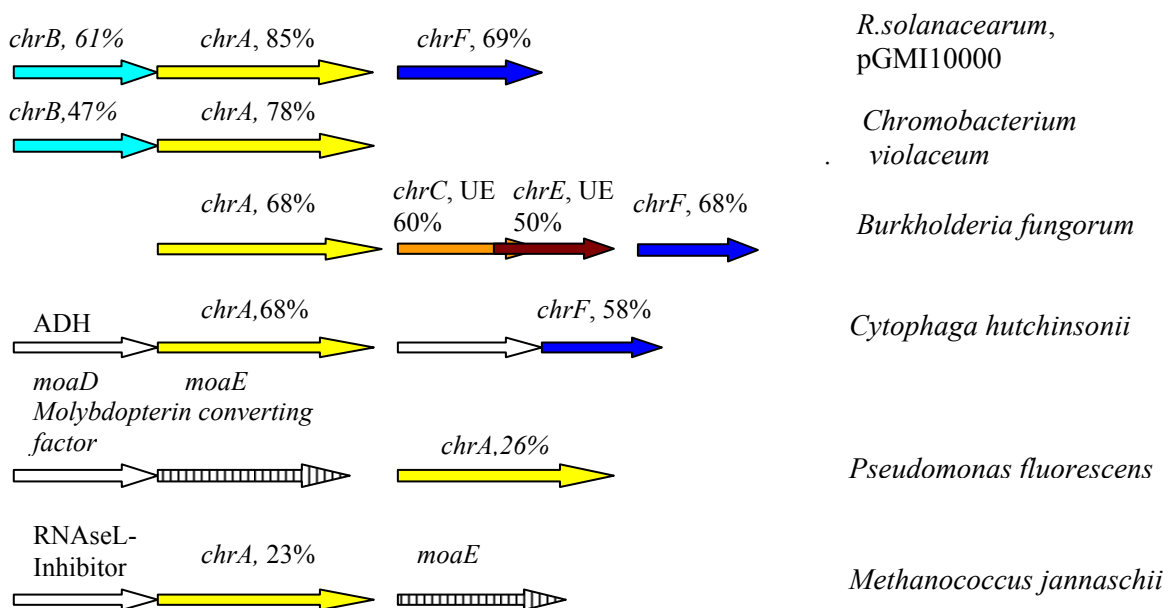


Abb. 30: Genorganisation in der Umgebung der *chrA*-Gene in verschiedenen Mikroorganismen. Die *chrA*-homologen Gene wurden mittels BLAST-Analyse identifiziert, die Nucleotidsequenzen der umgebenden ORF's mittels BLASTp-Analyse zugeordnet. [A] Beschriebene *chr*-homologe Regionen, [B] nicht untersuchte *chr*-homologe Regionen aus sequenzierten Mikroorganismen. Die angegebenen Prozentzahlen geben die Identität zum entsprechenden Protein der *chr*₁-Genregion aus *R. metallidurans* an.

Es wurden dabei keine *chrI*- bzw. *chrR*- homologen Gene identifiziert. Diese im 5'-Bereich der *chr*-Determinanten von *R. metallidurans* lokalisierten Gene wurden daher nicht mitbetrachtet.

Auf dem Megaplasmid pGMI10000 aus *R. solanacearum* wurde ein Bereich mit der Genorganisation *chrBAF* identifiziert. Dies entspricht der Anordnung der *chr*₂-Determinante aus *R. metallidurans*. *Chromobacterium violaceum* besitzt eine *chrBA*-Region. Der Organismus *Burkholderia fungorum* enthält eine zur *chr*₁-Genregion homologe Determinante. Zwar besitzt diese – wie auch bei *P. aeruginosa* – kein *chrB*-Gen, dafür aber den gesamten

stromabwärts gelegenen Bereich mit *chrACEF*. Auffälligerweise bilden *chrC* und *chrE* hier einen gemeinsamen ORF, der wahrscheinlich für ein Protein mit zwei Untereinheiten kodiert. Dies ist ein interessanter Gesichtspunkt für die Funktionsaufklärung dieser Proteine und wird an späterer Stelle genauer besprochen.

Bei phylogenetisch weiter entfernten Organismen wird oft ein *chrF*-verwandter ORF in der Nähe des *chrA*-Gens gefunden. Dies ist in Abbildung 30B beispielhaft für *Cytophaga hutchinsonii* gezeigt. Im Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* sowie in *Pseudomonas fluorescens* liegt das *chrA*-Gen assoziiert mit *moaD* und *moaE* vor. Die Proteine MoaD und MoaE sind die zwei Untereinheiten der Molybdopterin-Synthase, die für die Biosynthese der Dithiolen-Bindestelle des Molybdän-Kofaktors verantwortlich ist (Rudolph *et al.*, 2003, Wuebbens & Rajagopalan, 2003). Hier ist kein Zusammenhang zu einer Chromatresistenz zu vermuten. Am häufigsten sind *chrA*- und *chrF*-Gene miteinander assoziiert, so dass man einen funktionellen Zusammenhang annehmen kann. Die häufige Lokalisation dieser Genbereiche auf Plasmiden (*R. metallidurans*, *P. aeruginosa*, *Synechococcus* PCC7942, *R. solanacearum*) lässt die Verbreitung durch horizontalen Gentransfer vermuten.

4.4. Der Chromattransporter ChrA₁ - Das zentrale Strukturprotein der Chromatresistenz-Determinante *chr*₁

Das ChrA₁-Protein ist das primär Resistenz-vermittelnde Protein der Chromatresistenz-Determinante *chr*₁. Es gehört zur CHR-Genfamilie, deren Mitglieder sich durch Sequenz- und Sekundärstruktur-Homologie auszeichnen und bei Bakterien und Archaea verbreitet, jedoch nicht essentiell sind (Nies *et al.*, 1998). Nur ca. 25% der sequenzierten mikrobiellen Genome enthalten mindestens ein putatives CHR-Protein (Nies, 2003). Zwei Vertreter dieser Proteinfamilie wurden in *R. solanacearum* und *Bacillus halodurans* und *P. aeruginosa* gefunden. Neueste BLAST-Analysen zeigten allerdings die bisher unbekannte Tatsache, dass ChrA-Proteine auch in Eukaryoten vorkommen. Zwei in diesem Jahr sequenzierte Organismen - der zu den *Ascomyceten* gehörende rote Brotschimmel *Neurospora crassa* und die Malaria-übertragende Stechmücke *Anopheles gambiae* - besitzen ChrA-Proteine mit 21% bzw. 60% Identität zu ChrA₁ aus *R. metallidurans*.

Die Involvierung von CHR-Proteinen in eine Chromatresistenz wurde für ChrA₁ und ChrA₂ aus *R. metallidurans* und ChrA aus *P. aeruginosa* gezeigt (Nies *et al.*, 1989; Juhnke *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 1990). Daneben existieren in *R. metallidurans* zwei weitere zu ChrA₁ verwandte Proteine, die mit ChrA₃ (23% Identität) und ChrA₄ (25% Identität) bezeichnet wurden. Das ChrA₄-Protein wird dabei durch zwei Polypeptidketten gebildet, die zum N-terminalen bzw. C-terminalen Teil des Transporters verwandt sind. Sowohl ChrA₃ als auch

ChrA₄ scheinen nicht an der Ausbildung von Chromatresistenz in *R. metallidurans* beteiligt zu sein. Beide Proteine sind weder durch Chromat induzierbar, noch führen ihre Deletionen zu einer Chromatsensitivität (C. Baumann, pers. Mitteilung). Es ist also denkbar, das ChrA-homologe Proteine neben einem Chromattransport noch andere Funktionen in der Zelle erfüllen können.

In Abbildung 31 ist ein phylogenetischer Stammbaum ChrA-homologer Proteine dargestellt. Bei Organismen mit mehreren ChrA-Proteinen wurde dasjenige Gen in die Verwandtschaftsanalyse einbezogen, das die höchste Identität zu ChrA₁ aus *R. metallidurans* besitzt.

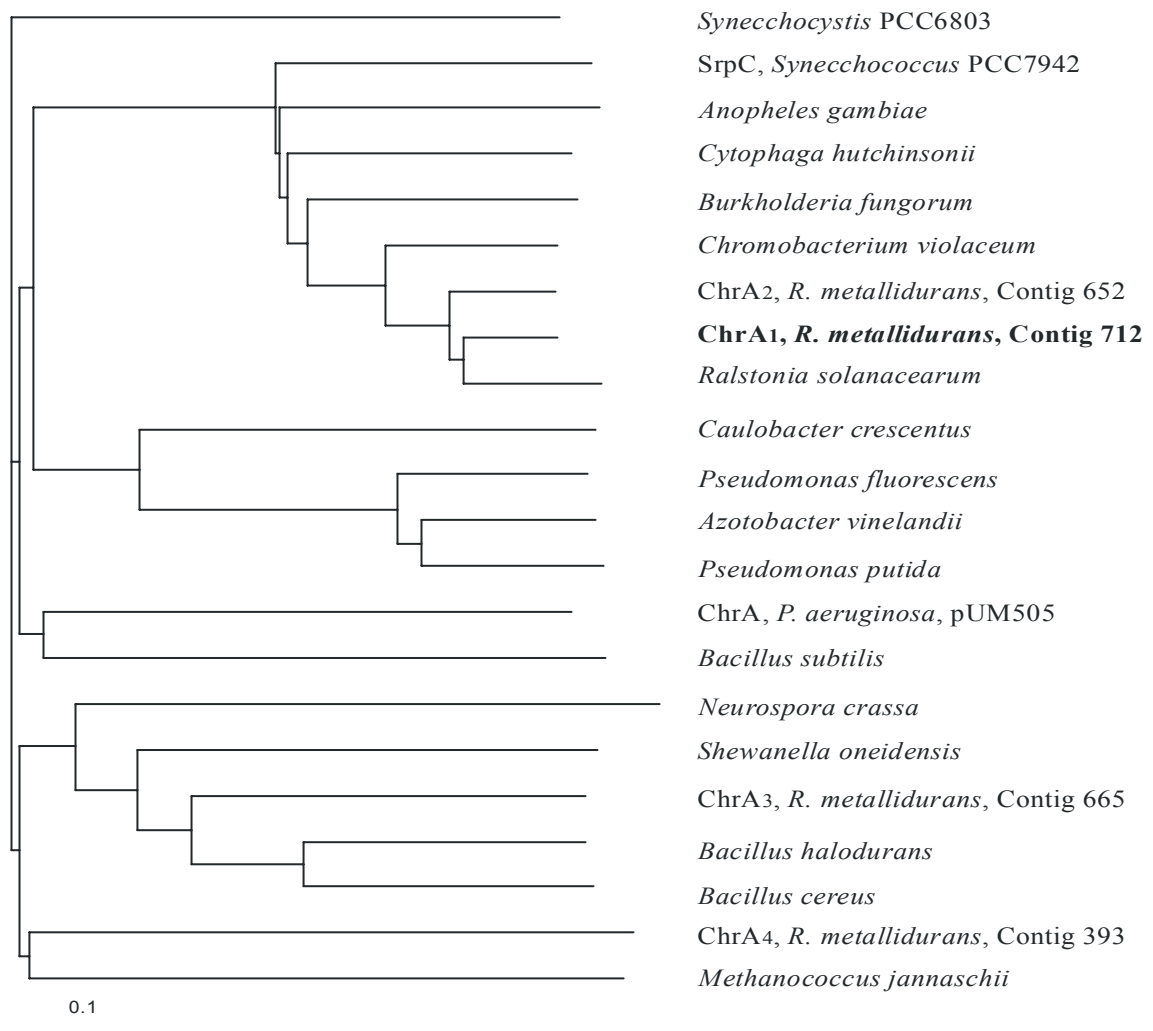


Abb. 31: Phylogenetischer Stammbaum mit ChrA-homologen Proteinen. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit CLUSTALW untersucht und der Stammbaum mit dem Programmpaket Phylip erstellt (bootstrap – Analyse nach Felsenstein, 1989). Die Referenzen (*accession numbers*) der Proteine sind im Anhang aufgeführt.

ChrA₁ und ChrA₂ bilden ein Cluster mit den homologen Proteinen aus *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia fungorum*, *Chromobacterium violaceum* und *Cytophaga hutchinsonii* – nah verwandten Mikroorganismen aus der Gruppe der β -Proteobakterien. ChrA₃ und ChrA₄ aus *R. metallidurans* sowie auch ChrA aus *Pseudomonas aeruginosa* sind nur weitläufig mit ChrA₁ verwandt.

Die CHR-Genfamilie enthält Membranproteine, die zehn α -helikale Membrandurchgänge besitzen. Ein Hydrophathie-Blot des ChrA₁-Proteins mit der angenommenen Lage der Membrandurchgänge ist in Abbildung 32A dargestellt. Eine N-terminale Domäne von ca. 80 Aminosäuren befindet sich nach Topologieuntersuchungen im Cytoplasma. Das Protein ist evolutionär wahrscheinlich durch eine Genduplikation gefolgt von Genfusion entstanden (Nies *et al.*, 1998). So gibt es Bakterien (z.B. *Bacillus subtilis*, *R. metallidurans*, *Chromobacterium violaceum*), bei denen ChrA durch zwei Polypeptidketten gebildet wird. Zwei verschiedene Gene kodieren einmal den N-terminalen bzw. den C-terminalen Bereich des Proteins. Die durch Genduplikation entstandenen membranständigen Bereiche könnten zwei Domänen, d. h. zwei Membrankanäle ausbilden.

CHR-Proteine sind Effluxpumpen, die über einen chemiosmotischen Gradienten angetrieben werden. Da der Export eines Anions so wie das elektrische Feld des Protonengradienten über der Membran gerichtet ist, ist das Membranpotential $\Delta\Psi$ allein ausreichend, um den Chromatefflux anzutreiben. Gleichzeitig ist das ChrA-Protein aus *P. aeruginosa* der bisher einzige Vertreter, für den ein protonenabhängiger Chromattransport demonstriert werden konnte. Invertierte Membranvesikel von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, die das Chromatresistenz-Protein ChrA exprimierten, akkumulierten die vierfache Menge an Chromat im Vergleich zu Vesikeln ohne ChrA. Dies deutet auf einen Chromatefflux im resistenten Stamm hin. Der Chromatefflux war abhängig von einem transmembranen Protonengradienten und wurde durch das Chromat-Analogon Sulfat inhibiert (Alvarez *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte ein *in vivo*-Efflux von Chromat durch das ChrA-Protein in *P. aeruginosa* PAO1 gezeigt werden (Pimentel *et al.*, 2002).

Für *R. metallidurans* konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit des Entkopplers FCCP keine verminderte Akkumulation von Chromat aufrechterhalten werden konnte. Bei Zusammenbruch des Protonengradienten über der Membran stieg die intrazelluläre Menge an [⁵¹Cr] in AE126(pMOL28) auf das Niveau von Stamm AE104(plasmidfrei). Da aber auch in AE104 die Akkumulation von [⁵¹Cr] bei Zugabe von FCCP anstieg, kann von einem weiteren, chromosomal kodierten Chromattransporter ausgegangen werden. Ein Kandidat dafür ist das ChrA₂-Protein, das in der *chr*₂-Genregion kodiert wird.

Die bisherigen Hinweise auf einen protonengetriebenen Transport lassen einen Chromat/Protonen-Antiport möglich erscheinen. Zur Gruppe der protonengetriebenen Efflux-Systeme gehören die RND-Transporter (*resistance nodulation cell division*) (Paulsen *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 2000). Ein Vertreter ist das Zink, Kobalt und Kadmium transportierende CzcA-Protein aus *R. metallidurans*. Hier wurden zwei transmembrane Kanäle postuliert, wobei ein Kanal als Protonenkanal und der zweite als Metallionenkanal fungiert (Goldberg *et al.*, 1999). Im Protonenkanal wurde ein Ladungs-Relais-System gefunden, bei welchem der Protonentransport über die Carboxylgruppen von zwei Aspartat- und einer Glutamatgruppe vom Periplasma in das Cytoplasma verläuft. Die negativ geladenen Carboxylgruppen dienen dabei als Protonen-Akzeptoren bzw. –Donatoren. Protonentransport über solche Carboxylseitenketten wurde z.B. für Bacteriorhodopsin (Krebs & Korana, 1993) und den mitochondrialen Phosphat-Carrier (Phelps *et al.*, 1996) beschrieben.

Auch für ChrA₁ aus *R. metallidurans* ist ein Aufbau als Zweikanaltransporter denkbar. Typischerweise bilden jeweils sechs Helices einen transmembranen Kanal. Eine solche Anordnung ist z.B. in der Kristallstruktur des RND-Transporters AcrB nachgewiesen worden (Murakami *et al.*, 2002). Für ChrA₁ dagegen ist eine Anordnung, wie in Abb. 32B dargestellt, denkbar. In Helix VIII, IX und X befindet sich ein konserviertes Motiv (D₃₃₅D₃₅₉E₃₈₁) aus zwei Aspartat- und einer Glutamat-Gruppe (Abb. 32A,C). Diese Aminosäuren befinden sich nach Computervorhersagen und topologischen Untersuchungen im Membrandurchgang (Nies *et al.*, 1998). Da geladene Aminosäuren innerhalb des Membrandurchganges energetisch ungünstig angeordnet sind, lässt sich eine wichtige Funktion vermuten.

Der C-terminale Teil des Proteins könnte somit einen Protonenkanal darstellen. Das würde bedeuten, dass die N-terminale hydrophobe Domäne (Helices I-VI) für die Chromattranslokation zuständig ist.

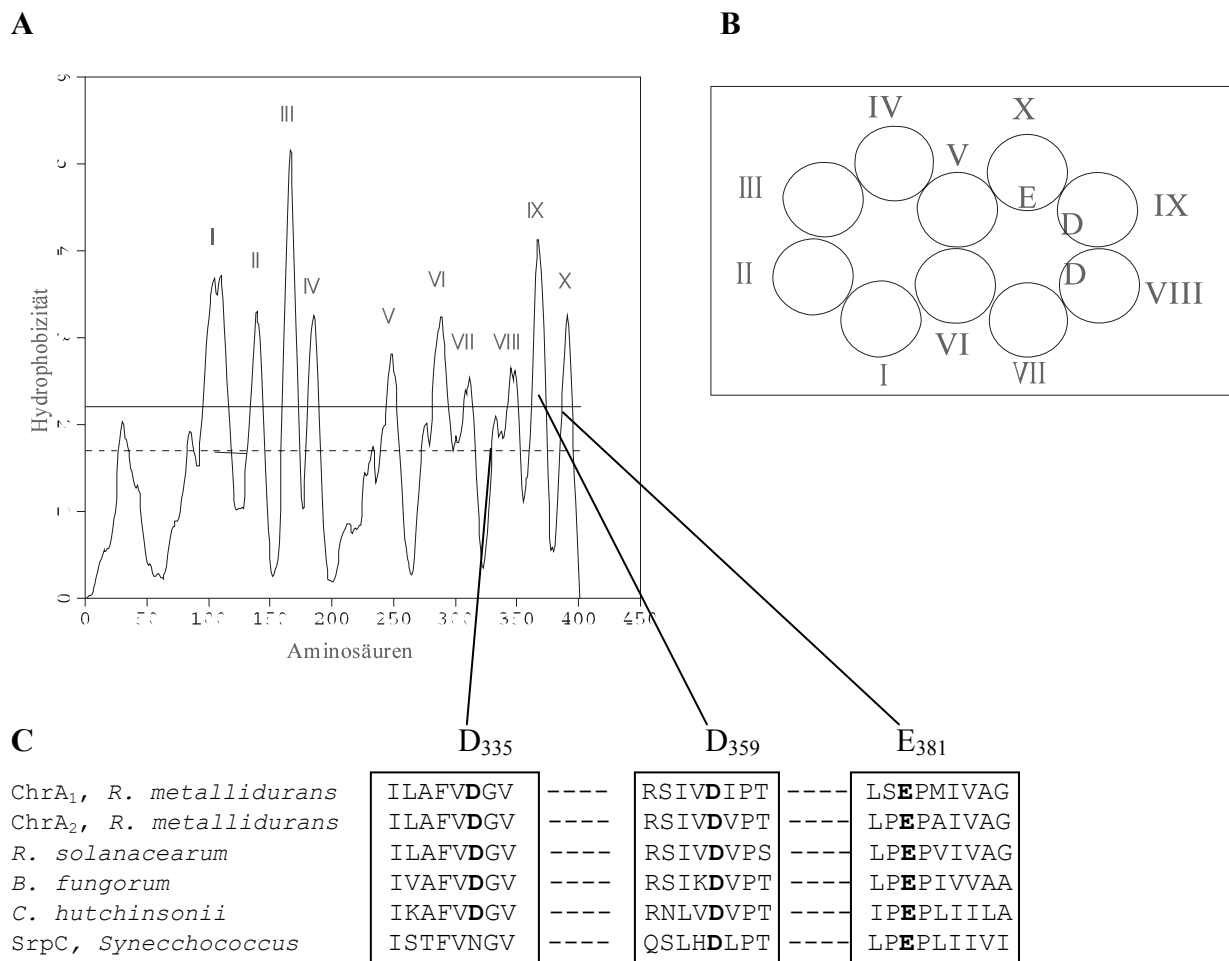


Abb. 32: Hydrophobie-Blot des ChrA₁-Proteins und mögliche Struktur der transmembranen Kanäle. [A] Topologiemodell nach von Heinje (1992) mit zehn transmembranen Helices. [B] Mögliche Lage der Helices mit dem Aminosäuremotiv –DDE– bei Bildung eines Zweikanaltransporters. [C] Sequenzalignment ausgewählter ChrA-Proteine im Bereich des –DDE– Motivs, Die Numerierung der Aminosäuren bezieht sich auf ChrA₁ aus *R. metallidurans*.

Wie erfolgen aber die Bindung und der Transport von Chromat? Bisher ist kein chromatbindendes Protein beschrieben worden und keine spezifische Chromatbindestelle bekannt. Deshalb werden nun im Folgenden Vorstellungen zur Chromatbindung erörtert, die auf dem Vergleich mit anderen Oxyanion-Bindestellen beruhen.

Phosphat, Sulfat, Molybdat und Wolframat werden unter anderem durch hochaffine ABC-Transporter in die Zelle aufgenommen. Periplasmatische Bindeproteine akquirieren das jeweilige Substrat und die Oxyanion-gebundene Form interagiert mit dem integralen Membranprotein, welches für den Transport zuständig ist (Pau & Lawson, 2002).

Ein gut untersuchtes Protein ist das periplasmatische Bindeprotein ModA. ModA ist Bestandteil eines hochaffinen Molybdattransporters und liegt ungebunden im Periplasma Gram-negativer Bakterien vor. Wenn man die Ähnlichkeit von Molybdat mit anderen tetrahedralen Oxyanionen wie Sulfat, Phosphat und auch Chromat bedenkt, ist der

Mechanismus mit dem ModA spezifisch Molybdat binden und andere Ionen diskriminieren kann von generellem Interesse (Hu *et al.*, 1997).

Das Protein bildet zwei globuläre Domänen, zwischen denen sich ein tiefer Bindungsspalt befindet. Zwischen diesen beiden Domänen werden Molybdat und Wolframat gebunden. Dabei wird das Anion über sieben Wasserstoffbrücken fixiert. Interessanterweise werden die Brücken ausschließlich zu den polarisierbaren OH- und NH-Gruppierungen ungeladener Aminosäuren, wie z. B. Threonin, Asparagin und Serin ausgebildet. Die meisten Wechselwirkungen bestehen mit Amidgruppen des Peptidrückgrates, wobei die Aminosäuren, die in die Bindung involviert sind, sehr unterschiedlich sein können. Die Ladung des Oxyanions in der Bindungstasche wird über eine hohe Konzentration lokaler Dipole ausgeglichen (Quioco *et al.*, 1987, He & Quioco, 1993).

Durch verschiedene gelöste Kristallstrukturen weiß man, dass der Aufbau dieser Bindungstasche bei allen Oxyanion-bindenden Proteinen sehr ähnlich ist. Bindeproteine von ABC-Transportern haben eine sehr ähnliche Tertiärstruktur - die Primärstruktur lässt dabei aber oft keine Gemeinsamkeiten erkennen (Quioco & Ledvina, 1996).

Phosphat-, Sulfat- und Molybdat-bindende Proteine sind hochselektiv für die jeweiligen Anionen. Die Selektivität beruht interessanterweise nicht auf Unterschieden in den Interaktionen der Wasserstoffbrücken. Die Oberfläche der Bindungstasche ist sogar negativ geladen und damit nichtkomplementär zu den Anionen (Ledvina *et al.*, 1996). Phosphat-bindende Proteine haben eine Präferenz für protonierte Oxyanionen und binden daher außer Phosphat auch Arsenat (Luecke & Quioco, 1990). Sulfatbindende Proteine (SBP) binden deprotonierte Oxyanionen. Sulfat, Chromat, Molybdat und Wolframat liegen bei neutralem pH-Wert als deprotonierte Anionen vor. Alle Oxyanionen sind Tetraeder von Sauerstoffatomen. Ein Unterschied besteht im Volumen des zentralen Metallatoms, und damit im Volumen der benötigten Bindungstasche (Lawson *et al.*, 1998). Da Chrom und Schwefel einen ähnlichen Atomradius besitzen, haben SBPs oft gute Bindungseigenschaften für Chromat (Jacobson & Quioco, 1988). Des Weiteren sollten sich die Unterschiede in den Säurekonstanten (Sulfat pKs = 1.9, Chromat pKs = 6.49) in der unterschiedlichen Stärke der Wasserstoffbrücken wieder finden. Mit dem mehr basischen Chromat sollten stärkere Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden (Shan *et al.*, 1996). Daher wird Chromat wahrscheinlich mit einer höheren Zahl OH-Liganden gebunden. Im Vergleich dazu bevorzugt Sulfat NH-Liganden.

Gemeinsamkeiten in den Primärstrukturen der bekannten Bindeproteine sind kaum vorhanden, dies macht eine einfache Vorhersage zu einer Chromatbindestelle unmöglich. Alle bekannten ChrA-Proteine in Bakterien und Archaea besitzen in der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne zwei hochkonservierte Motive: -F₃₈GG- und -P₇₅GP- (ChrA₁-Nomenklatur). Des Weiteren ist ein Tryptophan (W₅₈, ChrA₁) in allen bekannten ChrA-

Proteinen konserviert. Prolin und Tryptophan enthalten polarisierbaren NH-Gruppen - aber keine OH-Gruppen. Außerdem ist in CDC25-Phosphatasen ein glycinreiches Phosphat-Bindemotiv bekannt (Mukhopadhyay *et al.*, 2003) – auch die konservierten Motive in ChrA-Proteinen enthalten drei Glycinreste. Eine Beteiligung dieser Regionen an der Chromatbindung müsste, z.B. durch Mutantanalyse, untersucht werden.

Die Bindung von Oxyanionen findet nach bisherigen Vorstellungen zwischen zwei Domänen oder Monomeren statt. Die Bindung hat eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge, da sie kooperativ an der Oberfläche beider Domänen bzw. Monomere erfolgt (Jacobson *et al.*, 1992). Mittels Circular Dichroismus wurde nach Inkubation von ChrA₁ mit Chromat keine Veränderung im Fern-UV-Bereich gefunden, d. h. es gibt keinen Hinweis auf Veränderungen in der Sekundärstruktur von ChrA₁ durch Chromatbindung. Da der Chromatexport aus der Zelle hochselektiv erfolgen sollte, könnte auch die Bereitstellung von Chromat für den Export durch ein chromatbindendes Protein erwogen werden. Der hochselektive Export von Chromat könnte analog zu hochaffinen Aufnahmesystemen für Oxyanionen über ein lösliches Bindeprotein vermittelt werden. Dieses chromatbindende Protein sollte cytoplasmatisch lokalisiert sein. Für eine erfolgreiche Rekonstitution und die Messung eines ChrA₁-abhängigen Chromattransports wäre somit die Anwesenheit dieses chromatbindenden Proteins essentiell.

Die Vermutung, dass ChrA₁ allein keinen Chromatefflux katalysieren kann, wird durch folgende Effekte unterstrichen. Paradoxe Weise führte die Expression von ChrA₁ in *E. coli* BL21-RP zu Chromathypersensitivität des Stammes. Bereits Nies *et al.* (1990) beobachteten bei alleiniger Expression von ChrA₁ eine Hyperakkumulation von Chromat in *R. metallidurans*. Analoge Beobachtungen machten Nicholson & Laudenbach (1995) mit dem SrpC-Protein aus *Synechococcus* (62% Identität zu ChrA₁). Tatsächlich führte das SrpC-Protein zu einer erhöhten Chromatsensitivität in *Synechococcus*. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass ChrA-Proteine nur als Bestandteil eines Transportkomplexes Chromat aus der Zelle transportieren.

4.5. ChrB- und ChrF- Proteine besitzen eine bei Bakterien und Archaea konservierte Domäne mit unbekannter Funktion

Beide Chromatresistenz-Determinanten aus *R. metallidurans* – *chr₁* und *chr₂* – enthalten sowohl ein *chrB*- als auch ein *chrF*-Gen. Die Produkte beider Gene sind bisher unbeschrieben und ihrer Funktion nach unbekannt. Warum kann man davon ausgehen, dass diese Gene tatsächlich aktive Gene sind? Die Induktion der Transkription dieser Gene wurde mittels Transkriptionsfusionen mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen untersucht. Die *chrB*- und *chrF*-Gene beider Genregionen waren spezifisch durch Chromat induzierbar.

Das *chrB₁*-Gen liegt direkt stromabwärts des induzierbaren Promotors *chrB_{1p}* der *chr₁*-Determinante – wird also zusammen mit dem des Chromattransporter ChrA₁ transkribiert. Allein diese Tatsache lässt eine wichtige Funktion des ChrB₁-Proteins vermuten. Deletionen des *chrB₁*-Gens oder des homologen *chrB₂*-Gens in Stamm AE126(pMOL28) hatten keinen Einfluss auf die Chromatresistenz. Erst eine Deletion von *chrB₂* in Stamm AE104(plasmidfrei), die zu einem Verlust beider ChrB-Proteine führte, bewirkte einen Resistenzverlust, der mit dem Fehlen beider Chromattransporter vergleichbar war (Tab. 5). Beide Proteine können offensichtlich wechselseitig ihre Funktion erfüllen, sind aber für die Ausbildung der Resistenz essentiell.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation haben sich Reporter-gen-Fusionen bewährt (Manoil *et al.*, 1990, Goldberg *et al.*, 1999). Die Lokalisation des ChrB₁-Proteins wurde mittels einer Translationsfusion mit alkalischer Phosphatase untersucht, welche Disulfid-Brücken besitzt, und damit nur im Periplasma funktionell falten kann (Derman *et al.*, 1993). Die ChrB₁-Fusion zeigte eine cytoplasmatische Lokalisierung. Außerdem wurde nachgewiesen, dass ChrB₁ ein mit der Membran assoziiertes Protein ist. Betrachtet man einen Hydrophathie-Blot von ChrB₁ (Abb. 19A), so fällt direkt am N-Terminus eine stark hydrophobe Sequenz auf, die für die Membran-Verankerung verantwortlich sein könnte.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob das ChrB₁-Protein Chromat zu binden vermag. Dazu wurden CD-Spektren von ChrB₁ mit und ohne Chromat aufgenommen. Nach Inkubation mit Chromat veränderte sich der Verlauf des Spektrums leicht aber signifikant. Das die Änderung des Spektrums tatsächlich signifikant ist, wird durch die Tatsache unterstrichen, dass das ChrA₁-Protein unter analogen experimentellen Bedingungen identische CD-Spektren aufwies (Abb. 14 und Abb. 23) Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Bindung von Chromat durch das ChrB₁-Protein. Die Charakterisierung von Metallbindung an Protein durch Circular Dichroismus wurde auch für folgende Proteine durchgeführt: Kupferbindung an das Prion-Protein PrP (Garnett & Viles, 2003), Kalzium-Bindung an Annexine (Lecona *et al.*, 2003) und Kupferbindung an Wilson's P-type ATPase (Fatemi & Sarkar, 2002). Der

Einfluss der Bindung auf die Fern-UV-CD-Spektren dieser Proteine war mit den in dieser Arbeit erhaltenen Spektren für ChrB₁ vergleichbar.

Unterstützt wird die Annahme der Chromatbindung durch ChrB₁ auch durch ein - nach Inkubation mit Chromat - verändertes Laufverhalten des Proteins in der Nativen PAGE. Eine Veränderung des Laufverhaltens nach Metallbindung wurde bereits für Kation-bindende (Anton, 2001) und Oxyanion-bindende Proteine (Rech *et al.*, 1995; Makdessi *et al.*, 2001) beschrieben. Ein weiterer Funktionshinweis für ChrB₁ ergibt sich aus der Tatsache, dass ohne ChrB-Protein in *R. metallidurans* keine Induktion des *chrB₁p*-Promotors, und damit der *chr₁*-Chromatresistenz-Determinante mehr möglich war (Tab. 6). Damit könnte ChrB in die Regulation der Chromatresistenz als Aktivator involviert sein.

Ein Sequenzvergleich mittels BLAST-Analyse erbrachte die Tatsache, dass sich im C-terminalen Teil von ChrB₁ eine hochkonservierte Domäne von ca. 130 AS befindet, die in der Datenbank von NCBI-Blast als cog4275 bezeichnet wurde. ChrB-Proteine dieser Struktur sind bisher nur in der näheren Verwandtschaft von *R. metallidurans*, bei den β -Proteobakterien *Burkholderia fungorum*, *Ralstonia solanacearum* und *Chromobacterium violaceum* bekannt (Abb. 33A). Die bisher bekannten *chrB*-Gene werden immer zusammen mit *chrA*-Genen kodiert.

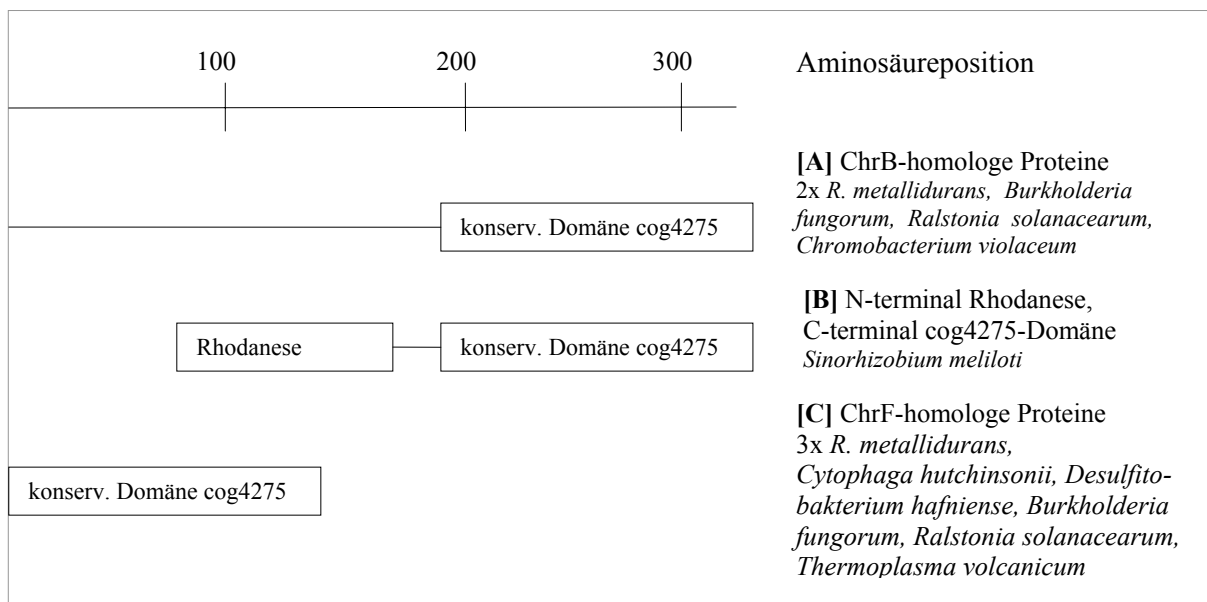


Abb. 33: Verbreitung und Domänen-Aufbau ChrB- und ChrF- homologer Proteine bei Bakterien und Archaea.

Die Domäne cog4275 wird außerdem in Rhizobien gefunden, wo sie zusammen mit einer Rhodanese-Domäne ein Protein bildet (Abb. 33B). Bei *Shinorhizobium meliloti* wird dieses ChrB-homologe Protein zusammen mit dem Ko-Chaperon GroES und einer Hydrolase kodiert.

Als einzelne Domäne wird cog4275 in ChrF-homologen Proteinen gefunden (Abb. 33C). ChrF Proteine kommen bei Bakterien und Archaea vor, sind aber nicht sehr weit verbreitet. *chrF*-Gene werden dabei nur zum Teil in der genetischen Umgebung von *chrA*-Genen kodiert. Die Analyse der genetischen Umgebung weiterer ChrF-homologer Proteine brachte keine Gemeinsamkeiten und damit keine weiteren Hinweise auf mögliche Funktionen der cog4275-Domäne.

ChrB- und ChrF-Proteine sind verwandt. So besitzen die cog4275-Domänen von ChrB₁ und ChrF₁ aus *R. metallidurans* eine Identität von 28% (Abb. 34). Die in dieser Arbeit untersuchten Deletionen von *chrF*₁ und *chrF*₂ hatten nur einen geringfügigen Verlust an Chromatresistenz zur Folge (Tab. 5). Die Deletion von *chrF*₂ bewirkte keine Veränderung der Induktion des *chrB*₁*p*-Promotors. ChrF₂ zeigte also keinen regulatorischen Einfluss auf die Chromatresistenz. Die Verallgemeinerung, dass ChrF-Proteine nicht regulatorisch sind ist kritisch zu betrachten, da die analogen Untersuchungen für ChrF₁ noch ausstehen.

Geht man dennoch von dieser Annahme aus, sollte der regulatorische Einfluss von ChrB₁ nicht von der cog4275-Domäne, sondern von der N-terminalen Domäne ausgeübt werden (s. Kap. 4.8.). Für die C-terminale cog4275-Domäne sollten dadurch chromatbindende Eigenschaften angenommen werden. ChrF-Proteine könnten also chromatbindende Proteine sein.

Für Silberresistenzsysteme wurde ein periplasmatisches Silber-Bindeprotein SilE beschrieben (Silver 2003). SilE vermittelt alleine eine gewisse Silberresistenz und ist für die Entgiftung des Periplasmas zuständig (Lo *et al.*, 2002). Eine ähnliche Funktion könnte für ChrF im Chromatresistenz-System von *Ralstonia metallidurans* postuliert werden.

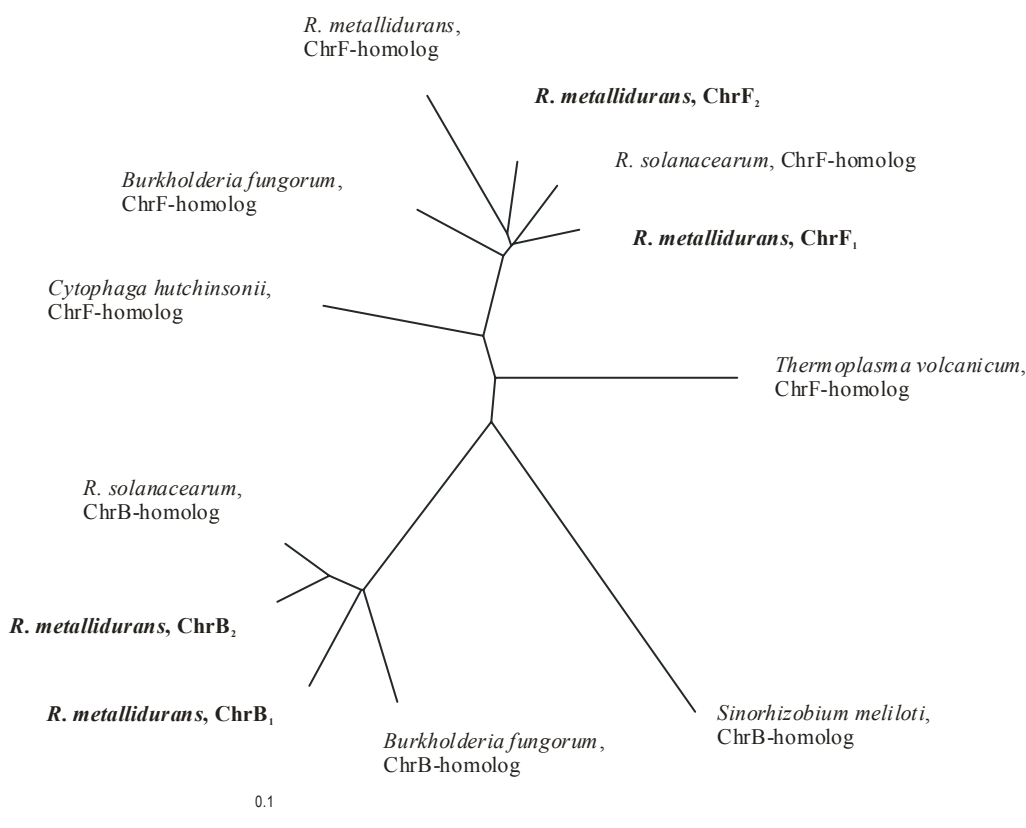
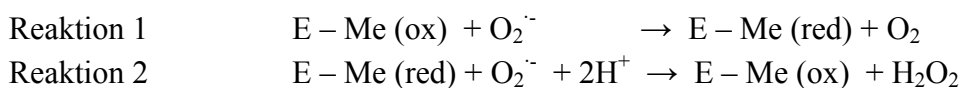


Abb. 34: Phylogenetischer Stammbaum der konservierten Domänen cog4275 von ChrB- und ChrF-homologen Proteinen verschiedener Organismen. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit CLUSTALW untersucht und der Stammbaum mit dem Programmpaket Phylip erstellt (*bootstrap* – Analyse nach Felsenstein, 1989). Die Referenzen (*accession numbers*) der Proteine sind im Anhang aufgeführt.

4.6. Die Funktion des ChrC-Protein bei der Entgiftung von Chromat

Die Homologie des ChrC-Proteins zu Superoxid-Dismutasen war aus Sequenzvergleichen bekannt. Die höchste Identität zeigte eine SOD aus *Bradyrhizobium japonicum* mit 65%. Durch Northern-Analysen war auch die spezifische Induktion der Transkription von *chrC* durch Chromat gezeigt worden (Juhnke *et al.*, 2002). Weiterführend sollte nun der Aufbau und die Aktivität des ChrC-Proteins näher beschrieben werden, um die Funktion innerhalb des Chromatstoffwechsels von *Ralstonia metallidurans* besser zu verstehen.

SODs sind eine weit verbreitete Klasse von Metalloenzymen, die einen primären Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies vermitteln (Touati, 1997). Sie katalysieren die Umsetzung des Superoxidradikal-Anions zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Der Mechanismus der Reaktion beruht auf der Reduktion und Reoxidation des Metallions im aktiven Zentrum durch das Superoxidradikal:



In Bakterien werden vier Klassen von SODs beschrieben, die nach ihrem Metall-Kofaktor eingeordnet werden: Mangan (Keele *et al.*, 1970), Eisen (Yost & Fridovich, 1973), Kupfer und Zink (Benov *et al.*, 1995) und Nickel (Kim *et al.*, 1996). Die verschiedenen SOD-Typen sind außerdem durch ihre spezifische subzelluläre Lokalisation und die Regulation ihrer Expression charakterisiert. *Escherichia coli* besitzt drei bekannte SODs, wobei die Fe- und Mn-SOD sich im Cytoplasma befinden, während die Cu/Zn-SOD im Periplasma lokalisiert ist. Darüber hinaus ist die Expression der Fe-SOD konstitutiv, die Expression der Mn-SOD aber ist abhängig von Superoxid-Stress und wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert (Compan & Touati, 1993).

Durch Roux & Covés (2002) wurde eine eisenhaltige SOD aus *R. metallidurans* beschrieben, die bereits unter Normalbedingungen ein hohes Expressionsniveau aufweist und durch oxidativen Stress zusätzlich induzierbar ist. Die Autoren postulieren diese Fe-SOD als einzig aktives Enzym in *R. metallidurans*, da sich durch Induktion mit Chromat die SOD-Aktivität im Rohextrakt des Bakteriums nur geringfügig steigerte.

Auch in dieser Arbeit konnte nach Induktion mit Chromat keine zusätzliche SOD-Aktivität durch Aktivitätsfärbung einer Nativen PAGE identifiziert werden. Das in *E. coli* BL21 exprimierte ChrC-Protein war ein homotetrameres Protein und wies eine spezifische SOD-Aktivität von 23 U/mg auf. Dies ist im Vergleich zu dem von Roux & Covés charakterisierten dimeren Enzym (2940 U/mg) eine sehr geringe Aktivität - die im Rohextrakt von *R. metallidurans* auch unter Chromatstress nicht nachweisbar war. Die ChrC-Aktivität war also auch *in vivo* sehr gering.

Dabei wies das ChrC-Protein typische Eigenschaften einer Fe-SOD auf. Der Eisengehalt des Proteins wurde mittels EDX-Spektrum und ICP-AES-Messung nachgewiesen. Außerdem ließ sich das untersuchte Enzym durch H₂O₂, nicht aber durch KCN hemmen – ein Charakteristikum Eisen-abhängiger SODs (Beyer & Fridovich, 1987, Roux & Covés, 2002). Ungewöhnlicherweise ist in diesem Fall eine induzierbare SOD nicht Mangan- sondern Eisen-abhängig. Das überexprimierte ChrC-Protein war zu 74% mit Eisen gesättigt – die geringe SOD-Aktivität ist also wahrscheinlich nicht durch das Fehlen von Fe²⁺-Ionen im aktiven Zentrum des Enzyms bedingt. Warum leistet sich *R. metallidurans* eine spezifisch durch Chromat induzierbare Superoxid-Dismutase, deren Aktivität nur ca. 1/100 der konstitutiv bereits vorhandenen SOD beträgt?

Die geringe Aktivität von ChrC scheint kein Artefakt der Überexpression in *E. coli* zu sein. Unter Chromatstress konnte wohl eine Induktion der Transkription von *chrC*, nicht aber eine zusätzliche SOD-Aktivität im Rohextrakt von *R. metallidurans* gezeigt werden konnte. Ist die SOD-Aktivität von ChrC eine Nebenaktivität des Proteins - besitzt ChrC *in vivo* eine andere Funktion?

Die Toxizität von Chromat beruht auf unspezifischen Oxidationsprozessen in der Zelle, bei denen auch hochreaktive Radikale entstehen. Es ist bekannt, dass Cr(VI) die Haber-Weiss-Reaktion katalysieren kann, in deren Verlauf Superoxid- und Hydroxylradikale gebildet werden (Shi & Dalal, 1992). Andererseits bildet Chromat nach einem Ein-Elektronen-Transfer Cr(V)-Addukte mit thiolhaltigen Verbindungen, Proteinen und DNA (Shi & Dalal, 1990; Shi *et al.*, 1999). Diese Cr(V)-Addukte sind relativ langlebige Zwischenstufen bei der Reduktion von Cr(VI), denen eine hohe Cytotoxizität zugeschrieben wird (Florez & Perez, 1999). Die Reduktion dieser Cr(V)-Zwischenstufen muss nicht zwangsläufig mit der Bildung von Superoxid-Radikalen einhergehen.

Von einigen SODs ist bekannt, dass sie neben der Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ auch als Superoxid-Reduktase (SOR) oder Superoxid-Oxidase (SOO) fungieren können (Liochev & Fridovich, 2000). Kann ein anderer Elektronendonator das Superoxid-Radikal in der Teilreaktion 1 der SOD-Reaktion ersetzen, resultiert eine SOR-Reaktion. Ersetzt dagegen ein Elektronenakzeptor das Superoxid-Radikal in der Teilreaktion 2, so fungiert das Enzym als SOO (Liochev & Fridovich, 2001). Cu/Zn-SODs können neben der Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ auch die Reduktion von $O_2^{\cdot-}$ durch Eisen(II) und die Oxidation von $O_2^{\cdot-}$ durch Eisen(III) katalysieren. In Analogie dazu sind für das ChrC-Protein zwei Reaktionswege denkbar.

Möglicherweise kann ChrC Cr(V)-Addukte zur Oxidation des Eisen-Kofaktors nutzen. Eine solche SOO-Reaktion könnte der gezielten Reduktion dieser toxischen Addukte dienen. ChrC würde zusätzlich zur Fe-SOD eine Funktion bei der Chromatentgiftung in *R. metallidurans* besitzen. Die zweite Möglichkeit besteht in der Reoxidation der Cr(V)-Addukte zu Chromat durch $O_2^{\cdot-}$. Eine solche SOR-Reaktion könnte Chromat reoxidieren und für den Efflux durch ChrA zur Verfügung stellen (Abb. 35).

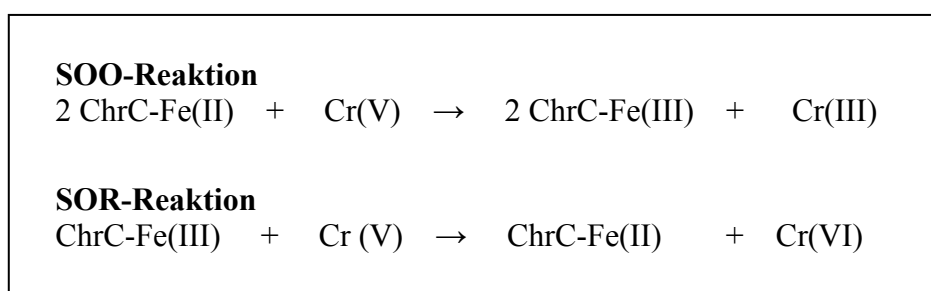
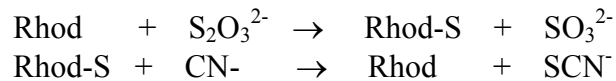


Abb. 35: Putative Reaktionen von ChrC als Superoxid-Oxidase (SOO) oder Superoxid-Reduktase (SOR)

4.7. ChrE ist ein Protein mit Homologie zu Rhodanese-Domänen

Rhodanese - Domänen sind ubiquitär verbreitete Strukturmodule. Rhodanese (Thiosulfat-Sulfurtransferase) katalysiert *in vitro* den Transfer eines Schwefelatoms von Thiosulfat auf Cyanid (Bordo & Bork, 2002):



Das Enzym wird als *Tandem-repeat* gefunden, z.B. in bakteriellen RhdA-Proteinen und *boviner* Rhodanese, wobei nur die C-terminale Domäne ein Cystein im aktiven Zentrum besitzt (Bordo *et al.*, 2000, Ploegman *et al.*, 1979). Dieses Cystein ist für die katalytische Aktivität entscheidend und bildet mit dem transferierten Schwefel ein Persulfid-Intermediat.

Des weiteren können Rhodanese-Proteine aus einer einzelnen katalytischen Domäne bestehen (*single-domain* Rhodanese – z.B. GlpE, PspE, ArsR aus *E. coli*) oder mit anderen Protein-Domänen wie der MAPK-Phosphatase assoziiert sein (Hofmann *et al.*, 1998).

Die biologische Rolle von Sulfurtransferasen ist umstritten, da bisher keine *in vivo*-Substrate identifiziert wurden (Ray *et al.*, 2000). Diskutierte Funktionen sind die Detoxifikation von Cyanid (Sorbo, 1957), die Bildung von prosthetischen Gruppen in Eisen-Schwefel-Proteinen (Pagani *et al.*, 1984) und die Beteiligung an der Thiamin-Biosynthese (Palenchar *et al.*, 2000). In *Acidithiobacillus ferrooxidans* wurde ein Rhodanese-Protein identifiziert, das eine wichtige Rolle bei der Solubilisierung von Metallsulfiden aus Gestein spielt (Ramirez *et al.*, 2002). In nichtkatalytischen Rhodanese-Domänen ist das Cystein im aktiven Zentrum ausgetauscht. Diesen Proteinen wird eine regulatorische Funktion zugesprochen, z.B. dem ArsR-Repressor des Arsenatresistenz-Systems aus *E. coli*.

Das in dieser Arbeit identifizierte Gen *chrE* ist Bestandteil der *chr*₁-Chromatresistenz-Determinante. Eine *chrE-lacZ* Fusion wurde spezifisch unter Chromatstress induziert. Das ChrE-Protein zeigte in Sequenzvergleichen Homologie zu Proteinen der Rhodanese-Superfamilie und gehört demnach zu den *single-domain* Rhodanese-Proteinen. Die höchste Homologie zeigten die C-terminalen Domänen von RhdA aus *Azotobacter vinelandii* (25% Identität) und Rhodanese aus Rinderleber (22% Identität). Ein mit dem Programmpaket PHYLIP aufgestellter phylogenetischer Stammbaum zeigte jedoch, das PspE aus *E.coli* am nächsten verwandt zu ChrE war (Abb. 36).

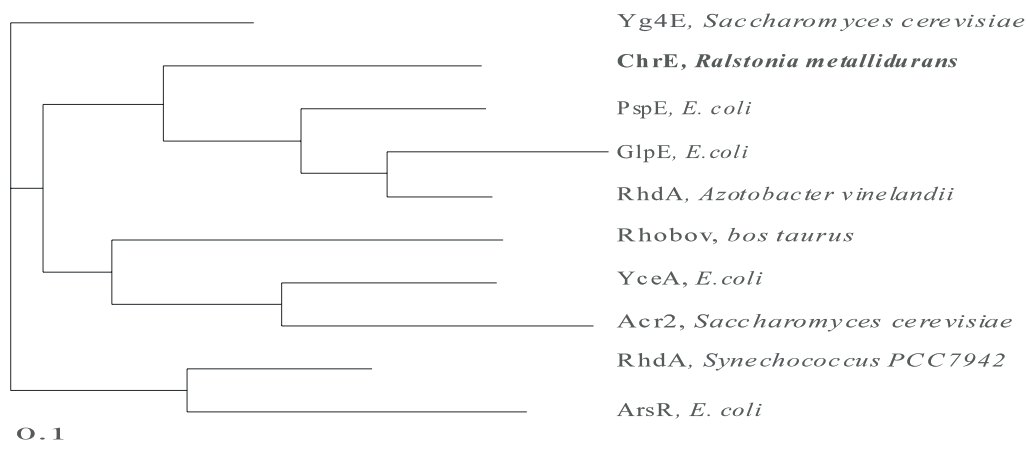


Abb. 36: Stammbaum mit Vertretern der Rhodanese-Superfamilie. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit CLUSTALW untersucht und der Stammbaum mit dem Programmpaket Phylip erstellt (*bootstrap* – Analyse nach Felsenstein, 1989). Die *accession numbers* der Proteine sind im Anhang aufgeführt.

Ein Alignment konservierter Regionen von ChrE mit PspE und GlpE aus *E. coli* und zwei anderen repräsentativen Vertretern der Rhodanese-Superfamilie nach Adams *et al.* (2002) zeigte ein Cystein im aktiven Zentrum aller Enzyme (Abb. 37). Das ChrE-Protein könnte somit eine katalytische Rhodanese-Domäne sein. Die Enzymaktivität von ChrE als Sulfurtransferase muss allerdings in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

	Motiv im aktiven Zentrum			
ChrE	DANRPVTVY	CVHGHQ	VSQDCAALLEAVGFDATYLVG	
PspE	DKNDTVKVY	CNAGRQ	SGQAKEILSEMGYTHVEN-AG	<i>single-domain</i> Rhodanese
GlpE	DFDTPVMVM	CYHGNS	SKGAAQYLLQQGYDVVYSIDG	
RhdA	TPDKEIVTH	CQTHHR	SGLTYLIAKALGYPRVKGYAG	<i>tandem-repeat</i> Rhodanese
Rhobov	DLTKPLIAT	CRKGVV	ACHIALAAYLCGKPDVAIYDG	
ArsR	DRKQGKVVH	YRLSPH	IPAWAAKIIDEAWRCEQEKVQ	<i>single-domain</i> Rhodanese, nicht katalytisch

Abb. 37: Vergleich des aktiven Zentrums von ChrE mit anderen repräsentativen Thiosulfat-Sulfurtransferasen. ChrE- *R. metallidurans*; PspE, GlpE, ArsR- *E. coli*; RhdA- *A. vinelandii*; Rhobov- *bos taurus*. Das aktive Zentrum befindet sich in einer Box, das aktive Cystein ist fettgedruckt. Die Abbildung wurde von Adams *et al.* (2002) übernommen und um ChrE erweitert.

Welche Vermutungen über die Funktion des ChrE-Proteins lassen sich aufstellen? *Single-domain* Rhodanese-Proteine werden in der Literatur vielfach mit spezifischen Stressbedingungen assoziiert. So wird PspE aus *E. coli* unter verschiedenen Stressbedingungen induziert, eine physiologische Funktion ist aber bisher nicht bekannt (Adams *et al.*, 2002). Der Repressor ArsR des Arsenat-Resistenzsystems von *E. coli* besteht

aus mehreren Untereinheiten (Shi *et al.*, 1994; Xu & Rosen, 1997). Es wurde eine Rhodanese-Domäne in Assoziation mit einem DNA-bindenden *Helix-turn-Helix* Motiv gefunden (Adams *et al.*, 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Rhodanese-Domäne Arsenat binden kann und dadurch die DNA-Bindung des Repressors moduliert. ArsR besitzt allerdings eine nichtkatalytische Rhodanese-Domäne, die im Gegensatz zu ChrE kein Cystein im aktiven Zentrum hat. Die Proteine Acr2 und Yg4E sind an der Ausbildung einer Arsenat-Resistenz in *S. cerevisiae* beteiligt, wobei für Acr2 eine Arsenatreduktase-Aktivität nachgewiesen wurde (Mukhopadhyay & Rosen, 1998). ChrE wird zwar in der *chr*₁-Genregion von *R. metallidurans* kodiert, führt aber zu keiner deutlichen Resistenzhöhung gegenüber Chromat. Auch eine Chromatreduktase-Aktivität ist unwahrscheinlich, da *R. metallidurans* AE126(pMOL28) keine höhere Reduktase-Aktivität als Stamm AE104 (plasmidfrei) aufwies. In *Synechococcus sp.* wurde ein schwefelreguliertes Rhodanese-verwandtes Protein isoliert, das speziell unter Sulfatmangel-Bedingungen exprimiert wird (Laudenbach *et al.*, 1991). Chromat- und Schwefelmetabolismus in *R. metallidurans* zeigten in den durchgeführten Experimenten einen engen Zusammenhang. Allerdings war die Expression von ChrE nicht vom Sulfatgehalt des Mediums abhängig, so dass eine Schwefelregulierung, wie in *Synechococcus*, wahrscheinlich keine Rolle spielt.

Ogasawara *et al.* (2001) zeigten die Spaltung von Selen-Glutathion-Komplexen durch Rhodanese. Ist eine Spaltung von Chrom-Glutathion-Komplexen oder anderen toxischen Cr(V)-Intermediaten in der Zelle durch Rhodanese möglich? In diesem Fall könnte ChrE an der Beseitigung von toxischen Chrom-Intermediaten in der Zelle beteiligt sein. Hier könnte ein Zusammenhang mit einer SOO-Aktivität des ChrC-Proteins bestehen.

ChrE-homologe Rhodanesen wurden in *Burkholderia fungorum* als Untereinheit eines ChrC-Proteins und in *Shinorhizobium meliloti* als Untereinheit eines ChrF-Proteins gefunden (Abb. 33). Dies ist ein weiterer Hinweis auf den möglichen funktionellen Zusammenhang dieser Proteine in *R. metallidurans*, die in der *chr*₁-Chromatresistenz-Determinante von benachbarten Genen kodiert werden.

4.8. Wie wird die Chromatresistenz in *R. metallidurans* reguliert?

Bei Prokaryoten ist die Transkription die wichtigste Ebene der Genregulation. Um sich schnell an veränderte Umweltbedingungen anpassen zu können, besitzen Mikroorganismen alternative Sigmafaktoren für die differentielle Genexpression. Diese Sigmafaktoren sind übergeordnete Regulatoren, die regulatorischen Netzwerken vorstehen und Affinität für spezifische Promotorsequenzen besitzen. Der Sigmafaktor RpoD vermittelt die Expression der *house-keeping* Gene des Zellstoffwechsels (Paget & Helmann, 2003), während für den

Wechsel von exponentieller Wachstumsphase in die stationäre Phase RpoS verantwortlich ist (Hengge-Aronis, 2002). Für die allgemeine Stressantwort der Zelle sind hauptsächlich die ECF-Sigmafaktoren (*extracytoplasmic function*) und RpoH verantwortlich (Helmann, 2002, Nakahigashi *et al.*, 1995). RpoH-Sigmafaktoren bewirken insbesondere die Expression von Hitzeschockproteinen (Yura *et al.*, 1993). Allerdings scheinen ECF-Sigmafaktoren den RpoH-Sigmafaktoren noch übergeordnet zu sein. In einigen Enterobakterien und *P. aeruginosa* wurde gezeigt, das *rpoH* unter anderem von RpoE-abhängigen Promotoren aus transkribiert wird (Ramirez-Santos *et al.*, 2001).

Neueste Untersuchungen zeigten, dass in *R. metallidurans* der ECF-Sigmafaktor RpoE ein Hauptregulator für die Anpassung an Schwermetallstress ist. Eine RpoE-Mutante zeigte drastische Veränderungen in der Resistenz gegenüber Kobalt, Zink, Kupfer und auch Chromat (M. Egler, pers. Mitteilung).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der chromatinduzierbare RpoH-Sigmafaktor aus *R. metallidurans* keinen Einfluss auf die Ausbildung der pMOL28-vermittelten Chromatresistenz hat. Für etliche Gene der *chr*₁-Determinante wurden RpoH-abhängige Promotoren postuliert (Peitzsch, 1999). Da *R. metallidurans* nur einen RpoH-Faktor besitzt, ist davon auszugehen, dass die Gene der Chromatresistenz-Determinante nicht RpoH-abhängig transkribiert werden. Die Untersuchung einer RpoH-Deletionsmutante zeigte aber, dass in Abwesenheit von RpoH eine verstärkte Transkription vom *chrB*₁-Promotor initiiert wird. Dies könnte ein indirekter regulatorischer Einfluss sein. Es ist bekannt, das RpoH durch Stressbedingungen induziert wird, die zu einer Akkumulation falschgefalteter Proteine in der Zelle führen (Yura *et al.*, 2000). Auch die oxidierenden Eigenschaften von Chromat schaffen diese Bedingungen in der Zelle. Ein großer Teil der von RpoH induzierten Hitzeschockproteine sind Chaperone und Proteasen. Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine titriert das DnaK-System aus seinem Komplex mit RpoH und setzt dadurch den Sigmafaktor frei (Gamer *et al.*, 1996).

Über welche Systeme werden Schwermetall-Resistenzen reguliert? Als primäres Signal für die Regulation dient gewöhnlich das toxische Metallion. Das *cnr*-Resistenzsystem aus *R. metallidurans* und das *ncc*-Resistenzsystem aus *Axylobacter xylosoxidans* vermitteln Resistenz gegenüber Kobalt und Nickel bzw. Kobalt, Nickel und Kadmium (Liesegang *et al.*, 1993, Schmidt & Schlegel, 1994). In diesen Systemen erfolgt die Signalweitergabe über Sigmafaktor-Antisigmafaktorkomplexe. Bei Schwermetallstress kommt es zur Abspaltung des Sigmafaktors und damit zur Initiation der Transkription (Grass *et al.*, 2000, Tibazarwa *et al.*, 2000). Eine wichtige regulatorische Rolle spielen weiterhin Zweikomponenten-Systeme, bei denen die Signalweitergabe durch Phosphorylierung eines *Response*-Regulators durch eine

Histidin-Kinase erfolgt (Cho *et al.*, 2001). Das Kupferresistenz-System *cus* aus *E. coli* wird ausschließlich durch ein solches System reguliert (Munson *et al.*, 2000).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Erkenntnisse über mögliche Regulatoren der Chromatresistenz in *R. metallidurans* vor. Homologien zu bekannten Regulationssystemen, wie den oben beschriebenen, wurden in den Chromatresistenz-Determinanten nicht gefunden. Bekannt war lediglich, dass Chromat die Transkription einiger Gene der *chr*₁-Determinante induziert und dass die Verfügbarkeit von Sulfat Einfluss auf die Ausbildung der Chromatresistenz besitzt (Peitzsch, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation der Transkription der *chr*₁-Determinante näher untersucht.

Durch die Charakterisierung von Transkriptionsfusionen mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen wurden zwei Promotoren identifiziert. Im Bereich 200 bp vor *chrA*₁ befindet sich ein konstitutiver Promotor, von dem aus eine Basislevel-Expression des ChrA₁-Chromattransporters gewährleistet wird. Ein 200 bp – Fragment, das den Bereich stromaufwärts von *chrB*₁ umfasste, enthielt den chromatinduzierbaren Promotor *chrB*₁*p*. Dieser Promotor sollte für die Regulation der Chromatresistenz essentiell sein, da er die Transkription der wichtigsten Strukturgene ermöglicht. Der primäre Effektor für die Induktion der Transkription von *chrB*₁*p* ist das Chromat-Oxyanion. Alle anderen untersuchten Stressoren hatten keinen Einfluss auf diesen Promotor. Da die Induktion des Promotors auch in AE104(plasmidfrei) beobachtet wurde, wurde davon ausgegangen, dass auch chromosomal kodierte Faktoren an der Regulation beteiligt sind. Als Kandidaten dafür wurden die Genprodukte ChrB₂ und ChrR identifiziert. Ihre Deletion zeigte Einfluss auf die Induzierbarkeit des *chrB*₁*p*-Promotors.

Da die Aminosäuresequenz von ChrB₁ 66% Identität zu der von ChrB₂ aufweist, sollten beide Proteine dieselbe Funktion als chromatabhängiger Aktivator besitzen. Aus Eukaryoten sind Transkriptions-Aktivatoren bekannt, die wie ChrB₁ mit der Membran assoziiert sind. Diese Faktoren werden durch proteolytische Spaltung von der Membran in ihre aktive Form entlassen. Die Prozessierung wird durch ein Signal in oder in der Nähe der Membran eingeleitet (Hoppe *et al.*, 2001). Überträgt man dieses Modell auf ChrB-Proteine, so könnte in die Zelle transportiertes Chromat direkt in Membrannähe an die cog-4275 Domäne von ChrB binden. Damit würde dann die Signalkaskade zur Aktivierung der Transkription der *chr*₁-Determinante in Gang gesetzt.

Die BLAST-Analyse des zweiten potentiellen chromosomal kodierten Regulators zeigte, dass ChrR eine DNA-bindende Domäne mit hoher Homologie zu Transkriptionsregulatoren der AraC/XylS – Familie besitzt. Diese Familie positiver Transkriptionsregulatoren ist unter Proteo-, Gram-positiven- und Cyanobakterien weit verbreitet (Gallegos *et al.*, 1997). Sie besitzen regulatorische Funktionen bei Stressantwort und Pathogenese. Ein bekannter Vertreter dieser Familie ist der SoxS-Regulator, der an der Antwort auf oxidativen Stress

beteiligt ist (Li & Demple, 1994). Die konservierte C-terminale Domäne hat eine Größe von ca. 99 AS und enthält zwei *Helix-turn-Helix* Motive. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der AraC/XylS-Familie ist für ChrR eine Repressorfunktion anzunehmen, da bei Deletion von *chrR* eine Steigerung der Aktivität des *chrB_{1p}*-Promotors ermittelt wurde. Die nichtkonservierte Domäne ist für die Effektorbindung und damit die spezifische Funktion des Regulators zuständig. Es besteht keine Verwandtschaft zwischen ChrR und typischen metallabhängigen Transkriptionsregulatoren wie ArsR (Busenlehner *et al.*, 2003) oder MerR (Brown *et al.*, 2003).

Der Unterschied zwischen plasmid- und chromosomal- kodierter Chromatresistenz-Determinante ist die Präsenz der Gene *chrC*, *chrE* und *chrI*. Die Genprodukte ChrC und ChrE wurden bereits unter 4.6. und 4.7. diskutiert. Das abgeleitete ChrI-Protein ist verwandt mit zwei Proteinen unbekannter Funktion aus *Pseudomonas syringae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Bei Deletion von *chrI* wurde eine leicht verminderte Chromatresistenz beobachtet. Ausserdem scheint ChrI *chr₁* spezifisch unter Sulfatmangelbedingungen zu reprimieren. Eine Aussage über die Funktion von ChrI innerhalb des Chromatstoffwechsels von *R. metallidurans* ist aufgrund der bisherigen Daten nicht möglich.

Eine weitere offene Frage ist der Zusammenhang zwischen Verfügbarkeit von Sulfat und der Ausprägung der Chromatresistenz in *R. metallidurans*. Dieser Einfluss von Sulfat ist nicht allein durch die gesteigerte Aufnahme von Chromat in die Zelle bei Sulfatmangel zu erklären. Die Induktion der Transkription am *chrB_{1p}* Promotor war vom Sulfatgehalt des Mediums abhängig, wobei ChrB₁ und ChrI *chrB_{1p}* spezifisch bei Sulfatmangel reprimierten. Dieser Effekt von ChrB₁ wurde von Peitzsch *et al.* (1998) auch mit einer anderen Reporterfusion beobachtet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die pMOL28-kodierte *chr₁*-Determinante Chromat speziell bei Sulfatsättigung entgiftet. Möglicherweise komplementieren die beiden untersuchten Genregionen einander unter wechselnden ökologischen Bedingungen und ermöglichen *Ralstonia metallidurans* das Wachstum in einem möglichst großen Konzentrationsbereich an Chromat und Sulfat.

4.9. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Genregionen beschrieben, die an der Ausprägung einer Chromatresistenz in *Ralstonia metallidurans* beteiligt sind. Die funktionelle Charakterisierung der einzelnen Genprodukte wurde begonnen und darauf basierend ein Arbeitsmodell erstellt, welches chromatabhängige Vorgänge in der Zelle zusammenfasst und experimentelle Ergebnisse sowie theoretische Erwägungen des Diskussionsteils enthält. Dieses zusammenfassende Modell ist in Abbildung 38 dargestellt und sollte als Ausgangspunkt für weitergehende Arbeiten dienen.

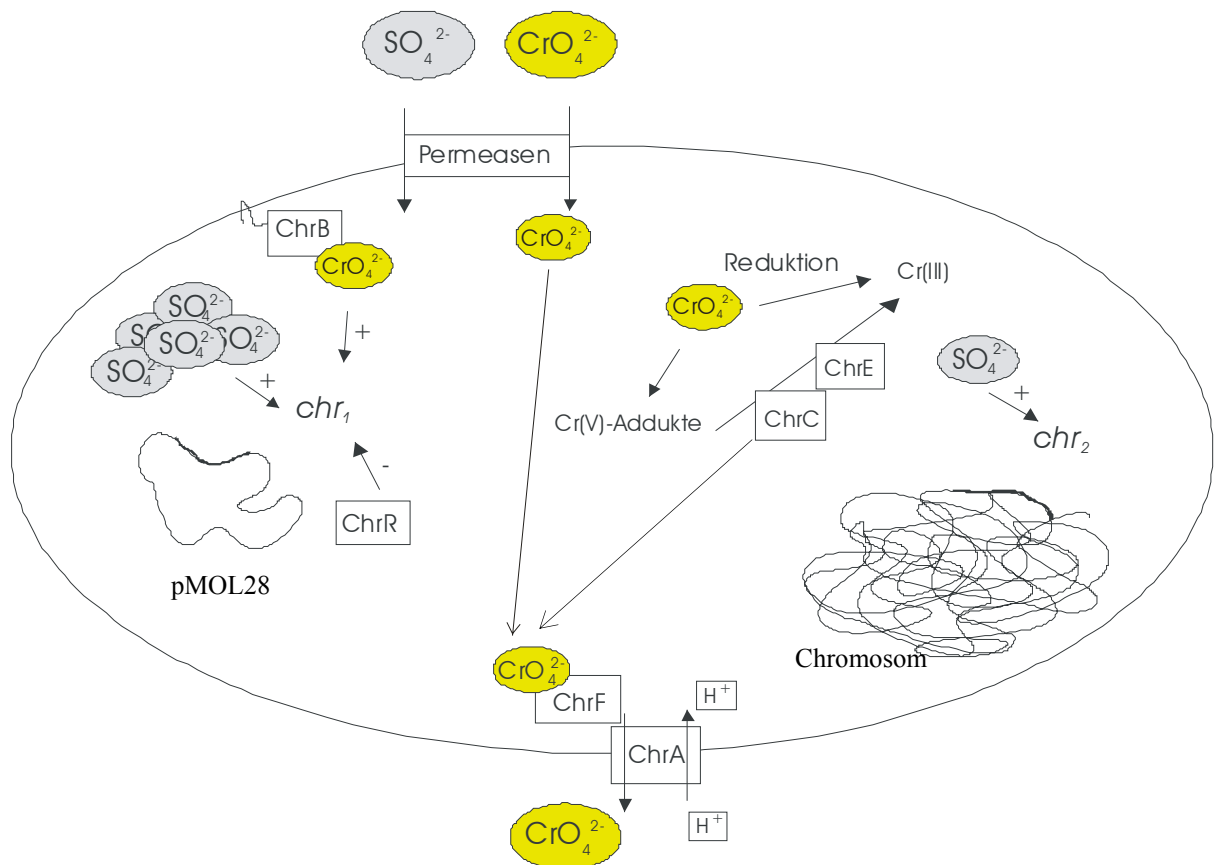


Abb. 38: Arbeitsmodell der Chromatentgiftung in *R. metallidurans* CH34. Zwei Genregionen sind für die Ausbildung einer Chromatresistenz in *R. metallidurans* essentiell. Diese befinden sich auf dem Chromosom und auf dem Megaplasmid pMOL28.

Chromat wird als Sulfat-Strukturanalogon über Sulfatpermeasen in die Zelle transportiert. In der Zelle erfolgt die Reduktion von Chromat zu Cr(III) . Dabei entstehen toxische Cr(V) -Addukte, die möglicherweise unter Beteiligung von ChrC (Superoxid-Dismutase) und ChrE (Rhodanese) entgiftet werden. Chromat wird durch ChrA (Chromattransportprotein) aktiv aus der Zelle transportiert. ChrF könnte in diesen Prozess involviert sein. ChrF und ChrB besitzen eine homologe Domäne, die für Chromatbindung verantwortlich sein könnte. ChrB und ChrR sind an der Regulation der Transkription der Chromatresistenz-Determinante chr_1 beteiligt. Der Chromatmetabolismus von *R. metallidurans* ist vom Sulfatgehalt des Mediums abhängig.

Primär sollte der experimentelle Nachweis des Chromattransportes durch das ChrA-Protein. Dazu muss überprüft werden, ob ein chromatbindendes Protein essentieller Bestandteil eines Transportkomplexes ist. Als wahrscheinlichster Kandidat sollten dazu das ChrF-Protein auf seine Chromatbindungseigenschaften getestet werden.

Sehr günstig für die genauere funktionelle Analyse einzelner Proteine und deren Mutanten wäre die Konstruktion eines *in trans* Komplementationssystem für die Chromatresistenz. Dies ist auf der Basis des Weitwirtsbereichsvektors pVDZ'2 möglich.

Um das Zusammenspiel der beiden Genregionen besser zu verstehen, sollte deren Regulation - und insbesondere der Einfluss von Sulfat auf die Ausbildung der Chromatresistenz – weiter geklärt werden.

5. Zusammenfassung

Chrom ist ein nichtessentielles Element in Mikroorganismen und Pflanzen. Chromat besitzt aufgrund seines hohen Redoxpotentials starke zytotoxische Eigenschaften. Die wichtigsten mikrobiellen Schutzmechanismen gegen Chromat sind die Reduktion zum schwerlöslichen, weniger toxischen Cr(III) sowie der aktive Efflux von Chromat aus der Zelle. *R. metallidurans* ist gegen eine Vielzahl von Schwermetallen resistent und sowohl zur Reduktion als auch zum aktiven Efflux von Chromat befähigt. Dadurch erwies sich dieser Organismus als geeignetes Objekt zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Mechanismen der Chromatresistenz in Bakterien.

1. *R. metallidurans* besitzt mindestens zwei Genregionen, die an der Ausprägung der Chromatresistenz beteiligt sind. Die chromosomal kodierte *chr₂* Determinante umfasst die Gene *chrR*, *chrB₂*, *chrA₂* und *chrF₂*. Die auf dem Megaplasmid pMOL28 kodierte *chr₁* Determinante beinhaltet die zur *chr₂* Genregion hoch homologen Gene *chrB₁*, *chrA₁* und *chrF₁*. Darüber hinaus sind die Gene *chrI*, *chrC* und *chrE* in dieser Genregion lokalisiert.
2. Deletionen einzelner Gene der zwei untersuchten *chr*-Determinanten führten zu einer Erhöhung der Sensitivität von *R. metallidurans* gegenüber Chromat und hatten Einfluss auf die Induzierbarkeit des *chrB_{1p}* Promotors der *chr₁* Genregion. Dadurch konnte die Zugehörigkeit der untersuchten Gene zu den Chromatresistenz-Determinanten gezeigt werden.
3. Das ChrA₁-Protein ist ein Vertreter der CHR-Proteinfamilie, einer Familie von Chromattransportern. Das Protein wurde als *StrepTagII* Fusionsprotein gereinigt und die biochemische Charakterisierung begonnen. Der ChrA₁-abhängige Transport ist wahrscheinlich von einem Protonengradienten über der Zellmembran abhängig.
4. Das ChrB₁-Protein wurde als *StrepTagII* Fusionsprotein gereinigt. Das Fusionsprotein war mit der Zytoplasmamembran assoziiert. Durch eine Translationsfusion mit Alkalischer Phosphatase wurde die zytoplasmatische Lokalisierung des Proteins nachgewiesen. Mittels Gelshift-Analyse in einer Nativen PAGE und Circular Dichroismus konnte eine

- Bindung von Chromat an das ChrB₁-Protein gezeigt werden. Deletionsmutanten zeigten eine chromatabhängige Aktivatorfunktion für ChrB-Proteine.
5. Das ChrC *Strep*TagII Fusionsprotein zeigte in der Aktivitätsfärbung und im Enzymassay Superoxiddismutase-Aktivität. Mittels EDX-Spektrum und ICP-AES Analyse wurde Eisen als Metall-Kofaktor des Proteins bestimmt. Durch Analytische Ultrazentrifugation wurde der oligomere Zustand von ChrC als Homotetramer nachgewiesen.
 6. Die Regulation der Transkription der *chr*₁ Genregion wurde mittels Reporterfusionen untersucht. Das zentrale *chrA*₁-Gen wurde vom konstitutiven *chrA*₁*p*-Promotor und vom induzierbaren *chrB*₁*p*-Promotor aus transkribiert. Der *chrB*₁*p*-Promotor war sehr spezifisch nur durch Chromat und nicht durch strukturanaloge Oxyanionen oder andere Stressfaktoren induzierbar. Deshalb kann man davon ausgehen, dass Chromat das primäre Signal für die Signaltransduktion in der Regulation darstellt. Mittels Deletionsmutanten wurden als potentielle Regulatoren der Chromatresistenz der Aktivator ChrB und der Repressor ChrR identifiziert. Der durch Chromat induzierbare Hitzeschock-Sigmafaktor RpoH hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung der Chromatresistenz in *R. metallidurans*. Der Einfluss auf die Transkription von *chr*₁ ist sekundär.
 7. *R. metallidurans* besitzt die chromosomal kodierte Fähigkeit, Chromat zu reduzieren. Im Rohextrakt von Stamm AE104 wurde eine NADH-abhängige Chromatreduktase-Aktivität identifiziert, die nicht durch Chromat induzierbar war.
 8. Von zwei mit Chromat kontaminierten Standorten wurden chromatresistente Mikroorganismen angereichert und mittels 16S rDNA-Analyse taxonomisch eingeordnet. Dabei zeigte sich, dass Gram-positive Mikroorganismen eine höhere natürliche Toleranz gegenüber Chromat besitzen als Gram-negative Bakterien.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, H., W. TEERTSTRA, M. KOSTER UND J. TOMMASSEN. 2002. PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. *FEBS Letters*. **518**: 173-176.
- ALEXANDER, J. UND J. AASHET. 1995. Uptake of chromate in human red blood cells and isolated rat liver cells: the role of the anion carrier. *Analyst*. **120**: 931-933.
- ALVAREZ, A. H., R. MORENO-SANCHEZ UND C. CERVANTES. 1999. Chromate Efflux by Means of the ChrA Chromate Resistance Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 7398-7400.
- ANDERSON, R. A. 1995. Chromium and parenteral nutrition. *Nutrition*. **11**: 83-86.
- ANTON, A. 2001. Genetische und biochemische Charakterisierung von CzcD und anderen Regulatoren der *czc*-vermittelten Schwermetallresistenz in *Ralstonia metallidurans*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- ARSLAN, P., M. BELTRAME UND A. TOMASI. 1987. Intracellular chromium reduction. *Biochim. Biophys. Acta*. **931**: 10-15.
- 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.
- BAKER, A. J. M. 1987. Metal tolerance in Plants. *New Phytol.* **106**: 93-111.
- BARKAY, T., S. M. MILLER UND A. SUMMER. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 355-384.
- BAUTISTA, E. M. UND M. ALEXANDER. 1972. Reduction of inorganic compounds by soil microorganisms. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **36**: 918-920.
- BENOV, L., L. Y. CHANG, B. DAY UND I. FRIDOVICH. 1995. Copper, Zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli*: periplasmic localization. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**: 508-511.
- BEYER JR., W. F. UND I. FRIDOVICH. 1987. Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **26**: 1251-1257.
- BLAKE, M. S., K. H. JOHNSTON, G. J. RUSSEL-JONES UND E. C. GOTTSCHLICH. 1984. A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179.
- BLINDAUER, C. A., M. D. HARRISON, A. K. ROBINSON, J. A. PARKINSON, P. W. BOWNESS, P. J. SADLER UND N. J. ROBINSON. 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* **45**: 1421-1432.
- BORDO, D., D. DERIU, R. COLNAGHI, A. CARPEN, S. PAGANI UND M. BOLOGNESI. 2000. The crystal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J. Mol. Biol.* **298**: 691-704.
- BORDO, D. UND P. BORK. 2002. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO reports* **3**: 741-746.
- BORST-PAUWELS, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*. **650**: 88-127.

- BRADFORD, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- 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.
- BULLOCK, W. O., J. M. FERNANDEZ UND J. M. SHORT.** 1987. XL1Blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galaktosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378.
- BUSENLEHNER, L. S., M. A. PENNELLA, D. P. GIEDROC.** 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 131-143.
- CAMPOS, J., G. MARTINEZ-CADENA, R. ALVAREZ-GONZALEZ UND C. CERVA.** 1997. Purification and partial characterization of a chromate reductase from *Bacillus*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **39**: 73-81.
- CAMPOS, J., M. MARTINEZ-PACHECO UND C. CERVANTES.** 1995. Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie Van Leeuwenhoek* **68**: 203-208.
- CASEY, R. P., B. H. ARIANO UND A. AZZI.** 1982. Studies on the transmembrane orientation of the cytochrome c oxidase in phospholipid vesicles. *Eur. J. Biochem.* **122**: 313-318
- CERVANTES, C., H. OHTAKE, L. CHU, T. MISRA UND S. SILVER.** 1990. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* **172**: 287-291.
- CERVANTES, C., J. CAMPOS-GARCIA, S. DEVARIS, F. GUTIERREZ-CORONA, H. LOZATAVERA, J. C. TORRES-GUZMAN UND R. MORENO-SANCHEZ.** 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 335-347.
- CHARDIN, B., M.-T. GIUDICI-ORTICONI, G. DELUCA, B. GUIGLIARELLI UND M. BRUSCHI.** 2003. Hydrogenases in sul fate-reducing bacteria function as chromium reductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, published online, 12/07/2003.
- CHEUNG, D. T. UND M. E. NIMNI.** 1982. Mechanism of crosslinking of proteins by glutardialdehyde I: reaction with model compounds. *Connect Tissue Res.* **10**: 187-199.
- CHO, H. S., J. G. PELTON, D. YAN, S. KUSTU UND D. E. WEMMER.** 2001. Phosphoaspartates in bacterial signal transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 679-684.
- CLARK, D. P.** 1994. Chromate reductase activity of *Enterobacter aerogenes* is induced by nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**: 233-237.
- CLODFELDER, B. J., J. EMAMAULLEE, D. D. HEPBURN, N. E. CHAKOV, H. S. NETTLES UND J. B. VINCENT.** 2001. The trail of chromium(III) in vivo from the blood to the urin: the roles of transferrin and chromodulin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**: 608-617.
- COMPAN, I. UND D. TOUATI.** 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**: 1687-1696.
- DARTSCH, P. C., S. HILDEBRANDT, R. KIMMEL UND F. W. SCHMAHL.** 1998. Investigations on the nephrotoxicity and hepatotoxicity of trivalent chromium compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **71**: 40-45.

- DERETIC, V., S. CHANDRASEKHARAPPA, J. F. GILL, D. K. CHATTERJE UND A. M. CHAKRABARTY. 1987. A set of cassettes and improved vectors for genetic and biochemical characterization of *Pseudomonas* genes. *Gene* 57: 61-72
- DERMAN, A. I. UND J. BECKWITH. 1993. Mutation that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*. 262: 1744-1777.
- DEY, S. UND B. P. ROSEN. 1995. Dual Mode of Energy Coupling by the Oxyanion-Translocating ArsB Protein. *J. Bacteriol.* 177: 385-389.
- DHAKEPHALKAR, D. K., J. V. BHIDE UND K. M. PAKNIKAR. 1996. Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCM B-180. *Biotechnol. Lett.* 18: 1119-1122.
- DIELS, L. AND M. MERGEAY. (1990). DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1485-1491.
- DREYFUSS, J. 1964. Characterization of a sulfate and thiosulfate transporting system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 239: 2292-2297.
- 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(13):6127-6145.
- FANCY, D. A. UND T. KODADEK. 1999. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6020-6024
- FATEMI, N. UND B. SARKAR. 2002. Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease. *Environ. Health Perspect.* 110: 695-598.
- FELSENSTEIN, J. 1989. PHYLIP. Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*. 5: 164-166.
- FLOHÉ, L., R., BECKER, R. BRIGELIUS, E. LENGFELDER UND F. ÖTTING. 1988. CRC Handbook of Free Radicals. Vol. 3. pp. 287-293.
- FLORES, A. UND J. M. PEREZ. 1999. Cytotoxicity, apoptosis, and in vitro DNA damage induced by potassium chromate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161: 75-81.
- FRANCISCO, R., M. C. ALPOIM UND P. V. MORAIS. 2002. Diversity of chromium-resistant und -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. *J. Appl. Microbiol.* 92: 837-843.
- FUREY, W. F., A. H. ROBBINS, L. L. CLANCY, D. R. WINGE, B. C. WANG UND C. D. STOUT. 1986. Crystal structure of Cd, Zn metallothionein. *Science*. 231: 704-710.
- GARBISU, C., I. ALKORTA, M. L. LLAMA UND J. L. SERRA. 1998. Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation*. 9: 133-141.
- GAMER, J., G. MULTHAUP, T. TOMOYASU, J. S. MCCARTY, S. RÜDIGER, H. J. SCHÖNFELD, C. SCHIRRA, H. BUJARD UND B. BUKAU. 1996. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GroE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* 15: 607-617.
- GARNETT, A. P. UND J. H. VILES. 2003. Copper binding to the Octarepeats of the Prion Protein. *J. Biol. Chem.* 278: 6795-6802.
- GOLDBERG, M., T. PRIBYL, S. JUHNKE UND D. H. NIES. 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J. Biol. Chem.* 274: 26065-26070.

- GORIS, J., P. DE VOS, T. COENYE, B. HORST, 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.
- GRASS, G.** 2000. Molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der *cnr* Cobalt/Nickel-Resistenz-Determinante aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- 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.
- GRILL, E.** 1989. Phytochelatins in plants. In "Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry", pp. 280-300. Alan Riss, New York.
- HARZDORF, C.** 1990. Spurenanalytik des Chroms. *G. Thieme Verlag, Stuttgart.*
- HE, J. J. UND F. A. QUIOCHO.** 1993. Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active trans protein. *Protein Sci.* **2**: 1643-1647.
- HELMANN, J. D.** 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* **46**: 47-110.
- HENGGE-ARONIS, R.** 2002. Signal Transduction and Regulatory Mechanism Involved in Control of the σ_s (RpoS) Subunit of RNA-Polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 373-395.
- HOFMANN, K., P. BUCHER UND A. V. KAJAVA.** 1998. A model of Cdc25 Phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J. Mol. Biol.* **282**: 195-208.
- HOLLEMANN, A. F. UND E. WIBERG (HRSG.).** 1985. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 91.-100. Auflage. Walter de Gruyter. Berlin, New York.
- HOPPE, T., M. RAPE UND S. JENTSCH.** 2001. Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 344-348.
- HRYNIEWICZ, M., A. SIRKO, A. PALUCHA, A. BÖCK UND D. HULANICKA.** 1990. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.* **172**: 3358-3366.
- HU, Y., S. RECH, R. P. GUNSALUS UND D. C. REES.** 1997. Crystal structure of the molybdate binding protein ModA. *Nature Struct. Biol.* **4**:703-707.
- HÜBENER, N.** 2000. Untersuchungen zur Chromatresistenz-Determinante *chr* aus *Ralstonia metallidurans* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- JACOBSON, B. L., J. J. HE, D. D. LEMON UND F. A. QUIOCHO.** 1992. Interdomain salt bridges modulate ligand-induced domain motion of the sulfate receptor protein for active transport. *J. Mol. Biol.* **223**: 27-30.
- JOHNSON, J. L.** 1981. Genetic Characterization. In: Gerhardt, P. (Ed.) Manual of Methods of General Bacteriology, ASM, Washington, USA:450-472.
- JUHNKE, S., N. PEITZSCH, N. HÜBENER, C. GROBE UND D. H. NIES.** 2002. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* **179**: 15-25.

- KAWANISHI, S., S. INOUE UND S. SANO.** 1986. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **261**: 5952-5958.
- KEELE JR., B. B., J. M. MCCORD UND I. FRIDOVICH.** 1970. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**: 6176-6181.
- KIELWEIN, G.** 1969. Ein Nährboden zur selektiven Züchtung von *Pseudomonaden* und *Aeromonaden*. *Arch. f. Lebensmittelhygiene.* **20**:131-133.
- KIM, E. J., H. P. KIM, Y. C. HAH UND J. H. ROE.** 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* **27**: 178-185.
- KREBS, M. P. UND H. G. KHORANA.** 1993. Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. *J. Bacteriol.* **175**: 1555-1560.
- KWAK, Y. H., D. S. LEE UND H. B. KIM.** 2003. *Vibrio harveyi* Nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4390-4395.
- KYTE, J. UND R. F. DOOLITTLE.** 1982. A simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- LAEMMLI, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- LAUDENBACH, D. E., D. EHRHARDT, L. GREEN UND A. GROSSMAN.** 1991. Isolation and Characterization of a Sulfur-Regulated Gene Encoding a Periplasmically Localized Protein with Sequence Similarity to Rhodanese. *J. Bacteriol.* **173**: 2751-2760.
- LAWSON, D. M., C. E. WILLIAMS, L. A. MITCHENALL, R. N. PAU.** 1998. Ligand size is a major determinant of specificity in periplasm of oxyanion-binding proteins:: the 1.2 Å resolution crystal structure of *Azotobacter vinelandii* ModA. *Structure.* **6**: 1529-1539.
- LECONA, E., J. TURNAY, N. OLMO, A. GUZMAN-ARANGUEZ, R. O. MORGAN, M. FERNANDEZ UND M. A. LIZARBRE.** Structural and functional characterization of recombinant mouse annexin A11: influence of calcium binding. *Biochem. J.* **373**: 437-449.
- LEDVINA, P. S., N. YAO, A. CHOUDHARY UND F. A. QUIOCHO.** 1996. Negative electrostatic surface potential of protein sites specific for anionic ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 6786-6791.
- LENZ, O., E. SCHWARTZ, J. DERNEDDE, M. EITINGER, UND B. FRIEDRICH.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J. Bacteriol.* **176**:4385-93.
- LI, Z. UND B. DEMPLE.** 1996. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*: purification and interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* **269**: 18371-18377.
- 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
- LIOCHEV, S. I. UND I. FRIDOVICH.** 2000. Copper- and Zinc-containing Superoxide Dismutase Can Act as a Superoxide Reductase and a Superoxide Oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**: 38482-38485.

- LIOCHEV, S. I. UND I. FRIDOVICH. 2001. Copper, Zinc Superoxide Dismutase as a Univalent NO⁻ Oxidoreductase and as a Dichlorofluorescein Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**: 35253-35257.
- LIU, K. J., J. JIANG, X. SHI, H. GABRYS, T. WALCZAK UND M. SWARTZ. 1995. Low-frequency EPR-study of chromium (V) formation from chromium (VI) in living plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**: 829-834.
- LIU, J. UND B. P. ROSEN. 1997. Ligand interactions of the ArsC Arsenate Reductase. *J. Biol. Chem.* **272**: 21084-21089.
- LLOYD, J. R. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 411-425.
- LLOYD, J. R., G. H. THOMAS, J. A. FINLAY, J. A. COLE UND L. E. MACASKIE. 1999. Microbial Reduction of Technetium by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*: Enhancement via the Use of High-Activity Strains and Effect of Process Parameters. *Biotechnol. Bioengineering.* **66**: 122-130.
- LO, J.-F., N. GORDON, P. G. W. GETTINS UND S. SILVER. 2002. The silver binding protein SilE of plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*.
- LOVLEY, D. R. UND E. J. P. PHILLIPS. 1994. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:726-728.
- LUECKE, H. UND F. A. QUIOCHO. 1990. High specificity of a phosphate transport protein determined hydrogen bonds. *Nature.* **347**: 402-406.
- MACY, J. M., K. NUNAN, K. D. HAGEN, D. R. DIXON, P. J. HARBOR, M. CAHILL UND L. I. SLY. 1996. *Chrysiogenes arsenatis*, gen. sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine waste-water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 1153-1157.
- MAKDESSI, K., J. R. ANDREESEN UND A. PICH. 2001. Tungstate Uptake by a highly specific ABC transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. *J Biol Chem.* **276**:24557-24564.
- MANOIL, C. UND J. BECKWITH. 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 8129-8133.
- MANOIL, C., J. J. MEKALANOS UND J. BECKWITH. 1990. Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* **172**: 515-518.
- MCCARTY, M. F. 1997. Subtoxic intracellular trivalent chromium is not mutagenic: implications for safety of chromium supplementation. *Med. Hypotheses.* **49**: 263-269.
- MCGRATH, S. P. UND S. SMITH. 1990. In: Heavy metals in Soils (Alloway, B., ed.). pp. 125-150. Wiley, New York.
- MEGHARAY, M., S. AVUDAINAYAGAM UND R. NAIDU. 2002. Toxicity of Hexavalent Chromium and Its Reduction by Bacteria Isolated from Soil Contaminated with Tannery Waste. *Curr. Microbiol.* **47**: 51-54.
- MERGEAY, M., S. MONCHY, T. VALLAeYS, 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.
- MERGEAY, M., D. H. NIES, H. G. SCHLEGEL, J. GERITS, P. CHARLES UND F. VAN GJSEGEN. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a fakultativ chemolithotroph with plasmid bound resistance to heave metals. *J. Bacteriol.* **162**: 328-334.

- MICHEL, C., M. BRUGNA, C. AUBERT, A. BERNADEC UND M. BRUSCHI. 2001. Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 95-100.
- MILLER, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. 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 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- MISHRA, S., V. SHING, S. SRIVASTAVA, R. SRIVASTAVA, M. M. SRIVASTAVA, S. DASS, G. P. SATSANGI UND S. PRAKASH. 1995. Studies on uptake of trivalent and hexavalent chromium by maize (*Zea mays*). *Food Chem. Toxicol.* **33**: 393-397.
- MUKHOPADHYAY, R. UND B. ROSEN. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiol Lett.* **168**: 127-136.
- MUKHOPADHYAY, R., B. ROSEN, L. PHUNG UND S. SILVER. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 311-325.
- MUKHOPADHYAY, R., Y. ZHOU UND B. P. ROSEN. 2003. Directed Evolution of a Yeast Arsenate Reductase into a Protein-tyrosine Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**: 24476-24480.
- 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**: 5864-71.
- MURAKAMI, S., R. NAKASHIMA, E. YAMASHITA UND A. YAMAGUCHI. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature.* **419**: 587-593.
- NAKAHIGASHI, K., H. YANAGI UND T. YURA. 1995. Isolation and sequence analysis of rpoH genes encoding σ_{32} homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4383-4390.
- NEIDHARDT, F. C. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella* – Cellular and Molecular Biology. Sec. Ed. Vol. 2. ASM Press. Washington, DC.
- NESTERENKO, M. V., M. TILLEY UND S. J. UPTON. 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **28**(3):239-242.
- NICHOLSON, M. L. UND D. E. LAUDENBACH. 1995. Genes encoded on a cyanobacterial plasmid are transcriptionally regulated by sulfur availability and CysR. *J. Bacteriol.* **177**: 2143-2150.
- NIES, A., D. H. NIES UND S. SILVER. 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171**: 5065-5070.
- NIES, A., D. H. NIES UND S. SILVER. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol Chem.* **265**: 5648-5653.
- NIES, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 313-339.

- 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. USA*. **86**: 7351-7355.
- NIES, D. H., S. KOCH, S. WACHI, N. PEITZSCH UND M. H. J. SAIER. 1998. CHR, a novel family of procaryotic proton motive force driven transporters probably containing chromate/sulfate transporters. *J. Bacteriol.* **180**: 5799-5802.
- NIES, D. H., 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. UND S. SILVER. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171**: 896-900
- NIES, D. H. UND S. SILVER. 1989a. Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J. Bacteriol.* **171**: 4073-4075.
- OGASAWARA, Y., G. LACCOURCIERE UND T. C. STADTMAN. 2001. Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 9494-9498.
- OGAWA, N., C. M. TZENG, C. D. FRALEY UND A. KORNBERG. 2000. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* **182**(23): 6687-6693
- OHTAKE, H., C. CERVANTES UND S. SILVER. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**: 3853-3856.
- OHTAKE, H., K. KOMORI, C. CERVANTES UND K. TODA. 1990. Chromate-resistance in a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 85-88.
- OHTAKE, H. UND S. SILVER. 1994. Bacterial detoxification of toxic chromate. In: *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals* (Chaudry, G. R. Ed.). pp. 403-415. Dioscorides. Portland. OR.
- OREMLAND, R. S. UND J. STOLZ. 2000. in: *Environmental Microbe – Metal Interactions* (Lovley, D. R., Ed.), pp. 199-224. ASM Press, Washington, DC.
- PAGANI, S., F. BONOMI UND P. CERLETTI. 1984. Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **142**: 361-366.
- PAGET, M. S. UND J. D. HELMANN. 2003. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**: 203.
- PALENCHAR, P. M., C. J. BUCK, H. CHENG, T. J. LARSON UND E. G. MUELLER. 2000. Evidence that ThiI, an enzyme shared between thiamin and t-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *J. Biol. Chem.* **275**: 8283-9286.
- PARK, C. H., M. KEYHAN, B. WIELINGA, S. FENDORF UND A. MATIN. 2000. Purification to Homogeneity and Characterization of a Novel *Pseudomonas putida* Chromate Reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(5): 1788-1795.

- PATTANAPIITPAISAL, P., A. N. MABBETT, J. A. FINLAY, A. J. BESWICK, M. PATERSON-BEEDLE, A. ESSA, M. R. TOLLEY, U. BADAR, N. AHMED, N. L. BROWN UND L. E. MACASKIE. 2002. Reduction of Cr(VI) and bioaccumulation of chromium by gram positive and gram negative microorganisms not previously exposed to Cr-stress. *Environ. Technol.* **23**: 731-745.
- PAU, R. N. UND D. M. LAWSON. 2002. Transport, homeostasis, regulation, and binding of molybdat and tungstate to proteins. *Met. Ions Biol. Syst.* **39**: 31-74.
- PAULSEN, I. T., M. H. BROWN UND R. A. SKURRAY. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**: 575-608.
- PAULSEN, I. T., J. H. PARK, P. S. CHOI UND M. H. SAIER JR. 1998. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 1-8.
- PAULSEN, I. T. UND M. H. SAIER. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**: 99-103.
- PEITZSCH, N. 1999. Der Chromatstoffwechsel des schwermetallresistenten Bakteriums *Alcaligenes eutrophus* CH34. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- PEITZSCH, N., G. EBERTZ UND D. H. NIES. 1998. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 453-458.
- PFENNIG, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* **100**: 197-206.
- PHELPS, A., C. BRIGGS, L. MINCONE UND H. WOHLRAB. 1996. Mitochondrial Phosphate Transport Protein. Replacement of Glutamic, Aspartic and Histidine Residues Affect Transport and Protein Conformation and Point to a Coupled Proton Transport Path. *Biochemistry.* **35**: 10757-10762.
- PIMENTEL, B. E., R. MORENO-SANCHEZ UND C. CERVANTES. 2002. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**: 249-254.
- PLOEGMAN J. H., G. DRENT, K. H. KALK UND W. G. J. HOL. 1979. The structure of bovine liver rhodanese. II. The active site in the sulfur-substituted and sulfur free enzyme. *J. Mol. Biol.* **127** : 149-162.
- PRIBYL, T. 2001. Topologie des CzcCBA-Efflux-Komplexes aus *Ralstonia metallidurans*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- PUTMAN, M., H. W. VAN VEEN UND W. N. KONINGS. 2000. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 672-693.
- PUZON, G. J., J. N. PETERSEN, A. G. ROBERTS, D. M. KRAMER UND L. XUN. 2002. A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)-NAD(+) complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**: 76-81.
- QUIOCHO, F. A. UND P. S. LEDVINA. 1996. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**: 17-25.
- QUIOCHO, F. A., J. S. SACK UND N. K. VYAS. 1987. Stabilization of charges on isolated ionic groups sequestered in proteins by polarized peptide units. *Nature.* **329**: 561-564.

- RABILLOUD, T., G. CARPENTIER UND P. TARROUX.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*. **9(6)**:288-291.
- RACKER, E.** 1979. Reconstitution of membrane processes. *Methods Enzymol.* **55**: 699-711
- RAMIREZ, P., H. TOLEDO, N. GUILIANI UND C. A. JEREZ.** 2002. An exported Rhodanese-like Protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in Metal Sulfides and Different Sulfur Compounds. *Appl Environ. Microbiol.* **68**: 1837-1845.
- RAMIREZ-SANTOS, J., J. COLLADO-VIDES, M. GARCIA-VARELA UND M. C. GOMEZ-EICHELMANN.** 2001. Conserved regulatory elements of the promoter sequence of the gene *rpoH* of enteric bacteria. *Nucl. Acids Res.* **29**: 380-386.
- RAY, W. K., G. ZENG, M. B. POTTERS, A. M. MANSURI UND T. J. LARSON.** 2000. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**: 2277-2284.
- RECH, S., C. WOLIN UND R. P. GUNSALUS.** 1995. Properties of the Periplasmic ModA Molybdate-binding Protein of *Escherichia coli*. *J. Biol Chem.* **271**: 2557-2562.
- REIDLINGER, J. AND V. MÜLLER.** 1994. Purification of ATPsynthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F1/F0-type enzyme. *Eur. J. Biochem.* **226** (3): 1079.
- RENSING, C., M. GHOSH UND B. P. ROSEN.** 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J. Bacteriol.* **181**: 5891-5897.
- RENSING, C., T. PRIBYL UND D. H. NIES.** 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* **179(22)**:6871-9.
- ROUX, M. UND J. COVÉS.** 2002. The iron-containing superoxide dismutase of *Ralstonia metallidurans* CH34. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 129-133.
- RUDOLPH, M. J., M. M. WUEBBENS, O. TURQUE, K. V. RAJAGOPALAN UND H. SCHINDELIN.** 2003. Structural Studies of Molybdopterin Synthase Provide Insights into Its Catalytic Mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**: 14514-14522.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH UND T. MANIATIS.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- SANGER, F., S. NICKLEN UND A. R. COULSON.** 1977. DNA-Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **75**:5463-5467.
- SCHEIBEL, T., S. BELL UND S. WALKE.** 1997. *S. cerevisiae* and sulfur: a unique way to deal with the environment. *FASEB J.* **11**: 917-921.
- SCHIERING, N., W. KABSCH, M. J. MOORE, M. D. DISTEFANO, C. T. WALSH UND E. F. PAI.** 1991. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607. *Nature.* **352**: 168-172.
- SCHMID, F. X.** 1996. In: Protein structure: a practical approach (2nd edn) (ed. T. E. Creighton). Oxford University Press, Oxford.
- SCHMIDT, T. UND H. G. SCHLEGEL.** 1994. Combined cobalt-nickel-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* **176**: 7045-7054.

- SCHULDINER, S., H. ROTTENBERG UND A. AVRON. 1972. Determination of Δ pH in chloroplasts. 2 Fluorescent amines as a probe for the determination of Δ pH in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **25**: 64-70
- SCHWARZ, K. UND W. MERTZ. 1959. Chromium(III) and glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**: 292-295.
- SCHWUCHOW, T. 1995. Expression der *czcD*-Genregion von *Alcaligenes eutrophus* CH34. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- SHAN S. O., S. LOH UND D. HERSCHLAG. 1996. The energetics of hydrogen bonds in model systems: implications for enzymatic catalysis. *Science.* **272**: 97-101.
- SHEN, H. UND Y.-T. WANG. 1993. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 3346. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3771-3777.
- SHEWRY, P. R. UND P. J. PETERSON. 1974. The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* **25**: 785-797.
- SHI, J., A. VLAMIS-GARDIKAS, F. ASLUND, A. HOLMGREN UND B. P. ROSEN. 1999. Reactivity of Glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that Glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalysed Arsenate Reduction. *J. Biol. Chem.* **274**: 36039-36042.
- SHI, W., J. WU UND B. P. ROSEN. 1994. Identification of a Putative Metal Binding Site in a New Family of Metalloregulatory Proteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 19826-19829.
- SHI, X. L., A. CHIU, C. T. CHEN, B. HALLIWELL, V. CASTRANOVA UND V. VALLYATHAN. 1999. Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. *J. Toxicol Environ. Health B Crit. Rev.* **2**: 87-104.
- SHI, X. L. UND N. S. DALAL. 1990. One-electron reduction of chromate by NADPH-dependent glutathione reductase. *J. Inorg. Biochem.* **40**: 1-12.
- SHI, X. L. UND N. S. DALAL. 1992. The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: the Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**: 323-327.
- SILVER, S. 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 341-353.
- SILVER, S. UND L. T. PHUNG. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- SIMON, R., U. PRIEFER UND A. PÜHLER. 1983. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology* **1**: 784-791
- SORBO, B. H. 1957. Sulfite and complex-bound cyanide as sulfur acceptors for rhodanese. *Acta Chem. Scand.* **11**: 628-633.
- STERN, R. M. 1982. Chromium compounds: Production and occupational exposure. In: Biological and environmental aspects of Chromium (S. Langard, ed.). pp. 5-47. Elsevier, Amsterdam.
- SUDGEN, K. D. UND D. M. STEARNS. 2000. The role of chromium(V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**: 215-230.
- SUMMERS, A. O. UND L. I. SUGARMAN. 1974. Cell-free mercury(II)-reducing activity in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **119**: 242-249.

- SUZUKI, T., N. MIYATA, H. HORITSU, K. KAWAI, K. TAKAMIZAWA, Y. TAI UND M. OKAZAKI. 1992. NAD(P)H-Dependent Chromium(VI) Reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) Intermediate Is Formed during the Reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* **174**: 5340-5345.
- TABOR, S. UND C. C. RICHARDSON. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 1074-1078.
- 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.
- TIBAZARWA, C., S. WUERTZ, M. MERGEAY, L. WYNS UND D. VAN DER LELIE. 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J. Bacteriol.* **182**: 1399-1409.
- TOUATI, D. 1997. Superoxide Dismutases in bacteria and pathogen protest. In: Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses (Scandalios, J. G., Ed.), pp. 447-493. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- 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.
- TUCKER, M. D., L. L. BARTON UND B. M. THOMSON. 1997. Reduction and immobilization of molybdenum by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Environ. Qual.* **26**: 1146-1152.
- VIAMAJALA, S., B. M. PEYTON, J. N. PETERSEN. 2003. Modeling chromate reduction in *Shewanella oneidensis* MR – Development of a novel dual-enzyme kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 790-797.
- VINCENT, J. B. 1999. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**: 6-12.
- VON HEIJNE, G. 1992. Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the 'Positive Inside' Rule. *J. Mol. Biol.* **225**: 487-494.
- WANG, Y.-T. 2000. in: Environmental Microbe-Metal Interactions. Lovley, D. R., Ed., pp. 225-235. ASM Press, Washington D.C.
- WANG, P. C., T. MORI, K. KOMORI, M. SASATSU, K. TODA UND H. OHTAKE. 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1665-1669.
- WEBER, K. UND M. OSBORN. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- WEISBURG, W. G., S. M. BARNES, D. A. PERLLETIER UND D. J. LANE. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- WESSEL, D. UND V. J. FLÜGGE. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**: 141-143.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANISATION. 1988. Chromium. Environmental Health Criteria 61. Genf.

- WUEBBENS, M. UND K. V. RAJAGOPALAN. 2003. Mechanistics and Mutational Studies of *Escherichia coli* Molybdopterin Synthase Clarify the Final Step of Molybdopterin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**: 14523-14532.
- XU, C. UND B. P. ROSEN. 1997. Dimerization Is Essential for DNA Binding and Repression by the ArsR Metalloregulatory Protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 15734-15738.
- YANISCH-PERRON, C., J. VIEIRA UND J. MESSING. 1985. Improved M13 phage clonig vectors and host strains: nucleotide sequence of M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- YOST, F. L. L. UND I. FRIDOVICH. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**: 4905-4908.
- YOUNG, M. UND S. T. COLE. 1993. *Clostridium*. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive organisms, pp. 35-52. Ed. By Sonenshein, A. L. Washington, DC. American society for microbiology.
- YURA, T., M. KANEMORI UND M. T. MORITA. 2000. The heat shock response: regulation and function, pp. 3-18. In: G. Stortz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington D. C.
- YURA, T., H. NAGAI UND H. MORI. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 321-350.
- YURKOVA, N. A. UND N. N. LYALIKOVA. 1991. New vanadate-reducing facultative chemolithotrophe bacteria. *Microbiology.* **59**: 672-677.
- ZGURSKAYA, H. I. UND H. NIKAIDO. 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37**: 219-225.
- ZHITKOVICH, A., V. VOITKUN, T. KLUZ UND M. COSTA. 1998. Utilization of DNA-protein crosslinks as a biomarker of chromium exposure. *Environ. Health Perspect.* **106**: 969-974.
- ZHOU, T. UND B. P. ROSEN. 1997. Tryptophan Fluorescence Reports Nucleotide-induced Conformational Changes in a Domain of the ArsA ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 19731-19737.

Anhang

Die Tabelle zeigt die Referenzen (*accession numbers*) der in den Abbildungen 31, 34 und 36 aufgeführten Proteine:

Protein, Organismus	<i>accession number</i>
ChrA-homologe Proteine	
<i>Synechocystis</i> PCC6803	D90916.1
SrpC, aus <i>Synechococcus</i> PCC7942	C56274
<i>Anopheles gambiae</i>	AAAB01001918.1
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	NZ_AAABD-02000066.1
<i>Burkholderia fungorum</i>	NZ_AAAJ02000282.1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	AE016913.1
ChrA ₁ , aus <i>R. metallidurans</i>	AJ313327.1
ChrA ₂ , aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000313.1
ChrA ₃ , aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000326.1
ChrA ₄ , aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000055.1
<i>Ralstonia solanacearum</i>	AL646079.1
<i>Caulobacter crescentus</i>	AE005787.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NZ_AAAT02000056.1
<i>Azotobacter vinelandii</i>	NZ_AAAU02000009.1
<i>Pseudomonas putida</i>	AE016783.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Plasmid pUM505	P14285
<i>Bacillus subtilis</i>	Z93767.1
<i>Neurospora crassa</i>	AL670006.1
<i>Shewanella oneidensis</i>	AE015542.1
<i>Bacillus halodurans</i>	AP001509.1
<i>Bacillus cereus</i>	AE017014.1
<i>Methanococcus jannaschii</i>	U67518.1
ChrB-homologe Proteine	
ChrB ₁ , aus <i>R. metallidurans</i>	AJ313327.1
ChrB ₂ , aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000313.1
<i>Ralstonia solanacearum</i>	AL646079.1
<i>Burkholderia fungorum</i>	NZ_AAAJ02000307.1
<i>Shinorhizobium meliloti</i>	AL591785.1
ChrF-homologe Proteine	
ChrF ₁ , aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000373.1
ChrF ₂ , aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000313.1
<i>Ralstonia metallidurans</i>	NZ_AAAI01000359.1
<i>Ralstonia solanacearum</i>	AL646079.1
<i>Burkholderia fungorum</i>	NZ_AAAJ02000282.1
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	NZ_AAABD02000066.1
<i>Thermoplasma volcanicum</i>	AP000995.2

Fortsetzung

Protein, Organismus	<i>accession number</i>
ChrE-homologe Proteine	
ChrE, aus <i>R. metallidurans</i>	NZ_AAAI01000373.1
PspE, aus <i>E. coli</i>	X57560.1
GlpE, aus <i>E. coli</i>	AE016768.1
YceA, aus <i>E. coli</i>	D64848
ArsR, aus <i>E. coli</i>	A56269
Yge4E, aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T40714
Acr3, aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q06598
RhdA, aus <i>Azotobacter vinelandii</i>	S62187
RhdA, aus <i>Synechococcus PCC7942</i>	M65244.1
Rhobov, aus <i>bos taurus</i>	NM_177489.1

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. H. Nies für die Überlassung des Themas, für die konstruktiven Vorschläge und Diskussionen und das große Vertrauen in den Fortgang der Arbeit. Dies hat entscheidend zum erfolgreichen Abschluss beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Andreesen danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten an seinem Institut durchzuführen.

Gregor danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen, die eine Isolierung des „Chromatthemas“ erfolgreich verhinderten.

Für die Durchführung der Analytischen Ultrazentrifugation und die Unterstützung bei den CD-Messungen danke ich Dr. H. Lilie.

Herrn Dr. D. Neumann danke ich für die Aufnahme des EDX-Spektrums. Bei Frau Dr. U. Krämer möchte ich mich für die Durchführung der ICP-AES Messungen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an die kritischen Korrekturleser Hilmar, Gregor und Sylvia.

Bei Grit Schleuder bedanke ich mich vor allem für die angenehme Zeit im Labor, aber auch für die Durchführung wichtiger Klonierungsarbeiten, Sequenzierungen und das frühmorgendliche Animpfen von Kulturen.

Ede und Monique waren für schier unlösbare Computerfragen immer die richtigen Ansprechpartner, danke!

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Nies möchte ich für die freundlich Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit bedanken.

Das letzte große Dankeschön geht an meine Eltern und Freunde; an Johanna, Raven und Moritz - und HILMAR. Eure Unterstützung, Geduld, Aufmunterung und auch Ablenkung war für das Entstehen dieser Arbeit unendlich wichtig.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und aus benutzten Werken entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Halle/Saale, den 14. 11. 2003

Susanne Juhnke

Lebenslauf

Name: Susanne Doris Juhnke
Geburtsdatum: 28.07.1974
Geburtsort: Stendal
drei Kinder: Johanna, Raven und Moritz

Schulausbildung

09/1980 – 08/1982 Polytechnische Oberschule „Salvador Allende“ in Magdeburg
09/1982 – 08/1988 Sprachschule mit erweitertem Russischunterricht „Nikolai Ostrowski“ in Magdeburg
09/1988 – 06/1992 Siemens-Gymnasium mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Ausrichtung in Magdeburg
Abitur mit dem Prädikat „Sehr gut“

Studium

10/1992 – 09/1997 Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/1996 – 09/1996 Diplomprüfung in den Fächern: Biochemie, Enzymologie, Mikrobiologie, Molekularbiologie und Organische Chemie
10/1997 – 09/1997 Diplomarbeit zum Thema: „Einfluß von Punktmutationen im *czcA*-Gen auf die Funktion des CzcA-Proteins“
Abschluss: Diplom-Biochemikerin
Prädikat: „Sehr gut“

seit 01/1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. D. H. Nies am Institut für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Anfertigung der Promotionsarbeit