

**Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur
Funktion von DsrN und DsrL im dissimilatorischen
Schwefelstoffwechsel von *Allochromatium vinosum***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Yvonne Lübbe

aus

Münster

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referentin: Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl
2. Referent: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Hans G. Trüper

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Sulfitreduktasen | 2 |
| 1.2 | Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen | 6 |
| 1.3 | Das <i>dsr</i> -Operon in <i>Allochromatium vinosum</i> | 8 |
| 2 | Material und Methoden | 12 |
| 2.1 | Mikroorganismen | 12 |
| 2.2 | Vektoren | 12 |
| 2.3 | Oligonukleotide | 13 |
| 2.4 | Chemikalien, Enzyme, Kits und sonstige Materialien | 14 |
| 2.4.1 | Chemikalien | 14 |
| 2.4.2 | Enzyme und Proteine | 15 |
| 2.4.3 | Verwendete Kits | 15 |
| 2.4.4 | Sonstige Materialien | 16 |
| 2.5 | Verwendete Internetprogramme und Computersoftware | 16 |
| 2.6 | Mikrobiologische Methoden | 17 |
| 2.6.1 | <i>Allochromatium vinosum</i> | 17 |
| 2.6.1.1 | Kultivierung von <i>A. vinosum</i> | 17 |
| 2.6.1.2 | Konservierung von <i>A. vinosum</i> -Stämmen | 19 |
| 2.6.1.3 | Herstellung einer Rifampicin resistenten <i>A. vinosum</i> Mutante | 19 |
| 2.6.1.4 | Fermenterversuche zur Charakterisierung von <i>A. vinosum</i> Deletionsmutanten | 19 |
| 2.6.2 | <i>Escherichia coli</i> | 20 |
| 2.6.2.1 | Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen | 21 |
| 2.6.2.2 | Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>A. vinosum</i> | 21 |
| 2.7 | Molekulargenetische Methoden | 22 |
| 2.7.1 | Methoden zur Präparation von DNA | 22 |
| 2.7.1.1 | Isolierung genomischer DNA aus <i>A. vinosum</i> | 22 |
| 2.7.1.2 | Phenol/Chloroform-Extraktion | 23 |
| 2.7.1.3 | Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 23 |
| 2.7.1.4 | Ethanol-fällung von DNA | 23 |
| 2.7.1.5 | Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA | 23 |
| 2.7.2 | Enzymatische Modifikation von DNA | 24 |
| 2.7.2.1 | Restriktion von DNA | 24 |
| 2.7.2.2 | Ligation | 24 |
| 2.7.2.3 | Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase | 25 |
| 2.7.3 | <i>In vitro</i> -Amplifizierung von DNA durch PCR | 25 |
| 2.7.3.1 | Standard-PCR | 25 |
| 2.7.3.2 | Gene SOEing | 26 |
| 2.7.3.3 | Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mit PCR | 27 |
| 2.7.3.4 | Kolonie-PCR | 28 |

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 2.7.4 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA | 28 |
| 2.7.4.1 | Agarose-Gelelektrophorese: | 28 |
| 2.7.4.2 | Färbung von Agarosegelen mit Ethidiumbromid | 29 |
| 2.7.4.3 | Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 29 |
| 2.7.5 | Klonierung von DNA-Fragmenten | 29 |
| 2.7.5.1 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 29 |
| 2.7.5.2 | Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen..... | 30 |
| 2.7.5.3 | Identifizierung positiver Klone | 30 |
| 2.7.6 | DNA-DNA-Hybridisierung | 30 |
| 2.7.6.1 | Übertragung von DNA auf Membranen (Southern-Blot) | 30 |
| 2.7.6.2 | Hybridisierung mit DIG-dUTP-markierter DNA-Sonde | 31 |
| 2.7.6.3 | Chemilumineszenz-Detektion..... | 32 |
| 2.7.7 | DNA-Sequenzierung | 33 |
| 2.8 | Proteinbiochemische Methoden | 33 |
| 2.8.1 | Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> | 33 |
| 2.8.2 | Zellernte und Zellaufschluss | 34 |
| 2.8.3 | Ultrazentrifugation | 35 |
| 2.8.4 | Dialyse - Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen | 35 |
| 2.8.5 | Konzentrierung von Proteinlösungen | 35 |
| 2.8.6 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen | 35 |
| 2.8.6.1 | Proteinbestimmung mit dem „Micro BCA Assay“ | 35 |
| 2.8.6.2 | Proteinbestimmung nach Bradford..... | 36 |
| 2.8.7 | Aufreinigung aus „inclusion bodies“ und anschließende Renaturierung des Proteins | 36 |
| 2.8.7.1 | Affinitätschromatographie an ATP-Agarose..... | 36 |
| 2.8.8 | Säulenchromatographische Methoden | 37 |
| 2.8.8.1 | Affinitätschromatographie über eine Nickelchelatsäule | 37 |
| 2.8.8.2 | Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) | 38 |
| 2.8.8.3 | Anionenaustauschchromatographie mit MonoQ | 39 |
| 2.8.8.4 | Gelfiltrationschromatographie | 39 |
| 2.8.9 | UV-Vis-Spektroskopie | 40 |
| 2.8.10 | Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen | 40 |
| 2.8.10.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 40 |
| 2.8.10.2 | Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE) | 41 |
| 2.8.10.3 | Methoden zum Nachweis von Proteinen in nativen und denaturierenden Polyacrylamidgelen | 41 |
| 2.8.10.4 | Elektroblotting von Proteinen | 42 |
| 2.8.11 | Immunologischer Nachweis von Proteinen | 42 |
| 2.8.11.1 | Herstellung und verwendete Antikörper | 43 |
| 2.8.12 | Enzymtests | 43 |
| 2.8.12.1 | Glutamatsynthaseaktivitätstest..... | 43 |
| 2.8.12.2 | Enzymtests zur Diaphoraseaktivität und Disulfidreduktaseaktivität von DsrL | 44 |
| 2.8.12.3 | Bestimmung von K_M -Werten | 45 |
| 2.8.13 | Vorbereitung der Proben für die Siro(häm)amidbestimmung | 45 |
| 2.9 | Chemisch-Analytische Methoden | 45 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 2.9.1 | Analyse von Schwefelverbindungen mittels HPLC | 45 |
| 2.9.1.1 | Bestimmung von Thiolen mittels HPLC..... | 46 |
| 2.9.1.2 | Sulfat-Bestimmung mittels HPLC..... | 47 |
| 2.9.1.3 | Schwefel-Bestimmung mit HPLC..... | 47 |
| 2.9.1.4 | Schwefel-Bestimmung (modifiziert nach Bartlett und Skoog (1954))..... | 48 |
| 2.9.2 | Bestimmung von Eisen-Schwefel-Clustern | 48 |
| 2.9.2.1 | Nachweis von säurelabilem Schwefel (King und Morris, 1966)..... | 48 |
| 2.9.2.2 | Nachweis von Nicht-Häm-Eisen in Proteinen (nach Massey (1957))..... | 48 |
| 2.9.3 | Bestimmung des Flavingehaltes in rekombinatem DsrL | 49 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Bestimmung der prosthetischen Gruppe der Sulfitreduktase | 50 |
| 3.1.1 | Analyse der löslichen Fraktion | 50 |
| 3.1.2 | Nachweis von Siro(häm)amid in einer Sulfitreduktasepräparation | 54 |
| 3.1.2.1 | Anreicherung der Sulfitreduktase (DsrAB)..... | 55 |
| 3.1.2.2 | Nachweis des Siro(häm)amids..... | 57 |
| 3.2 | Charakterisierung von DsrN aus <i>A. vinosum</i> | 58 |
| 3.2.1 | Überexpression von rekombinatem DsrN in <i>E. coli</i> | 58 |
| 3.2.1.1 | Aufreinigung von DsrN aus <i>E. coli</i> unter denaturierenden Bedingungen..... | 59 |
| 3.2.1.2 | Renaturierung von denaturiertem DsrN | 60 |
| 3.2.2 | Nachweis von DsrN in <i>A. vinosum</i> | 61 |
| 3.2.3 | Physiologische Untersuchung zur Funktion von DsrN | 62 |
| 3.2.3.1 | Herstellung eines Rifampicin resistenten <i>A. vinosum</i> Stammes..... | 62 |
| 3.2.3.2 | Herstellung von „in frame“ Deletionsmutanten..... | 63 |
| 3.2.3.3 | Phänotypische Charakterisierung der <i>dsrN</i> -Deletionsmutante | 66 |
| 3.2.3.4 | Komplementation von <i>A. vinosum ΔdsrN</i> mit <i>dsrN</i> | 70 |
| 3.2.3.5 | Nachweis der Sulfitreduktase in <i>A. vinosum ΔdsrN</i> | 73 |
| 3.2.4 | Suche nach <i>dsrN</i>-homologen Genen im Genom von <i>A. vinosum</i> | 74 |
| 3.3 | Charakterisierung von DsrL | 75 |
| 3.3.1 | Sequenzvergleiche mit DsrL-homologen Proteinen | 75 |
| 3.3.2 | Aufreinigung von rekombinatem DsrL aus <i>E. coli</i> | 81 |
| 3.3.2.1 | Überexpression von rekombinatem DsrL..... | 81 |
| 3.3.2.2 | Aufreinigung von rekombinatem DsrL aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 81 |
| 3.3.3 | Nachweis und Lokalisation von DsrL in <i>A. vinosum</i> | 83 |
| 3.3.4 | Aufreinigung von DsrL aus <i>A. vinosum</i> | 85 |
| 3.3.5 | Biochemische Charakterisierung von DsrL | 89 |
| 3.3.5.1 | Untersuchungen zum Multimerisierungszustand von DsrL..... | 89 |
| 3.3.5.2 | Bestimmung der Cofaktoren..... | 90 |
| 3.3.5.3 | Versuche zum Nachweis der Glutamatsynthaseaktivität von DsrL..... | 92 |
| 3.3.5.4 | Diaphoraseaktivität in rekombinatem und nativen DsrL..... | 94 |
| 3.3.5.5 | Versuche zur möglichen Disulfidreduktaseaktivität..... | 100 |
| 3.3.5.6 | Versuche zur Reduktion von Sulfit | 100 |
| 3.3.6 | Physiologische Untersuchung zur Funktion von DsrL | 101 |
| 3.3.6.1 | Konstruktion des <i>dsrL</i> -Deletionsvektors pK18 <i>mobsacBΔdsrL</i> | 102 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.3.6.2 | Konstruktion und Identifizierung von <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrL$ auf genetischer Ebene | 102 |
| 3.3.6.3 | Phänotypische Charakterisierung von <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrL$ | 102 |
| 3.3.6.4 | Komplementation von <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrL$ mit <i>dsrL</i> | 103 |
| 3.3.6.5 | Charakterisierung von <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrL$ und <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrL + dsrL$ über Western-Blot..... | 106 |
| 3.3.7 | Hinweise auf die Regulation der Dsr-Proteine am Beispiel von DsrL | 107 |
| 3.3.8 | Suche nach <i>dsrL</i>-homologen Genen im Genom von <i>A. vinosum</i>..... | 108 |
| 4 | Diskussion | 109 |
| 4.1 | DsrN..... | 110 |
| 4.2 | DsrL..... | 117 |
| 5 | Zusammenfassung | 128 |
| 6 | Literatur..... | 130 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CSPD | Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat |
| CIAP | Calf Intestinal Alkaline Phosphatase |
| (k)Da | (kilo)Dalton |
| Dig | Digoxigenin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSM | Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| HEPES | N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethan-sulfonsäure] |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| INT | Iodonitrotetrazoliumchlorid |
| IPTG | Isopropyl- β -S-thiogalactosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| K _m | Kanamycin |
| K _M | Michaelis-Menten-Konstante |
| MALDI | Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation |
| mcs | Multiple cloning side |
| MTT | Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid |
| NAD(P)H | Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid(-phosphat) |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Open Reading Frame |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Rif | Rifampicin |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| TCEP | Tris(2-Carboxyethyl)phosphinehydrochlorid |
| TEMED | Tetramethylendiamin |
| T _m | Schmelztemperatur |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |

| | |
|-------|---|
| U | Unit (Enzymeinheit) |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| ZU | Ultrazentrifugation |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid |

1 Einleitung

Schwefel ist ein essentielles Element, das in allen Organismen in Form von organischen Verbindungen, wie z.B. Aminosäuren, Coenzymen und Vitaminen vorkommt. Die Funktion des Schwefels in diesen Verbindungen kann dabei katalytischer, struktureller oder auch regulatorischer Art sein. Die biologischen Funktionen anorganisch vorliegenden Schwefels beschränken sich dagegen auf zwei Punkte: assimilatorischer Einbau in die oben genannten organischen Verbindungen oder Nutzung als Elektronendonator bzw. -akzeptor im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel. Eine assimilatorische Sulfatreduktion kann von den meisten Prokaryonten, Pilzen und Pflanzen durchgeführt werden, Tiere sind jedoch darauf angewiesen, ihren Bedarf an reduzierten Schwefelverbindungen über die Nahrung zu decken. Der dissimilatorische Schwefelstoffwechsel ist auf die Prokaryonten beschränkt (Brüser et al., 2000a; Dahl et al., 2002).

Die dissimilatorische Reduktion von Schwefelverbindungen erfolgt unter strikt anaeroben Bedingungen. Dabei werden oxidierte Schwefelverbindungen (meist Sulfat aber auch Schwefel, Sulfit, Thiosulfat und Polysulfide) als terminale Elektronenakzeptoren einer anaeroben Atmungskette genutzt, bei der Sulfid freigesetzt wird (Brüser et al., 2000a; Fauque et al., 1991). Als Elektronendonoren dienen hierbei normalerweise organische Verbindungen oder H_2 . Zu den Sulfatreduzieren gehören u.a. die Gattungen *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* und *Desulfonema* (Trüper, 1984a; Widdel und Hansen, 1992). Unter den Archaea sind Vertreter der Gattung *Archaeoglobus* zu einer Sulfatatmung befähigt.

Reduzierte Schwefelverbindungen können von einer Vielzahl photo- und chemotropher Schwefeloxidierer genutzt werden. Hierbei dienen anorganische Schwefelverbindungen, wie Sulfid, Polysulfide, elementarer Schwefel, Sulfit und Thiosulfat als Elektronendonoren, die meist bis zum Sulfat oxidiert werden (Brüser et al., 2000a). In einigen chemotrophen Schwefeloxidieren, wie z.B. *Thiobacillus denitrificans*, kann eine anaerobe Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen erfolgen, bei der die freiwerdenden Elektronen in einem Atmungsprozess auf Nitrat übertragen werden. In den meisten chemotrophen Schwefeloxidierern erfolgt dagegen eine aerobe Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen mit Sauerstoff als terminalem Akzeptor (Friedrich, 1998). Dazu gehören u.a. die Gruppe der Thiobacilli, die Gattung *Beggiatoa* und einige bakterielle Endosymbionten aus marinen Invertebraten (Trüper, 1984a). Manche Vertreter der Archaea sind ebenfalls zu einer aeroben lithoautotrophen Schwefeloxidation befähigt. Diese Fähigkeit ist

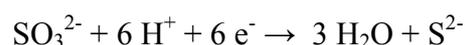
jedoch auf einige Mitglieder der Gattungen *Sulfolobus* und *Acidianus* beschränkt (Friedrich, 1998).

Die phototrophen anoxygenen Schwefelbakterien können die Elektronen aus der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen für die photosynthetische CO₂-Reduktion nutzen (Brune, 1995b). Zu diesen gehören die Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*) und die grünen Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*). Einige Vertreter der „schwefelfreien“ Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*), der grünen gleitenden Bakterien (*Chloroflexaceae*), der Grampositiven Heliobakterien (Bryantseva et al., 2000) und der Cyanobakterien sind ebenfalls in der Lage Schwefelverbindungen als Elektronendonoren zu nutzen (Brune, 1989; Brune, 1995b).

Ein Mitglied der Familie der *Chromatiaceae* ist *Allochromatium vinosum* (Imhoff et al., 1998). Dieses Gram-negative γ -Proteobakterium kommt typischerweise in Gewässern und Sedimenten mit stehendem Schwefelwasserstoff-haltigem Süß- oder Salzwasser vor (Pfennig und Trüper, 1989). Unter anoxischen Bedingungen im Licht betreibt *A. vinosum* eine anoxygene Photosynthese, bei der neben reduzierten Schwefelverbindungen wie Sulfid, Schwefel, Thiosulfat und Sulfit auch molekularer Wasserstoff, Formiat, Acetat, Propionat, Pyruvat, Fumarat, Malat und Succinat verwertet werden können (Imhoff und Trüper, 1989; Steudel et al., 1990; van Gemerden, 1987). Für diesen Organismus steht seit 1995 ein System zur manipulativen Genetik zur Verfügung (Pattaragulwanit und Dahl, 1995), so dass in den letzten Jahren wesentliche neue Erkenntnisse über den Schwefelstoffwechsel in diesem Bakterium gewonnen werden konnten (Dahl, 1996; Dahl et al., 2005; Pattaragulwanit et al., 1998; Pott und Dahl, 1998; Reinartz et al., 1998).

1.1 Sulfitreduktasen

Ein weit verbreitetes Enzym im Schwefelstoffwechsel ist die Sulfitreduktase. Dieses Enzym katalysiert den sechs – Elektronenübergang vom Sulfit zum Sulfid,



ein zentraler Schritt in der dissimilatorischen und assimilatorischen Sulfatreduktion. Assimilatorische Sulfitreduktasen, die in Prokaryonten, Pilzen und Pflanzen gefunden wurden, stellen das für den Einbau in Aminosäuren und Cofaktoren benötigte Sulfid zur Verfügung (Widdel, 1988). Dissimilatorische Sulfitreduktasen wurden dagegen ausschließlich in Prokaryonten gefunden, hauptsächlich in sulfatreduzierenden Eubakterien, aber auch in thermophilen Archaea wie z.B.

Archaeoglobus fulgidus (Dahl et al., 1993; Dahl et al., 1994). Aus den sulfatreduzierenden Eubakterien wurden vier verschiedene dissimilatorische Sulfitreduktasen isoliert, die sich in Bezug auf ihre spektralen und redoxaktiven Eigenschaften unterscheiden: Desulfoviridin (Lee und Peck, Jr., 1971), Desulforubidin (Lee et al., 1973), Desulfofuscidin (Hatchikian und Zeikus, 1983) und P-582 (Trudinger, 1970).

Den Sulfitreduktasen sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich sind Nitritreduktasen, die den sechs-Elektronenschritt von Nitrit zu Ammonium katalysieren (Crane und Getzoff, 1996; Murphy et al., 1974). Beide Enzyme enthalten als Cofaktor u.a. eine Häm-ähnliche Gruppe, die zuerst aus der assimilatorischen NADPH-Sulfitreduktase aus *E. coli* isoliert und charakterisiert wurde (Murphy et al., 1973; Siegel et al., 1973). Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Gruppe auch in den dissimilatorischen Sulfitreduktasen von *Desulfotomaculum nigrificans* (P-582) und *Desulfovibrio gigas* (Desulfoviridin) und in der aus Spinat isolierten assimilatorische Nitritreduktase enthalten ist (Murphy et al., 1974; Murphy und Siegel, 1973).

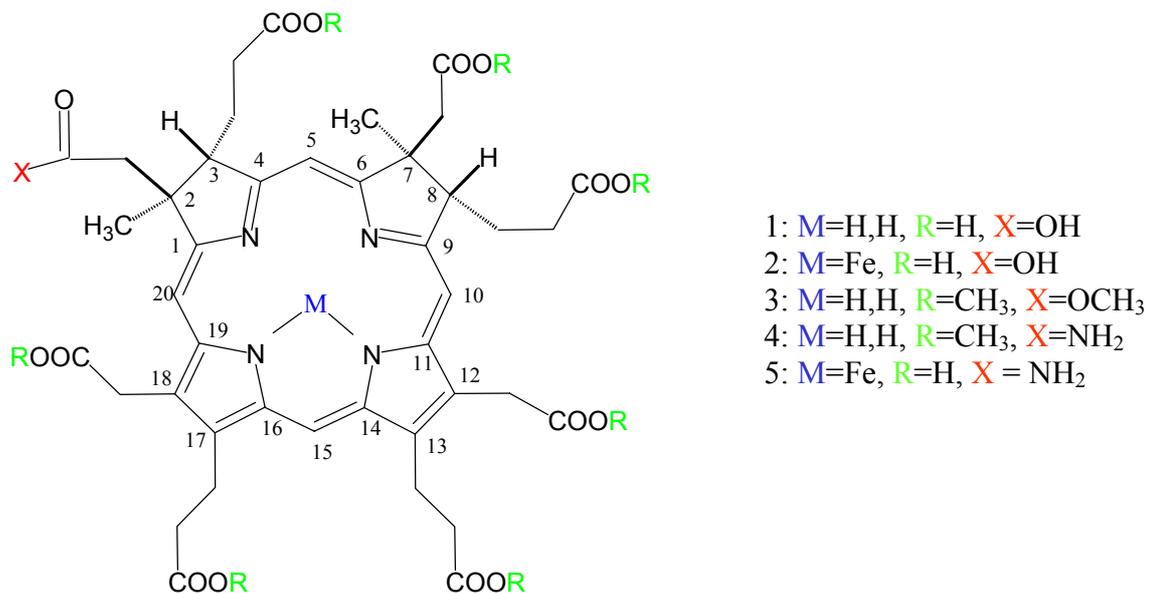


Abb. 1.1: Sirohäm/Siro(häm)amid-Grundstruktur mit verschiedenen Substituenten (nach Matthews et al. (1995)); 1: Sirohydrochlorin, 2: Sirohäm, 3: Sirohydrochlorin-Octamethylester, 4: Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid, 5: Sirohämamid (= Siroamid); die Zahlen zeigen die Nummer der C-Atome im Tetrapyrrolring an;

Die prosthetische Gruppe ist ein Eisen-enthaltendes Tetrahydroporphyrin (s. Abb. 1.1) vom Iso-bakteriochlorin Typ (angrenzende Pyrrole sind reduziert) mit acht Carboxylseitenketten (Murphy et al., 1973). Dieser Tetrahydroporphyrin-Gruppe wurde der Trivialname Sirohydrochlorin (1) gegeben, daran anlehnend wurde die prosthetische Gruppe, ein Eisenchelat des Sirohydrochlorins, als Sirohäm (2) bezeichnet (Murphy und Siegel, 1973). Enzyme mit Sirohäm als prostheti-

scher Gruppe zeigen ein charakteristisches Häm-ähnliches Absorptionsspektrum mit, in den meisten Fällen, einem Maximum zwischen 570 und 595 nm (Siegel et al., 1978). Neuere Untersuchungen des Sirohäm-Cofaktors der dissimilatorischen Sulfitreduktase aus Vertretern der Gattung *Desulfovibrio* zeigten jedoch, dass die prosthetische Gruppe des Enzyms in diesen Sulfatreduzierern nicht Sirohäm ist, sondern eine amidierte Form, die als Siro(häm)amid (5) bezeichnet wurde (Matthews et al., 1995). Eine der Carboxylgruppen des Sirohäms ist in diesem Molekül durch eine Amidgruppe ersetzt. Untersuchungen der assimilatorischen Sulfitreduktase aus *E. coli* in der gleichen Studie bestätigten dagegen Sirohäm als prosthetische Gruppe in diesem Enzym. Zu Beginn der Sirohämisolation erfolgt eine Behandlung mit Methanol und HCl, was zum Verlust des Eisenatoms und zur Veresterung der Carboxylseitenketten führt. Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid (4) ist im Vergleich zu dem Octamethylester (3) stärker polar, was möglicherweise der Grund dafür ist, dass die amidierte Form in früheren Analysen nicht detektiert wurde, da sie als unvollständig verestertes Material verworfen wurde. Kleinere Mengen des Octamethylesters wurden außerdem auch in den neueren Analysen mit dem Material aus *Desulfovibrio* sp. isoliert. Dies ist vermutlich auf eine partielle Methanolyse der Amidgruppe zurückzuführen (Matthews et al., 1995).

Die assimilatorische Sulfitreduktase aus *E. coli* ist ursprünglich als $\alpha_8\beta_4$ Oligomer beschrieben worden, das aus acht 66 kDa Flavoprotein- und vier 64 kDa Häm-Proteinuntereinheiten besteht (Siegel und Davis, 1974). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass das Protein aus *E. coli* eine $\alpha_8\beta_8$ -Protein-Struktur aufweist (Champier et al., 2002; Zeghouf et al., 2000). Jede der α -Flavoproteinuntereinheiten bindet ein FAD und ein FMN und enthält eine NADPH-Bindestelle. Der Häm-Proteinanteil ist ein Metalloprotein, in dem jede β -Untereinheit einen [4Fe-4S]-Cluster enthält, der über eine Cysteinbrücke mit dem Sirohäm der jeweiligen Untereinheit verbunden ist (Crane et al., 1995; Crane und Getzoff, 1996; Siegel et al., 1973). Die dem [4Fe-4S]-Cluster entgegengesetzte Seite des Sirohäm bindet vermutlich das Sulfit über eine Ligation des Schwefelatoms an das Eisen (Young und Siegel, 1988a). Für die Reduktion des Sulfits werden die Elektronen von dem an der Flavoproteinuntereinheit gebundenen NADPH über FAD und FMN auf die β -Untereinheit transportiert, wo sie über das [4Fe-4S]-Cluster auf das an das Sirohäm gebundene Sulfit übertragen werden (Crane et al., 1997).

Im Gegensatz zu der assimilatorischen Sulfitreduktase aus *E. coli* enthalten die dissimilatorischen Sulfitreduktasen keine Flavoproteinuntereinheit. Allen dissimilatorischen Sulfitreduktasen ist gemeinsam, dass sie aus zwei verschiedenen Polypeptiden (DsrA und DsrB) bestehen, die zu einer $\alpha_2\beta_2$ -Struktur zusammengefügt sind. Wie das Enzym aus *E. coli* enthalten sie Sirohäm

(bzw. Siro(häm)amid s.o.) und Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe (Fauque et al., 1991). Die zwei Untereinheiten werden von zwei hintereinanderliegenden Genen kodiert, die zueinander signifikante Homologien aufweisen. Das für die Bindung des [4Fe-4S]-Sirohäm(amid)-Cofaktors essentielle Sequenzmotiv ist jedoch nur in der DsrA-Untereinheit vorhanden, was dem Anteil von zwei Sirohäm(amid) pro Molekül Sulfitreduktase entspricht (Dahl et al., 1993; Hipp et al., 1997; Karkhoff-Schweizer et al., 1995). Dissimilatorische Sulfitreduktasen wurden ausschließlich in sulfatreduzierenden Prokaryonten gefunden, mit bisher zwei Ausnahmen: Aus dem chemolithotrophen Bakterium *Thiobacillus denitrificans* (Schedel et al., 1975; Schedel und Trüper, 1979) und dem photolithotrophen Bakterium *Allochromatium vinosum* (Schedel et al., 1979) wurden dissimilatorische Sulfitreduktasen isoliert, die den für Sulfatreduzierer beschriebenen Proteinen entsprechen. Für das aus *A. vinosum* aufgereinigte Enzym wurde zunächst eine $\alpha_4\beta_4$ -Struktur angenommen (Schedel et al., 1979). Die hohen Homologien der für die Sulfitreduktase kodierenden Gene (*dsrA* und *dsrB*) zu den Sulfitreduktasegenen aus Sulfatreduzierern (Hipp et al., 1997) lassen jedoch vermuten, dass die Sulfitreduktase aus *A. vinosum* ebenfalls eine $\alpha_2\beta_2$ -Struktur aufweist (Pott und Dahl, 1998). Dies wird durch Untersuchungen von (Kobayashi et al., 1978) unterstützt, die für das Protein eine Grösse von 180 kDa bestimmten, was einer $\alpha_2\beta_2$ -Struktur entspricht.

Für das aus *A. vinosum* isolierte Protein wurde eine Funktion in der Sulfidoxidation vermutet, da das Enzym nur bei photolithoautotrophen Wachstum auf reduzierten Schwefelverbindungen detektiert werden konnte (Schedel et al., 1979). Die vermutete direkte Oxidation von externem Sulfid zu Sulfit in *A. vinosum* durch eine umgekehrte Sulfitreduktasereaktion konnte durch Interposonmutagenese jedoch ausgeschlossen werden. Die Sulfidoxidationsrate der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt (Pott und Dahl, 1998). Durch das gleiche Experiment konnte in *A. vinosum* jedoch eine essentielle Beteiligung der Sulfitreduktase und weiterer im selben Operon kodierter Proteine an der Oxidation akkumulierten Schwefels nachgewiesen werden (Dahl et al., 2005; Pott und Dahl, 1998). Neben den Genen für die dissimilatorische Sulfitreduktase (Hipp et al., 1997) wurde in *A. vinosum* auch ein Gen gefunden, das vermutlich für eine assimilatorische Sulfitreduktase kodiert (Neumann et al., 2000). Im Gegensatz zu dem Protein aus *E. coli* (s.o) besteht die assimilatorische Sulfitreduktase aus *A. vinosum* nur aus einer Untereinheit (CysI), die Homologien zu den Ferredoxin-abhängigen Sulfitreduktasen aus Cyanobakterien (Gisselmann et al., 1993) und Pflanzen (Brühl et al., 1996) und der Sirohämuntereinheit der NADPH-abhängigen Sulfitreduktasen aufweist (Neumann et al., 2000). Neben dem *cysI*-Gen wurden in *A. vinosum* weitere Gene gefunden, deren Genprodukte hohe Homologien zu anderen an der assimilatorischen Sulfatreduktion beteiligten Enzymen aufweisen (Neumann et

al., 2000). Vor dem *cys*-Operon wurde in entgegengesetzter Orientierung ein *cysB*-Gen gefunden. Die Anwesenheit von CysB lässt vermuten, dass die Expression der in diesem Operon kodierten *cys*-Gene, wie in *E. coli*, nur in Abwesenheit reduzierter Schwefelverbindungen erfolgt (Kredich, 1996; Neumann et al., 2000). Der Nachweis des Gens für eine assimilatorische Sulfitreduktase in *A. vinosum* unterstützt weiter die postulierte Funktion der dissimilatorischen DsrAB-kodierten Sulfitreduktase in der Schwefeloxidation.

1.2 Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen

Eine große Anzahl von Enzymen, die verschiedene Redox-Reaktionen mit reduzierten Schwefelverbindungen katalysieren, wurden aus phototrophen und auch chemotrophen Bakterien isoliert. Die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen in Phototrophen konnte aufgrund dieser Ergebnisse in drei Schritte eingeteilt werden (Dahl und Trüper, 1994; Trüper, 1984b): die Oxidation von Sulfid oder Thiosulfat zu Schwefel, die Oxidation des in Schwefelkugeln gespeicherten Schwefels zu Sulfid und die weitere Oxidation des Sulfids zum Endprodukt Sulfat. Da die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zum oxidativen Schwefelstoffwechsel mit dem Modellorganismus *A. vinosum* durchgeführt wurden, werden die im folgenden Abschnitt behandelten Punkte zum größten Teil auf die Kenntnisse aus diesem Organismus beschränkt.

Für die Oxidation von Sulfid zu Schwefel wurden verschiedene Enzyme diskutiert: Flavocytochrom *c*, Sulfitreduktase (reverse Funktion) und Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR). Da Flavocytochrom *c* nicht in allen zur Sulfidoxidation befähigten Bakterien vorkommt, ist dieses Enzym vermutlich nicht essentiell an der Sulfidoxidation beteiligt (Brune, 1989; Brune, 1995b), eine Vermutung, die durch Insertionsinaktivierung des Gens für das Flavocytochrom *c*₅₅₂ aus *A. vinosum* bestätigt wurde (Reinartz et al., 1998). Eine Beteiligung der Sulfitreduktase (s.o.) an der Oxidation des Sulfids konnte ebenfalls durch Insertionsinaktivierung ausgeschlossen werden (Pott, 1996; Pott und Dahl, 1998). Vermutlich ist die SQR (Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase), ein Enzym, das in vielen sulfidoxidierenden Bakterien gefunden wurde, für die Sulfidoxidation in *A. vinosum* verantwortlich. Bei der SQR handelt es sich um ein membrangebundenes Flavoprotein (Dahl et al., 2002), das Elektronen von Sulfid auf den Chinon-Pool der Membran überträgt (Reinartz et al., 1998).

Thiosulfat kann von den meisten phototrophen Schwefelbakterien, wie auch *A. vinosum*, als Elektronendonator verwendet werden. Das Thiosulfat wird in einen Sulfan- und Sulfonschwefel

gespalten, wobei der Sulfanschwefel vor der weiteren Oxidation in den Schwefelkugeln akkumuliert und der Sulfonschwefel direkt zu Sulfat umgesetzt wird (Schedel und Trüper, 1980; Smith und Lascelles, 1966). In *A. vinosum* wie auch in dem chemolithoautotrophen Schwefeloxidierer *Paracoccus pantotrophus* erfolgt die Thiosulfatoxidation über den von den sog. *sox*-Genen kodierten Multienzymkomplex (Daniela Hensen, pers. Mitteilung, (Friedrich et al., 2001)). In *P. pantotrophus* sind die Sox-Proteine auch für die Sulfidoxidation notwendig (Friedrich et al., 2001), in *A. vinosum* konnte dagegen durch die Inaktivierung der *sox*-Gene keine Beeinträchtigung der Sulfidoxidation beobachtet werden (Daniela Hensen, pers. Mitteilung).

Bei der Oxidation von Sulfid und Thiosulfat treten in einigen Schwefeloxidierern Schwefelkugeln als sichtbares Intermediat auf. Die Schwefelkugel-bildenden Bakterien können in zwei Gruppen unterteilt werden: 1. Bakterien, die den Schwefel intrazellulär akkumulieren, 2. Bakterien, die den Schwefel extrazellulär ablagern. Die erste Gruppe umfasst die Familie der *Chromatiaceae*, die Gattungen *Beggiatoa*, *Thioploca* und einige andere Gattungen. Zu der zweiten Gruppe zählen die Familie der *Ectothiorhodospiraceae*, *Chlorobiaceae* und einige andere Vertreter aus unterschiedlichen Familien (Dahl et al., 2002).

Zur Aufklärung der genauen Struktur des Schwefels in den Schwefelkugeln wurden „in situ“-Analysen mit Röntgenabsorptionsspektroskopie im Nahkantenbereich durchgeführt (Prange et al., 1999; Prange et al., 2002b; Prange et al., 2002a). Demnach besteht der überwiegende Anteil des Schwefels in den Schwefelkugeln von *A. vinosum* aus Schwefelketten, die bisher nicht identifizierte organische Reste an einem oder beiden Enden tragen. Es handelt sich wahrscheinlich um (Bis-)Organylsulfane der Struktur R-S_n-R.

Über den Verlauf der Oxidation des intermediären Schwefels ist bisher noch sehr wenig bekannt. In *A. vinosum* und vermutlich auch in anderen Vertretern der *Chromatiaceae* liegt der Schwefel (Oxidationsstufe = 0) in Schwefelkugeln extracytoplasmatisch im Periplasma vor (Pattaragulwanit et al., 1998). Möglicherweise erfolgt zunächst eine reduktive Aktivierung des Schwefels, der dann durch eine reverse Sulfitreduktase (s.o.) zu Sulfit oxidiert wird (Trüper, 1984b). Die Sulfitreduktase aus *A. vinosum* ist jedoch im Cytoplasma lokalisiert (Hipp et al., 1997), was einen Transport des akkumulierten Schwefels über die Cytoplasmamembran erforderlich macht. Wie das geschieht, ist bisher jedoch noch unbekannt. Bekannt ist dagegen, dass die reverse Sulfitreduktase (DsrAB) essentiell an der Oxidation des akkumulierten Schwefels beteiligt ist (Pott, 1996; Pott und Dahl, 1998; Pott-Sperling, 2000).

Für die Oxidation des Sulfit zum Sulfat sind bisher zwei Wege bekannt, die direkte und die indirekte Oxidation zum Sulfat. Die direkte Oxidation wird durch die Sulfit: Akzeptor-Oxidoreduktase katalysiert (Kappler, 1999; Kappler et al., 2000; Kappler und Dahl, 2001), die indirekte AMP-abhängige Oxidation erfolgt über das Intermediat Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS). Dabei katalysiert die APS-Reduktase die oxidative Bildung von APS aus Sulfit und AMP. In einem zweiten Schritt wird Sulfat anschließend durch die ATP-Sulfurylase oder die Adenylylsulfat:Phosphat-Adenylyltransferase (APAT) unter Konservierung der energiereichen Bindung aus APS freigesetzt (Brüser et al., 2000b). Der indirekte Weg über die APS-Reduktase ist in *A. vinosum* nicht essentiell, da die Insertionsinaktivierung des APS-Reduktase-Gens zu zum Wildtyp vergleichbaren Sulfitoxidationsraten führte (Dahl, 1996). Eine Sulfit: Akzeptor-Oxidoreduktase konnte in *A. vinosum* bisher weder auf genetischer noch auf Proteinebene isoliert werden, obwohl physiologische Hinweise auf ein solches Enzym gefunden wurden (Dahl, 1996; Kappler, 1999). Neueste Untersuchungen zeigen, dass SoxY, ein Protein das an der Thiosulfatoxidation beteiligt ist, eine bedeutende Rolle in der Oxidation von Sulfid spielt (Daniela Hensen, Bettina Franz, pers. Mitteilung).

1.3 Das *dsr*-Operon in *Allochromatium vinosum*

Zusammen mit den Genen für die beiden Untereinheiten der Sulfitreduktase *dsrA* und *dsrB*, sind in derselben Transkriptionseinheit weitere *dsr*-Gene lokalisiert, deren Genprodukte vermutlich ebenfalls essentiell an der Schwefeloxidation beteiligt sind (Dahl et al., 2005; Pott, 1996; Pott und Dahl, 1998). Aus den Gensequenzen wurden erste Hinweise auf die Funktion, mögliche Cofaktoren und die Lokalisation dieser Proteine erhalten (Abb. 1.2).

Die Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* kodieren für kleine cytoplasmatische Proteine ohne prosthetische Gruppen. Die abgeleiteten Proteine DsrE, DsrF und DsrH bilden ein Holoprotein mit einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Struktur (Dahl et al., 2005). Durch Kristallisation des rekombinanten Proteins aus *E. coli* konnte die hexamere Struktur bestätigt werden (Andrea Schulte, pers. Mitteilung). Die Proteine zeigen Homologien zu Proteinen unbekannter Funktion u.a. aus *E. coli*, *Haemophilus influenzae* und methanogenen Archaea. In den DsrE homologen Proteinen treten zwei konservierte Cysteinreste auf, die auf eine mögliche katalytische Funktion hindeuten, in DsrE ist jedoch nur einer der Reste konserviert (Pott-Sperling, 2000). Zu *dsrEFH* homologe Gene wurden auch in dem grünen Schwefelbakterium *Chlorobaculum tepidum* (früher *Chlorobium tepidum* (Imhoff, 2003)) gefunden, jedoch nicht in Sulfatreduzierern (Dahl et al., 2005; Pott-Sperling, 2000).

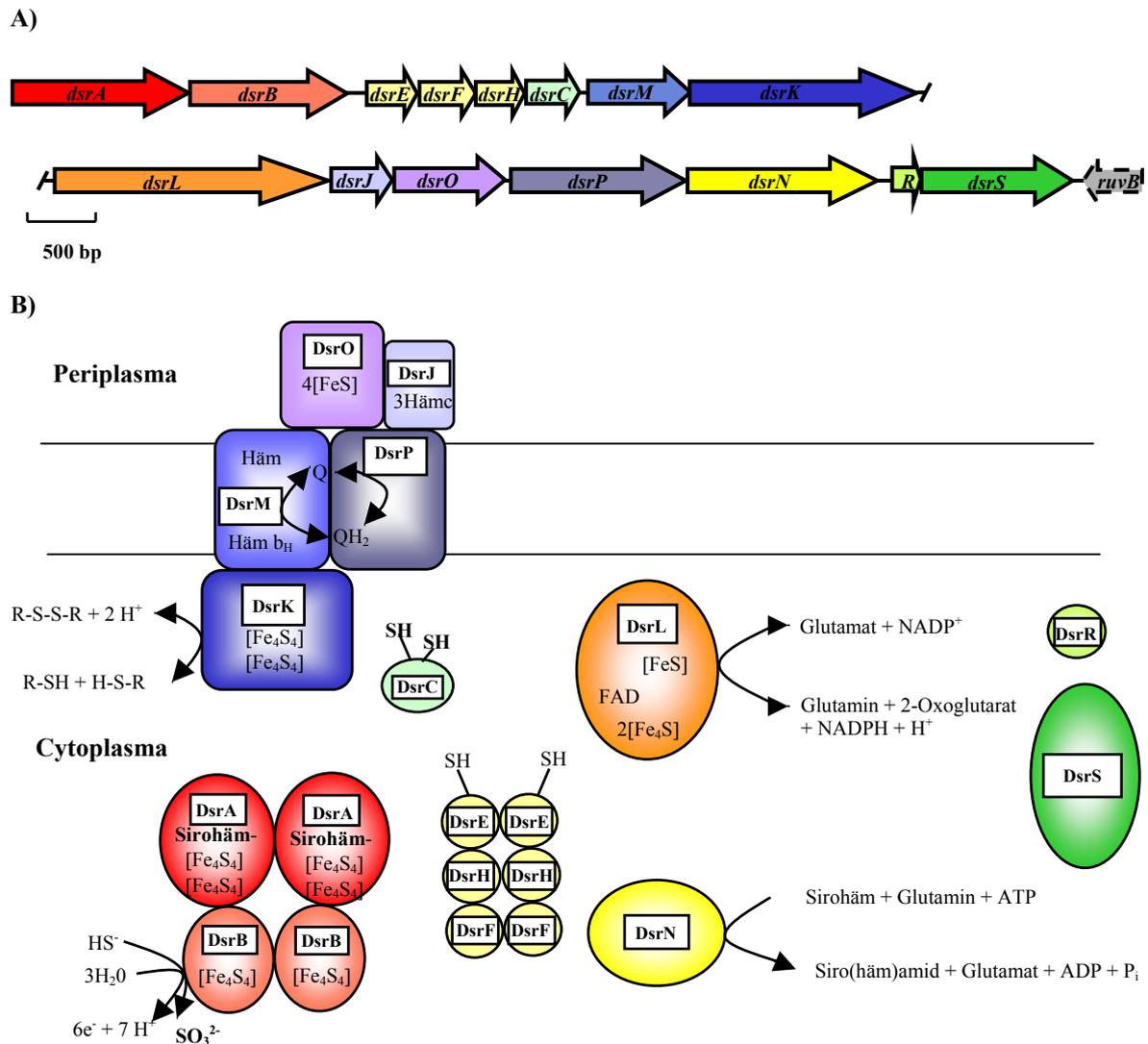


Abb.1.2: A) Das *dsr*-Operon in *Allochromatium vinosum*, B) Schematische Darstellung der Dsr-Proteine aus *Allochromatium vinosum*, nach Dahl et al. (2005).

Bei DsrC handelt es sich ebenfalls um ein kleines cytoplasmatisches Protein ohne prosthetische Gruppe. Neuere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei DsrC möglicherweise um ein Homodimer handelt (Andrea Schulte, pers. Mitteilung). Signifikante Homologien wurden u.a. zu den *dsy(r)C*-Genprodukten aus *Desulfovibrio vulgaris* (Karkhoff-Schweizer et al., 1993), *Pyrobaculum islandicum* (Molitor et al., 1998) und *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997) gefunden, die aus einigen Sulfatreduzieren zusammen mit der Sulfitreduktase gereinigt wurden (Arendsen et al., 1993; Pierik et al., 1992; Steuber et al., 1995). Die Konservierung von zwei bzw. einem Cysteinrest im C-Terminus der DsrC-homologen Proteine lässt auch in diesem Fall eine katalytische Funktion vermuten (Pott und Dahl, 1998; Pott-Sperling, 2000). Die Proteine DsrMKJOP bilden vermutlich einen transmembranen Redox-Komplex, der Ähnlichkeiten zu dem Hme-Komplex aus *A. fulgidus* (Klenk et al., 1997; Mander et al., 2002) und dem Hmc-Komplex aus

D. vulgaris (Rossi et al., 1993) aufweist (Dahl et al., 2005), die als membrangebundene Enzymkomplexe aufgereinigt werden konnten. Möglicherweise ist dieser Komplex (oder Teile des Komplexes) in den Elektronentransport von der Sulfitreduktase zum Chinonpool der Membran involviert (Dahl et al., 2005). DsrR und DsrS sind vermutlich cytoplasmatische Proteine mit bisher unbekannter Funktion. In dem kürzlich sequenzierten Genom von *T. denitrificans* konnten ebenfalls zu *dsrR* und *dsrS* homologe Gene in Verbindung mit anderen *dsr*-Genen detektiert werden (Dahl et al., 2005). Durch die Untersuchung von „in frame“-Deletionsmutanten konnte nachgewiesen werden, dass DsrR und DsrS zwar nicht essentiell, aber doch maßgeblich an der Schwefeloxidation beteiligt sind (Grimm, 2004).

Die *dsrN*-Sequenz kodiert für ein ~ 50 kDa grosses, wahrscheinlich cytoplasmatisch lokalisiertes Protein, das vermutlich keine prosthetischen Gruppen enthält (Pott-Sperling, 2000). Signifikante Homologien wurden zu dem hypothetischen Genprodukt von *dsrN* aus *Desulfobacter vibrioformis* (Larsen et al., 2000) gefunden, das wie *dsrN* aus *A. vinosum* zusammen mit *dsrA* und *dsrB* in einem Operon liegt. Die beiden hypothetischen DsrN-Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu eubakteriellen und archaealen Cobyrinsäure-a,c-Diamidsynthasen, Enzyme, die in die Vitamin B₁₂-Synthese involviert sind. Diese katalysieren die Amidierung von Cobyrinsäure zu Cobyrinsäure-a,c-Diamid, bei der zwei Moleküle Glutamin zu zwei Molekülen Glutamat umgesetzt werden (Crouzet et al., 1990; Debussche et al., 1990; Scott und Roessner, 2002). Da wie oben erläutert in verschiedenen *Desulfovibrio*-Arten Siro(häm)amid als prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase nachgewiesen wurde (Matthews et al., 1995), wurde postuliert, dass DsrN möglicherweise die Amidierung des Sirohäm zum Siro(häm)amid katalysiert (Dahl et al., 2005; Larsen et al., 2000).

DsrL ist ein ~ 72 kDa grosses Protein, das aufgrund des Fehlens von Signalsequenzen vermutlich im Cytoplasma lokalisiert ist (Pott-Sperling, 2000). Für das zu DsrL homologe Protein GltA aus *Thermococcus kodakarensis* (früher *Pyrococcus* sp. KOD1, (Atomi et al., 2004)), das wie DsrL hohe Homologien zu den kleinen Untereinheiten von Glutamatsynthasen aufweist, konnte sowohl eine Glutamin- als auch eine Ammonium-abhängige Glutamatsynthaseaktivität nachgewiesen (Jongsareejit et al., 1997). In Anbetracht der möglicherweise von DsrN katalysierten Glutamin-abhängigen Amidierungsreaktion wurde vermutet, dass DsrL in einer umgekehrten Glutamatsynthasereaktion das Glutamin für diese Reaktion zur Verfügung stellt (Pott-Sperling, 2000). Glutamatsynthasen sind komplexe Eisen-Schwefel-Flavoproteine die den reduktiven Transfer der L-Glutaminamidgruppe auf das C2-Atom von 2-Oxoglutarat katalysieren (Vanoni und Curti, 1999). Bakterielle Glutamatsynthasen bestehen aus zwei Untereinheiten, die ein katalytisches

$\alpha\beta$ Protomer bilden, das ein FAD, ein FMN und drei verschiedene FeS-Cluster enthält. Die Glutamin-Amidotransferase-Domäne ist in der größeren α -Untereinheit lokalisiert, die β -Untereinheit enthält neben FAD und FeS-Clustern die NADP(H)-Bindestelle (Vanoni und Curti, 1999; Vanoni und Curti, 2005). Wie die kleinen β -Untereinheiten der Glutamatsynthasen weist die Sequenz von DsrL zwei Dinukleotid- und ein FAD-Bindemotiv auf. Sequenzanalysen ließen vermuten, dass DsrL NADP(H) gegenüber NAD(H) bevorzugt (Dahl et al., 2005). Im N-Terminus enthält die DsrL-Sequenz wie die β -Untereinheiten der Glutamatsynthasen zwei Cysteincluster, die auf die Bindung von Eisen-Schwefel-Zentren hindeuten. In DsrL fehlt jedoch einer der konservierten Reste im ersten Cluster. Im C-Terminus, der den kleinen Untereinheiten der Glutamatsynthasen fehlt, enthält die DsrL-Sequenz zwei weitere Cysteincluster (CX₂CX₂CX₃CP), die auf die Bindung weiterer [4Fe-4S]-Cluster hindeuten (Pott-Sperling, 2000).

In dieser Arbeit sollten die aufgrund von Sequenzhomologien aufgestellten Vermutungen über die Eigenschaften und Funktionen von DsrN und DsrL in *A. vinosum* näher untersucht werden. Als erster Schritt sollte geklärt werden, ob Sirohäm oder Siro(häm)amid als prosthetische Gruppe in der Sulfitreduktase vorhanden ist. Diese Annahme bildet den Ausgangspunkt für die postulierten Funktionen der beiden Proteine. Die Charakterisierung von DsrN und DsrL sollte dann sowohl auf biochemischer als auch auf molekulargenetischer Ebene erfolgen. Die Lokalisation sowie der Nachweis der Proteine und der aufgrund der Sequenz postulierten Größen und prosthetischen Gruppen (nur DsrL) sollte bestimmt werden. Der Nachweis sollte mit in *E. coli* überproduziertem und/oder nativem Protein aus *A. vinosum* durchgeführt werden. Im Falle von DsrL sollte die vermutete Glutamatsynthaseaktivität zum einen durch einen Enzymtest mit aufgereinigtem rekombinanten bzw. nativem DsrL aus *A. vinosum* nachgewiesen werden, zum anderen durch die Komplementation eines Glutamatsynthase-defizienten *E. coli*-Stammes. Für die Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene sollten „in frame“-Mutanten konstruiert werden, in denen das jeweilige Gen so deletiert werden sollte, dass der Leserahmen des Operons nicht zerstört wurde. In den bisher durch Interposonmutagenese hergestellten Mutanten traten polare Effekte hinsichtlich der Expression der anderen Dsr-Proteine auf (Pott, 1996; Pott-Sperling, 2000), so dass der Phänotyp nicht auf die Funktion eines einzelnen Gens zurückgeführt werden konnte. Die Charakterisierung der „in frame“-Mutanten in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Oxidation akkumulierten Schwefels sollte Aufschluss darüber geben, welche Rolle DsrN und DsrL im oxidativen Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* spielen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

Tab. 2.1: *Allochrochromatium vinosum*-Stämme

| Stamm | Genetische Marker | Referenz |
|--|---|----------------------------|
| <i>A. vinosum</i> DSM 180 ^T | Wildtyp | (Pfennig und Trüper, 1971) |
| <i>A. vinosum</i> Rif50 | Rifampicin-resistente Spontanmutante des <i>A. vinosum</i> Wildtyp DSM 180 ^T (= Rif50) | diese Arbeit |
| <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrL$ | Rif50; $\Delta dsrL$ (Deletion: 1443 bp des <i>dsrL</i> -Gens) | diese Arbeit |
| <i>A. vinosum</i> $\Delta dsrN$ | Rif50; $\Delta dsrN$ (Deletion: 1281 bp des <i>dsrN</i> -Gens) | diese Arbeit |

Tab. 2.2: *Escherichia coli*-Stämme

| Stamm | Genetische Marker | Referenz |
|-----------------------------|---|---|
| <i>E. coli</i> DH5 α | F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA relA1</i> | (Hanahan, 1983) |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm met</i> (DE3) | Novagen (Madison) |
| <i>E. coli</i> S17.1 | 294 (<i>recA pro res mod⁺</i>) Tp ^r Sm ^r (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7) | (Simon et al., 1983) |
| <i>E. coli</i> EB5001 | F ⁻ , <i>psiQ39::Mud1I-1734</i> (<i>gltD::Mud1I-1734</i>); aus Wildtyp W3110 hergestellt | (Metcalf et al., 1990), (Goss et al., 2001) |
| <i>E. coli</i> K12 | Wildtyp | DSM 498 |

2.2 Vektoren

Tab. 2.3: Verwendete Vektoren und erzeugte Hybridplasmide für die Herstellung von „in frame“-Deletionsmutanten, die Komplementation von Mutanten und die Expression von Genen.

| Vektor | Charakteristika | Referenz |
|-----------------------|---|----------------------------|
| pET15b | Ap ^r ; Expressionsvektor mit N-terminalem His ₆ -Tag | Novagen (Madison, USA) |
| pET11a | Ap ^r ; Expressionsvektor | Novagen (Madison, USA) |
| pMHE2 <i>crt</i> Km | Km ^r , <i>lacZ</i> , <i>crtD</i> Promotorregion, Mob ⁺ | (Fodor et al., 2004) |
| pK18 <i>obsacB</i> | Km ^r , <i>lacZ</i> , <i>sacB</i> , Mob ⁺ | (Schäfer et al., 1994) |
| pBBR1MCS2 | Km ^r , <i>lacZ</i> , Mob ⁺ | (Kovach et al., 1995) |
| pBAD22A | Ap ^r , <i>araC</i> , P _{BAD} -Promotor, | (Guzman et al., 1995) |
| pBluescript SK II (+) | Ap ^r , <i>lacZ</i> | Stratagene (Heidelberg, D) |
| pGEM-3Zf (+) | Ap ^r ; <i>lacZ</i> | Promega (Heidelberg, D) |
| pNEX5 | Ap ^r ; mit NEXf und NEXr amplifiziertes und nach Restriktion mit <i>NdeI/BamHI</i> in mit <i>NdeI/BamHI</i> restringierten pET15b kloniertes <i>dsrN</i> | diese Arbeit |
| pNEX8 | Ap ^r ; mit NEXf und NEXr amplifiziertes und nach Restriktion mit <i>NdeI/BamHI</i> in mit <i>NdeI/BamHI</i> restringierten pET11a kloniertes <i>dsrN</i> | diese Arbeit |
| pLEX2 | Ap ^r ; mit LEXf und LEXr amplifiziertes und nach Re- | diese Arbeit |

| Vektor | Charakteristika | Referenz |
|--------------------------|--|--------------|
| | Restriktion mit <i>NdeI/BamHI</i> in mit <i>NdeI/BamHI</i> restringierten pET15b kloniertes <i>dsrL</i> | |
| pMHE2crtKmdsrN | Km ^r ; mit <i>dsrNHindIII</i> f und NEXr amplifiziertes und nach Restriktion mit <i>HindIII/BamHI</i> in mit <i>HindIII/BamHI</i> restringierten pMHE2crtKm kloniertes <i>dsrN</i> | diese Arbeit |
| pK18mobsacBΔ <i>dsrN</i> | Km ^r , mit NXbaA/Nrev3 wurde Fragment 1 (1572 bp), mit NxbaD/Nfor3 wurde Fragment 2 (1249 bp) amplifiziert, beide dienten als Matrize für die PCR von Fragment 3 mit NXbaA/NxbaD; das 2,8 kb mit <i>XbaI</i> restringierte PCR-Fragment 3 (Deletion von <i>dsrN</i> : 1281 bp) wurde in mit <i>XbaI</i> restringierten pK18mobsacB kloniert | diese Arbeit |
| pK18mobsacBΔ <i>dsrL</i> | Km ^r , mit LXbaA/Lrev2 wurde Fragment 1 (1532 bp), mit LxbaD/Lfor2 wurde Fragment 2 (1494 bp) amplifiziert, beide dienten als Matrize für die PCR von Fragment 3 mit LXbaA/LxbaD; das 3 kb mit <i>XbaI</i> restringierte PCR-Fragment 3 (Deletion von <i>dsrL</i> : 1443 bp) wurde in mit <i>XbaI</i> restringierten pK18mobsacB kloniert | diese Arbeit |
| pNEX5P _{dsr} | Ap ^f , mit Dsr-Promotor-forw und Dsr-Promotor-rev amplifiziertes <i>dsr</i> -Promotorfragment und nach Restriktion mit <i>XbaI/NdeI</i> in mit <i>XbaI/NdeI</i> restringierten pNEX5 kloniert (Klonierungsstrategie s. Abb. 3.16.) | diese Arbeit |
| PLEX2P _{dsr} | Ap ^f , mit Dsr-Promotor-forw und Dsr-Promotor-rev amplifiziertes <i>dsr</i> -Promotorfragment und nach Restriktion mit <i>XbaI/NdeI</i> in mit <i>XbaI/NdeI</i> restringierten pLEX2 kloniert (Klonierungsstrategie s. Abb. 3.16.) | diese Arbeit |
| pBBR1MCS2 <i>dsrN</i> | Km ^r , mit den Primern Dsr-Promotor forw und pet15b rev aus pNEX5P _{dsr} amplifiziertes und über <i>XbaI/HindIII</i> in pBBR1MCS2 kloniertes <i>dsr</i> -Promotor + <i>dsrN</i> -Gen + Terminator-Fragment (Klonierungsstrategie s. Abb. 3.16.) | diese Arbeit |
| pBBR1MCS2 <i>dsrL</i> | Km ^r , mit den Primern Dsr-Promotor forw und pet15b rev aus pLEXP _{dsr} amplifiziertes und über <i>XbaI/HindIII</i> in pBBR1MCS2 kloniertes <i>dsr</i> -Promotor + <i>dsrL</i> -Gen + Terminator-Fragment (Klonierungsstrategie s. Abb. 3.16.) | diese Arbeit |
| pBAD <i>dsrL</i> | Ap ^f ; mit ComLf und ComLr amplifiziertes und nach Restriktion mit <i>NcoI/XbaI</i> in mit <i>NcoI/XbaI</i> restringierten pBAD22A kloniertes <i>dsrL</i> | diese Arbeit |

2.3 Oligonukleotide

Die Basenabfolge der Primer wurde anhand bekannter Sequenzen festgelegt. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) bezogen.

Tab. 2.4: Oligonukleotidprimer für die Herstellung von DNA-Sonden, Expressionsvektoren, Deletionsvektoren und Komplementationsvektoren (die Sequenzen der eingefügten Schnittstellen sind rot markiert).

| Oligonukleotid-Primer | Sequenz (5' → 3') | Referenz |
|-----------------------|---|---------------------------|
| NEXf | GCC GGC CTC ATA TGG CGT CGC TCT A | C. Dahl, pers. Mitteilung |
| NEXr | GTG AAC AGG GAT CCG CGC GCT TTC AG | C. Dahl, pers. Mitteilung |

| Oligonukleotid-Primer | Sequenz (5' → 3') | Referenz |
|-----------------------|--|---------------------------|
| dsrNHindIII | CAA GCC GGA AGC TTA TGG CGT CGC TC | diese Arbeit |
| LEXf | AGA ACG ATT CAT ATG GCG ACT TCC AGC | C. Dahl, pers. Mitteilung |
| LEXr | CCT CCA GGA TCC TCA CTC GCC CAG | C. Dahl, pers. Mitteilung |
| LxbaA | CGT CAA GGT CTA GAA TCC GAT CGA TGA GGA GG | diese Arbeit |
| LxbaD | CGT GCC CCT CTA GAC CGA GTT GTT CAT GCC G | diese Arbeit |
| Lfor2 | GCG TAT CAA CTG CGT ATC AAG ATG GGT CTG G | diese Arbeit |
| Lrev2 | CCA GAC CCA TCT TGA TAC GCA GTT GAT ACG C | diese Arbeit |
| NxbaA | GGG CTG TGT CTA GAG CTG CAA TCT GTG C | diese Arbeit |
| NxbaD | GTC GAG GAT CTA GAG CAG GAC ATC CTG GTT GG | diese Arbeit |
| Nfor3 | GGT CTT TGT CGT GAA CAT ATT CGT CGC ACG | diese Arbeit |
| Nrev3 | CGT GCG ACG AAT ATG TTC ACG ACA AAG ACC | diese Arbeit |
| Dsr-Promotor-forw | GAT GGC GAT CTA GAC GAA TGA CTT CAT GG | diese Arbeit |
| Dsr-Promotor-rev | TCG ATA GCC ATA TGG CGG TCT CTC CTA TCG AT | diese Arbeit |
| pet5b rev | ATC CGG ATA AGC TTC CTC CTT TCA GCA AA | diese Arbeit |
| ComLf | AAC GAT TGC CAT GGC GAC TTC C | diese Arbeit |
| ComLr | CAT CGA CGT CTA GAG GGG CCT C | diese Arbeit |

2.4 Chemikalien, Enzyme, Kits und sonstige Materialien

2.4.1 Chemikalien

| | |
|--------------------------------------|--|
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) | Roth (Karlsruhe, D) |
| 4 x Rotiload | Roth (Karlsruhe, D) |
| 4-Chloro-1-Naphthol | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Agarose | Gibco/Invitrogen Corporation (Paisley, UK) |
| Ampicillin (Na-Salz) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Anti-Digoxigenin-AP | Roche (Mannheim, D) |
| APS | Roth (Karlsruhe, D) |
| Blocking Reagenz | Roche (Mannheim, D) |
| Bradford-Reagenz | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| CSPD | Roche (Mannheim, D) |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate | Fermentas (St.Leon-Rot, D) |
| Dig-dUTP | Roche (Mannheim, D) |
| EDTA | Gibco/Invitrogen (Paisly, UK) |
| Entwickler | Kodak (Rochester, USA) |
| Fixierer | Kodak (Rochester, USA) |
| HEPES | Roth (Karlsruhe, D) |
| IPTG | Roth (Karlsruhe, D) |

| | |
|--|--------------------------------|
| Kanamycinsulfat | Gibco/Invitrogen (Paisley, UK) |
| Methanol (HPLC-grade) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Monobrombiman | Fluka (Buchs, CH) |
| Natriumcyanid | Merck (Darmstadt, D) |
| Natriumrhodanid | Fluka (Buchs, CH) |
| N-Laurylsarcosin | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) | Gibco/Invitrogen (Paisley, UK) |
| Phytigel | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Rifampicin | Fluka (Buchs, CH) |
| SDS | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Sulfat | Merck (Darmstadt, D) |
| Sulfid | Fluka (Buchs, CH) |
| Sulfit | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| TEMED | Roth (Karlsruhe, D) |
| X-Gal | Roth (Karlsruhe, D) |

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe, D), Fluka (Buchs, CH), Sigma-Aldrich (Steinheim, D) und Merck (Darmstadt, D) bezogen.

2.4.2 Enzyme und Proteine

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Alkalische Phosphatase | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Roth (Karlsruhe, D) |
| BSA-Proteinstandard | Pierce (Rockford, USA) |
| Lysozym | Fluka (Buchs, CH) |
| Restriktionsenzyme | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Restriktionsenzyme | Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| Ribonuclease A | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| <i>Taq</i> -Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| T4-Ligase | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |

2.4.3 Verwendete Kits

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| BCA Protein Assay Reagent Kit | Pierce (Rockford, USA) |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen (Hilden, D) |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen (Hilden, D) |

2.4.4 Sonstige Materialien

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1 kb DNA-Leiter | Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| Anaerokult | Merck (Darmstadt, D) |
| Anaerotest | Merck (Darmstadt, D) |
| Cellulose-Nitrat-Filter | Sartorius (Göttingen, D) |
| Cellulosenitrat-Membran | Schleicher & Schuell (Dassel, D) |
| Centricon | Millipore (Bedford, USA) |
| Dialyseschläuche | Roth (Karlsruhe, D) |
| DNA-Größenstandard (1 kb) | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Kohlendioxid | Air Products (Hattingen, D) |
| Nylon-Membran | Schleicher & Schuell (Dassel, D) |
| Prestained Protein Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Röntgenfilme X-OMAT AR | Kodak (Rochester, USA) |
| Sterilfilter (0,2 µm) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Stickstoff | Air Products (Hattingen, D) |
| Whatman 3MM-Papier | Whatman (Maidstone, UK) |

2.5 Verwendete Internetprogramme und Computersoftware

Tab. 2.5: Internetprogramme und Computersoftware

| Programm | Funktion | Quelle |
|-------------------------------|---|---|
| BLAST | Sequenzvergleiche von DNA- oder Proteinsequenzen mit Genbankeinträgen | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST |
| Clonemanager 5.03 | Sequenzbearbeitung und Erstellung von Vektorkarten | Scientific & Educational Software |
| ClustalW | Alignments von Aminosäuresequenzen | http://align.genome.ip/ |
| Entrez | Sequenzdatenbank | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ |
| Expasy | Zugang zu Internetprogrammen zur DNA- und Protein-Analyse | http://www.expasy.ch |
| Microsoft Office 2002 | Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Erstellen von Präsentationen | Microsoft Corporation |
| Agilent Technologies Software | Software zur Ansteuerung des 8453 Diode Array Spektralphotometer | Agilent Technologies, Böblingen, D |
| PC 1000 | Ansteuerung der HPLC | Thermo Separation Products Inc. |
| Tigr | Datenbank zu Genomprojekten | |
| UV Winlab 2.80.03 | Software zur Ansteuerung des UV/VIS Spektralphotometers Lambda 11 | Perkin-Elmer (Düsseldorf) |
| Virtual Genome Center | Berechnung der Schmelztemperatur von Oligonukleotiden (T_m) | http://alces.med.umn.edu/VGC.html |

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 *Allochromatium vinosum*

2.6.1.1 Kultivierung von *A. vinosum*

A. vinosum wurde photoorganotroph auf RCV-Medium (Weaver et al., 1975) oder photolithoautotroph auf Pfennig-Medium (Pfennig und Trüper, 1992) bzw. Thiosulfatmedium (Sperling, 2001) angezogen.

- RCV-Medium:** 50 ml Räh-Medium, 0,5 g Hefeextrakt ad 950 ml aqua dest., pH mit NaOH-Plätzchen auf 7,5 einstellen; 50 ml KPP-Puffer (steril) nach Autoklavieren und Abkühlen dazugeben
- Räh-Medium:** 20 g Ammoniumsulfat, 75 g Malat, 4 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 1 g Calciumchlorid-Dihydrat, 4 ml Spurenelementelösung SLA, ad 1 l aqua dest.; Lagerung unsteril bei 4°C
- KPP-Puffer:** 180 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat/ Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer, pH 7,0, Lagerung unsteril bei RT
- Spurenelement-Lösung** 3,0 g EDTA-Na₂ x 2 H₂O, 1,1 g FeSO₄ x 7 H₂O, 42 mg ZnCl₂, 50 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 300 mg H₃BO₃, 190 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 2 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 24 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 18 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O ad 1000 ml aqua dest., Lagerung unsteril bei 4°C
- SL 12:**
- Pfennig-Medium, 10 l:** Die Salzlösung wurde im 10 Liter-Carboy angesetzt und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung wurden unter Stickstoffbegasung die getrennt autoklavierten Lösungen Phosphat-, Carbonat- und Sulfidlösung (in dieser Reihenfolge) zugegeben. Dann wurde das Medium solange mit Kohlendioxid durchgeblasen bis es klar wurde. Der pH-Wert wurde dadurch auf pH 6,8 – 7,0 eingestellt. Das fertige Medium wurde steril in sterile Schraubdeckelflaschen abgefüllt und vor Gebrauch mindestens eine Nacht im Dunkeln bei RT aufbewahrt
- O-Medium:** = Pfennigmedium ohne Zugabe von Sulfidlösung
- Salzlösung:** Angesetzt im 10 Liter Carboy: 3,3 g KCl, 3,3 g MgCl₂ x 6H₂O, 4,3 g CaCl₂ x H₂O, 3,3 g NH₄Cl, 10 ml Spurenelement-Lösung SLA, ad 7750 ml aqua dest; unter Stickstoff-Atmosphäre abkühlen

| | |
|--|--|
| <u>Phosphatlösung:</u> | 3,3 g KH_2PO_4 in 1000ml aqua dest. autoklaviert |
| <u>Carbonatlösung:</u> | 15 g NaHCO_3 in 1000 ml aqua dest. autoklaviert |
| <u>Sulfidlösung:</u> | 12 g $\text{NaS}_2 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml aqua dest. in randvoller, verschlossener Flasche autoklaviert |
| <u>Thiosulfatmedium:</u> | Die Lösung 1 wurde im 10 l Carboy angesetzt und autoklaviert: Nach Abkühlen der Lösung wurde unter Stickstoffbegasung die getrennt autoklavierte Lösung 2 zugegeben. Das fertige Medium wurde entweder sofort zur Kultur im 10 l Fermenter gebraucht, oder steril in sterile 1 l Flaschen (randvoll!) abgefüllt und im Dunkeln gelagert. |
| <u>Lösung 1:</u> | Angesetzt im 10 l Carboy: 100 ml 100 x Makroelementelösung ad. 9500 ml aqua dest., autoklaviert. |
| <u>Lösung 2:</u> | 26,5 g Na_2CO_3 , 21 g NaHCO_3 , 31 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 25 ml Sulfidlösung ad 500 ml aqua dest., autoklaviert. |
| <u>Sulfidlösung:</u> | 18,5 g $\text{HNaS} \times 1 \text{H}_2\text{O}$, Lagerung unsteril bei 4°C. |
| <u>100 x Makroelementelösung:</u> | 100 g KH_2PO_4 , 70 g NH_4Cl , 40 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 100 ml 10 x Spurenelementelösung SL 12 (s.o.), 193 ml HCl_{konz} ad 1000 ml aqua dest. |

A. vinosum wurde als Flüssigkultur in randvollen Glasröhrchen oder Kulturflaschen mit gasdichtem Schraubverschluss kultiviert. Frisches Medium wurde 10%ig mit der Vorkultur beimpft und bei 30 °C und einer Beleuchtungsstärke von 1000-2000 lux (15-20 cm vor einer 60 Watt Glühbirne) für 3-5 Tage inkubiert.

Für die Kultivierung auf Festmedium und die Selektion von Deletionsmutanten wurden Phytageplatten eingesetzt. Diese bestanden aus RCV-Medium dem 0,5 % NaCl und 1 % Phytigel zugesetzt wurde. Außerdem wurde dem Medium nach dem Autoklavieren (und vor dem Gießen) 10 mM Na-Acetat, 0,1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und 0,2 % Futterlösung zugegeben.

Futterlösung: 3,1 g $\text{HNa}_2\text{S} \times 1 \text{H}_2\text{O}$, 5 g NaHCO_3 ad 100 ml aqua dest., autoklaviert

Die Platten wurden unmittelbar nach Verfestigung des Mediums verwendet. Die Inkubation der Platten erfolgte unter anoxischen Bedingungen im Anaerobiertopf bei 30 °C im Licht.

Zur Selektion von Mutanten, die eine bestimmte Antibiotikaresistenz aufweisen sollten, wurde dem Medium die entsprechende Konzentration des Antibiotikums zugegeben: Rifampicin: 50 µg/ml (gelöst in Methanol); Kanamycin: 10 µg/ml (gelöst in aqua dest.).

Kulturen von *A. vinosum* wurden regelmäßig auf mögliche Kontaminationen überprüft, indem sie auf LB-Medium ausplattiert und unter oxischen Bedingungen inkubiert wurden.

2.6.1.2 Konservierung von *A. vinosum*-Stämmen

Allochromatium vinosum Wildtyp DSM 180^T und die in dieser Arbeit hergestellten Mutantenstämme wurden zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurde eine 3-5 Tage alte, gut gewachsene 100 ml RCV-Flüssigkultur abzentrifugiert (4000 Upm, 10 min, RT), das Pellet in ca. 6 ml des abzentrifugierten Mediums resuspendiert und zu je 900 µl auf sterile Nunc-Röhrchen (CryoTubes) aufgeteilt. Nach Zugabe von 900 µl sterilem 10%igem DMSO wurden die Röhrchen fest verschraubt im Stickstoffbehälter eingelagert.

2.6.1.3 Herstellung einer Rifampicin resistenten *A. vinosum* Mutante

Rifampicin: 0,25 g/10 ml Methanol

Für die Herstellung einer Rifampicin resistenten *A. vinosum* Mutante wurde der *A. vinosum* Wildtyp-Stamm (DSM 180^T) verwendet. Dieser wurde auf Phytigelplatten (s. 2.6.1.1.) mit verschiedenen Konzentrationen Rifampicin (10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml) ausplattiert. Erhaltene Kolonien wurden dann auf Platten, die je 10 µg/ml Rifampicin mehr als in der Ausgangskultur enthielten, ausplattiert, bis eine Kolonie erhalten wurde, die auf 50 µg/ml Rifampicin wachsen konnte. Diese wurde dann auf 50 ml RCV-Flaschen hochgezogen. Die fertige Mutante wurde als *A. vinosum* Rif50 bezeichnet.

2.6.1.4 Fermenterversuche zur Charakterisierung von *A. vinosum* Deletionsmutanten

Versuche zur Charakterisierung von *A. vinosum* *dsrL*- und *dsrN*-Deletionsmutanten in Bezug auf den Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen wurden in einem auf 30 °C temperierten 1,5 l Glasfermenter durchgeführt. Eine anoxische Atmosphäre wurde durch das Durchblasen des Mediums während des Animpfens mit N₂ und das Anhängen eines mit N₂ gefüllten Ballons an den Fermenter während der Kultur gewährleistet. Die Zellen einer photoheterotroph angezogenen vier Tage alten Vorkultur wurden in sterilen Zentrifugenbechern abzentrifugiert (15 min, 7000 Upm) und das Pellet in wenig Restmedium (~ 20 ml) resuspendiert. Damit wurde die Kulturflüssigkeit des Fermenters beimpft. Als Kulturflüssigkeit wurde O-Medium verwendet, dem

steril verschiedene Mengen der Sulfidlösung (s. 2.6.1.1) zugegeben wurden, um den Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen unter unterschiedlichen Sulfidkonzentrationen testen zu können. Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 7,0 eingestellt. Durch die angeschlossene pH-Regulierungseinheit (pH-mV Regler M7832N, Mostec, Liestal, CH) wurde der pH-Wert während der gesamten Kultivierungsdauer überwacht und gegebenenfalls mit 1M HCl bzw. 1M NaH₂CO₃-Lösung reguliert. Aus den Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und der Umsatz der reduzierten Schwefelverbindungen (s. 2.9), die OD (bei 690 nm) und der Proteingehalt (s. 2.8.6.2) bestimmt.

2.6.2 *Escherichia coli*

LB (Luria-Bertani)–Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,5; ad 1 l aqua dest (Miller, 1972)

NZCYM-Medium: 10 g Caseinhydrolysat, 5 g NaCl, 1 g Casaminoacids, 5 g Hefeextrakt, 2 g MgSO₄ x 7 H₂O, 2 g Maltose

W4-Minimalmedium: 10,5 g K₂HPO₄, 4,5 g KH₂PO₄, 0,1 g MgSO₄, pH 7,4

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten bei 37 °C; Flüssigkulturen wurden in LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 180 Upm über Nacht inkubiert. Zur Klonierung wurde *E. coli* DH5 α verwendet, die Expression von Proteinen wurde in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Für den Plasmidtransfer von *E. coli* nach *A. vinosum* wurde der *E. coli*-Stamm S17.1 eingesetzt. Die Expression von *dsrL* in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte in NZCYM-Medium, da in diesem Medium die größte Ausbeute an Protein erzielt wurde.

Experimente zur Komplementierung des Glutamatsynthase-defizienten *E. coli*-Stamms EB5001 mit dem *dsrL*-Gen aus *A. vinosum* wurden in W4-Minimalmedium durchgeführt, dem 0,2 % Glucose, 0,4 % Arabinose und 0,2 % Arginin zugesetzt wurden.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren (121 °C, 20 min) 1,5 % Agar zugesetzt. Selektionsplatten für die Anzucht von Klonen mit plasmidkodierten oder genomisch integrierten Resistenzen wurden mit den entsprechenden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen versehen: Ampicillin 100 μ g/ml (in aqua dest. gelöst), Kanamycin 50 μ g/ml (in aqua dest. gelöst). X-Gal-Platten für die Blau-Weiß-Selektion transformierter *E. coli* DH5 α -Zellen wurden aus LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum, X-Gal (gelöst in N,N-Dimethylformamid) und IPTG (gelöst in aqua dest.) hergestellt. Die Endkonzentration von X-Gal nach Zugabe zu dem auf ca. 50 °C abgekühlten Agar betrug 80 μ g/ml, die

Endkonzentration von IPTG 0,5 mM. Den Flüssigmedien wurden jeweils kurz vor Gebrauch die Antibiotika in den benötigten Konzentrationen zugesetzt.

2.6.2.1 Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Glycerinlösung: 65 % Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 0,025 M Tris/HCl, pH 8, autoklaviert

E. coli-Kulturen konnten auf Agarplatten bei 4 °C für 1-2 Monate aufbewahrt werden. Zur Langzeitkultivierung wurden von den Stämmen Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Übernachtskulturen in LB-Medium in sterile 2 ml Kunststoffröhrchen 1:1 mit steriler Glycerinlösung gemischt und bei –20 °C bzw. –70 °C gelagert.

2.6.2.2 Plasmidtransfer von *E. coli* nach *A. vinosum*

Durch Konjugation ist es möglich Plasmid-DNA von *E. coli* nach *A. vinosum* zu übertragen (Pattaragulwanit und Dahl, 1995). Bei den übertragenen Plasmiden handelt es sich um Derivate des pk18*mobsacB* (Schäfer et al., 1994) und des pBBR1MCS2 (Kovach et al., 1995).

Als Plasmiddonor-Stamm dient der *E. coli* S17.1, der über Nacht mit dem zu konjugierenden Plasmid auf LB-Medium (+ entsprechendes Antibiotikum) bei 37 °C angezogen wurde, so dass sich die Zellen am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Diese wurden dann bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 in 3 ml RCV-Medium resuspendiert. Eine OD₆₀₀ von 0,1 entspricht bei *E. coli* etwa 10⁸ Zellen pro ml (Sambrook et al., 1989). Der Rezipientenstamm *A. vinosum* Rif50 wurde photoheterotroph in RCV-Medium mit Rifampicin (50 µg/ml) für ca. 3 – 4 Tage bis zu einer OD₆₉₀ von 1,0 bis 1,5 angezogen. Die Zellen sollten sich dann in der stationären Wachstumsphase befinden. Von der Kultur wurde die genaue OD bei 690 nm bestimmt. Die Gesamtzellzahl wurde nach Pattaragulwanit (1995) ermittelt. Etwa 12 x 10⁸ *A. vinosum* Zellen (1,0 – 1,5 ml) wurden in einem sterilen Mikroreaktionsgefäß 5 min bei 10000 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert und durch vorsichtiges Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren zweimal in 1 ml RCV-Medium gewaschen. Etwa 4 x 10⁸ *E. coli*-Zellen (0,5 ml) wurden zu den gewaschenen *A. vinosum*-Zellen (resuspendiert in 0,5 ml RCV-Medium) gegeben. Das Gemisch wurde erneut abzentrifugiert (5 min, 10000 Upm, RT) und der Überstand abgegossen. Die im Rücklauf resuspendierten Zellen wurden auf RCV-Agarplatten ausgelegte sterile Cellulose-Nitrat-Filter (Sartorius, Porengröße 0,45 µm) pipettiert. Die Platten wurden 2 – 3 Tage anaerob im Licht inkubiert. Die inkubierten Filter wurden dann in sterile 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und die Zellen mit 1 ml RCV-Medium von den Filtern gewaschen. Die Suspension

wurde in verschiedenen Konzentrationen auf Phytagelplatten (s. 2.6.1) ausplattiert, denen 50 µg/ml Rifampicin und 10 µg/ml Kanamycin zugesetzt wurden. Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit wurden außerdem einige Zellen auf Platten ohne Kanamycin ausplattiert und mindestens 5 Tage unter anoxischen Bedingungen im Licht bei 30 °C inkubiert.

2.7 Molekulargenetische Methoden

2.7.1 Methoden zur Präparation von DNA

2.7.1.1 Isolierung genomischer DNA aus *A. vinosum*

| | |
|--------------------------------------|---|
| <u>TE-Puffer:</u> | 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0 |
| <u>TES:</u> | 50 mM Tris-HCL, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.0 |
| <u>Saccharose-TES-Puffer:</u> | 20 % Saccharose in TES-Puffer |
| <u>Lysozym-Rnase-Lösung:</u> | 20 mg/ml Lysozym, 1 mg/ml RNase |
| <u>Sarcosin-Lösung:</u> | 10 % Laurylsarcosin, 250 mM EDTA |

Die Isolierung genomischer DNA aus *A. vinosum* wurde basierend auf der Sarkosyl-Lyse (modifiziert nach (Bazaral und Helinski, 1968)) mit anschließender Reinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Dialyse durchgeführt.

Für die DNA-Isolierung wurden 80 – 100 mg Zellmaterial aus RCV-Flüssigkulturen eingesetzt, die in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß mit 1 ml eiskaltem TES-Puffer resuspendiert und dann mit einem weiteren Milliliter TES-Puffer aufgefüllt wurden. Diese Zellsuspension wurde dann 10 min bei 4 °C und 8000 Upm (Heraeus 15 R Mikrozentrifuge) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 0,25 ml Saccharose-TES-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden 0,25 ml Lysozym-RNase-Lösung zugegeben und der Ansatz zur vollständigen Zelllyse für 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad leicht geschüttelt. Nach Zugabe von 0,1 ml Sarcosin-Lösung wurde der Ansatz geschwenkt. Es entstand eine viskose Masse. Die DNA wurde mit einer sterilen Spritze mit steriler Kanüle durch zehnmaliges Aufziehen und Herausdrücken geschert. Anschließend wurden 0,3 ml steriles Reinstwasser zugegeben und die DNA durch zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmalige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gereinigt (s. 2.7.1.2).

Zur weiteren Reinigung wurde die DNA in vorbereitete Dialyseschläuche (Servapor 12000-14000) gefüllt (s. 2.8.4) und einmal 3 h gegen TE-Puffer, einmal 12-15 h gegen TE-Puffer und einmal 2 h gegen steriles Reinstwasser dialysiert. Die DNA wurde anschließend in sterile Mikro-

reaktionsgefäße überführt, die Konzentration und Reinheit bestimmt (s. 2.7.1.5) und bei 4 °C gelagert.

2.7.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Bei dieser Methode werden durch Phenolisierung Proteine aus der Nukleinsäurelösung entfernt (Sambrook et al., 1989; Wallace, 1987).

Wässrige DNA-Proben wurden mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und stark geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugieren (5 min, 15000 Upm, RT) beschleunigt und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Extraktion in einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die obere Phase in gleicher Weise mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um Phenolreste aus der Probe zu entfernen. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Plasmid Kit (Quiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers. Das Kit beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und der spezifischen Adsorption von DNA an Silica-Gel bei hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979).

2.7.1.4 Ethanolfällung von DNA

Zur Konzentrierung und zum Umpuffern von DNA-Proben wurde die DNA durch Ethanol gefällt. Zur Präzipitation wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 – 3 Volumen eiskaltes Ethanol (absolut) zu der DNA-Lösung gegeben. Die Proben wurden durch Invertieren gemischt und dann für mindestens 30 min bei – 20 °C gefällt (Sambrook et al., 1989). Anschließend wurde die als Natriumsalz quantitativ gefällte DNA für 30 min bei 4 °C und 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet zweimal mit 0,2 – 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde im Heizblock bei 50 °C getrocknet und in dem gewünschten Volumen Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.7.1.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentration gelöster DNA erfolgte durch spektroskopische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm, der Wellenlänge, bei der Nukleinsäuren ein Maximum aufweisen. Nach dem

Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorption bis zu einem gewissen Maß direkt proportional zur Konzentration der absorbierenden Verbindung. Bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter entspricht ein Absorptionswert bei dieser Wellenlänge (260 nm) von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook et al., 1989). Um herauszufinden wie kontaminiert die Probe mit RNA oder Proteinen ist, also Substanzen die ebenfalls bei 260 nm absorbieren, wurde die Absorption auch bei 280 nm gemessen. Der Quotient E_{260}/E_{280} gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA-Lösung. Er sollte im Bereich von 1,8 – 2,0 liegen. Liegt der Wert höher ist die Probe mit RNA verunreinigt, tiefere Werte weisen auf Kontaminationen mit Proteinen hin.

2.7.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.2.1 Restriktion von DNA

Restriktionsansatz: 0,5 – 10 µg DNA, 1 x bzw. 2 x Reaktionspuffer, 3-5 U Enzym pro µg DNA, Reinstwasser ad 10 – 50 µl Endvolumen

Die *in vitro* Modifikation von DNA erfolgte mit Restriktionsendonucleasen der Firmen Gibco/Invitrogen (Paisley, UK) und Fermentas (St. Leon-Rot, D). Die Reaktionen wurden nach Angaben der Hersteller in spezifischen Puffern durchgeführt. In der Regel erfolgte die Inkubation der Proben für 2 - 16 h bei 37 °C. Sollten weitere enzymatische Modifikationen vorgenommen werden, wurde das Restriktionsenzym bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inaktiviert. Zur Überprüfung der restringierten DNA wurde diese in 1%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (2.7.4).

2.7.2.2 Ligation

Ligationsansatz: Verhältnis Vektor-DNA (~ 100 ng):Insert-DNA; 1:3 bis 3:1; 1 x T4-Ligase-Puffer, T4-DNA-Ligase 2-3 U, Reinstwasser ad 20 µl

Aufgereinigte und in Wasser aufgenommene DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) ligiert. Die Ligationsansätze wurden entweder für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor der Transformation der Ligationsansätze wurde die Ligase bei 65 °C 10 min inaktiviert, um die Transformationseffizienz zu erhöhen.

2.7.2.3 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Um eine Rezirkularisierung einfach geschnittener Vektoren durch die T4-Ligase zu vermeiden, wurden solche Ansätze vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (CIAP, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Fermentas, St. Leon-Rot) inkubiert. Das Enzym katalysiert dabei die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppen an den 5'-Enden der DNA-Moleküle. Das Enzym wurde nach Inaktivierung des Restriktionsansatzes in einer Konzentration von 0,25 – 0,5 U pro Ansatz eingesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 10 min auf 75 °C erhitzt und die DNA im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend aufgereinigt (s. 2.7.4.1).

2.7.3 *In vitro*-Amplifizierung von DNA durch PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen durch die zyklische Abfolge von Anlagerung von Oligonukleotiden (Primer) an die DNA, Verlängerung der Primersequenzen durch thermostabile DNA-Polymerase und die Denaturierung der Polymerisationsprodukte (Embury et al., 1987; Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1986).

2.7.3.1 Standard-PCR

In diesem Abschnitt ist die Standard-PCR dargestellt wie sie in den meisten Fällen eingesetzt wurde. Ausnahmen bzw. Modifikationen dieses Ansatzes sind unter den Punkten 2.7.3.2 - 2.7.3.4 aufgeführt. Die PCR wurde in 0,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen in einem 50 µl-Ansatz durchgeführt, der zur Vermeidung von Verdunstung mit Mineralöl überschichtet wurde. Die Reaktion wurde in einem TRIO-Thermoblock (LAB-Line Multi Block Heater) der Firma Biometra (Göttingen, D) durchgeführt. Für die Katalyse der Synthese wurde bei der PCR entweder die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt (*Taq*-Polymerase) oder die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerase). Die *Pfu*-Polymerase besitzt im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 3'-5'-Korrekturleseaktivität, was das Vorkommen von Sequenzfehlern in den Amplifikaten minimiert. Die *Pfu*-Polymerase wurde deshalb für die Amplifikation von Fragmenten verwendet, die für die Konstruktion von Expressions-, „Deletions“- und Komplementations-Vektoren eingesetzt wurden. Für alle anderen Anwendungen, wie die Überprüfung von Mutanten mittels PCR oder die Herstellung von DNA-Sonden wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Beide Enzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen. Die Einführung von Schnittstellen in die PCR-Amplifikate erfolgte durch die Verwendung

von mutagenen Primern. Dabei wurde der 15 - 18 Basenpaar langen Sequenz (Homolog zum Anfang oder Ende der zu amplifizierenden Sequenz) die Sequenz der Schnittstelle angehängt, gefolgt von weiteren 8 Basenpaaren der zu amplifizierenden Sequenz.

Im folgenden ist ein Standard-PCR-Ansatz dargestellt:

Standard-PCR-Ansatz :

| | |
|----------|---|
| 5 µl | 10x PCR-Puffer |
| 1,5 µl | Primer a (100 pmol/µl) |
| 1,5 µl | Primer b (100 pmol/µl) |
| 3 µl | MgCl ₂ (25 mM) |
| 2,5 µl | DMSO (100%ig) |
| 1 µl | dNTP-MIX (Mix aus je 10 mM dATP, dCTP, dGTP; dTTP) |
| 1 µl | DNA-Matrize (0,1 –0,5 µg/µl) |
| 1 µl | <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl) bzw. <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5U/µl) |
| ad 50 µl | Reinstwasser |

Standard-PCR-Programm:

| | | |
|----|----------------|------------------------------|
| 1. | 95 °C | Initialdenaturierung |
| 2. | 95 °C | Denaturierung |
| 3. | T _a | Primeranlagerung |
| 4. | 72 °C | Primer-Extension |
| 5. | | Schleife 4 an 2 (30 – 35x) |
| 6. | 72 °C | verlängerte Primer-Extension |
| 7. | 4°C | Programmende |

T_a: Anlagerungstemperatur der Primer

Die Anlagerungstemperatur der Primer (T_a) wurde in der Regel 2 - 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Die Schmelztemperatur der Primer wurde theoretisch entweder mit Hilfe der Internetseite des Virtual Genome Centers oder nach folgender Formel $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \times (\text{C} + \text{G})$ berechnet. Die Buchstaben stehen für die Anfangsbuchstaben der entsprechenden Basen.

2.7.3.2 Gene SOEing

Zur Herstellung von “in-frame”-Deletionsmutanten wurde die Methode des Gene SOEing (gene splicing by overlap extension) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine sequenzunabhängige PCR-Methode zur ortsgerichteten Mutagenese und Rekombination von DNA-Molekülen (Horton, 1995).

Zur gezielten Deletion eines Gens wurden DNA-Fragmente stromauf- und stromabwärts des entsprechenden Gens amplifiziert. Den dazu verwendeten Primern (b und c in Abb. 2.1) wurde die Sequenz des jeweils anderen Primers sozusagen als „Schwanz“ angehängt. Dadurch entstanden zwei Amplifikate mit zueinander komplementären Enden. Diese dienten sich gegenseitig in einer weiteren PCR (PCR3, Abb. 2.1) als Primer. Im folgenden Reaktionsschritt wurde das so erhaltene Fragment mit den äußeren Primern (a und d in Abb. 2.1) noch vervielfältigt. Das entstandene Fragment enthielt nun die ursprüngliche Sequenz mit der Deletion des gewünschten Gens. Durch die Wahl der Primer wurde sichergestellt, dass der Leserahmen der nachfolgenden Gene nicht verschoben wurde. Die Deletion wurde „in frame“ durchgeführt.

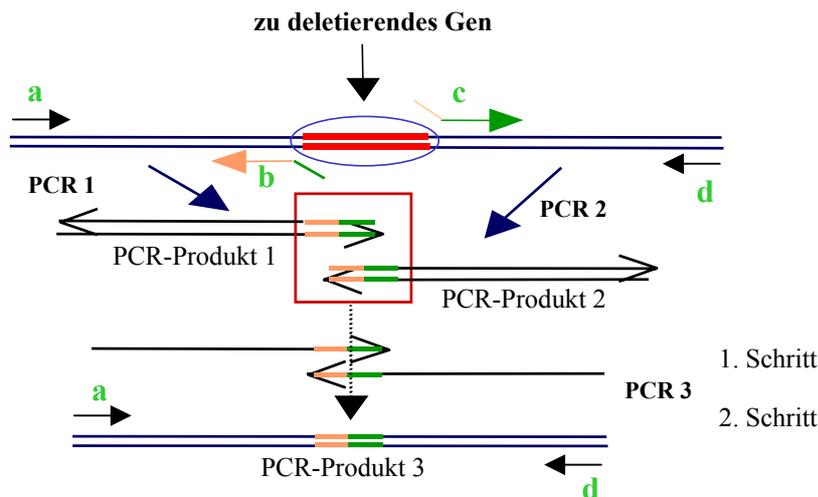


Abb.2.1: Schematische Darstellung des Gene SOEing (gene splicing by overlap extension) zur Erzeugung von „in-frame-Mutationen“; PCR 1 mit den Primern a und b ergibt das PCR-Produkt 1, PCR 2 mit den Primern c und d ergibt das PCR-Produkt 2. Die 3. PCR besteht aus zwei Schritten, in dem ersten erfolgt die Verlängerung der PCR-Produkte 1 und 2 die an jeweils einem Ende zueinander komplementär sind. Im zweiten Schritt erfolgt die Amplifikation des aus Produkt 1 und Produkt 2 entstandenen Fragments zum PCR-Produkt 3.

Die Ansätze der ersten beiden PCR's (PCR 1 und PCR 2 in Abb. 2.1) wurden nach den Angaben zur Standard-PCR durchgeführt (s. 2.7.3.1). Für die Auswahl der Anlagerungstemperatur der Primer wurde der angehängte komplementäre „Schwanz“ der Primer aus der Berechnung herausgenommen. Bei der dritten PCR wurden zwei verschiedene Syntheseschritte, mit zwei verschiedenen Primeranlagerungstemperaturen (T_a) durchgeführt. Die erste Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des Überlappungsbereiches, die zweite nach der Schmelztemperatur der äußeren Primer. Der Ansatz der dritten PCR erfolgte nach folgenden Angaben:

PCR 3 - Ansatz:

| | |
|---------------|---|
| 5 μ l | 10x PCR-Puffer |
| 1,5 μ l | Primer a (100 pmol/ μ l) |
| 1,5 μ l | Primer d (100 pmol/ μ l) |
| 3 μ l | MgCl ₂ (25 mM) |
| 2,5 μ l | DMSO (100%ig) |
| 1 μ l | dNTP-MIX (Mix aus je 10 mM dATP, dCTP, dGTP; dTTP) |
| 1 μ l | DNA-Fragment aus PCR 1* |
| 1 μ l | DNA-Fragment aus PCR 2* |
| 1 μ l | <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5U/ μ l) |
| ad 50 μ l | Reinstwasser |

PCR 3 - Programm:

| | |
|-----------|------------------------------|
| 1. 95 °C | Initialdenaturierung |
| 2. 95 °C | Denaturierung |
| 3. T_a | Primeranlagerung |
| 4. 72 °C | Synthesephase 1 |
| 5. | Schleife 4 an 2 (30 - 35x) |
| 6. 95 °C | Denaturierung |
| 7. T_a | Primeranlagerung |
| 8. 72 °C | Synthesephase 2 |
| 9. | Schleife 8 an 6 (15x) |
| 10. 72 °C | verlängerte Primer Extension |
| 11. 4 °C | Programmende |

* PCR-Fragmente wurden in 30 μ l Reinstwasser eluiert

2.7.3.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mit PCR

Die Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden erfolgte durch den Einbau von an dUTP gekoppeltes Digoxigenin (Dig-dUTP) in die PCR-Produkte während der Amplifikation (Seibl et al., 1990). Dabei wird das Dig-dUTP anstelle von dTTP in die PCR-Amplifikate eingebaut. Das

Digoxigenin (gewonnen aus *Digitalis purpurea*) wird über einen Spacerarm an dUTP gebunden. Um sterische Behinderungen zu verhindern, wurde Dig-UTP zu dTTP im Verhältnis 1:9 eingesetzt. Die PCR wurde bis auf eine Änderung wie unter 2.7.3.1 beschrieben durchgeführt. Statt der Endkonzentration von 200 μM dTTP wurden 160 μM dTTP und 20 μM Dig-dUTP eingesetzt. Neben dem Sonden-Ansatz wurde jeweils ein Kontrollansatz ohne Dig-dUTP mit 200 μM dTTP angesetzt. Nach der PCR wurden beide Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen, wobei Digoxigenin markierte Fragmente im Gel langsamer laufen als unmarkierte Fragmente. Die richtige Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Fragment in 50 μl rH₂O eluiert (s.2.7.4.3) und 20 min bei 100 °C in Vorhybridisierungslösung gekocht, bevor es zur Southern-Blot-Hybridisierung (Southern, 1975) (s. 2.7.6.1) verwendet wurde.

2.7.3.4 Kolonie-PCR

Zum schnellen Nachweis rekombinanter *A. vinosum*-Mutanten wurde die PCR mit ganzen Zellen durchgeführt. Das Zellmaterial wurde entweder aus Flüssigkultur oder von Platten entnommen. Bei der Verwendung von Zellen aus Flüssigkultur wurden 100 μl Kultur abzentrifugiert (5 min, 14000 Upm, RT), in 100 μl Reinstwasser gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50 μl Reinstwasser aufgenommen. 1 – 2 μl dieser Zellsuspension wurden als DNA-Matrize eingesetzt. Wenn Zellmaterial von Kolonien eingesetzt wurde, wurde direkt etwas Zellmaterial von der Platte entnommen und in 50 μl Reinstwasser resuspendiert. Dies konnte direkt als Matrize für die PCR-Reaktion eingesetzt werden. In beiden Fällen wurde der erste Denaturierungsschritt auf 10 min hochgesetzt und das Enzym wurde erst nach Ablauf dieser Zeit zugegeben.

2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

2.7.4.1 Agarose-Gelelektrophorese:

10 x Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA

Die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) wurde zu präparativen und analytischen Zwecken genutzt. 1 % Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen in eine vorbereitete Gelkammer gegossen (Horizon 58, Horizon 11.14; Gibco BRL, Eggenstein, D). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt. Neben den Proben wurde ein 1 kb Grössen-Standard (In-

vitrogen, Karlsruhe, D) aufgetragen. Die Spannungen wurden im Bereich von 20 bis 100 V angelegt.

2.7.4.2 Färbung von Agarosegelen mit Ethidiumbromid

Zum Anfärben der DNA in Agarosegelen wurden diese in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) unter leichtem Schwenken im Dunkeln für etwa 10 min inkubiert. Zum Entfernen nicht interkaliertem Ethidiumbromids aus den Gelen wurden diese anschließend mit aqua dest. gewaschen. Die gefärbten Gele wurden zur Auswertung auf einem Transilluminator im UV-Licht betrachtet und mit einem Videosystem der Firma INTAS dokumentiert.

2.7.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden, D) verwendet. Die Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.7.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

2 x YT-Medium: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 l aqua dest.

CaCl₂/MgSO₄-Lösung: 70 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄ (aus getrennt autoklavierten 1 M Stammlösungen durch Verdünnung in sterilem aqua dest. hergestellt)

Zur Herstellung von zur Aufnahme reiner DNA befähigter *E. coli*-Zellen (= kompetente Zellen) wurde die Calciumchloridmethode (Dagert und Ehrlich, 1974) verwendet. Für die Vorkultur wurden 5 ml 2 x YT mit einer Kolonie beimpft und über Nacht unter Schütteln (180 Upm) bei 37 °C angezogen. 70 ml 2 x YT-Medium im OD-Messkolben wurden mit 700 µl Vorkultur beimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 angezogen. Der Ansatz wurde in einer Sorvall-Zentrifuge bei 6000 Upm (4 °C, 6 min) in sterilen Röhrchen abzentrifugiert, das Pellet in 10,5 ml eiskalter CaCl₂/MgSO₄-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 6000 Upm, 4 °C) wurde das Sediment in 3,5 ml eiskalter CaCl₂/MgSO₄-Lösung aufgenommen und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 875 µl sterilem Glycerin versetzt, gemischt, aliquotiert und bei –70 °C gelagert.

2.7.5.2 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 5 bis 10 ng Plasmid-DNA zu 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und 20 – 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann 1,5 min bei 42 °C hitzegeschockt und anschließend 3 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert und dann auf LB-Platten mit geeigneten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.7.5.3 Identifizierung positiver Klone

Klonierungsvektoren der pBluescript- (Stratagene, Heidelberg, D) und der pGEM-Serie (Promega, Heidelberg, D) wurden in *E. coli* DH5α transformiert und auf X-Gal-Medium auf die vektorvermittelte Ampicillinresistenz selektiert. Die Insertion eines DNA-Fragmentes in die multiple Klonierungsstelle der Vektoren führt zur Unterbrechung im *lacZ*-Gen und damit zum Verlust der Fähigkeit zur α-Komplementation der β-Galaktosidase. Die Kolonien bleiben weiß, während sich Kolonien mit Vektoren ohne Insert blau verfärben. Bei Insertionen von Fremd-DNA in Expressionsvektoren der pET-Serie (Novagen, Madison, USA) und Vektoren der pBBR-Reihe (Kovach et al., 1995) wurde auf Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum auf die Aufnahme des Plasmids selektiert. Da Vektor- und Insert-DNA vor der Ligation immer mit jeweils zwei verschiedenen Enzymen restringiert wurden, war eine Religation des Vektors unwahrscheinlich.

2.7.6 DNA-DNA-Hybridisierung

Durch Southern-Blot-Hybridisierungen können im Agarosegel aufgetrennte Restriktionsfragmente, die zu einer bekannten DNA-Sequenz homolog sind, nachgewiesen werden (Southern, 1975; Southern, 1979; Vogelstein, Gillespie, 1979). Dazu werden die einzelsträngigen DNA-Stränge auf eine Membran übertragen, immobilisiert und mit einer markierten DNA-Sonde hybridisiert. Entstandene DNA-DNA-Hybride können dann anhand der Markierung der Sonde detektiert werden.

2.7.6.1 Übertragung von DNA auf Membranen (Southern-Blot)

| | |
|-------------------------------------|---|
| <u>Depurinierungslösung:</u> | 0,25 M HCL |
| <u>Transferpuffer:</u> | 0,4 M NaOH |
| <u>20 x SSC:</u> | 3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ -Citrat, pH 7,0 |
| <u>2 x SSC, 1 % SDS:</u> | 10 % 20 x SSC, 1 % (w/v) SDS |

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf eine Nylon-Membran (Sartolon, Sartorius, Göttingen, D) erfolgte nach der von Ausubel et al. (1997) als *downward-blot* beschriebenen Methode (s. Abb. 2.3.). Nach zweimaligem Waschen des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels in aqua dest., folgte ein weiterer Waschschrift des Gels für 15 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung der DNA-Fragmente. Als Transferpuffer diente 0,4 M NaOH. In dieser Lösung wurden alle Bestandteile des Blots, bis auf das unterste saugfähige Papier, vor dem Aufbau geschwenkt. Die erste Schicht des Blots bestand aus saugfähigem Papier, dann folgten zwei Lagen 3 MM Whatman-Papier, auf die die angefeuchtete Nylonmembran aufgelegt wurde. Darauf wurde das Agarosegel luftblasenfrei aufgelegt. Als oberste Schicht folgten wiederum zwei Lagen 3 MM Whatman-Papier (genau auf die Grösse des Gels zugeschnitten), denen zwei weitere Lagen 3 MM Whatman-Papier folgten, die als „Brücke“ die Verbindung zum Puffertank (0,4 M NaOH) herstellten. (s. Abb.2.2). Der DNA-Transfer auf die Membran erfolgte über 2 h. Danach wurden die Taschen auf der Membran markiert, die Membran kurz in 2 x SSC mit 1 % SDS geschwenkt, auf Whatman 3 MM-Papier gelegt und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200 μ J) in einem Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, USA) mit der Membran kreuzvernetzt. Die Membran wurde anschließend für die Hybridisierung verwendet.

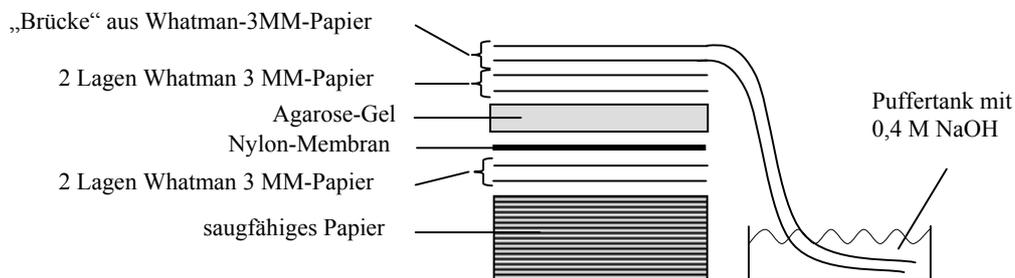


Abb. 2.2: Schematische Darstellung zum Aufbau des *downward-blot*.

2.7.6.2 Hybridisierung mit DIG-dUTP-markierter DNA-Sonde

Puffer 1: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7.5

Vorhybridisierungslösung: 20% Puffer 1, 25% 20x SSC, 0,1% N-Laurylsarcosin, 10% SDS, 2% Blocking-Reagenz

Hybridisierungslösung: 20 ml Vorhybridisierungslösung mit 20-200 ng/ml Gensonde

2 x SSC, 0,1 % SDS: 10% 20 x SSC, 0,1% (w/v) SDS

0,1 x SSC, 0,1 % SDS: 0,5% 20 x SSC, 0,1% (w/v) SDS

Für die Hybridisierungen wurden ein MWG Biotech- (Ebersberg, D) und ein Biometra- (Göttingen, D) Hybridisierungsöfen genutzt. Die Nylonmembran wurde zunächst mit 20 ml Vorhybridisierungslösung 3 - 4 h bei 60 – 68 °C vorhybridisiert. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung gegen die zuvor 15 min bei 100 °C (zur Denaturierung der DNA) erhitzte Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Membran damit etwa 16 h hybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung in ein steriles Falcon gegeben und bis zur erneuten Verwendung bei -20 °C gelagert. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch zweimaliges Waschen der Membran bei Raumtemperatur mit 2x SSC, 0,1 % SDS (je 5 min) und zweimaliges Waschen bei Hybridisierungstemperatur mit vorgewärmten 0,1x SSC, 0,1 % SDS (je 15 min) entfernt.

2.7.6.3 Chemilumineszenz-Detektion

| | |
|----------------------------|--|
| <u>Puffer 1:</u> | 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7.5 |
| <u>Puffer 2:</u> | 1% Blocking-Reagenz in Puffer 1 |
| <u>Puffer 3:</u> | 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ (MgCl ₂ erst nach dem Autoklavieren einwiegen, Lagerung bei 4 °C) |
| <u>Waschpuffer:</u> | 0,3 % Tween 20 in Puffer 1 |

Die Digoxigenin-markierten Sondenmoleküle auf der hybridisierten Membran können durch Chemilumineszenz-Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Digoxigenin nachgewiesen werden, die mit Molekülen von alkalischer Phosphatase verknüpft sind. Das zugegebene chemilumineszente Substrat CSPD wird von der alkalischen Phosphatase unter Freisetzung von Lichtenergie umgesetzt, die dann von einem Röntgenfilm erfasst wird.

Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran im Hybridisierungsöfen bei Raumtemperatur nacheinander mit folgenden Lösungen inkubiert:

1. 5 min Waschpuffer
2. 30 min Puffer 2
3. 30 min 15 ml Anti-Digoxigenin-AP-Antikörperkonjugat (1:17500 in Puffer 2)
4. 2 x 15 min Waschpuffer
5. 5 min Puffer 3
6. 10 min 15 ml 25 µM CSPD (in Puffer 3)

Die Membran wurde danach auf 3 MM-Whatman-Papier kurz angetrocknet und noch feucht mit dem Papier in eine Kunststoffolie eingeschweißt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak, Rochester, USA) aufgelegt und je nach Signalstärke 10 min bis mehrere Stunden exponiert.

2.7.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Proben wurden durch Auftragssequenzierung bei der Firma Sequiserve (Vaterstetten, D) sequenziert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die Überexpression rekombinanter Proteine wurde in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Dazu wurden die Gene der zu überproduzierenden Proteine (DsrL und DsrN) in die Vektoren pET11a und pET15b (Novagen, Madison, USA) kloniert. Unter Verwendung von mutagenen Oligonukleotiden wurden den Genfragmenten so Schnittstellen eingefügt, dass sie ohne Verschiebung des Leserahmens in die dafür vorgesehene Klonierungsstelle in den Vektoren eingefügt werden konnten. In dem Vektor pET15b wird dem Gen eine Sequenz aus 18 Basenpaaren vor dem Startcodon angehängt. Dadurch erhält das produzierte Protein einen N-terminalen Schwanz aus sechs Histidinresten, der die Aufreinigung des Proteins über eine Nickel-Chelatsäule ermöglicht (2.8.8.1). Die Expression in pET11a führte nicht zu Modifikationen am Protein, das Protein wurde entsprechend der Sequenz aus *A. vinosum* gebildet.

Expressionen in diesem System wurden mit wenige Tage alten Kolonien gestartet, da Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) nicht über Wochen bei 4 °C stabil sind. Für DsrN wurden 5 ml LB + Amp-Vorkulturen mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Für die Überexpression von DsrL wurden 25 ml NZCYM + Amp-Medium angeimpft und ebenso über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Überexpression von DsrL wurde NZCYM-Medium gewählt, da sich herausgestellt hat, dass die Ausbeute an überexprimiertem DsrL in diesem Medium am größten ist. Außerdem wurde zur Erhöhung der Ausbeute die Überexpression von DsrL im fünffachem Volumen im Vergleich zu DsrN durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen steril abzentrifugiert, in geringem Volumen LB + Amp bzw. NZCYM + Amp-Medium resuspendiert und als Inokulum für eine 100 ml LB-Amp-Kultur (DsrN) bzw. eine 500 ml NZCYM + Amp-Kultur (DsrL) eingesetzt. Die Anzucht der Expressionskultur erfolgte in Schüttelkolben bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8. Dann wurden noch einmal 100 µg/ml Ampicillin zu der Kultur gegeben und die Produktion der Proteine durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG gestartet. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C für die Produktion von DsrN und bei 30 °C für die Produktion von DsrL wurden die Kulturen gerettet (4 °C, 8000 Upm, 20 min) und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.2 Zellernte und Zellaufschluss

Bakterienkulturen wurden durch Zentrifugation in einer Beckmann Coulter Avanti J-20XP Kühlzentrifuge (JA-25.50) geerntet (15-20 min, 8000 Upm, RT). Die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für den Zellaufschluss wurde das Pellet zuerst einmal in Aufschlusspuffer gewaschen, abzentrifugiert (s.o.) und erneut in Aufschlusspuffer resuspendiert (pro Gramm Zellen 3 ml Puffer). Die Zusammensetzung des Aufschlusspuffers richtete sich nach der weiteren Aufreinigung des Proteins. Die verschiedenen Aufschlusspuffer für die Aufreinigung / Anreicherung von DsrL und DsrN aus *E. coli* und DsrL, DsrN und der Sulfitreduktase (DsrAB) aus *A. vinosum* sind in Tabelle 2.6 dargestellt:

Tab. 2.6: Zusammenfassung der verschiedenen Aufschlusspuffer für die Aufreinigung von DsrN und DsrL aus *E. coli* und DsrL, DsrN und DsrAB aus *A. vinosum*.

| Organismus aus dem das Protein isoliert wurde | Protein | Aufschlusspuffer |
|---|--------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | DsrL (mit N-terminalem Histag) | 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidiazol, 1 mM TCEP, 10% Glycerol, pH 7,5 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | DsrN (mit N-terminalem Histag) | 20 mM Tris HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidiazol, pH 7,9 |
| <i>A. vinosum</i> DSM180 ^T | DsrL | 50 mM KPP-Puffer, 10% Glycerol, 1mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 7,5 |
| <i>A. vinosum</i> DSM180 ^T | DsrN | 50 mM KPP-Puffer pH 7,5 |
| <i>A. vinosum</i> DSM180 ^T | Sulfitreduktase (DsrAB) | 50 mM KPP-Puffer pH 7,5 |

Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen in einem Glashomogenisator auf Eis homogenisiert und dann mit Ultraschall (Cell Disruptor B15, Branson) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Beschallungsdauer von 1 min/ml Homogenisat im Puls-Modus bei 50 % Leistung. Das Lysat wurde zur Befreiung von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen in einer Sorvall Kühlzentrifuge für 30 min bei 15000 Upm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Bei der Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli* wurde das Lysat nach dem Ultraschallaufschluss als Rohextrakt bezeichnet, der dann durch die Sorvallzentrifugation in Überstand und Pellet getrennt wurde. Bei der Aufreinigung von Proteinen aus *A. vinosum* erfolgte nach der Sorvallzentrifugation noch ein weiterer Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge (s. 2.8.3) zur Abtrennung der Membranproteine. Hierbei wurde der Überstand nach der Sorvallzentrifugation als Rohextrakt bezeichnet, der dann in der Ultrazentrifugation in Überstand (lösliche Fraktion) und Pellet

(Membranfraktion) getrennt wurde. Da die Überproduktion von DsrN zur Bildung von „inclusion bodies“ führte wurde in diesem Fall der Aufschluss etwas modifiziert (2.8.7).

2.8.3 Ultrazentrifugation

Zur Trennung der löslichen und der Membran-Fraktion der Proteine aus dem *A. vinosum*-Rohextrakt nach dem Zellaufschluss (s. 2.8.2) wurde dieser für 3 h bei 45000 Upm und 4 °C in einer Beckmann LE-80K Ultrazentrifuge (60 Ti-Festwinkelrotor) abzentrifugiert. Zur Isolierung der hier beschriebenen Proteine wurde ausschließlich die lösliche Fraktion verwendet.

2.8.4 Dialyse - Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen

Vorbereitung der Dialyseschläuche (Servapor, Serva) wurden auf 10 - 20 cm Länge zugeschnitten und 10 min in 1 mM EDTA, 2 % NaHCO₃, pH 8 autoklaviert, in aqua dest. gewaschen und für 10 min in 1mM EDTA, pH 8 autoklaviert. Vor Gebrauch wurden die Schläuche mit sterilem aqua dest. gespült.

Zur Entfernung von Salzen aus Proteinlösungen oder zum Wechseln des Puffers wurden diese gegen den gewünschten Puffer bei 4 °C für 2 – 16 h dialysiert.

2.8.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mittels Ultrafiltration in Centriplus-Konzentratoren (Amicon, Beverly, USA) aufkonzentriert. Die Lösungen wurden dazu nach Angaben des Herstellers in den Konzentratoren mehrmals bei 4 °C und 4000 Upm zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht wurde.

2.8.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2.8.6.1 Proteinbestimmung mit dem „Micro BCA Assay“

Die Proteinkonzentrationen von Lösungen mit angereicherten/gereinigten Proteinen wurden mit Hilfe des „Micro BCA Assays“ Reagenzienkits (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Als Standard wurde BSA nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.8.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der Fermenterproben erfolgte mit Hilfe des Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) nach Angaben des Herstellers. In den Test wurde eingefrorene und wieder aufgetaute Zellkultur aus den Fermenterversuchen eingesetzt.

2.8.7 Aufreinigung aus „inclusion bodies“ und anschließende Renaturierung des Proteins

Aufschlusspuffer: 20 mM Tris HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,9

Denaturierungspuffer: 20 mM Tris HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,9, 6 M Harnstoff

Nach Ernten der Zellen der 100 ml-Kultur des Überexpressionsstammes BL21(DE3) pNEX5 wurden die Zellen in 10 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und mit Ultraschall (s. 2.8.2) aufgeschlossen. Das Lysat wurde zur Sedimentation der „inclusion bodies“ abzentrifugiert (15000 Upm, 15 min, 4 °C) und das Pellet erneut in Aufschlusspuffer aufgenommen. Nach einem weiteren Aufschluss mittels Ultraschall und Zentrifugation (dieser Schritt erhöht die Reinheit der DsrN „inclusion bodies“ im Pellet) wurde das Pellet in Denaturierungspuffer aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (17000 Upm, 20 min, 4 °C) befand sich das denaturierte Protein im Überstand. Durch die vorherige Abtrennung der löslichen Proteine nach dem Ultraschallaufschluss, enthielt dieser Überstand zum größten Teil nur noch DsrN. Das denaturierte Protein wurde für 10 h oder über Nacht gegen 50 mM Tris HCl, pH 7,5 mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen (4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M und 0 M Harnstoff) dialysiert. Die schrittweise Verringerung des Harnstoffs im Dialysepuffer sollte eine langsame Rückfaltung des Proteins ermöglichen (pET System Manual, Novagen, Madison).

2.8.7.1 Affinitätschromatographie an ATP-Agarose

Säulenmaterial: ATP-Agarose (Sigma)

Säule: 5 ml Plastiksälchen (Quiagen), 1 ml Gelvolumen

Startpuffer: 50 mM Tris HCl, pH 7,5

Elutionspuffer: 50 mM Tris HCl, pH 7,5, 3 mM ATP

Das potentiell aus „inclusion bodies“ renaturierte DsrN wurde gegen den Startpuffer dialysiert und auf eine mit 20 ml 50 mM Tris HCl, pH 7,5 äquilibrierte ATP-Agarosesäule (Volumen: 1 ml, in 5 ml Plastikröhrchen, Quiagen) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch Wa-

schen der Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer entfernt. Die Elution gebundenen Proteins erfolgte über die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen ATP zum Startpuffer.

2.8.8 Säulenchromatographische Methoden

Die Säulenchromatographie von Proteinlösungen wurde mit einem Fast-Protein-Liquid-Chromatography (FPLC)-System und einem HiLoad-System der Firma Pharmacia (Uppsala, S) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden entgast und filtriert (Cellulose-Nitrat-Filter, Porengröße 0,45 µm, Sartorius, Göttingen), die Chromatographiesäulen wurden auf 4 °C gekühlt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf die Säule entweder zentrifugiert (15000 Upm, 4 °C, 10 min) oder durch einen PVDF-Filter (Roth, Ø 0,22 µm) von kontaminierenden Partikeln befreit. Lose Säulenmaterialien wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet und in Leersäulen gepackt.

2.8.8.1 Affinitätschromatographie über eine Nickelchelatsäule

Säulenmaterial: Ni Nta-Agarose (Quiagen, Hilden, D)

| | <u>Aufreinigung DsrL</u> | <u>Aufreinigung DsrN</u> |
|-------------------------|--|---|
| <u>Säule:</u> | Gelvolumen: 5 ml, Säule: | Gelvolumen: 1 ml, Quiagen Säulchen |
| <u>Puffer A:</u> | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 1 mM TCEP, 10 % Glycerol, pH 7,5 | 20 mM Tris HCl, 0,5 M NaCl, 6 M Harnstoff, pH 7,9 |
| <u>Puffer B:</u> | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, 1 mM TCEP, 10 % Glycerol, pH 7,5 | 20 mM Tris HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M Imidazol, 6 M Harnstoff, pH 7,9 |

In dieser Arbeit wurden die Proteine DsrL und DsrN mit N-terminalem Oligohistidinrest überproduziert und affinitätschromatographisch über Nickel-Chelat-Matrix aufgereinigt (pET System Manual, Novagen, Madison). Die Aufreinigung von DsrN über die Nickel-Chelat-Matrix wurde nicht mit dem FPLC-System durchgeführt, sie erfolgte in 5 ml Quiagen-Plastiksäulchen, bei denen die Flussrate des Puffer durch die Schwerkraft bestimmt wird. Das Säulenmaterial wurde mit 0,5 % Puffer B äquilibriert, dann wurde die Probe aufgetragen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte, nach einem Waschschrift mit 1 % Puffer B, in Stufen mit verschiedenen Imidazol-konzentrationen.

DsrL wurde über eine selbstgegossene Säule, die an das FPLC-System angeschlossen wurde, aufgereinigt. Das Säulenmaterial wurde mit 4 Säulenvolumen Puffer A gewaschen und dann mit 4 Säulenvolumen 1 % Puffer B äquilibriert. Der Auftrag des Rohextraktes, sowie auch die Äqui-

librierungsschritte wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte nach folgendem Programm:

1. 0-10 ml; 1 % Puffer B
2. 10,1-20 ml; 2 % Puffer B
3. 20,1-30 ml; 5 % Puffer B
4. 30,1-60 ml; 5 %-100 % Puffer B

Nach dem Säulenlauf wurde die Säule wieder mit Puffer A gespült und dann zur Lagerung unter 20 % Ethanol gesetzt. Die Säule wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.8.8.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

| | |
|---|--|
| <u>Säulenmaterial:</u> | Phenylsepharose 6 Fast Flow (low sub) (Pharmacia, Uppsala, S) |
| <u>Säule:</u> | Gelvolumen 70 ml |
| <u>Puffer A (Niedrigsalzpuffer):</u> | 50 mM KPP-Puffer, pH 7,5 (für DsrL +1 mM EDTA, 1 mM TCEP, 10 % Glycerol) |
| <u>Puffer B (Hochsalzpuffer):</u> | Puffer A + 40 % Ammoniumsulfat (= 226 g/l bei 4 °C) |

Für die Aufreinigung von Proteinproben über die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde die lösliche Fraktion (s. 2.8.3) verwendet. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde dieser mit 40 % Ammoniumsulfat (226 g/l) über Nacht bei 4 °C gefällt und ausgefallene Proteine durch Zentrifugation (30 min, 15000 Upm, 4 °C) entfernt. Als Säulenmaterial für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde Phenylsepharose 6 Fast Flow (low sub) von Pharmacia (Uppsala, S) eingesetzt. Die selbstgegossene Säule wurde zuerst mit Puffer A (2,5 ml/min, 2 – 3 Säulenvolumen), dann mit Hochsalzpuffer (Puffer B, 2,5 ml/min, 3 - 4 Säulenvolumen) äquilibriert, danach wurde die Probe aufgetragen (2,5 ml/min). Nach Elution der ungebundenen Proteine mit 100 % Puffer B erfolgte die Elution der gebundenen Proteinen mit einem linear- absteigenden Salzgradienten von 100 % bis 0 % Puffer B in einem Volumen von 450 ml (für DsrAB) bzw. 550 ml (für DsrL). Zur Entfernung aller Proteine wurde die Säule noch mit 100 ml Puffer A gespült. Die Puffer für die Aufreinigung der Sulfitreduktase (DsrAB) enthielten kein EDTA, kein Glycerol und kein TCEP. Diese Substanzen wurden nur bei der Reinigung von DsrL eingesetzt, um das Protein zu stabilisieren. Die Säulen wurden bei 4 °C unter 20 % Ethanol gelagert.

2.8.8.3 Anionenaustauschchromatographie mit MonoQ

Säule: MonoQ HR 5/5 Fertigsäule (Pharmacia, Uppsala, S),
Gelvolumen 1 ml

| Aufreinigung: | |
|------------------------------------|---|
| Sulfitreduktase (DsrAB) | Puffer A (Niedrigsalzpuffer): 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 |
| | Puffer B (Hochsalzpuffer): Puffer A + 1M NaCl |
| DsrL | Puffer A (Niedrigsalzpuffer): 25 mM HEPES/KOH, 1 mM TCEP, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, pH 7,5 |
| | Puffer B (Hochsalzpuffer): Puffer A + 1M NaCl |

Als starker Anionenaustauscher wurde eine MonoQ HR 5/5 Fertigsäule verwendet, die als funktionelle Gruppen tertiäre und quartäre Amine auf dem Trägermaterial, den sog. Mono Beads, besitzt. Das Äquilibrieren der Säule erfolgte mit 10 Säulenvolumen Puffer A, 10 Säulenvolumen Puffer B und erneut 10 Säulenvolumen Puffer A (1 ml/min). Die Probe wurde vor dem Auftragen (1 ml/min) gegen Puffer A dialysiert. Zur Aufreinigung von DsrAB wurden ungebundene und schwach gebundene Proteine durch einen Waschschrift mit 30 % Puffer B eluiert, die Elution der Sulfitreduktase erfolgte über einen linearen Gradienten von 30 – 60 % Puffer B in einem Volumen von 30 ml. Bei der Aufreinigung von DsrL erfolgte zunächst ein Waschschrift mit 0 % Puffer B, die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 – 40 % Puffer B in einem Volumen von 40 ml (1 ml/min). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C unter 20 % Ethanol.

2.8.8.4 Gelfiltrationschromatographie

Säule: HiLoad 16/60 Superdex Tm 200 (Pharmacia, Uppsala),
Laufpuffer: 25 mM HEPES/KOH, 1 mM TCEP, 1mM EDTA, 10 % Glycerol, pH 7,5
Eichproteine: Sigma kit for molecular weight (29000 – 700000 Da)

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden Proteine an einem porösen Material anhand ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurde hauptsächlich die Superdex Tm 200 von Pharmacia verwendet, die vor Gebrauch mit dem zweifachen Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert wurde. Die Probe wurde mit 0,2 ml/min aufgetragen, der Lauf erfolgte mit 0,5 ml/min. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die Säule mit Standardproteinen (Cytochrom c aus Pferdeherz: 12,4 kDa; Carboanhydrase: 29 kDa; Albumin Bovin: 67 kDa; Aldolase: 158 kDa; Catalase: 232 kDa;

Ferritin: 440 kDa) geeicht. Mit dem ermittelten Elutionsvolumen der Standardproteine wurde deren K_{av} -Wert berechnet [$K_{av}=(v_e-v_a)/(v_t-v_a)$]. Der K_{av} -Wert setzt das Elutionsvolumen (v_e) mit dem Ausschlussvolumen (v_a) und dem Gesamtvolumen (v_t) der Säule in Beziehung. Dies erlaubt eine matrixspezifische Aussage über das Elutionsverhalten, die unabhängig von den Säulenmaßen ist. Der K_{av} -Wert wird gegen den log des Molekulargewichts der Eichproteine aufgetragen. Mit diesem Plot kann das Molekulargewicht von Proteinen unbekannter Größe ermittelt werden. Die Lagerung der Säule erfolgte unter 20 % Ethanol.

2.8.9 UV-Vis-Spektroskopie

UV-Vis-Spektren wurden mit Proben in einer 1 ml Quartz-Küvette an einem 8453 Dioden Array Spektralphotometer (Agilent Technologies, Böblingen, D) aufgenommen.

2.8.10 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.8.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1) (Roth, Karlsruhe)

Lösung A: 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8, 0,3 % SDS

Lösung B: 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8, 0,4 % SDS

4 x Protein-Probenpuffer: Roti-Load (Roth, Karlsruhe)

5 x Elektrophoresepuffer: 15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1 l aqua dest.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach (Laemmli, 1970) mit verschiedenen Trenngelkonzentrationen in einer Mini-PROTEAN II Gelkammer (Bio-Rad, München, D) durchgeführt. Die Zusammensetzungen der verschiedenen konzentrierten Trenngel und des Sammelgels sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung von SDS-Gelen verschiedener Polyacrylamidkonzentrationen. Die angegebenen Mengen reichen für zwei Gele in der Mini-Protean II Gelkammer (Biorad, München, D).

| Acrylamidkonzentration | Trenngel | | | | | | Sammelgel |
|------------------------|----------|--------|--------|--------|---------|--------|-----------|
| | 6 % | 7,5 % | 8,75 % | 10 % | 11,25 % | 12,5 % | 4,5 % |
| Acrylamidlösung | 2,4 ml | 3 ml | 3,5 ml | 4 ml | 4,5 ml | 5 ml | 0,75 ml |
| Wasser | 6,6 ml | 6 ml | 5,5 ml | 5 ml | 4,5 ml | 4 ml | 3 ml |
| Lösung A | 3 ml | 3 ml | 3 ml | 3 ml | 3 ml | 3 ml | |
| Lösung B | | | | | | | 1,25 ml |
| 10% APS ¹ | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

¹APS = Ammoniumpersulfat

Die Acrylamidlösung, Wasser und Lösung A wurden miteinander vermischt, die Polymerisation durch Zugabe von 10 % APS und TEMED gestartet und die Lösung in zwei Gele im vorbereiteten Gießstand gegossen. Das Trenngel wurde bis zur vollständigen Polymerisation mit Wasser überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 4 x Probenpuffer (Roth, Karlsruhe, D) versetzt, 5 min bei 100 °C aufgekocht und auf die auspolymerisierten Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Elektrophoresepuffer bei 100 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele geblottet (s. 2.8.10.5) oder mit Coomassie angefärbt (s. 2.8.10.3).

2.8.10.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)

4 x nativer Probenpuffer: 100 mM MOPS pH 6,8, 40 % Glycerol, 0,014 % Bromphenolblau

Wie auch die denaturierende SDS-PAGE wurden die nativen Gele als diskontinuierliche Gele mit Sammelgel gegossen. Es wurden die gleichen Puffer (Lösung AB und Elektrophoresepuffer) verwendet wie unter 2.8.10.1 beschrieben, jedoch ohne Zusatz von SDS. Die Proben wurden mit 4 x nativem Probenpuffer versetzt und ohne Aufkochen aufgetragen. Die native PAGE wurde in einem Mighty Small Gelelektrophorese System (Pharmacia/ Hoefer; Typ SE 250) durchgeführt, in dem die Gele während des Laufes auf 4 °C temperiert wurden, um die Aktivität und native Konformation der Proteine besser erhalten zu können.

2.8.10.3 Methoden zum Nachweis von Proteinen in nativen und denaturierenden Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbung:

Coomassie-Färbelösung: 0,25 % Coomassie Blue R250, 50 % Methanol, 10 % Eisessig, 40 % H₂O

Entfärberlösung: 10 % Eisessig, 20 % Methanol, 70 % H₂O

Zum Anfärben der Proteine wurden die Gele mindestens 30 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden diese durch mehrfaches Waschen mit Entfärberlösung entfärbt.

Aktivitätsfärbung für DsrL in nativen Gelen:

Färbelösung mit NADH: 50 mM Hepes KOH pH 7,5; 120 µM NADH; 1 mM MTT

Färbelösung mit NADPH: 50 mM BisTris pH 6,0; 120 µM NADPH ; 1 mM MTT

Für die Aktivitätsfärbung von DsrL wurden die diaphoretischen Eigenschaften des Enzyms ausgenutzt. Wie unter 3.3.5.4 beschrieben, ist DsrL in der Lage NADH bzw. NADPH als Elektronendonator zu nutzen, was zur Reduktion des Elektronenakzeptors MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) führt. Bei MTT handelt es sich um einen Farbstoff, der je nach Oxidationsstatus entweder gelb (oxidiert) oder blau (reduziert) erscheint. Banden von aktivem DsrL erscheinen im Gel blau. Nach dem Ende der nativen Elektrophorese wurden die Gele für max. 30 min in der Färbelösung entweder mit NADH oder mit NADPH bei 30 °C inkubiert. Nach ausreichender Anfärbung der Banden (max. 45 min) wurde die Färbelösung verworfen, das Gel in H₂O gewaschen und dann mit einem Vakuum-Geltrockner ca. 45 min getrocknet.

2.8.10.4 ElektrobloTTing von Proteinen

Towbin-Blot-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,0

Die Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Cellulose-Nitrat-Membranen erfolgte mit Towbin-Blot-Puffer (Towbin et al., 1979) in einer Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München, D). Das Gel und die auf Gelgröße zugeschnittene Membran (Protran BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel, D) wurden 15 min in Towbin-Puffer vorinkubiert. Die Membran wurde dann auf drei Lagen in Towbin-Blot-Puffer angefeuchtetem Whatman 3MM-Papier auf die Anode des Transblot-Geräts aufgelegt. Das Gel wurde auf die Membran gelegt. Es folgten drei weitere Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und ebenfalls angefeuchtetes Whatman-Papier. Dann wurde die Zelle durch Aufsetzen der Kathode verschlossen. Der Transfer erfolgte für 30 – 60 min bei 15 V.

2.8.11 Immunologischer Nachweis von Proteinen

10 x PBS (Stammlösung): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2 g KH₂PO₄, ad 1 l Reinstwasser

Der Nachweis von auf Cellulose-Nitrat-Membranen transferierten Proteinen erfolgte leicht modifiziert nach Sambrook et al. (1989). Die Membran wurde über Nacht in 1 x PBS mit 5 % Skim Milk bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst eine weitere Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur, gefolgt von fünf Waschschritten mit 1 x PBS für jeweils 5 min. Die folgende Inkubation mit dem 1:500 verdünnten Antikörper erfolgte in 20 ml 1 x PBS, 0,5 % BSA für 3 h. Nach weiterem dreimaligen Waschen für 5 min mit 1 x PBS wurde die Membran für 1 h in 20 ml 1 x PBS, 0,5 % BSA mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:5000). Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um ein Anti-Kaninchen-Meerrettich-

Peroxidase-Konjugat der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, D). Nach zweimaligem Waschen für 5 min in 1 x PBS erfolgte die Entwicklung. Dazu wurde die Membran mit 30 mg 4-Chloro-1-Naphthol in 7 ml eiskaltem Ethanol, das mit Reinstwasser auf 50 ml aufgefüllt wurde inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l H₂O₂ gestartet und durch mehrmaliges Waschen der Membran in Reinstwasser gestoppt.

2.8.11.1 Herstellung und verwendete Antikörper

Tab. 2.8: Für die Herstellung von Antikörpern verwendete Peptidsequenzen (Eurogentec, Seraing, B)

| Protein | Peptidsequenz |
|---------|---|
| DsrN | H ₂ N-ADVEMCDRPQGRGYVR-CONH ₂ und H ₂ N-TVRRGTGIDGSHDGIV-CONH ₂ |
| DsrL | H ₂ NMATSSDEMCKMKPTWRC-CONH ₂ |

Die Antikörper gegen DsrN und DsrL aus *A. vinosum* wurden von der Firma Eurogentec S.A. (Seraing, B) hergestellt. Zwei Kaninchen wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen viermal die jeweiligen Peptide injiziert. Im Falle von DsrN wurden zwei synthetische Peptide auf einmal gespritzt, um die Erfolgchancen für einen bindenden Antikörper zu erhöhen, da frühere Versuche mit einem anderen Peptid fehlgeschlagen waren. Nach drei Monaten konnte das endgültige Serum gewonnen werden.

Der zur Detektion von DsrB eingesetzte Antikörper wurde aus einem Kaninchen gewonnen, dem aus *A. fulgidus* aufgereinigte Sulfitreduktase injiziert wurde (Dahl et al., 1993). Die Antiseren wurden bei -20 °C bzw. bei -70 °C gelagert.

2.8.12 Enzymtests

2.8.12.1 Glutamatsynthaseaktivitätstest

Reaktionsansatz: 1 ml
 50 mM TrisHCl, pH 7,5
 5 mM L-Glutamin
 2,5 mM 2-Oxoglutarat
 0,2 mM NADPH
 Enzymlösung

Glutamatsynthaseaktivität wurde durch die enzymvermittelte Oxidation von NADPH und die damit verbundene Extinktionsabnahme bei 340 nm untersucht (Jongsareejit et al., 1997). Gluta-

matsynthesen katalysieren den Transfer der Amidgruppe von L-Glutamin auf 2-Oxoglutarat, wodurch zwei Moleküle L-Glutamat entstehen. Bei dieser Reaktion wird ein NADPH zu NADP⁺ oxidiert. Alle Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden in einer Küvette vorgelegt und gut durchmischt. Durch die Zugabe der Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet und die Extinktion bei 340 nm 5 min (alle 20 sec.) in einem Dioden-Array-Spektralphotometer (Agilent Technologies, Böblingen, D) gemessen. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur statt.

2.8.12.2 Enzymtests zur Diaphoraseaktivität und Disulfidreduktaseaktivität von DsrL

Beispielreaktions-Ansatz: (1 ml in einer Küvette mit Schraubverschluss und Septum)

50 mM HEPES/KOH pH 7,5

0,01-1 mM MTT (oder andere Elektronenakzeptoren, versch. Konzentrationen)

0,01-10 mM NADH/NADPH

Enzymlösung (1 – 20 µg Protein)

Die Diaphoraseaktivität von DsrL wurde durch die enzymvermittelte Reduktion verschiedener Elektronenakzeptoren nachgewiesen. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES-Puffer bzw. 50 mM Bis-Tris-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten zur Feststellung des pH-Optimums. Als Elektronendonoren wurden NADH (in 10 mM Mes-Puffer, pH = 6,5) und NADPH (in H₂O) in verschiedenen Konzentrationen (0,01 – 10 mM) eingesetzt. Als Elektronenakzeptoren wurden MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 563 nm), INT (Iodonitrotetrazoliumchloride, 490 nm), Dichloroindophenol (600 nm), Ferricyanid (420 nm) und Cytochrom c aus Pferdeherz (550 nm) eingesetzt. Die Tetrazoliumsalze MTT und INT wurden in 75 % Ethanol, 5 % Triton X 100 und 20 % H₂O gelöst, die anderen Elektronenakzeptoren in H₂O.

Puffer, H₂O und der Elektronendonator (NADH oder NADPH) wurden in einer Küvette mit Schraubverschluss und Deckel mit Septum vorgelegt und vor dem Start der Reaktion 5 min mit N₂ begast. Anschließend wurde der Elektronenakzeptor (s.o.) injiziert und der Reaktionsansatz auf 30 °C temperiert. Durch die Injektion der Enzymlösung (1 – 20 µg Protein) wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionszu- bzw. abnahme (je nach Elektronenakzeptor verschieden) bei der für den Elektronenakzeptor in Klammern angegebenen Wellenlänge im Dioden-Array-Spektralphotometer über 3 min (alle 10 sec) gemessen.

Verwendete Extinktionskoeffizienten: MTT: 10 mM⁻¹cm⁻¹; INT: 18,5 mM⁻¹cm⁻¹; Dichloroindophenol 21 mM⁻¹cm⁻¹; Ferricyanid: 1,04 mM⁻¹cm⁻¹; Cytochrom c aus Pferdeherz: 29,5 mM⁻¹cm⁻¹.

Zur Messung der möglichen DsrL-Disulfidreduktaseaktivität wurden Liponamid (in Ethanol), Liponsäure (in Ethanol), DTNB (5'5'Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) = Ellmans Reagenz, 412

nm) (in Ethanol) und oxidiertes Glutathion (in H₂O) getestet. Für Liponamid, Liponsäure und oxidiertes Glutathion wurde die Reaktion über die Oxidation des Elektronendonors NADH bei 340 nm verfolgt. Der Testansatz entsprach dem für die Messung der Diaphoraseaktivität.

Alle Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, D) bzw. Fluka (Buchs, CH) bezogen.

2.8.12.3 Bestimmung von K_M-Werten

Zur Bestimmung der apparenten K_M-Werte von DsrL aus *E. coli* und *A. vinosum* für NADPH, NADH und MTT wurden für NADPH Konzentrationen zwischen 250 und 2000 μM, für NADH Konzentrationen zwischen 50 und 200 μM und für MTT Konzentrationen zwischen 10 und 150 μM eingesetzt. Die jeweils andere Komponente wurde im sättigenden Bereich gehalten.

2.8.13 Vorbereitung der Proben für die Siro(häm)amidbestimmung

Für die Bestimmung von Siro(häm)amid aus der löslichen Zellfraktion wurden 250 g Zellen (Nassgewicht, gelagert bei -20 °C) in 1 ml Puffer (50 mM TrisHCL, pH 8, Zugabe von Spatelspitze DNase) pro Gramm Zellen resuspendiert. Nach Ultraschallaufschluss (s.2.8.2) wurde der Rohextrakt zur Abtrennung von Zelltrümmern 30 min, bei 4 °C und 15000 Upm in einer Sorvall-zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zur quantitativen Abtrennung der Membranfraktion in der Ultrazentrifuge für 16 h bei 4 °C und 45000 Upm erneut zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde abgenommen, eingefroren (-70 °C), lyophilisiert und zur weiteren Analyse durch die Arbeitsgruppe von Prof. Russel Timkovich (University of Alabama, USA) verschickt.

2.9 Chemisch-Analytische Methoden

2.9.1 Analyse von Schwefelverbindungen mittels HPLC

Die Analyse von Schwefelverbindungen in den gezogenen Fermenterproben erfolgte standardmäßig mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC). Die verwendete HPLC-Anlage der Firma Thermo Electron (Engelsbach, D), besteht aus zwei Pumpen P200 und P4000 mit Vakuum-Entgaser SCM1000, den UV-Detektoren UV 6000 LP und UV 150, dem Fluoreszenzdetektor FL 3000 und dem Säulenofen Column Thermostat Jetstream 2. Alle eingesetzten Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt und vor der Verwendung filtriert (Ø 0,2 μM). Die Säulen wurden nach Angaben des Herstellers eingefahren und regeneriert.

2.9.1.1 Bestimmung von Thiolen mittels HPLC

Derivatisierung der Proben mit Monobrombiman:

| | |
|------------------------------------|--|
| <u>HEPES-Puffer:</u> | 50 mM HEPES/NaOH, 5 mM EDTA, pH 8,0 |
| <u>Monobrombimanlösung:</u> | 96 mM Monobrombiman in Acetonitril, Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ |
| <u>Methansulfonsäure:</u> | 65 mM Methansulfonsäure |

Für den Nachweis von Thiolen wurde die aus dem Fermenter gezogene Probe direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman derivatisiert (Rethmeier et al., 1997). Das Monobrombiman sollte in jedem Fall im zweifachen Überschuss gegenüber den nachzuweisenden Thiolen vorliegen. In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 50 μl HEPES-Puffer und 55 μl Acetonitril vorgelegt. Nach schneller Zugabe von 50 μl Probe und 5 μl Monobrombiman wurde die Probe gut gemischt und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μl Methansulfonsäure (65 mM) abgestoppt. Die Proben wurden bis zur Vermessung durch die HPLC bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

HPLC-Nachweis der derivatisierten Thiole:

| | |
|---------------------------|--|
| <u>Säule:</u> | LiChrospher [®] 100 RP-18e (250-4, 5 μm) (Merck, Darmstadt) |
| <u>Detektion:</u> | Fluoreszenzdetektion-Anregung bei 380 nm, Emission bei 480 nm |
| <u>Laufmittel:</u> | A: 0,25 % Essigsäure, pH 4,0 (titriert mit 10 M NaOH) B: Methanol |

Der Nachweis der derivatisierten Thiole erfolgte mittels Reversed Phase HPLC mit Gradientenelution und Fluoreszenzdetektion (Rethmeier et al., 1997). 10 μl der derivatisierten Probe wurden mit 190 μl Laufmittelgemisch (85 % Laufmittel A und 15 % Laufmittel B) verdünnt, da die Fluoreszenz der Probe unverdünnt zu hoch für die Erfassung durch den Detektor ist. Diese 200 μl wurden in ein HPLC-Probenfläschchen pipettiert, von der der Autosampler 50 μl in eine 100 μl Probenschleife injizierte. Die Elution der Probe erfolgte mit folgendem linearen Gradienten mit 1 ml/min (Temperatur des Säulenofens: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$):

| t [min] | %A | %B |
|---------|----|-----|
| 0 | 85 | 15 |
| 5 | 85 | 15 |
| 50 | 55 | 45 |
| 55 | 0 | 100 |
| 58 | 0 | 100 |
| 61 | 85 | 15 |
| 76 | 85 | 15 |

Die Retentionszeiten betragen für Sulfit ca. 4,8 min, für Thiosulfat ca. 9 min und für Sulfid ca. 40 min. Die Eichkurven wurden im Bereich folgender Konzentrationen aufgenommen: Sulfit: 50 μM - 750 μM , Thiosulfat: 50 μM - 750 μM und Sulfid: 150 μM - 750 μM .

2.9.1.2 Sulfat-Bestimmung mittels HPLC

Säule: Polyspher IC AN-1 (Merck, Darmstadt)

Detektion: UV-Absorption bei 254 nm

Laufmittel: 1,5 mM Phthalsäure, 1,38 mM Tris, 300 mM Borsäure, pH 4,2 (nicht titrieren)

Die Analyse von Sulfat in den Fermenterproben erfolgte durch Ionenaustausch-HPLC mit indirekter UV-Detektion. Bei der indirekten UV-Detektion absorbiert das Laufmittel stärker als die zu messenden Substanzen, weshalb negative Signale gemessen werden. Von der Fermenterkultur wurden 1 ml abzentrifugiert (1 min, 14000 Upm) und der Überstand bis zur Vermessung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Vor der Messung wurde der Überstand erneut kurz abzentrifugiert und 200 μl des Überstandes in ein HPLC-Probenfläschchen überführt. 60 μl der Probe wurden von dem Autosampler in eine Probenschleife injiziert und auf die Säule aufgetragen. Die Elution von der Säule erfolgte isokratisch mit dem Laufmittel bei 1,3 ml/min. Die Retentionszeit für Sulfat betrug ca. 12,4 min. Die Eichkurve wurde im Bereich von 50 μM - 8 mM Sulfat aufgenommen.

2.9.1.3 Schwefel-Bestimmung mit HPLC

Säule: LiChrospher 100 RP 18 (125-4, 5 μm) (Merck, Darmstadt)

Detektion: UV-Detektion bei 263 nm

Laufmittel: 95 % Methanol, 5 % Wasser, isokratische Elution

Für die Bestimmung des Elementarschwefels mit HPLC wurden 100 μl Kulturflüssigkeit (Probe aus den 11-Thiosulfat-Flaschenversuchen) mit 100 μl Chloroform versetzt und gründlich gevortext. Nach Trennung der zwei Phasen wurde aus der unteren der chloroformextrahierte Schwefel mittels Reversed Phase HPLC und UV-Absorption bestimmt (Rethmeier et al., 1997). Dazu wurden 50 μl Probe direkt über eine 20 μl Probenschleife auf die Säule injiziert. Die Eichgerade wurde in einem Bereich von 25 μM bis 5 mM mit in Chloroform aufgelösten Elementarschwefel aufgenommen. Die Retentionszeit betrug ca. 4,5 min.

2.9.1.4 Schwefel-Bestimmung (modifiziert nach Bartlett und Skoog (1954))

Natriumcyanidlg.: 0,2 M Natriumcyanid in Reinstwasser

Eisennitrat-Reagenz: 30 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, 40 ml 55% HNO_3 , ad 100 Reinstwasser

Eine Fermenterprobe mit maximal 200 nmol Elementarschwefel wurde in einem Safelock-Mikroreaktionsgefäß abzentrifugiert (5 min, 14000 Upm), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Das aufgetaute Sediment wurde in 200 μl Reinstwasser resuspendiert, mit 100 μl Natriumcyanidlösung (0,2 M) versetzt und 10 min bei 100°C inkubiert. Nach Zugabe von 650 μl Reinstwasser und 50 μl Eisennitrat-Reagenz wurde der Ansatz 2 min bei 14000 Upm abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415C). Der Überstand wurde in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 460 nm in einem Biotech Novaspec II Photometer (Pharmacia) gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Eichgerade wurde mit Natriumrhodanid im Bereich von 0-300 nmol/Ansatz aufgenommen.

2.9.2 Bestimmung von Eisen-Schwefel-Clustern

2.9.2.1 Nachweis von säurelabilem Schwefel (King und Morris, 1966)

Zinkreagenz: 5 Volumen einer 2,6 % Zinkacetatlösung + 1 Volumen einer 6 % NaOH-Lösung

Diamin-Reagenz: 20 mM N`N`-Dimethyl-p-Phenyl-Diaminsulfat in 7,2 N HCl

Eisenchloridlösung: 30 mM FeCl_3 in 11,2 N HCl

Zu 0,7 ml der aufgereinigten Proteinprobe (5 – 20 nmol Sulfid) wurden 0,5 ml des frisch hergestellten Zinkreagenz gegeben. Der Ansatz wurde dann in dem verschlossenen Gefäß 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,1 ml des Diamin-Reagenz zugegeben, der Ansatz gemischt und sehr schnell 0,1 ml der Eisenchloridlösung zugegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation wurde die Absorption bei 670 nm gemessen. Die Sulfideichgerade wurde im Bereich von 5 – 20 nmol Sulfid angesetzt.

2.9.2.2 Nachweis von Nicht-Häm-Eisen in Proteinen (nach Massey (1957))

Zu 0,75 ml einer Proteinprobe (10 - 150 nmol Eisen) wurden 0,25 ml einer 20%igen Trichloressigsäurelösung gegeben und gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm, RT) und 0,4 ml des klaren Überstands wurden abgenommen. Zu diesen 0,4 ml wurden 360 μl aqua bidest, 150 μl 0,1%iges 1,10-Phenanthrolin, 50 μl 60 mM Ascorbinsäure und 40 μl gesättigte Ammoniumacetatlösung gegeben. Nach Mi-

schen der Probe wurde die Extinktion bei 510 nm gemessen. Die Eichkurve wurde im Bereich von 10 - 150 nmol aufgenommen.

2.9.3 Bestimmung des Flavingehaltes in rekombinantem DsrL

Die Bestimmung des Flavingehaltes des rekombinaten DsrL erfolgte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für FAD ($\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Vanoni et al., 1996).

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der prosthetischen Gruppe der Sulfitreduktase

Die Grundlage dieser Arbeit bildete die Annahme, dass die Sulfitreduktase aus *A. vinosum*, wie die aus *Desulfovibrio* sp. (Matthews et al., 1995), nicht Sirohäm sondern Siro(häm)amid als prosthetische Gruppe enthält. Darauf aufbauend wurden die Funktionen für die Proteine DsrN und DsrL postuliert, die in dieser Arbeit experimentell untersucht wurden. Zuerst erfolgten daher Untersuchungen zum Nachweis von Siro(häm)amid als prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase aus *A. vinosum*. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Russel Timkovich von der University of Alabama (USA) durchgeführt.

3.1.1 Analyse der löslichen Fraktion

Die Untersuchungen zum Nachweis von Siro(häm)amid wurden zunächst mit der löslichen Proteinfraction (= Überstand nach Ultrazentrifugation der mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen) durchgeführt. Eine Abtrennung der Membranfraktion (= UZ-Pellet) war notwendig, da das in dieser Fraktion in grossen Mengen enthaltene Bakteriochlorophyll die Analyse des Siro(häm)amid-Tetrapyrrols sehr erschweren würde. Weitere Überlegungen zu Beginn des Versuches gingen dahin, dass die Konzentration der Sulfitreduktase in der löslichen Fraktion vermutlich nicht sehr hoch ist. Obwohl es sich bei der Sulfitreduktase um ein lösliches cytoplasmatisches Protein handelt (Hipp et al., 1997; Schedel et al., 1979), wurde ein Teil dieses Proteins jedoch zusammen mit anderen Proteinen aus der Membranfraktion angereichert (Dahl et al., 2005). Voruntersuchungen mit der löslichen Fraktion aus 80 g Zellen (Nassgewicht), was einer Anzucht von 40 l Flüssigkultur entspricht (jeweils in 10 l-Fermentern), gaben erste Hinweise auf die Anwesenheit von Siro(häm)amid in *A. vinosum*. Für eine qualitative und quantitative Aussage war die Konzentration jedoch zu gering.

Die folgenden Untersuchungen wurden mit der löslichen Fraktion von 250 g Zellen (aus 130 l-Flüssigkultur) von photolithoautotroph auf Thiosulfatmedium angezogenem *A. vinosum* DSM 180^T durchgeführt. Aufgrund der grossen Masse wurden die Zellen nicht wie in anderen Versuchen üblich im Verhältnis 1 g Zellen zu 3 ml Puffer aufgenommen, sondern nur in 1 ml Puffer pro Gramm Zellen resuspendiert. Um erfolgreich die Membranbestandteile abtrennen zu können, wurde die Ultrazentrifugationszeit von den üblichen 3 h auf 16 h verlängert. Ein Nach-

teil dieser Methode liegt darin, dass möglicherweise grössere Proteine, wie die Sulfitreduktase, zum Teil ebenfalls sedimentiert wurden. Für eine effektive Abtrennung des Bakteriochlorophylls war dieser Schritt jedoch unvermeidbar. Die erhaltene lösliche Fraktion wurde gefriergetrocknet und durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Timkovich analysiert.

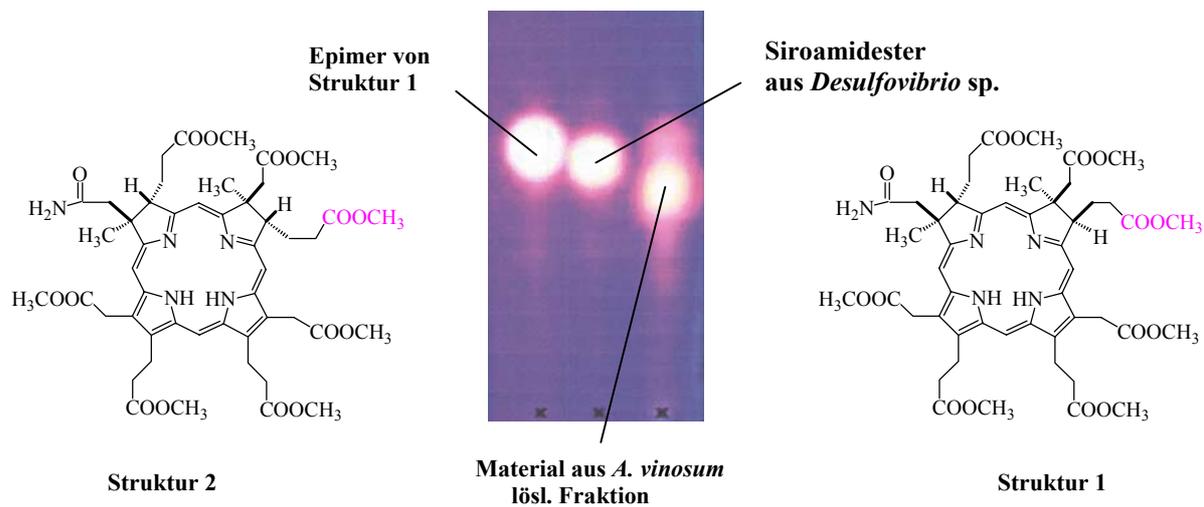


Abb. 3.1: Dünnschichtchromatographie mit Fluoreszenzdetektion zum Nachweis von Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid (SHM) isoliert aus der löslichen Fraktion von *A. vinosum*-Zellen; zum Vergleich wurden in Spur 1 und 2 zwei Epimere des aus *Desulfovibrio vulgaris* isolierten SHMs aufgetragen (Struktur 1 und 2) (s. Text), das epimere Zentrum ist durch die violette Schrift in der Struktur hervorgehoben.

Die Isolation des Siro(häm)amids erfolgte nach der in Matthews et al. (1995) beschriebenen Methode. Alle Schritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, um unerwünschte Reaktionen mit Sauerstoff zu vermeiden. Zu Beginn der Aufreinigung wurde der lyophilisierte Extrakt mit Methanol und HCl versetzt, was zur Veresterung der freien Carboxylgruppen am Tetrapyrrolringssystem und zum Verlust des Metallatoms führt. Das im Extrakt enthaltene Siro(häm)amid wird damit zum Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid (Abk.: SHM) modifiziert. Die weiteren Aufreinigungsschritte beinhalten, wie in Matthews et al. (1995) beschrieben, verschiedene Zentrifugations- und HPLC-Läufe. Mit dem isolierten Material wurde anschließend zunächst eine Dünnschichtchromatographie mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten (EM Science Silica Gel 60, 250 µm dick) mit einem Gemisch aus Ethylacetat:Methanol (Verhältnis: 9:1) als Laufmittel. Das aus *Desulfovibrio vulgaris* isolierte SHM ist in der mittleren Spur des in Abbildung 3.1 dargestellten Chromatograms aufgetragen, in der ersten Spur ist ein Epimer dieser Verbindung zu sehen. Der Epimerisierungsprozess ist eine spontan auftretende Reaktion die während der Aufreinigung des Sirohydrochlorinesters auftritt (Burkhalter und Timkovich, 1997), wobei die Epimerisation am

C3- oder C8-Atom des Tetrapyrrolrings stattfinden kann. Welches Epimer genau in *D. vulgaris* gebildet wurde, wurde jedoch nicht bestimmt, die angegebene Struktur 2 stellt daher nur eine Möglichkeit dar (Russel Timkovich, pers. Mitteilung). In Spur drei wurde das aus *A. vinosum* isolierte Material aufgetragen, das sich ähnlich zu dem aus *D. vulgaris* isolierten SHM verhält, allerdings auch deutliche Unterschiede zu diesem aufweist. Es zeigt eine schwache Schulter auf der Höhe von Struktur 1 bzw. Struktur 2, der größte Teil des Materials läuft jedoch tiefer als das SHM aus *D. vulgaris*. Siro(häm)amid ist demnach in dem Extrakt aus *A. vinosum* enthalten, allerdings zeigt die isolierte Verbindung deutliche Unterschiede zu dem aus *D. vulgaris* isolierten Siro(häm)amid.

Um eine genauere Auflösung der Struktur des isolierten Materials zu erhalten, wurde eine weitere HPLC-Aufreinigung durchgeführt (s. Abb. 3.2) (Bedingungen: Säulenmaterial Silicagel (\emptyset 5 μ m); Flussrate 1 ml/min; Laufmittel 98:2 Ethylacetat : Methanol mit 0,25 % Pyridin). Der Vergleich der beiden HPLC-Chromatogramme zeigt, dass aus *D. vulgaris* (A) nur ein SHM-Isomer isoliert wurde, in *A. vinosum* (B) scheinen jedoch mehrere Isomere des Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids vorhanden zu sein. Die einzelnen Fraktionen 2-7 des SHM's aus *A. vinosum* zeigten alle dasselbe UV-Vis Spektrum wie das isolierte Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid aus *D. vulgaris* (Russel Timkovich, pers. Mitteilung). Das SHM in Fraktion 4 von *A. vinosum* eluierte mit derselben Retentionszeit wie das SHM aus *D. vulgaris* von der Säule. Das Epimer dieser Verbindung (s. Abb.3.1), das auch während der Aufreinigung aus *D. vulgaris* in kleinen Mengen auftrat, eluierte mit der gleichen Retentionszeit wie Fraktion 2 von der Säule (Russel Timkovich, pers. Mitteilung).

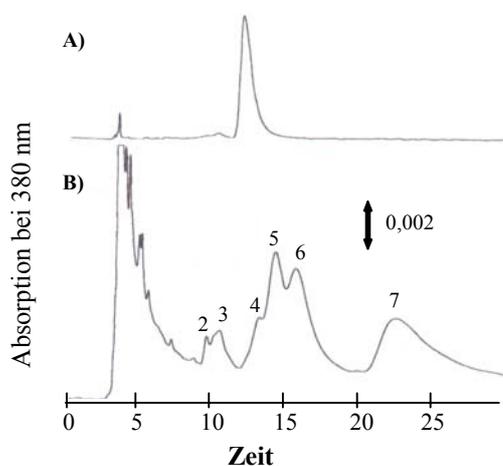


Abb.3.2: HPLC-Chromatogram des aufgereinigten Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids aus *D. vulgaris* (A) und aus *A. vinosum* (B); die Zahlen im Chromatogram B geben die Nummer der gesammelten Fraktionen an (s. Text).

Bei den Verbindungen, die bis zu einer Retentionszeit von 10 min von der Säule eluieren, handelt es sich um Verunreinigungen der Probe, die keine Tetrapyrrole enthalten (Russel Timkovich, pers. Mitteilung).

Zur weiteren Identifikation des aus *A. vinosum* isolierten SHMs wurden die Fraktionen 2-7 mit MALDI-TOF Massenspektroskopie weiter charakterisiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte wie bei Youn et al. (2002) beschrieben. Die Fraktionen 2, 3 und 4 zeigten alle die charakteristische Masse von 960 für das Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid (s. Abb. 3.3).

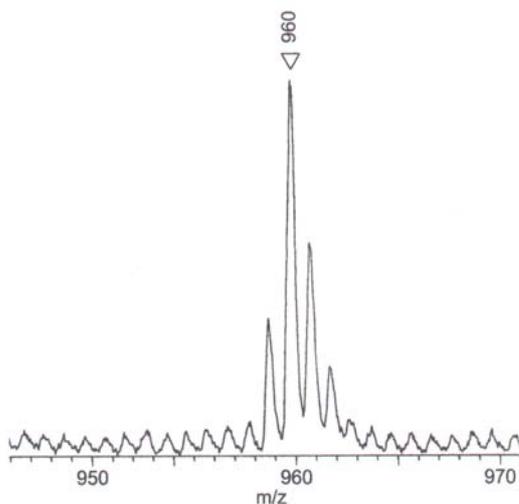


Abb. 3.3: MALDI-TOF Massenspektrometrie der HPLC-Fraktionen 2-4 (aus Abb. 3.2).

Die Fraktionen 2-4 enthalten demnach verschiedene Isomere des Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids, wie es schon das HPLC-Elutionsprofil (Abb. 3.2 (B)) des aus *A. vinosum* isolierten Materials vermuten ließ. Die isolierte Substanz in den Fraktionen 5-7 zeigt jedoch eine höhere Masse von 976. Siro(häm)amid verhält sich im Gegensatz zu anderen Tetrapyrrolen nach der „odd nitrogen rule“, die besagt, dass ein organisches Molekül mit einer ungeraden Anzahl von trivalenten Stickstoffatomen eine ungerade ganze Masse hat. Das protonierte Ion im MALDI-TOF besitzt also eine gerade Masse (Matthews et al., 1995). Das charakteristische chromatographische Verhalten und die gerade Masse (976) weisen auf die Anwesenheit einer funktionellen Amidgruppe hin. Möglicherweise handelt es sich hierbei um hydroxylierte Derivate des Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids (s. Abb. 3.4). Obwohl die Isolation unter anoxischen Bedingungen stattfand, ist es nicht immer möglich allen Sauerstoff auszuschließen. Häufig kommt es deshalb zu Oxidationsreaktionen am C3- und/oder C8-Atom des SHM's, wodurch es zur Bildung eines Alkohols kommt (Battersby et al., 1977). Bei der Isolation

des Siro(häm)amids aus *D. vulgaris* wurden diese Hydroxylierungsreaktionen ebenfalls beobachtet (Russel Timkovich, pers. Mitteilung).

Die Anwesenheit verschiedener Isomere des *A. vinosum* Siroamids könnte deshalb auf spontane Epimerisierungen und zufällige Hydroxylierungen durch Oxidationsreaktionen zurückzuführen sein. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Amidierung katalysierende Enzym (vermutlich DsrN) nicht streng stereospezifisch arbeitet, so dass die Amidgruppe an die anderen Acetatgruppen oder möglicherweise auch an die Propionatseitenketten angehängt wird.

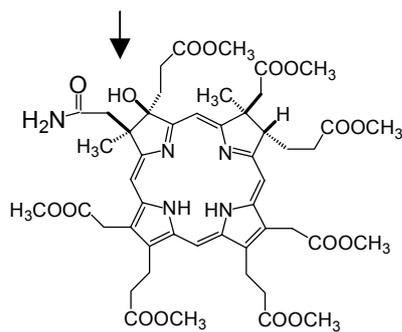


Abb. 3.4: Strukturformel des am C3 hydroxylierten Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids; die entstandene Alkoholgruppe am C3-Atom des Tetrapyrrolrings ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Insgesamt wurden aus den 250 g *A. vinosum* Zellen 69 nmol Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid isoliert, das entspricht 0,276 nmol Siro(häm)amid pro Gramm Zellen (Nassgewicht). Im Vergleich zu 70 nmol Siro(häm)amid die aus *D. vulgaris* isoliert wurden (Timkovich, pers. Mitteilung), ist dies eine sehr geringe Ausbeute. Außerdem wurden im Gegensatz zu dem aus *D. vulgaris* isolierten Material, das nur ein Isomer des Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids enthielt, aus *A. vinosum* mehrere Isomere des SHM's isoliert.

3.1.2 Nachweis von Siro(häm)amid in einer Sulfitreduktasepräparation

Die Analyse der löslichen Fraktion aus *A. vinosum* hat deutlich gezeigt, dass Siro(häm)amid in den Zellen vorhanden ist. Da *A. vinosum* bei Wachstum unter photolithoautotrophen Bedingungen auf reduzierten Schwefelverbindungen keine assimilatorische Sulfit- und Nitritreduktase bildet, ist das isolierte Siro(häm)amid mit grosser Wahrscheinlichkeit auf die prosthetische Gruppe der dissimilatorischen Sulfitreduktase (DsrAB) zurückzuführen. Um diese Annahme weiter zu bestätigen, wurde die Sulfitreduktase aus *A. vinosum* Zellen angereichert und wie die lösliche Proteinfraction (s.o.) auf den Gehalt an Siro(häm)amid untersucht.

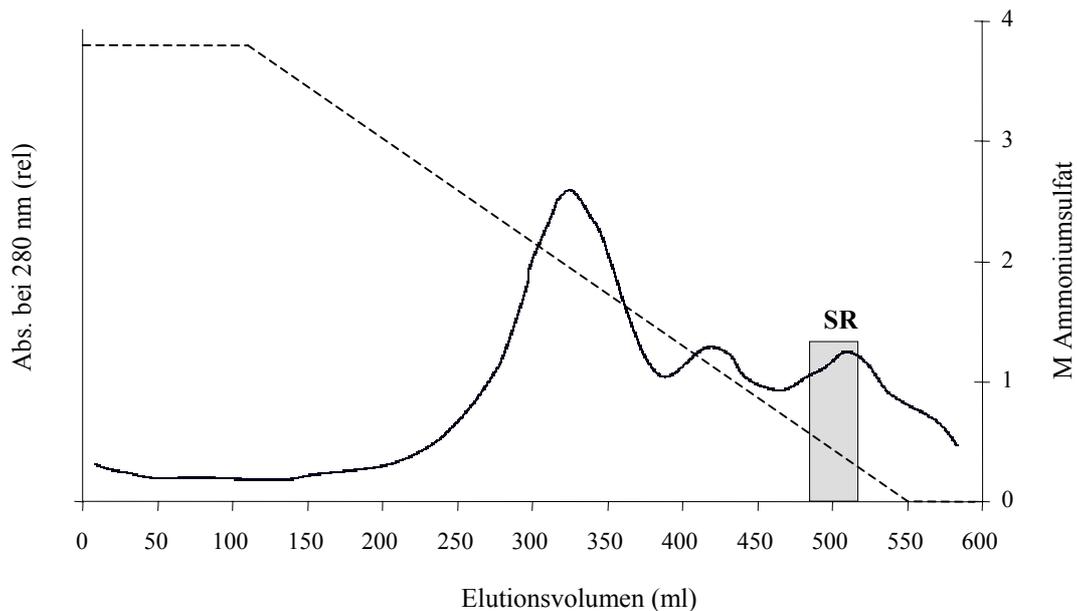


Abb. 3.5: Charakteristisches Elutionsprofil nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie (Phenylsepharose 4 Fast Flow) zur Anreicherung der Sulfitreduktase (SR); der Elutionsbereich der Sulfitreduktase (SR) wird durch den grauen Kasten markiert, die gestrichelte Linie stellt den absteigenden Ammoniumsulfatgradienten dar, die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel.) wieder.

3.1.2.1 Anreicherung der Sulfitreduktase (DsrAB)

Die Isolierung der Sulfitreduktase ist hier exemplarisch für 30 g Zellen (Nassgewicht) dargestellt. Die Zellen wurden im dreifachen Volumen Puffer aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und abzentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde über Nacht bei 4 °C einer 40%igen Ammoniumsulfatfällung unterzogen, der Fällungsüberstand auf eine äquilibrierte Phenylsepharose 4 Fast Flow-Säule (70 ml) aufgetragen und ungebundene Proteine durch Waschen der Säule mit Hochsalzpuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen absteigenden Gradienten von 3,7 M bis 0 M NH_4SO_4 (s. Abb. 3.5) in einem Volumen von 550 ml. Der Nachweis der Sulfitreduktase erfolgte durch die Messung der Absorption bei 395, 413 und 595 nm (Dahl et al., 1993). Die Sulfitreduktase eluierte bei einer Konzentration von 0,5 M bis 0,25 M NH_4SO_4 von der Säule. Diese Proben wurden vereinigt, dialysiert und auf eine MonoQ-Säule aufgetragen. Von dieser wurden ungebundene und schwach gebundene Proteine durch einen Waschschriff mit 300 mM NaCl entfernt. Die Elution der Sulfitreduktase erfolgte über einen linearen Gradienten von 300-600 mM NaCl in einem Volumen von 30 ml, wobei das Protein zwischen 460 und 500 mM NaCl von der Säule gewaschen wurde (s. Abb. 3.6). Die Aufreinigung der Sulfitreduktase wurde neben der Messung der charakteristischen Absorptionsmaxima auch über einen Western-Blot nach dem letzten Aufreinigungsschritt (MonoQ) überprüft.

Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen DsrB aus *A. fulgidus* (Dahl et al., 1993), der ebenfalls an DsrB aus *A. vinosum* bindet.

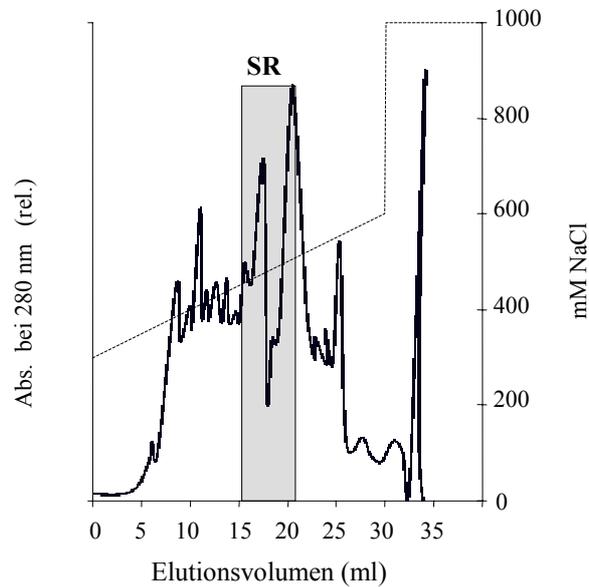


Abb. 3.6: Charakteristisches Elutionsprofil nach der Ionenaustauschchromatographie (MonoQ) zur Anreicherung der Sulfitreduktase (SR); der Elutionsbereich der Sulfitreduktase (SR) wird durch den grauen Kasten markiert; die gestrichelte Linie zeigt den NaCl-Gradienten, die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel.) wieder.

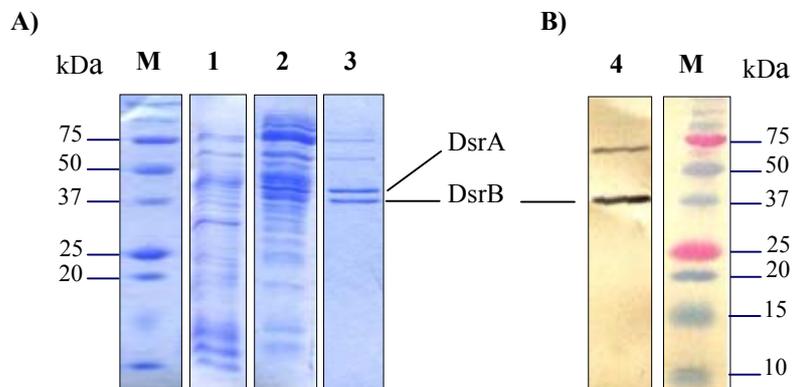


Abb. 3.7: A) SDS-Gel (Coomassie gefärbt) und B) Western-Blot zur Demonstration der Anreicherung der Sulfitreduktase (DsrA/B) aus *A. vinosum*; 1: Überstand nach Ammoniumsulfatfällung, 2: vereinigte Proben nach der Phenylsepharose-Säule, 3: vereinigte Proben nach der MonoQ, 4: Western-Blot der vereinigten Proben der MonoQ mit Antikörper gegen DsrB (Dahl et al., 1993), M: Marker.

Die erfolgreiche Anreicherung der Sulfitreduktase bis zu einer Reinheit von ~ 70 % und der Nachweis über Western-Blot (nach MonoQ) mit dem DsrB spezifischen Antikörper ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

3.1.2.2 Nachweis des Siro(häm)amids

Für den Nachweis von Siro(häm)amid aus Sulfitreduktasepräparationen wurde das Protein aus 150 g Zellen (= 80 l Flüssigkultur) aufgereinigt. Die Gesamtausbeute an Protein betrug 4,5 mg. Mit dem Extinktionskoeffizienten, der für die aus *E. coli* isolierte Sulfitreduktase bestimmt wurde ($18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (Young und Siegel, 1988b)), erfolgte die Berechnung des Siro(häm)amidgehalt der isolierten Proteinprobe. Aus der Sulfitreduktasepräparation mit berechneten 45,7 nmol Siro(häm)amid konnte SHM isoliert werden, jedoch nur in sehr geringen Mengen. Es wurden insgesamt nur 3 nmol SHM extrahiert und analysiert. Die HPLC-Analyse dieser Präparation ergab drei Fraktionen. Die größte entsprach ungefähr der Fraktion 6 aus der Präparation der löslichen Fraktion (s. Abb. 3.3) (Russel Timkovich, pers. Mitteilung). Die Masse dieser Fraktionen betrug ebenfalls 976, was der hydroxylierten Form des Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids entspricht (s. 3.1.1). Die Detektion gestaltete sich aufgrund der sehr geringen Menge des isolierten Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamids sehr schwierig. Dies ist vermutlich auch der Grund, weshalb nur die hydroxylierte Form nachgewiesen werden konnte, da schon geringe Mengen an Sauerstoff ausreichen, um das isolierte Material zu oxidieren (Russel Timkovich, pers. Mitteilung).

Die geringe Menge an isoliertem SHM in der angereicherten Proteinprobe ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass viele Proteine unter den eingesetzten sauren Bedingungen ausfallen. Dadurch kommt es möglicherweise dazu, dass die prosthetischen Gruppen nicht freigesetzt werden und mit dem Protein ausfallen. Dies wäre auch eine Erklärung für die geringe Ausbeute an Siro(häm)amid, die aus der löslichen Fraktion erhalten wurde.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Probe mit angereicherter Sulfitreduktase Siro(häm)amid enthielt, allerdings wurde das Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid nur in der hydroxylierten Form isoliert, was vermutlich auf nicht-enzymatische Oxidation durch geringe Mengen an Sauerstoff hervorgerufen wurde. Die prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase in *A. vinosum* ist demnach wie in *Desulfovibrio* sp. die amidierte Form des Sirohäm, das Siro(häm)amid.

3.2 Charakterisierung von DsrN aus *A. vinosum*

Durch den Nachweis von Siro(häm)amid als prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase in *A. vinosum*, kann die für DsrN postulierte Funktion als Sirohäm-Amidase bestätigt werden. Durch die im folgenden dargestellten biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurde das Enzym weiter charakterisiert.

3.2.1 Überexpression von rekombinantem DsrN in *E. coli*

Für erste Untersuchungen bezüglich der molekularen Masse des Proteins und als Positivkontrolle für den Nachweis der spezifischen Bindung von neu hergestellten Antikörpern gegen DsrN, wurde das Gen zunächst in *E. coli* überexprimiert. Das Anhängen eines N-terminalen Oligohistidinrestes sollte eine spätere mögliche Aufreinigung des Proteins erleichtern.

Für die Konstruktion des Überexpressionsvektors wurde das Gen über PCR mit den mutagenen Oligonukleotiden NEXf und NEXr (s. Tab. 2.4) so modifiziert, dass die Amplifikate am Startcodon eine *NdeI*-Schnittstelle und am Stoppcodon eine *BamHI*-Schnittstelle erhielten. Über diese Schnittstellen wurde das Gen in den ebenfalls mit *NdeI* und *BamHI* geschnittenen Expressionsvektor pET15b bzw. pET11a (Novagen, Madison, USA) kloniert. Die Expression von *dsrN* in pET15b führt zum Anhängen von 6 Histidinresten an den N-Terminus des Proteins. Der entstandene Expressionsvektor wurde als pNEX5 bezeichnet. Nach der gleichen Strategie wurde das *dsrN*-Gen auch in den Vektor pET11a kloniert. Die Expression des Proteins mit diesem Vektor, der als pNEX8 bezeichnet wurde, führt nicht zu Modifikationen am Protein. Durch Sequenzierung der Klonierungsübergänge durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten, D) wurde die korrekte Insertion des Gens in die Vektoren überprüft.

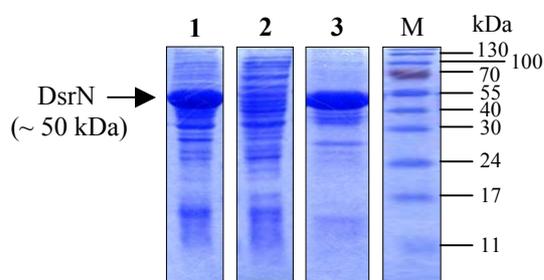


Abb. 3.8: SDS-Gel (Coomassie gefärbt) der Überproduktion von DsrN mit dem Vektor pNEX8 in *E. coli* BL21(DE3); 1: Rohextrakt nach Ultraschallaufschluss, 2: Überstand nach Zentrifugation 3: Zentrifugationspellet, resuspendiert in zum Überstand äquivalenten Volumen, M: Marker.

Die erhaltenen Vektoren wurden in den Expressionstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Produktion der rekombinanten Proteine und der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.8.1 und 2.8.2 beschrieben. Der erhaltene Rohextrakt (Extrakt nach Ultraschallaufschluss), der Zentrifugation-

süberstand, sowie das in einem dem Zentrifugationsüberstand entsprechendem Volumen resuspendierte Pellet wurden in einer SDS-Page aufgetrennt. DsrN konnte mit beiden Vektoren in großer Menge produziert werden, wobei die Expression von *dsrN* ohne Histag (mit pNEX8) zu größeren Ausbeuten führte. Die aufgrund der Sequenz berechnete Grösse von 50,2 kDa (Pott-Sperling, 2000) stimmte mit der im SDS-Gel bestimmten Grösse von ~ 50 kDa überein (s. Abb. 3.8). Nach dem Aufschluss wurde jedoch deutlich, dass das Protein zum größten Teil im Pellet und damit in „inclusion bodies“ vorlag. Da die Expression von DsrN mit beiden Vektoren zur Bildung von „inclusion bodies“ führte, konnte ausgeschlossen werden, dass das Anhängen des N-terminalen Histags für die Fehlfaltung des Proteins verantwortlich war. Durch die Variation der Expressionstemperatur (30 °C und 37 °C) und die Variation der IPTG-Konzentration (25 – 1000 µM) konnte die Bildung der „inclusion bodies“ nicht unterdrückt werden, bzw. das Verhältnis der Bildung von „inclusion bodies“ zu korrekt gefaltetem Protein konnte nicht auf die Seite des korrekt gefalteten Proteins verschoben werden¹.

Um auszuschließen, dass das Problem der „inclusion bodies“ auf das Expressionssystem zurückzuführen ist, wurde das *dsrN*-Gen noch in einen weiteren Expressionsvektor kloniert, den Vektor pMHE2*crt*Km (Fodor et al., 2004). Dieser Vektor enthält neben einem in *E. coli* nutzbaren Promotor auch noch eine Promotorsequenz aus *Thiocapsa roseopersicina*, was die Expression des *dsrN*-Gens und möglicherweise sogar eine Überexpression in *A. vinosum* ermöglichen könnte. Die Klonierung von *dsrN* in diesen Vektor erfolgte ebenfalls über PCR. Die Amplifikation von *dsrN* erfolgte mit den beiden mutagenen Oligonukleotiden dsrLHindIII_f und PNEX_r (s. Tab. 2.4). Durch diese Primer wurde in das amplifizierte Gen eine *Hind*III-Schnittstelle am Genanfang und eine *Bam*HI-Schnittstelle am Stoppcodon eingefügt. Über diese Schnittstellen erfolgte die Klonierung in den ebenfalls mit *Hind*III und *Bam*HI geschnittenen pMHE2*crt*Km Vektor. Die Expression von *dsrN* in *E. coli* BL21(DE3) pMHE2*crt*Km*dsrN* führte ebenfalls zum Anhängen eines N-terminalen Oligohistidinrestes an das Protein. Auch mit diesem Vektor wurde DsrN in *E. coli* BL21(DE3) ausschließlich in Form von „inclusion bodies“ produziert.

3.2.1.1 Aufreinigung von DsrN aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen

Da die Überexpression von *dsrN* unabhängig vom Vektor und dem Anfügen eines N-terminalen Histags nur unkorrekt gefaltetes Protein in Form von „inclusion bodies“ ergab, wurde versucht, dass Protein, produziert in *E. coli* BL21(DE3) pNEX5, unter denaturierenden Bedingungen aus den „inclusion bodies“ aufzureinigen. Wie unter 2.8.7 beschrieben wurden die „inclusion body-“

¹ Die Experimente zur Bildung von „inclusion bodies“ bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen IPTG-Konzentrationen wurden von Monika Krähling durchgeführt.

Proteine in Puffer, dem 6 M Harnstoff zugesetzt wurde, resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation befand sich das denaturierte Protein im Überstand. Durch die vorherige Abtrennung der löslichen Proteine nach dem Ultraschallaufschluss, enthielt dieser Überstand zum größten Teil nur noch rekombinantes DsrN. Der Versuch einer weiteren Aufreinigung des denaturierten DsrN über eine Nickelchelatsäule (s. 2.8.8.1) zeigte keinen nennenswerten Erfolg. Eine Abtrennung der restlichen kontaminierenden Proteine erfolgte nicht. Da das resuspendierte Pellet jedoch zum größten Teil nur noch DsrN enthielt, wurde dieses in den folgenden Renaturierungsversuchen eingesetzt.

3.2.1.2 Renaturierung von denaturiertem DsrN

Für weitere Untersuchungen bezüglich der Eigenschaften von DsrN, wie z.B. einer möglichen ATP-Bindung des Proteins oder der Bildung von Dimeren oder höheren Oligomeren im nativen Zustand, musste das denaturierte Protein renaturiert werden. Die Renaturierung des Proteins erfolgte über die Inkubation in Puffern mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen (s. 2.8.7 und pET System Manual, Novagen, Madison). Das Fehlen von Cofaktoren im nativen DsrN erhöht die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Renaturierung des Proteins.

Das denaturierte Protein wurde für 10 h oder über Nacht gegen Puffer mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen dialysiert. Ein Teil des Proteins fiel während der Renaturierungsversuche aus, der größte Teil befand sich jedoch auch nach der Dialyse noch in Lösung. Das Protein wurde nach dem letzten Dialyseschritt in Puffer ohne Harnstoff auf ein natives Gel aufgetragen, um festzustellen, ob definierte Banden, die auf renaturiertes Protein hindeuten, auftraten. Der grösste Teil des Proteins „schmierte“ jedoch über das Gel bzw. wanderte gar nicht erst in das Gel ein. Ganz schwach konnten zwei definierte Banden im unteren Teil des Gels festgestellt werden, die jedoch nur einen sehr geringen Teil des aufgetragenen Proteins repräsentierten. Die Renaturierung des Proteins war demnach nicht sehr erfolgreich. Weitere Versuche zum Nachweis von renaturiertem DsrN erfolgten mit einer ATP-Agarosesäule (s. 2.8.7.1). Da die Sequenz von *dsrN* eine Bindestelle für ATP zeigt, wurde versucht eine erfolgreiche Renaturierung, wenn auch nur von einem kleinen Teil des Proteins, über die Bindung des Proteins an eine ATP-Agarosesäule zu zeigen. Außer der Trennung von renaturiertem DsrN von nicht renaturiertem DsrN, könnten so auch erste Hinweise auf die enzymatische Aktivität des Proteins erhalten werden. Die Bindung von DsrN an die ATP-Liganden der Säule würde die Sequenzhinweise auf eine ATP-Bindung des Proteins bestätigen. Dies würde wiederum die postulierte Funktion von DsrN bei der Amidierung des Sirohäm zum Siro(häm)amid unter Verbrauch von ATP weiter unterstützen.

Die dialysierte Probe wurde auf eine äquilibrierte ATP-Agarosesäule (Volumen: 1 ml) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen der Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über die Zugabe von ATP zum Elutionspuffer. DsrN wurde schon im Waschschrift von der Säule entfernt, gebundenes DsrN konnte nicht von der Säule eluiert werden. Die Renaturierung von DsrN war demnach nicht erfolgreich.

3.2.2 Nachweis von DsrN in *A. vinosum*

Der in vivo Nachweis der Bildung von DsrN in *A. vinosum* sollte durch Western-Blot-Analyse erfolgen. Dazu wurden Antikörper gegen eine synthetische Peptidsequenz von DsrN durch die Firma Eurogentec S.A. (Seraing, B) hergestellt. Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden DsrN-Antikörper erwiesen sich als unbrauchbar, da sie keine spezifische Bindung an das in *E. coli* überproduzierte Protein zeigten. Deshalb wurde zunächst ein neuer Antikörper benötigt. Beim ersten Versuch wurden die Antikörper nur gegen eine DsrN-Peptidsequenz hergestellt, beim zweiten Mal wurden dagegen zwei verschiedene Sequenzbereiche für die Produktion der synthetischen Peptide ausgewählt. Die gleichzeitige Injektion von zwei verschiedenen Peptidsequenzen sollte die Chancen für einen funktionsfähigen Antikörper erhöhen.

Der immunologische Nachweis von DsrN erfolgte zunächst mit der löslichen Fraktion und der Membranfraktion von photolithoautotroph angezogenen *A. vinosum* Zellen. Als Kontrolle wurde das rekombinante DsrN verwendet. Dieses zeigt eine eindeutige Bande auf der erwarteten Höhe von ~50 kDa (Abb. 3.9), ein Beweis dafür, dass der neue Antikörper spezifisch an DsrN bindet. In den beiden Fraktionen aus Zellmaterial von *A. vinosum* konnte jedoch keine Bande in der entsprechenden Größe detektiert werden. Möglicherweise bindet der Antikörper nicht sehr stark an das Protein und /oder die Konzentration von DsrN in den Zellen ist sehr gering. Um DsrN dennoch in *A. vinosum* nachweisen zu können, sollte das Protein durch weitere Reinigungsschritte angereichert werden. Da es sich bei DsrN vermutlich um ein cytoplasmatisches Protein handelt, wurde die lösliche Fraktion für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Im Fällungsüberstand nach einer 40%igen NH_4SO_4 -Fällung konnte eine schwache Bande auf der Höhe von ~ 50 kDa detektiert werden (s. Abb. 3.9). Ein deutlicherer Nachweis von DsrN gelang in den Fraktionen der Phenylsepharose und der MonoQ, die bei der Aufreinigung von DsrL (s. 3.3.4) erhalten wurden. Wie Abb. 3.9 zeigt, wurde durch die verschiedenen Aufreinigungsschritte eine Anreicherung von DsrN erreicht, die zu einem deutlicheren Nachweis des Proteins im Western-Blot führte. Die Produktion von DsrN in vivo unter photolithoautotrophen Bedingungen konnte damit bestätigt werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es sich bei DsrN um ein lösliches Prote-

in mit der erwarteten Grösse von ~ 50 kDa handelt. Eine Aufreinigung von DsrN wurde aufgrund der geringen Konzentration des Proteins in *A. vinosum* nicht durchgeführt.

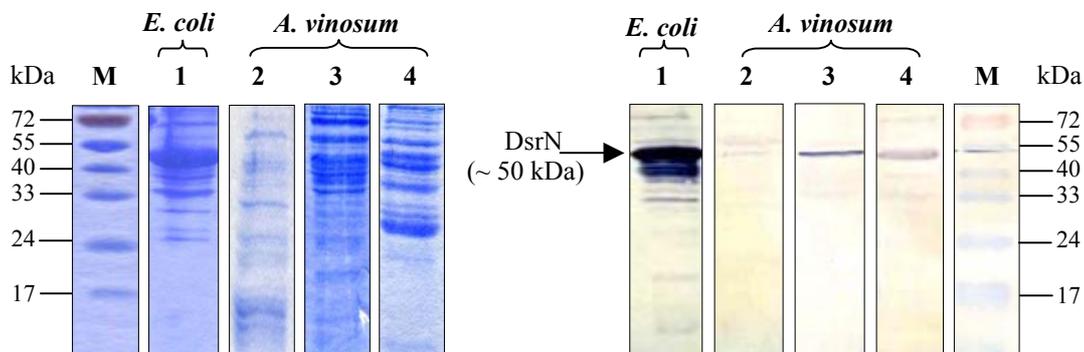


Abb. 3.9: SDS-Gel (Coomassie-gefärbt) und Western-Blot mit Antikörpern gegen DsrN; 1: Rohextrakt der Überproduktion von DsrN in *E. coli* BL21(DE3) pNEX8; 2: Überstand der Ammoniumsulfatfällung; 3: Phenylsepharosefraktion (s. Text); 4: MonoQ-Fraktion (s. Text), M: Marker.

3.2.3 Physiologische Untersuchung zur Funktion von DsrN

Die Untersuchung der Funktion von DsrN auf genetischer Ebene erfolgte mit Hilfe von *dsrN*-Deletionsmutanten, die durch „in frame“-Mutagenese erzeugt wurden. Im Gegensatz zu der bisher angewendeten Methode der Interposonmutagenese (Pott-Sperling, 2000) können durch die „in frame“-Mutagenese polare Effekte auf die anderen Gene des Operons vermieden werden. Damit wurde sichergestellt, dass der Phänotyp der Mutante allein auf das Ausschalten des *dsrN*-Gens zurückzuführen ist.

3.2.3.1 Herstellung eines Rifampicin resistenten *A. vinosum* Stammes

Für *A. vinosum* steht seit 1995 ein System zur manipulativen Genetik zur Verfügung (Pattaragulwanit und Dahl, 1995), bei dem Plasmide über Konjugation mit einem *E. coli*-Donorstamm übertragen werden können. Für das selektive Abtöten des *E. coli* nach der Konjugation wird ein *A. vinosum*-Stamm mit einer zusätzlichen nicht in *E. coli* enthaltenen Resistenz benötigt. Der bisher verwendete streptomycinresistente *A. vinosum* SM50-Stamm (Dahl, 1996) hatte jedoch die Konjugationsfähigkeit über die Jahre verloren. Deshalb wurde zuerst eine neue Spontanmutante des *A. vinosum* DSM 180^T mit einer Resistenz gegen Rifampicin hergestellt. Rifampicin wurde statt Streptomycin ausgewählt, um ein grösseres Spektrum an Vektoren u.a. auch mit Streptomycinresistenzen nutzen zu können. Der hergestellte *A. vinosum* Rif50 Stamm ist gegen eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin im Medium resistent, die ausreicht, um den verwendeten *E. coli* S17.1 (Simon et al., 1983) abzutöten.

3.2.3.2 Herstellung von „in frame“ Deletionsmutanten

Für die Herstellung der „in frame“-Deletionsmutanten wurde die Strategie des Gene SOEing (Horton, 1995) angewendet. Bei dieser Methode werden aus der genomischen DNA PCR-Fragmente stromauf- und stromabwärts der zu deletierenden Region amplifiziert und in einer darauffolgenden PCR-Reaktion zusammengefügt (s. 2.7.3.2). Das entstehende Fragment enthält dann die genaue Ausgangssequenz mit der Deletion der Zielregion ohne eine Verschiebung des Leserahmens. Durch modifizierte Primer wurden an den Enden der Fragmente *XbaI*-Schnittstellen eingefügt, über die die Klonierung in den ebenfalls mit *XbaI* geschnittenen Vektor erfolgte.

Als Klonierungsvektor für die „in-frame“-Mutagenese wurde der Vektor pK18*mobsacB* (Schäfer et al., 1994) eingesetzt. Dieser Vektor kann aufgrund der enthaltenen Mobilisierungsregion in eine Vielzahl Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien über Konjugation übertragen werden. In *A. vinosum* ist dieser Vektor nicht replizierbar. Neben der Kanamycinresistenz enthält der Vektor das *sacB*-Gen, das für eine Laevansaccharase kodiert. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Fructanen (Laevanen) aus Saccharose. Die Expression dieses Gens in Anwesenheit von Saccharose ist für viele Gram-negative Bakterien letal (Jäger et al., 1992). Die genaue Ursache hierfür ist noch nicht bekannt, vermutlich führt aber die Expression des Gens in Anwesenheit von Saccharose zu einem Verschleimen der Zellen, was das Absterben der Zellen zur Folge hat. Dieser Effekt sollte später zur Selektion der Doppelcrossover-Mutanten, die den Vektor nicht mehr enthalten sollten, genutzt werden.

Zunächst wurde deshalb die Fähigkeit von *A. vinosum* zum Wachstum auf verschiedenen Saccharosekonzentrationen überprüft. Dazu wurden Phytagelplatten mit 0 – 10 % Saccharose gegossen. Wachstum von *A. vinosum* konnte auf allen Platten detektiert werden, mit nur einer leichten Reduktion des Wachstums bei höheren Saccharosekonzentrationen. Zur Selektion von „Doublecrossover“-Mutanten (= nicht-vektortragenden) bzw. Revertanten (= Wildtyp) wurde deshalb eine Konzentration von 10 % Saccharose im Medium eingesetzt.

Konstruktion des *dsrN*-Deletionsvektors pK18*mobsacB*Δ*dsrN*

Die PCR-Fragmente zur Klonierung des *dsrN*-Deletionsvektors pK18*mobsacB*Δ*dsrN* wurden mit den Primern NXbaA / Nrev3 (1. Fragment, 1572 bp) und Nfor3 / NXbaD (2. Fragment, 1249 bp) amplifiziert. Die Fragmente eins und zwei dienten in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize. Es entstand ein 2821 bp grosses Amplifikat der genomischen Region um *dsrN*, mit einer Deletion der *dsrN*-Gensequenz von 1281 Basenpaaren. Dieses Fragment wurde über die in die Primer

NXbaA und NXbaD eingefügten *Xba*I-Schnittstellen in den ebenfalls mit *Xba*I restringierten pK18*mobsacB*-Vektor kloniert. Der fertige Vektor wurde als pK18*mobsacB* Δ *dsrN* bezeichnet.

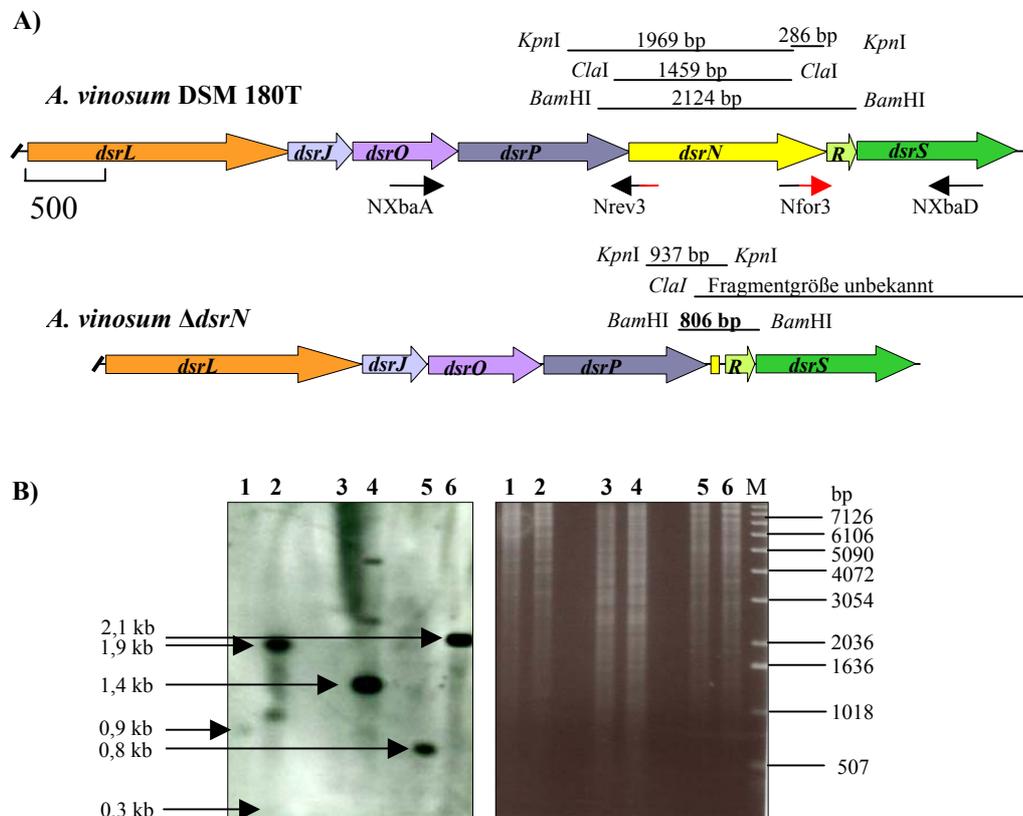


Abb. 3.10: A) Schematische Darstellung der genomischen Region um *dsrN* in Wildtyp und Mutante und Lage der für die Herstellung des Deletionsvektors benutzten Primer; B) Southern-Blot-Hybridisierung der *dsrN*-Deletionsmutante *A. vinosum* Δ *dsrN* im Vergleich zum Wildtyp *A. vinosum* Rif50; 1/2: *A. vinosum* Δ *dsrN* / *A. vinosum* Rif50 mit *Kpn*I restringiert; 3/4: *A. vinosum* Δ *dsrN* / *A. vinosum* Rif50 mit *Cla*I restringiert; 5/6: *A. vinosum* Δ *dsrN* / *A. vinosum* Rif50 mit *Bam*HI restringiert; die den Spuren im Blot entsprechenden Spuren im Agarosegel sind mit derselben Zahl nummeriert; M: 1 kb DNA-Marker

Konstruktion und Identifizierung von *A. vinosum* Δ *dsrN* auf genetischer Ebene

Der Vektor pK18*mobsacB* Δ *dsrN* wurde in *E. coli* S17.1 transformiert und mit *A. vinosum* Rif50 konjugiert. Zunächst erfolgte die Selektion auf Transkonjuganten, die das Plasmid durch ein „Single-crossover“ ins Genom integriert hatten. Dabei wurde auf die vektorvermittelte Kanamycinresistenz selektioniert, der *E. coli*-Stamm wurde durch die Zugabe von Rifampicin zum Medium abgetötet. Potentielle „Single-crossover“-Mutanten wurden über Kolonie-PCR überprüft. Positive Klone wurden auf RCV-Flüssigmedium ohne Kanamycin angezogen. Damit sollte erreicht werden, dass durch den fehlenden Selektionsdruck der Vektor aus dem Genom wieder entfernt wurde. Nach einer Woche und einmaligem Überimpfen der Kulturen wurden die Zellen auf RCV-Phytageplatten mit 10 % Saccharose ausplattiert. Die unter diesen Bedingungen erhal-

tenen Klone waren entweder Revertanten oder „Double-crossover“-Mutanten, die die Deletion des *dsrN*-Gens trugen.

Die Identifizierung von *dsrN*-Deletionsmutanten erfolgte zunächst über Kolonie-PCR. Die DNA eines positiven Klons wurde isoliert und über Southern-Blot-Hybridisierung überprüft. Dazu wurden die Restriktionsenzyme *KpnI*, *ClaI* und *BamHI* eingesetzt. Wie Abbildung 3.10 zeigt, waren die Banden der Mutante beim Verdau mit *KpnI* und *BamHI* um den Betrag der Deletion kleiner, als die Bande des Wildtyps. Eine Wildtypbande ist in der Mutante nicht mehr vorhanden. Die zweite *ClaI*-Schnittstelle der bekannten Sequenz des *dsr*-Operons liegt im Bereich der Deletion, sie wurde also mit der Deletion von *dsrN* entfernt, so dass keine kleinere Bande als die des Wildtyps erhalten wurde. Der „Schmier“ im oberen Bereich des Blots in der entsprechenden Spur zeigt die vermutlich sehr grosse Bande des hybridisierenden Fragments an. Die fertige Mutante wurde als *A. vinosum* $\Delta dsrN$ bezeichnet.

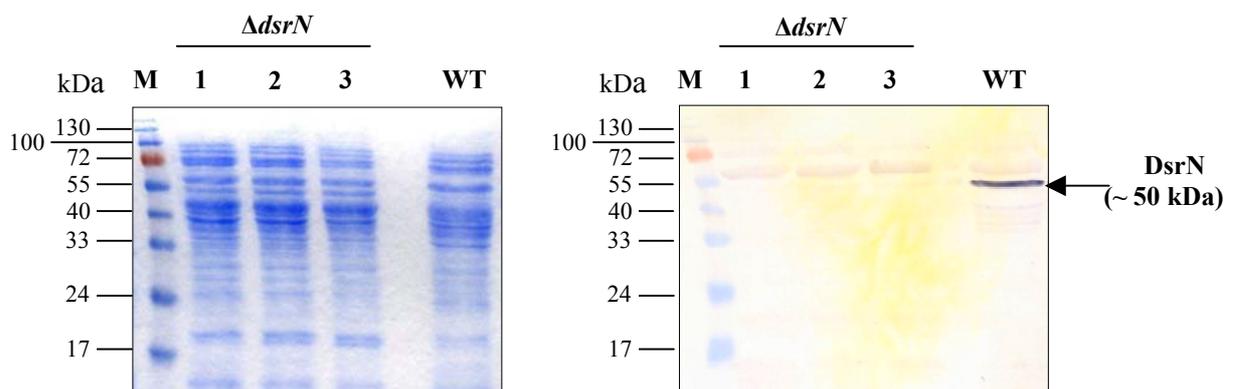


Abb. 3.11: SDS-Gel (Coomassie gefärbt) und Western-Blot mit Antikörpern gegen DsrN; 1-3: Fraktion (80, 82, 84) der Phenylsepharoseaufreinigung mit Material aus *A. vinosum* $\Delta dsrN$, WT: Fraktion der Phenylsepharoseaufreinigung (82) mit Material aus *A. vinosum* Wildtyp; M: Marker.

Nachweis der Deletion von *dsrN* in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ mit Western-Blot

Die erfolgreiche Ausschaltung des Gens wurde außer auf genetischer Ebene, auch auf Proteinebene untersucht. Wie schon unter Punkt 3.2.2. beschrieben ist der Nachweis von DsrN aufgrund der geringen Menge des Proteins in den Zellen sehr schwierig. Um das Fehlen von DsrN in der Mutante deutlich nachweisen zu können, wurden zunächst Zellen von *A. vinosum* $\Delta dsrN$ in großer Menge photolithoautotroph angezogen und aufgeschlossen. Der immunologische Nachweis, dass DsrN nicht mehr in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ vorhanden ist, erfolgte nach Phenylsepharoseaufreinigung mit den Fraktionen, die im Wildtyp eine deutliche Bande für DsrN zeigten. Wie Abbil-

dung 3.11 zeigt, ist DsrN in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ nicht mehr enthalten. Dieser Nachweis bestätigt zusätzlich die spezifische und korrekte Bindung des DsrN-Antikörper and DsrN.

Neben dem Beweis des Fehlens von DsrN in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ sollte außerdem nachgewiesen werden, dass die Expression der anderen Gene des *dsr*-Operons durch die Deletion von *dsrN* nicht beeinflusst wurde. Als Beispiel für die Expression eines Gens, das stromaufwärts von *dsrN* im *dsr*-Operon kodiert ist, wurde *dsrL* ausgewählt. Der immunologische Nachweis von DsrL aus der löslichen Fraktion in Abbildung 3.12 zeigt, dass die Produktion von DsrL durch die Deletion von *dsrN* nicht beeinflusst ist. Stromabwärts von *dsrN* liegen nur noch zwei weitere Gene im *dsr*-Operon, *dsrR* und *dsrS*. Gegen die von den Genen kodierten Proteine standen keine funktionierenden Antikörper zur Verfügung, deshalb konnte die Produktion dieser Proteine nicht bestätigt werden. Da die Deletion von *dsrN* „in frame“ durchgeführt wurde, sollte jedoch die Expression der Gene nicht beeinflusst sein.

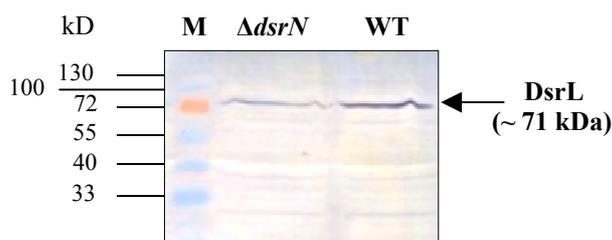


Abb. 3.12: Western-Blot mit Antikörpern gegen DsrL; lösliche Fraktion aus Kulturen von 1) *A. vinosum* $\Delta dsrN$, 2) *A. vinosum* Wildtyp; pro Spur wurden 20 μ g Protein aufgetragen, M: Marker;

3.2.3.3 Phänotypische Charakterisierung der *dsrN*-Deletionsmutante

Die Auswirkung der Deletion von *dsrN* wurde auf physiologischer Ebene in Bezug auf die Fähigkeit zur Schwefeloxidation untersucht. Dazu wurde die isolierte Mutante zunächst auf Thio-sulfatmedium angezogen, um erste Hinweise auf den Phänotyp zu erhalten.

Gasdichte 1 l-Kulturflaschen mit Thiosulfatmedium wurden 10%ig mit photoorganoheterotroph auf RCV-Medium angezogenen Vorkulturen angeimpft. Um die Akkumulation und die Oxidation des intrazellulären Schwefels zu verfolgen, wurden zu verschiedenen Zeiten Proben gezogen, aus denen die Konzentration des Schwefels bestimmt wurde. Der pH-Wert der Kulturen wurde bei jeder Probenentnahme überprüft und falls notwendig wieder auf pH 7,0 eingestellt. Abbildung 3.13 zeigt, dass *A. vinosum* $\Delta dsrN$ im Vergleich zum Wildtyp den intermediär gespeicherten Schwefel langsamer abbaut. Die Deletion von *dsrN* hat anscheinend eine Verzögerung der Schwefeloxidation zur Folge, sie führt jedoch unter diesen Bedingungen nicht zu einer kompletten Hemmung der Schwefeloxidation.

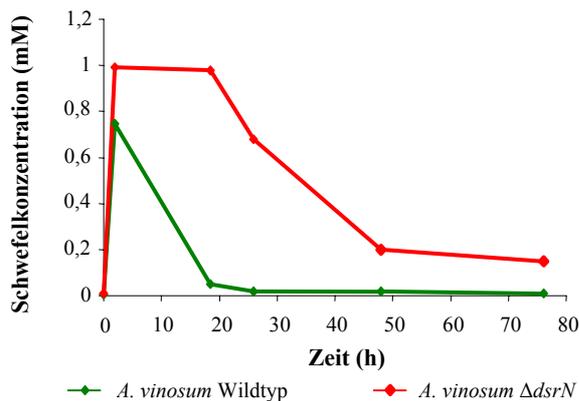
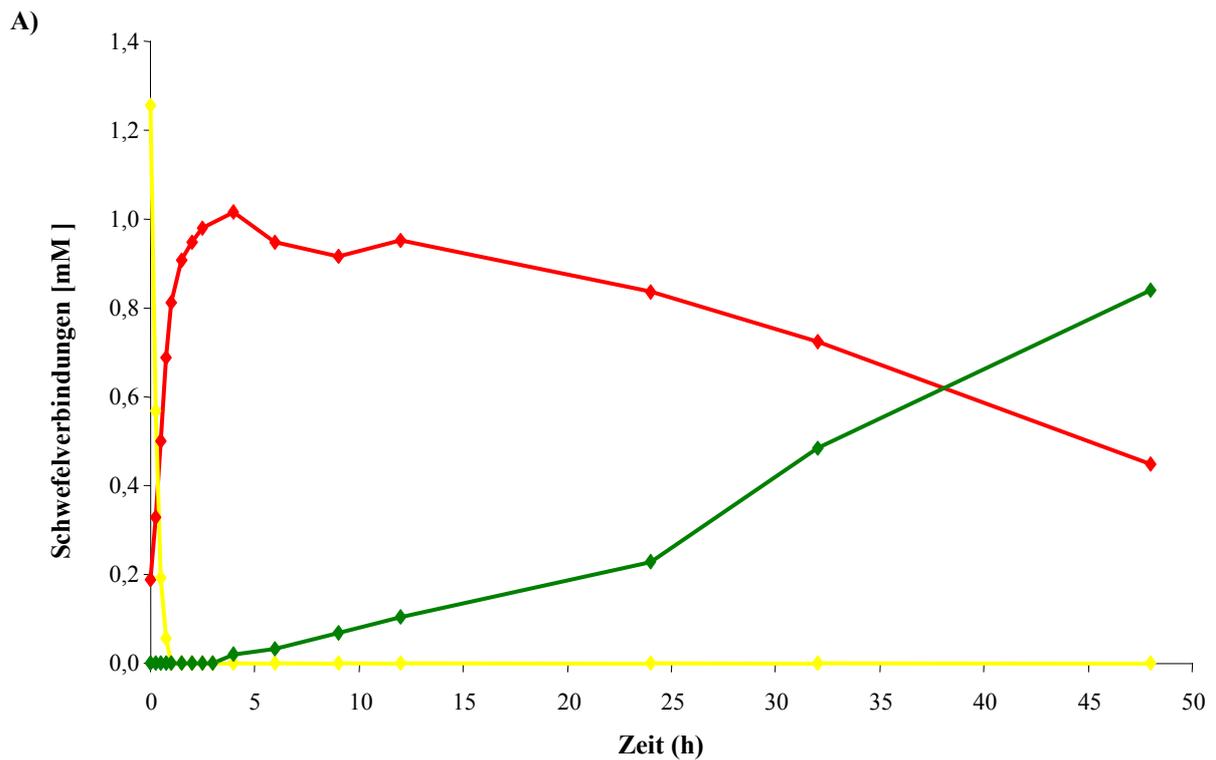


Abb. 3.13: Vergleich der Akkumulation und der Oxidation intrazellulären Schwefels in *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp) und *A. vinosum* $\Delta dsrN$ beim Wachstum auf 1 l Thiosulfatmedium.

Die genauere Charakterisierung der Mutante erfolgte im Fermenter unter kontrollierteren Wachstumsbedingungen, als es in der Flaschenkultur möglich war. Als photosynthetischer Elektronendonator wurde den Kulturen Sulfid in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Entstehendes Sulfat konnte damit direkt auf die Oxidation des akkumulierten Schwefels zurückgeführt werden. Für die Fermenterversuche wurde die Mutante bzw. der Wildtyp photoorganoheterotroph in 1 l Vorkulturen über vier Tage angezogen. Das steril abzentrifugierte Zellmaterial wurde dann als Inokulum für die Fermenterkultur eingesetzt. Die Kultur erfolgte entweder in 1,5 l Pfennig-Medium (7,5 mM Sulfid), oder in 1 l O-Medium, dem zu Beginn des Versuchs steril 2 – 4 mM Sulfid zugegeben wurde. Der Umsatz der reduzierten Schwefelverbindungen wurde durch regelmäßige Probenentnahmen verfolgt. Aus den gezogenen Proben wurde der Sulfid-, Thiosulfat-, Schwefel- und Sulfatgehalt bestimmt. Außerdem erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben, für eine spätere Berechnung der Oxidationsraten.

Der zeitliche Verlauf der Sulfidoxidation in einem Fermenter mit O-Medium, dem 2 mM Sulfid zugegeben wurde, ist exemplarisch für *A. vinosum* $\Delta dsrN$ und *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp) mit allen relevanten Zwischenprodukten bis zum Sulfat in Abbildung 3.14 dargestellt. Von dem zu Beginn des Versuches zugegebenen 2 mM Sulfid, konnte nur etwa die Hälfte in der ersten Probe detektiert werden. Ein Teil des Sulfids ging vermutlich beim Autoklavieren der Lösung verloren, ein weiterer möglicherweise beim Animpfen der Fermenter. Der Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante zeigt, dass die Oxidation des zugesetzten Sulfids in beiden Kulturen gleich schnell erfolgte. Die Oxidation des Sulfids ist, wie zu erwarten war, nicht durch die Deletion von *dsrN* beeinträchtigt. Bei der Mutante zeigt sich jedoch, im Gegensatz zum Wildtyp, eine Art Plateau im Schwefelgehalt zwischen der 4. und der 12. Stunde der Kultur, in der die Schwefelkonzentration nur geringfügig absinkt. Erst dann erfolgt die Oxidation akkumulierten Schwefels, allerdings deutlich langsamer als im Wildtyp.



—◆— mM Schwefel —◆— mM Sulfid —◆— mM Sulfat

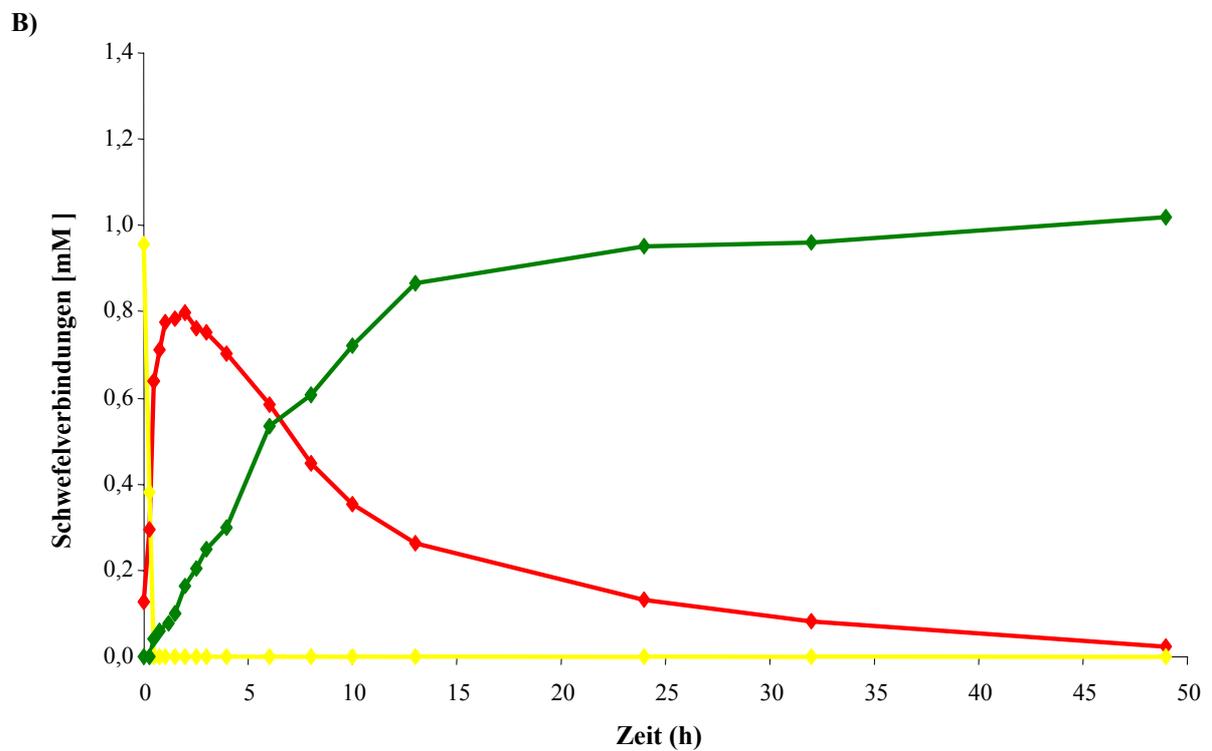


Abb. 3.14: Umsatz von Sulfid (2 mM) in A) *A. vinosum* $\Delta dsrN$ und B) *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp); dargestellt sind die Sulfidkonzentration (gelb), die Schwefelkonzentration (rot) und die Sulfatkonzentration (grün) der Kulturen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Der Proteingehalt betrug in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ 145 $\mu\text{g/ml}$, in *A. vinosum* Rif50 140 $\mu\text{g/ml}$.

Das zu Beginn der Versuche detektierte Sulfid findet sich im Wildtyp vollständig im Sulfat wieder. In der Mutante sind dagegen immer noch Schwefelkugeln vorhanden, so dass nur ein Teil des eingesetzten Sulfids als Sulfat detektiert werden konnte. In weiteren Fermenterversuchen über einen längeren Kultivierungszeitraum konnte in der *dsrN*-Deletionsmutante jedoch niemals die dem eingesetzten Sulfid entsprechende Menge an Sulfat detektiert werden, da immer noch Schwefelkugeln in diesen Zellen vorhanden waren. Die Mutante ist anscheinend nicht in der Lage den kompletten akkumulierten Schwefel zu oxidieren.

Sulfit konnte höchstens zu Beginn der Kultur, meistens jedoch gar nicht detektiert werden. Die Bildung von Polysulfiden, die während der Oxidation des Sulfids auftreten (Gehrke, 2000; Prange et al., 2004), wurde ebenfalls durch die Deletion von *dsrN* nicht verändert, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese deshalb in Abb. 3.14 nicht dargestellt.

DsrN ist unter den hier getesteten Bedingungen nicht essentiell für die Schwefeloxidation, führt jedoch zu einer sehr starken Verlangsamung des Prozesses. In der Mutante kann nicht der komplette akkumulierte Schwefel zu Sulfat oxidiert werden.

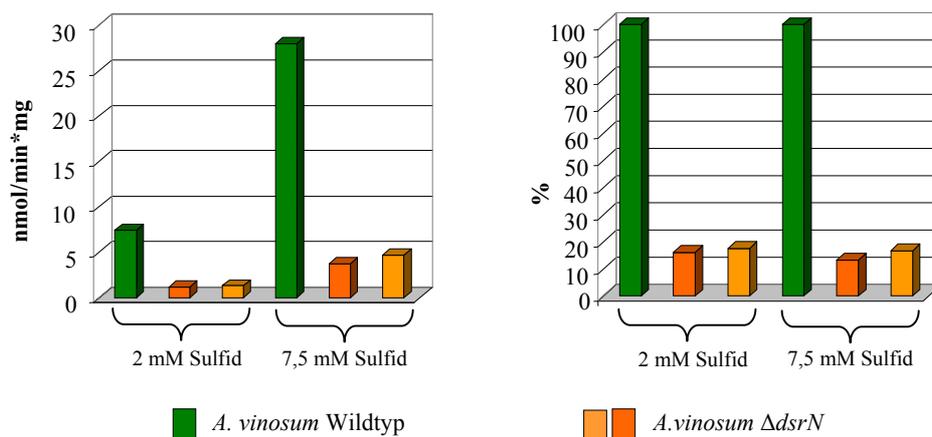


Abb. 3.15: Vergleich der Schwefeloxidationsraten in *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp, grün) und *A. vinosum* $\Delta dsrN$ (2 Kulturen dargestellt, Kurven in orange und rot) auf Medium mit 2 bzw. 7,5 mM Sulfid; das linke Diagramm gibt die Schwefeloxidationsraten in nmol/min*mg Protein an, das rechte in Prozent bezogen auf den Wildtyp (= 100%).

Abbildung 3.15 zeigt einen Vergleich der Schwefeloxidationsraten von Wildtyp und $\Delta dsrN$ -Mutante (jeweils zwei verschiedene Kulturen dargestellt) auf Medium mit 2 bzw. 7,5 mM Sulfid. Auf Medium mit 2 mM Sulfid beträgt die Oxidationsrate im Wildtyp 7,4 nmol/min*mg Protein und in der Mutante 1,2 bzw. 1,3 nmol/min*mg. Auf 7,5 mM Sulfid wurden im Wildtyp Schwefeloxidationsraten von 27,9 nmol/min*mg Protein und in der Mutante von 3,7 bzw. 4,7 nmol/min*mg Protein gemessen. Höhere Sulfidkonzentrationen im Medium führen sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante zu höheren Schwefeloxidationsraten. Prozentual gesehen

beträgt die Oxidationsrate der Mutante jedoch auf beiden Sulfidkonzentrationen nur ~ 15 % der Schwefeloxidationsrate des Wildtyps (s. Abb. 3.15). Die Deletion von *dsrN* führt eindeutig zu einer starken Verlangsamung der Schwefeloxidation, die auch durch höhere Sulfidkonzentrationen im Medium nicht aufgehoben werden kann. Möglicherweise führt die fehlende Amidierung des Sirohäm-Cofaktors der Sulfitreduktase zu einer Abnahme der Enzymaktivität, die zu dem beobachteten Phänotyp der $\Delta dsrN$ -Mutante führt.

Zellmaterial aus jedem Fermenter wurde mit Kolonie-PCR überprüft, so dass sichergestellt werden konnte, dass der beobachtete Phänotyp auch auf die Mutante bzw. den Wildtyp zurückzuführen ist.

3.2.3.4 Komplementation von *A. vinosum* $\Delta dsrN$ mit *dsrN*

Die Komplementation von *A. vinosum* $\Delta dsrN$ mit *dsrN* sollte als abschließender Nachweis zeigen, dass die Deletion von *dsrN* allein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Bisher wurde ein solches Experiment in *A. vinosum* noch nicht durchgeführt, so dass zu Beginn des Versuches kein funktionierendes Expressionssystem für *A. vinosum* zur Verfügung stand. Aufgrund der Lokalisation von *dsrN* im *dsr*-Operon, konnte das Gen nicht zusammen mit einem Promotor über PCR amplifiziert und kloniert werden. Bei der Suche nach einem geeigneten Promotor für die Expression von *dsrN* wurde zunächst der Promotor des Gens für die RuBisCo (*rbcA*) aus *A. vinosum* getestet. Mit diesem Promotor wurde von de Smet et al. (2001) eine erfolgreiche Produktion von Flavocytochrom c (ebenfalls aus *A. vinosum*) in *Rhodobacter capsulatus* nachgewiesen. In *A. vinosum* wurde das System jedoch nicht getestet.

Die Konstruktion aus *rbc*-Promotor und *dsrN*-Gen wurde in den in *A. vinosum* replizierbaren Vektor pBBR1MCS2 (Kovach et al., 1995) kloniert. Die erfolgreiche Expression von *dsrN* über den *rbc*-Promotor konnte in *Rhodobacter capsulatus* nachgewiesen werden (nicht dargestellt), eine Komplementation der $\Delta dsrN$ -Mutante dagegen jedoch nicht (nicht dargestellt).

Aufgrund dieser Fehlversuche wurde ein neuer Komplementationsvektor hergestellt. Bei diesem wurde als Promotor die potentielle Promotorregion des *dsr*-Operons, die sich vor dem ersten Gen des Operons (*dsrA*) befindet (Pott und Dahl, 1998), eingesetzt. Da der genomischen Sequenz von *dsrN* aufgrund der Lokalisation in der Transkriptionseinheit des *dsr*-Operons nicht direkt eine Terminationsstruktur folgt, wurde diese dem Gen im Komplementationsvektor zusätzlich angehängt. Die Konstruktion wurde ebenfalls in den Vektor pBBR1MCS2 kloniert (s.u.).

Konstruktion des *dsrN*-Komplementationsvektors pBBR1MCS2*dsrN*

Die Klonierung des Vektors erfolgte über PCR mit mutagenen Oligonukleotiden. Die Amplifikation des *dsr*-Promotors erfolgte mit den Primern Dsr-Promotor-forw und Dsr-Promotor-rev, über die eine *Xba*I-Schnittstelle und eine *Nde*I-Schnittstelle in das entstehende ca. 900 bp große Fragment eingeführt wurden. Dieses Fragment wurde in den ebenfalls mit *Xba*I und *Nde*I restringierten *dsrN*-Überexpressionsvektor pNEX5 (s. 3.2.1) direkt vor die *dsrN*-Gensequenz (*Nde*I-Schnittstelle direkt im Startcodon des *dsrN*-Gens) eingefügt. Dieses Konstrukt aus *dsr*-Promotor und *dsrN*-Gen wurde mit der im Vektor an das *dsrN*-Gen anschließenden Terminatorsequenz mit den mutagenen Oligonukleotiden Dsr-Promotor forw und pet15b rev über PCR amplifiziert. Das entstandene ~ 2,8 kb große Fragment wurde mit *Xba*I und *Hind*III (*Hind*III Schnittstelle über den Primer pet15b rev eingeführt) restringiert und in den Vektor pBBR1MCS2 kloniert (s. Abb. 3.16).

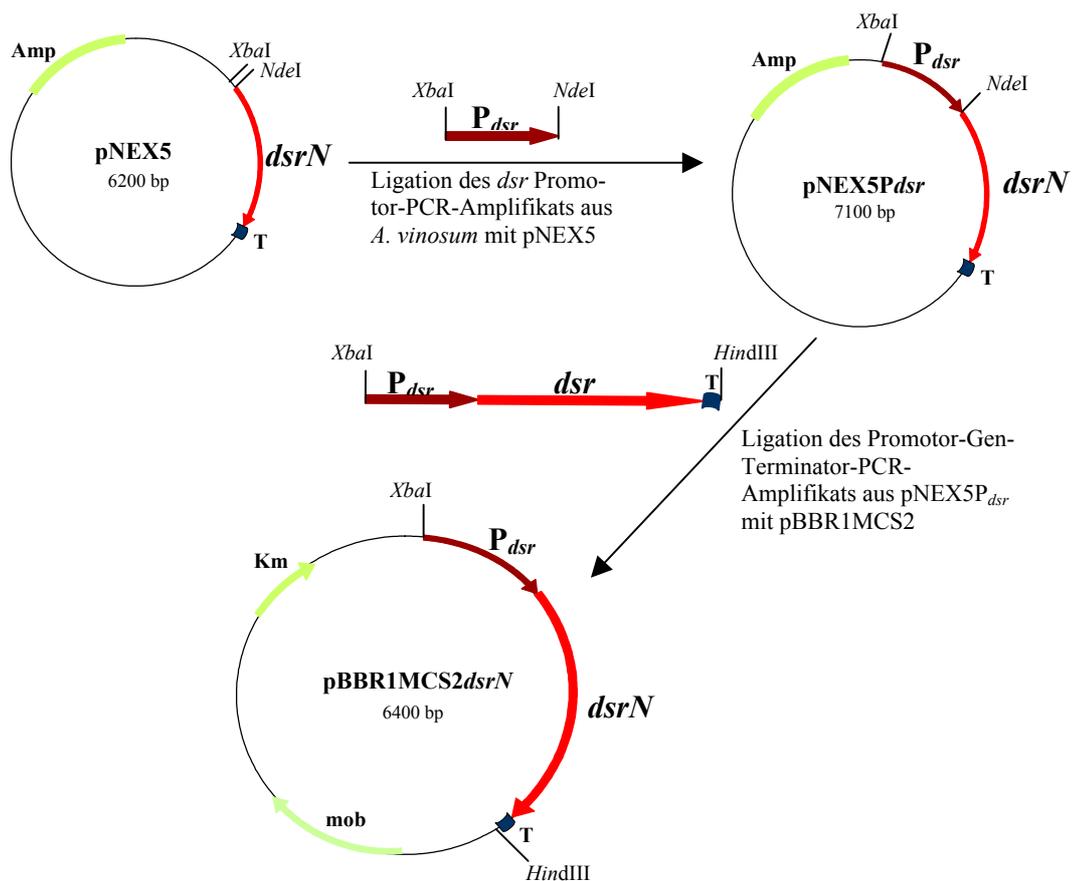


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des *dsrN*-Komplementationsvektors pBBR1MCS2*dsrN*, Erläuterung s. Text; nur die relevanten Schnittstellen sind dargestellt, T = Terminatorsequenz.

Komplementation und Charakterisierung der Komplementation

Der Komplementationsvektor pBBR1MCS2*dsrN* wurde über Konjugation in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ übertragen. Die erhaltenen kanamycinresistenten Klone von *A. vinosum* $\Delta dsrN$ sollten den Vektor tragen, wurden jedoch zusätzlich mit Kolonie-PCR überprüft.

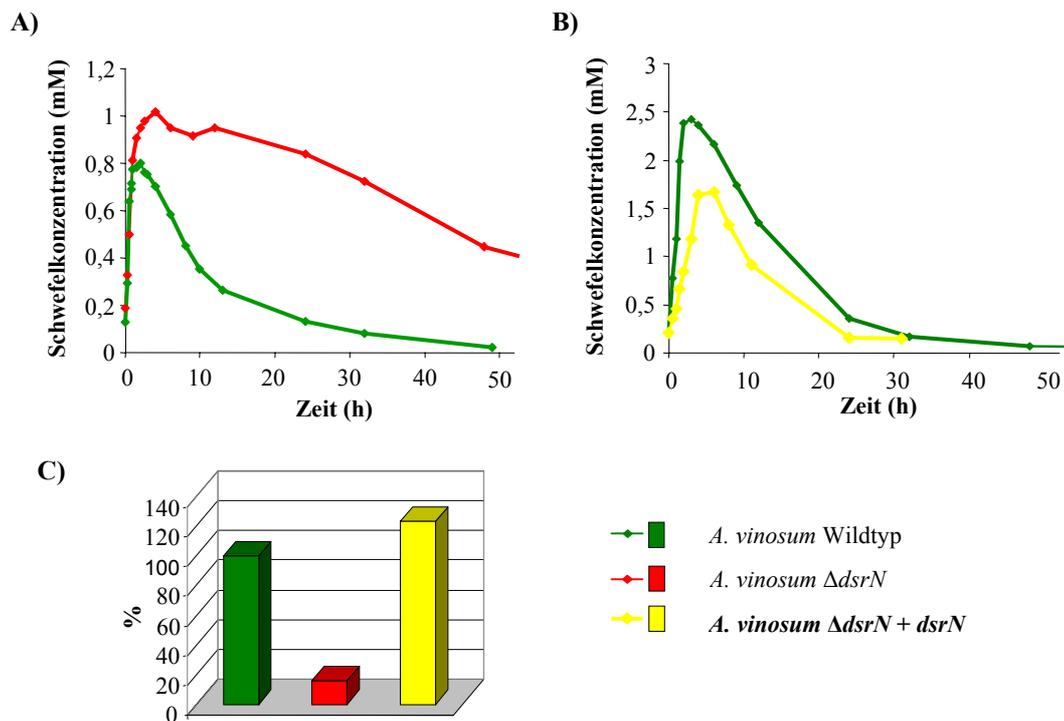


Abb. 3.17: Vergleich der Akkumulation und Oxidation intrazellulären Schwefels in A) *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp, grün) und *A. vinosum* $\Delta dsrN$ (rot) und B) *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp, grün) und *A. vinosum* $\Delta dsrN + dsrN$ (gelb); C) Vergleich der Oxidationsraten der verschiedenen Kulturen in %.

Die Charakterisierung der Komplementationsmutante *A. vinosum* $\Delta dsrN + dsrN$ erfolgte ebenfalls im Fermenter wie unter 3.2.3 beschrieben. In der Komplementationsmutante erfolgte die Schwefeloxidation mit vergleichbaren, teilweise niedrigeren, teilweise höheren Raten wie im Wildtyp *A. vinosum* Rif50. Die Oxidation des akkumulierten Schwefels (dargestellt in Abbildung 3.17) beim Wachstum auf 4 mM Sulfid erfolgte in der Komplementationsmutante mit 14,4 nmol/(min*mg Protein), im Wildtyp mit 11,8 nmol/(min*mg Protein). Die Komplementationsmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp und auch zu der $\Delta dsrN$ -Mutante eine verzögerte Sulfidoxidations- bzw. Schwefelbildungsrate. Dies ist vermutlich auf eine verringerte Wachstumsrate aufgrund der Expression der Kanamycinresistenz zurückzuführen. Die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Schwefelkonzentration in der Komplementationsmutante im Vergleich zum Wildtyp und der Deletionsmutante in Abbildung 3.17 zeigt deutlich, dass der Phänotyp der

verlangsamten Schwefeloxidation in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ durch die Komplementation mit dem *dsrN*-Gen aufgehoben werden konnte.

Die Kontrolle der Produktion von DsrN mit dem Vektor pBBR1MCS2 in *A. vinosum* $\Delta dsrN$ + *dsrN* erfolgte durch Western-Blot-Analysen mit dem Zellmaterial der Fermenterversuche. Der immunologische Nachweis von DsrN aus der löslichen Fraktion der Wildtypzellen zeigte eine schwache Bande auf der Höhe von DsrN, die in der Mutante fehlte (s. Abb. 3.18). In der Komplementationsmutante wurde ebenfalls eine Bande in der Höhe von DsrN detektiert. Die erfolgreiche Expression von DsrN mit dem potentiellen Promotor des *dsr*-Operons ist ebenfalls ein Beweis dafür, dass der Promotor des *dsr*-Operons wie vermutet in den ersten 900 bp vor *dsrA* liegt. Außerdem konnte mit dieser Methode ein erfolgreiches Expressionssystem für *A. vinosum* etabliert werden.

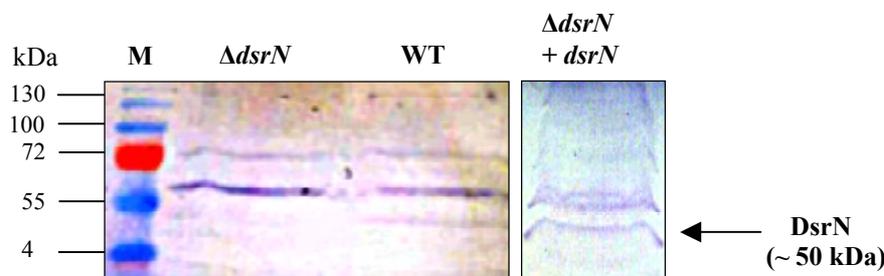


Abb. 3.18: Western-Blot der löslichen Fraktionen der angegebenen Kulturen mit Antikörpern gegen DsrN; in allen Spuren wurden 200 μ g Protein aufgetragen, M: Marker.

3.2.3.5 Nachweis der Sulfitreduktase in *A. vinosum* $\Delta dsrN$

DsrN ist vermutlich an der Synthese der prosthetischen Gruppe der Sulfitreduktase beteiligt. Der Nachweis von Siro(häm)amid in der löslichen Fraktion und auch in den Fraktionen mit angereicherter Sulfitreduktase (s. 3.1) unterstützt diese Vermutung. Die *dsrN*-Deletionsmutante *A. vinosum* $\Delta dsrN$ zeigt keine komplette Hemmung der Schwefeloxidation, sondern nur eine Verzögerung der Reaktion. Naheliegender wäre nun der Nachweis, dass kein Siro(häm)amid mehr in der Mutante enthalten ist. Da der Nachweis von Siro(häm)amid im Wildtyp aufgrund der geringen nachweisbaren Konzentrationen in den Proben schon sehr schwierig war, wurde von einem solchen Negativ-Nachweis Abstand genommen. Auch wenn am Ende der Siro(häm)amidisolation kein SHM in dem Material aus der Mutante nachgewiesen werden könnte, könnte man nicht mit Gewissheit sagen, dass dies auf ein Fehlen der Substanz in der Probe zurückzuführen ist. Aufgrund der geringen Konzentration wäre es möglich, dass ein Großteil der sowieso geringen Menge während der Isolation verloren gegangen wäre und der Rest unterhalb der Nachweisgrenze läge.

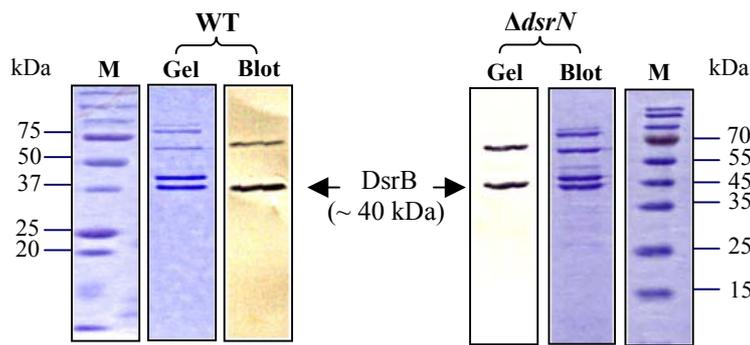


Abb. 3.19: SDS-Page (Coomassie gefärbt) und Western-Blot mit Antikörpern gegen DsrB zum Nachweis der Sulfitreduktase nach Aufreinigung aus *A. vinosum* Rif50 (links) und *A. vinosum* $\Delta dsrN$ (rechts); M: Marker;

Eine Aufreinigung der Sulfitreduktase aus photolithoautotroph angezogenen *A. vinosum* $\Delta dsrN$ -Zellen sollte zeigen, ob die Deletion von *dsrN* einen Einfluss auf die Bildung oder auch die Stabilität der Sulfitreduktase hat. Die Anreicherung der Sulfitreduktase erfolgte wie unter 3.1.2.1 für die Anreicherung aus dem Wildtyp beschrieben. Die Aufreinigung wurde anhand des charakteristischen Spektrums der Sulfitreduktase verfolgt. Nach dem letzten Aufreinigungsschritt über Anionenaustauschchromatographie wurde die Sulfitreduktase außerdem über Western-Blot nachgewiesen. Anhand des Spektrums sind keine Unterschiede im Vergleich zum Spektrum der Sulfitreduktase aus dem Wildtyp zu sehen. Dies war zu erwarten, da die Amidierung des Sirohämns keinen Einfluss auf das UV-Vis-Spektrum der Sulfitreduktase hat (Matthews et al., 1995). Auch die Aufreinigung der Sulfitreduktase aus der Mutante läßt keinerlei Hinweise auf eine Auswirkung des Fehlens von DsrN auf die Stabilität oder Bildung der Sulfitreduktase erkennen (s. Abb. 3.19).

3.2.4 Suche nach *dsrN*-homologen Genen im Genom von *A. vinosum*

Im Genom von *Chlorobaculum tepidum* (Eisen et al., 2002) wurden zwei Cluster mit *dsr*-homologen Genen gefunden. Einige der *dsr*-homologen Gene waren dabei in beiden Clustern zu finden, lagen im Genom also doppelt vor (Dahl et al., 2005). Ein zu *dsrN*-homologes Gen wurde jedoch nur in einem der Cluster gefunden. Trotzdem wurde genomische DNA von *A. vinosum* mit einer *dsrN*-Gensonde nach möglichen *dsrN*-homologen Genen, möglicherweise auch im Umfeld weiterer *dsr*-Gene, untersucht. Die heterologe Hybridisierung des Southern Blots wurde bei 60 °C durchgeführt. Im Blot wurden keine weiteren Banden außer den bekannten Banden für *dsrN* detektiert. Es scheint kein weiteres *dsrN*-Gen in *A. vinosum* vorhanden zu sein. Damit

konnte zusätzlich bewiesen werden, dass der Phänotyp der $\Delta dsrN$ -Mutante nicht durch ein weiteres nicht ausgeschaltetes *dsrN*-homologes Gen beeinflusst wird.

3.3 Charakterisierung von DsrL

3.3.1 Sequenzvergleiche mit DsrL-homologen Proteinen

Um einen aktuellen Überblick über die in den Datenbanken enthaltenen DsrL-homologen Sequenzen zu erhalten, wurde mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *dsrL*-Gens aus *A. vinosum* eine BLAST-Suche (Altschul et al., 1997) durchgeführt. Tabelle 3.1 zeigt nur die zehn zu DsrL aus *A. vinosum* ähnlichsten Proteine. Für einige der DsrL-homologen Proteine wurde eine Funktion als Glutamatsynthase angegeben, die aber in keinem Fall experimentell bestätigt wurde. Interessanterweise liegen die Gene der ersten fünf Proteine (grau unterlegt) in direkter Nachbarschaft zu Genen, deren Genprodukte hohe Homologien zu anderen Proteinen des *dsr*-Operons aus *A. vinosum* aufweisen, so dass es sich bei diesen vermutlich um „echte“ DsrL-Proteine handelt. Die folgenden aufgeführten fünf Proteinsequenzen zeigen außerdem viel geringere Ähnlichkeiten zu DsrL, was deutlich macht, dass es sich hierbei nicht um „echte“ DsrL-Proteine handelt. In dem sequenzierten Genom von *Chlorobaculum tepidum* (Eisen et al., 2002) wurden zwei *dsrL*-homologe Gene mit fast identischer Sequenz gefunden. Die Gensequenzen liegen an unterschiedlichen Stellen im Genom, in deren direkter Umgebung sich weitere *dsr*-Gene befinden. Die beiden Cluster sind jedoch nicht identisch (Dahl et al., 2005).

Für eine genauere Sequenzanalyse von DsrL wurde ein ClustalW Alignment (Thompson et al., 1994) mit den identifizierten DsrL-Proteinen durchgeführt. Für eine leichtere Bestimmung der Lage der Dinukleotid- und FAD-Bindestellen wurden die DsrL homologen Sequenzen der β -Untereinheiten der Glutamatsynthase aus *E. coli* (Accession Nr. P09832) und *A. brasiliense* (Accession Nr. Q05756) in das Alignment mit aufgenommen. Im N-Terminus enthalten die Sequenzen der β -Untereinheiten der Glutamatsynthasen zwei Cysteincluster. Das erste enthält vier, das zweite drei oder vier Cysteinreste, die vermutlich einen [4Fe-4S]- und einen [3Fe-4S]- bzw. [4Fe-4S]-Cluster koordinieren (Hagen et al., 2000a). Im ersten Cluster enthält die DsrL-Sequenz aus *A. vinosum*, wie auch die der anderen DsrL-Proteine nur drei konservierte Cysteinreste (der zweite fehlt), das zweite Cluster entspricht jedoch dem Motiv für die Bindung eines [3Fe-4S]-Clusters.

Tab. 3.1: Mit dem BLAST-Programm (Altschul et al., 1997) ermittelte Ähnlichkeiten von DsrL zu in den Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen; die zehn ähnlichsten Sequenzen, die mit Standard BLAST (blastp) detektiert wurden, sind dargestellt. „Echte“ DsrL Proteine sind grau unterlegt.

| Identifikation, Genbank | mögl. Funktion bzw. Sequenzähnlichkeiten des homologen Proteins, Organismus | Identische Aminosäuren | Ähnliche Aminosäuren |
|--|--|------------------------|----------------------|
| gi 23014811 ref ZP_00054610.1 (NZ_AAAP01003833.1) | COG0493: mögl. NADPH-abhängige Glutaminsynthase, beta UE und verwandte Oxidoreduktasen <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1 | 60 % | 77 % |
| gi 52006359 ref ZP_00333740.1 (NZ_AAFH01000005.1) | COG0493: mögl. NADPH-abhängige Glutaminsynthase beta UE und verwandte Oxidoreduktasen <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259 | 59 % | 73 % |
| gi 21673683 ref NP_661748.1 (NC_002932.3) | Eisen-Schwefel-Cluster enthaltendes Protein der GltD- Familie <i>Chlorobaculum tepidum</i> TLS | 38 % | 54 % |
| gi 21675056 ref NP_663121.1 (NC_002932.3) | Eisen-Schwefel-Cluster enthaltendes Protein der GltD Familie <i>Chlorobaculum tepidum</i> TLS | 38 % | 54% |
| gi 48833132 ref ZP_00290155.1 (NZ_AAAN02000009.1) | COG0493: mögl. NADPH-abhängige Glutaminsynthase, beta UE und verwandte Oxidoreduktasen <i>Magnetococcus sp.</i> MC-1 | 37 % | 52 % |
| gi 53758660 gb AAU92951.1 (AE017282.2) | Pyridine Nucleotide-Disulfide Oxidoreductase Proteinfamilie <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath. | 31 % | 46 % |
| gi 50841651 ref YP_054878.1 (NC_006085.1) | Dehydrogenase, GltD Familie <i>Propionibacterium acnes</i> KPA171202 | 31 % | 46 % |
| gi 54309174 ref YP_130194.1 (NC_006370.1) | hypothetische NADPH-abhängige Glutaminsynthase <i>Photobacterium profundum</i> SS9 | 31 % | 46 % |
| gi 5715987 dbj BAD85801.1 (AP006878.1) | Glutamatsynthase beta UE verwandte Oxidoreduktase, enthält 2Fe-2S and 4Fe-4S Cluster <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 | 30 % | 46 % |
| gi 21673121 ref NP_661186.1 NP_661186 | Putative Glutamatsynthase, kleine Untereinheit <i>Clorobaculum tepidum</i> TLS | 28 % | 43 % |

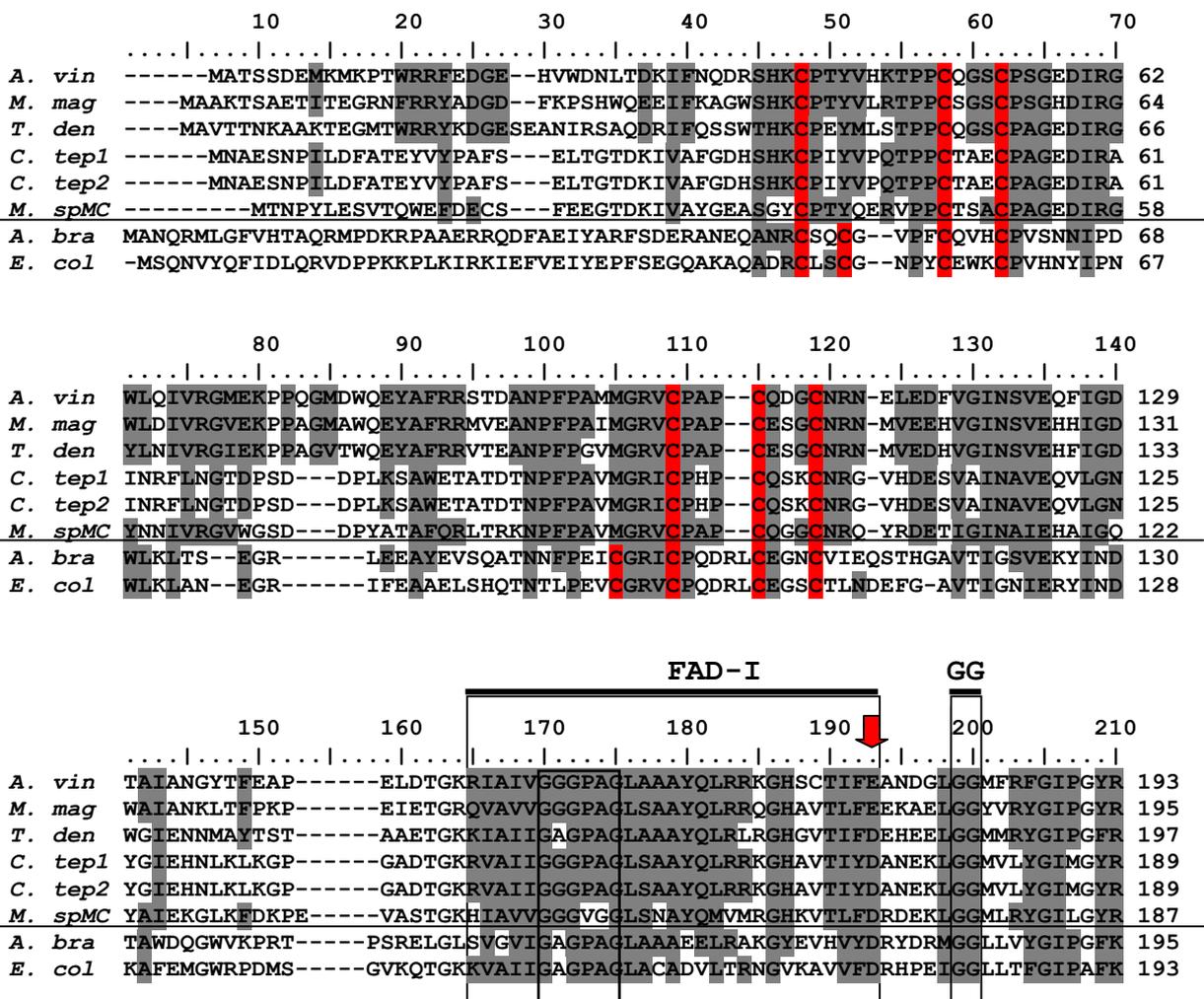
Die bisher vermutete erste Nukleotidbindestelle (Pott-Sperling, 2000) konnte durch den in Abbildung 3.20 dargestellten Sequenzvergleich bestätigt werden. Genauere Sequenzanalysen zeigten, dass in diesem Bereich das von Wierenga et al. (1986) für NADH und FAD-Bindedomänen beschriebene ohxhxGxGxxG/Axxxhxxhxxxx.....hxD/E – Motiv, das strukturell zur einer $\beta\alpha\beta$ -Faltung führt, enthalten ist. Dieses Motiv gilt ebenfalls für NADP(H)-Bindedomänen, mit der Ausnahme, dass der letzte saure Aminosäurerest (D/E) wegen der negativ geladenen 2'Phosphatgruppe des NADP(H) durch einen hydrophoben Rest ersetzt ist. Im weiteren Text wird dieses Motiv als DBM = Dinukleotidbinde-Motiv bezeichnet. Dabei steht das o für eine polare oder geladene Aminosäure und das h für einen hydrophoben Aminosäurerest. Bei diesem ersten Motiv handelt es sich vermutlich um die Bindestelle des Dinukleotidanteils des FAD, da

dem Motiv in einem Abstand von sechs Aminosäureresten ein GG folgt, wie es auch in vielen anderen Flavoproteinen direkt hinter der DBM gefunden wurde (Vallon, 2000). Außerdem zeigen Vergleiche unter komplexeren Flavoproteinen, die wie z. B. Glutamatsynthasen zwei Dinukleotid-Bindedomänen mit jeweils einem DBM besitzen, dass meistens die erste Domäne an der FAD-Bindung beteiligt ist, die zweite an der NAD(P)H-Bindung. Das GG-Motiv wurde immer nach dem ersten DBM gefunden (Vallon, 2000).

Für die Position der zweiten Dinukleotidbindestelle wurden in dem neu erstellten Alignment zwei verschiedene Sequenzabschnitte gefunden. Die erste Sequenz, die in A. Pott (2000) beschrieben wurde, ist zwischen *A. vinosum*, *M. magnetotacticum* und *T. denitrificans* (AS 280-301, hell unterlegt in Abb. 3.20) hochkonserviert. In diesem Sequenzabschnitt ist das dritte G des zentralen GXGXXG/A-Motivs durch ein S ersetzt, eine Variation, die in seltenen Fällen im DGM beobachtet wurde (Scrutton et al., 1990) und charakteristisch für die Bindung von NADP(H) ist. Der zweite Sequenzbereich, der in dem neu erstellten Alignment mit dem DBM der Glutamatsynthasen übereinstimmt, entspricht für die beiden DsrL-homologen Proteine aus *C. tepidum* und dem DsrL-homologen Protein aus *M. sp. MC1* genau dem DBM. In *A. vinosum*, *M. magnetotacticum* und *T. denitrificans* fehlt jedoch in diesem Sequenzabschnitt das erste G des zentralen GXGXXG/A-Motivs, das eigentlich hochkonserviert ist. Ausnahmen sind jedoch bekannt (Wierenga et al., 1985). Alle DsrL-Proteine haben anstelle des dritten Glycins des zentralen Motivs in diesem Sequenzabschnitt ein Alanin, das charakteristisch für NADP(H)-bindende Proteine ist. Es ist jedoch möglich, dass auch NAD(H)-Bindestellen an dieser Stelle ein Alanin aufweisen, was auch schon für FAD-Bindemotive gezeigt wurde (Bork, Grunwald, 1990). Die hohen Ähnlichkeiten der Sequenzen von *A. vinosum*, *M. magnetotacticum* und *T. denitrificans* in dem zuerst genannten Sequenzabschnitt lassen jedoch vermuten, dass dieser die NAD(P)H-Bindestelle in diesen Proteinen bildet.

Konservierte Argininreste, die in der Position den konservierten Argininresten aus *A. brasiliense* und *E. coli* (Pelanda et al., 1993) entsprechen, konnten in den DsrL-homologen Proteinen nicht gefunden werden. Diese Argininreste sind für die Bindung der 2'-Phosphatgruppe des NADP(H) wichtig (Scrutton et al., 1990). Stattdessen wurde sowohl nach dem ersten, als auch nach dem zweiten möglichen DBM-Motiv ein konservierter negativ geladener Aminosäurerest gefunden. Ein negativ geladener Rest am C-terminus des zweiten β -Stranges der $\beta\alpha\beta$ -Faltung interagiert vermutlich mit der 2'-Hydroxylgruppe der NAD(H)-Ribose (Wierenga et al., 1985). Wie oben erwähnt, ist in NADP(H)-bindenden Proteinen aufgrund der negativ geladenen 2'-Phosphatgruppe dieser Rest nicht vorhanden. Diese Sequenzanalyse lässt, entgegen früherer

Vermutungen, eine bevorzugte Reaktion der DsrL-Proteine mit NAD(H) wahrscheinlicher erscheinen, für eine definitive Aussage sind jedoch experimentelle Untersuchungen erforderlich. Mit dem neu erstellten Alignment konnte die bisher vermutete zweite FAD-Bindestelle nicht bestätigt werden. Der Sequenzbereich, der in dem neu erstellten Alignment mit dem FAD-Bindemotiv der dargestellten Glutamatsynthesesequenzen zusammenfällt, stimmt relativ gut in allen DsrL-Proteinen mit dem FAD-Fingerprintmotiv (TxxxxhφhhGD, h = hydrophobe Aminosäurerest, φ = aromatischer Aminosäurerest) (Eggink et al., 1990; Vallon, 2000) überein. Das Threonin ist in allen DsrL-Proteinen durch ein Prolin bzw. Lysin ersetzt, diese Abweichung kommt jedoch häufiger vor (Vallon, 2000). Hochkonserviert ist dagegen in allen verglichenen Sequenzen der aromatische Rest (Phenylalanin) und das abschließende GD-Motiv.



```

                220      230      240      250      260      270      280
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. vin  VPRDKLDAEIQRILDMGRVEVRLKTRIGTDVTVVEQLEKYDAILLWAIGCQSGRGLPVPGWEGTTPNCVTGV 263
M. mag  TPRDVLDAEINRIIDMG-ITVTRTKRIGTDITVSELEEKYDAIFWGIGTHAGRGLPIPGWKDVTNVCVSGV 264
T. den  TPREMLDAEINRIIALG-VETRLKTRVGSDFDELKDYDAIFMAMGAQAGRPLPVPGAE-APNCVTAV 265
C. tep1 VDRKVLAEIIGRIIELG-VETKMGVTIGKDITLEQLEAEYDAVFIAVGAQKGRALPVPGFEGTTPGATNAI 258
C. tep2 VDRKVLAEIIGRIIELG-VETKMGVTIGKDITLEQLEAEYDAVFIAVGAQKGRALPVPGFEGTTPGATNAI 258
M. spMC VSRVIDAEVQRILDLG-VEVKSGVTIGKDITLEQLSKDYDAVFLAVGAQKGRITPLPGSEGKALVKSAT 256
A. bra  LEKSVERRVKLLADAG-VIYHPNFEVGRDASLPELRRKHVAVLVATGVYKARDIKAPGSSGLGNIVAALD 264
E. col  LEKEVMTRRREIFTGMG-LEFKLNTEVGRDVQLDDLLSDYDAVFLGVGTYQSMRGGLENEDADGVYAALP 262
    
```

```

                                NAD (P) H                                NAD (P) H
                                290      300      310      320      330      340      350
                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. vin  AFLKAFNEGRMKVTAGKVVVCGGGDTSIDVVSVARRGHVNKSN-PNELPETVTRDGYVAHDAASAAAAQG 332
M. mag  AFLKAFNEGRLOHVPGRIVVGGGDTSIDVASVARRLGHIDTV-SEQDRADNVILGHVAHDVAATARREG 333
T. den  AFLRAFNEGRLOHVGNRVVVGGGDTSIDVATVARRLGNVTKSGTHDDRPEAVIAGHMASDVASISAREG 335
C. tep1 DFLKSYEVLG-----DDIIVG-----KHVVVIGDGNVSMVVARLALRLG 297
C. tep2 DFLKSYEVLG-----DDIPVG-----KHVVVIGDGNVAMDVARLALRLG 297
M. spMC DFLRDFEINGGIEAGGADKVKVG-----KVVVIGDGDVAMDACRLALRLG 302
A. bra  YLTTSNKVS LGDTVEAYENGLNAAGK-----HVVVIGGGDTAMD CVRTAIRQG 313
E. col  FLIANTKQLMG-FGETRDEPFVSMEGK-----RVVVIGGGDTAMD CVRTSVRQG 310
    
```

```

                                360      370      380      390      400      410      420
                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. vin  A-EVTLTSLFTRDKMTASEHEVDDATREGVTTILDGVMPVEVIKIDANGRAIGLKVADCTMTDGRF----- 395
M. mag  S-QVTLTSLFPVEKMFAAQREIDDAKREGVDIRGGIMPLEVILGSDGRATGLKLCQCTMEGMP----- 396
T. den  A-EVVLVSRA TVDKMAANKHEVEHAQQEGEIIIGGVTPVSVVVDANGRATAIRVADFVMEGKET----- 398
C. tep1 S-QATIIISGVPREEMACFENEFDDAKNEGTMMHFLTGTVEVLGGASGVTGLRCKTMVKKEGEEGWNNSPI 366
C. tep2 S-QATIIISGVPREEMACFENEFDDAKNEGTMMHFLTGTVEVLGGASGVTGLRCKTMVKKEGEEGWNNSPI 366
M. spMC S-KATLLSGVAREEMNCSAFEYDEALAECTDMKMCTGSLIETGEGDTITGIKVIEMARKEKGEDGWNHAV 371
A. bra  ATSVKCLYRDRKRNMPGSRQREVAHAEEEGVEFIWQAAPGFTG--DTVVTVGRAVRIHLGVADATGRQ-- 379
E. col  AKHVTCAYRDEENMPGSRREVKNAREEGVEFKFNVPGLGLEVNNGKVSQVVMVRTEMGEPAKGR-- 378
    
```

```

                                FAD-II
                                430      440      450      460      470      480      490
                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. vin  -----TPVEGTERVLEADLIVSAIGQGGD-----LSGLEQLDNGRGLMDSDKFYQVPGKAGHFVAGDI 453
M. mag  -----KPIPGTEFILDADLVVSAIGQSGD-----LADLPEMDNGKGFINADKAYRVPGRPKHFVGGDV 454
T. den  -----KIVEGTERDLPADLIVSAIGQVD-----FTGLEQFNNNGLIKADKNYRFPNNEKVFVGGDV 456
C. tep1 PFLRYKSNG-ESFEI EADMVVA AIGQAT-----LSGLGSAASG-PWLKVDNRNFRIPGREKLFGGGDA 427
C. tep2 PFLRYKSNG-ESFEI EADMVVA AIGQAT-----LSGLGSAASG-PWLKVDNRNFRIPGREKLFGGGDA 427
M. spMC PFMRYKQKAGSEATVACDMVVAVGQTTD-----MAGFESCTNGT PFLQVDHNFQVKGMDNVEGGGDA 434
A. bra  ---TPQVTEGSEFTVQADLVIKALGFEPEDLPNAFDEPELKVTRWGTLLVDHRTKM--TNMDGVFAAGDI 444
E. col  ---RAEIVAGSEHIVPADAVIMAFGFRPHNMEWLAKHSVELDSQGRIIAPEGSDNAFQTSNPKIFAGGDI 445
    
```

```

                                FAD
                                500      510      520      530      540      550      560
                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. vin  IR-PHLLTTAIGQAWIAADSIDAYVMQAEHKRRPKVDVHFNLLDKLTEAHLAPESFVAGQAGDMRGTS 522
M. mag  VK-PHLLTTAIGHGRVASAGIAEFLDHGDVAKRPKVDVHFNLLAKLHESNLDP----APYQPGPVRGTF 519
T. den  IR-PHLLTTAIGHASIAVDGIDAFLAGKELDKRPKVDVHFFDEIRKWLESGHEYS----EVKQGIWGTS 520
C. tep1 LK-VDLITTA VGHGRKAAYAIDAF LKGE PMP----- 457
C. tep2 LK-VDLITTA VGHGRKAAYAIDAF LKGE PMP----- 457
M. spMC VQ-IHLLTTAIGHGRKAAEAMDTFLKGGKLP----- 465
A. bra  VRGASLVVWAIRDGRDAAEGTHAYAKAKAEAPVAVAAE----- 482
E. col  VRGSDLVVTAIAEGRKAADGIMNWLEV----- 472
    
```


vierte Cysteinreste. Für die Bindung von [4Fe4S]-Clustern sind nur die letzten vier notwendig. Möglicherweise bilden die zwei davorliegenden Cysteine mit dem CXXC-Motiv das für eine Disulfidreduktaseaktivität notwendige Cysteinpaar.

3.3.2 Aufreinigung von rekombinantem DsrL aus *E. coli*

3.3.2.1 Überexpression von rekombinantem DsrL

Für den Nachweis der *in vivo* Bildung von DsrL wurde das Protein zunächst in *E. coli* überproduziert. Mit diesem Protein sollte die aufgrund der DNA-Sequenz berechnete molekulare Masse, sowie die Bindung spezifischer DsrL-Antikörper (hergestellt gegen eine synthetische Peptidsequenz) überprüft werden. Das Anhängen eines N-terminalen Oligohistidinrestes sollte eine spätere Aufreinigung des Proteins erleichtern.

Die Konstruktion des Überexpressionsvektors erfolgte nach der gleichen Strategie wie für den *dsrN*-Überexpressionsvektor pNEX5 unter 3.2.1 beschrieben. Für die Amplifikation des *dsrL*-Fragmentes wurden die Oligonukleotide LEXf und LEXr (s. Tab. 2.4) eingesetzt. Der fertige Vektor, in dem DsrL mit N-terminalem Histag überexprimiert werden konnte, wurde als pLEX2 bezeichnet.

Die Überexpression von rekombinantem DsrL erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben in NZCYM-Medium. Mit diesem Medium wurden im Vergleich zu LB-Medium höhere Ausbeute an rekombinantem Protein erzielt. Die Variation der Kultivierungstemperatur und der IPTG-Konzentration zur Induktion der Überexpression ergab eine optimale Produktion von DsrL bei einer Anzuchttemperatur von 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ und eine Temperatur von 30 °C nach der Induktion (mit 0,1 mM IPTG). DsrL konnte erfolgreich in grosser Menge in *E. coli* überproduziert werden (s. Abb. 3.23). Im Gegensatz zu dem überproduzierten DsrN befand sich DsrL ausschließlich im Zentrifugationsüberstand.

3.3.2.2 Aufreinigung von rekombinantem DsrL aus *E. coli* BL21(DE3)

Die Aufreinigung von rekombinantem DsrL aus Zellmaterial von sechs 500 ml Überexpressionskulturen erfolgte über Affinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Matrix. Allen verwendeten Puffern wurde zur Stabilisierung des Proteins 10 % Glycerol, 1 mM TCEP und 1 mM EDTA (nicht bei der Histagaufreinigung) zugegeben. Nach Auftragen des abzentrifugierten Rohextraktes auf eine selbstgegossene Ni Nta-Agarosesäule, wurden schwach gebundene Proteine über einen Stufengradienten (je 10 ml) mit 10 mM, 20 mM bzw. 50 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Elution des über den N-terminalen Oligohistidinrest an die Säule gebundenem

DsrL erfolgte über einen linearen Gradienten von 50 - 500 mM Imidiazol in einem Volumen von 30 ml (s. Abb. 3.21). Die DsrL- enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, über Nacht dialysiert und auf eine MonoQ-Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Puffer ohne Salz, wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 0 – 400 mM NaCl in einem Volumen von 40 ml von der Säule eluiert (s. Abb. 3.22). DsrL eluierte zwischen 250 - 400 mM NaCl von der Säule. Das SDS-Gel in Abbildung 3.23 zeigt, dass durch die Affinitätschromatographie eine sehr effektive Reinigung von DsrL erfolgte, die Reinigung über die MonoQ-Säule jedoch nur noch zu einer geringfügigen weiteren Aufreinigung von DsrL führte. Das Elutionsprofil der MonoQ zeigt jedoch, dass noch kontaminierende Proteine abgetrennt wurden. Rekombinantes DsrL konnte damit über zwei Säulen erfolgreich aufgereinigt werden. Die aufgereinigten DsrL enthaltenen Fraktionen nach der MonoQ wurden vereinigt, zur Entfernung des Salzes dialysiert, auf 5 ml konzentriert und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

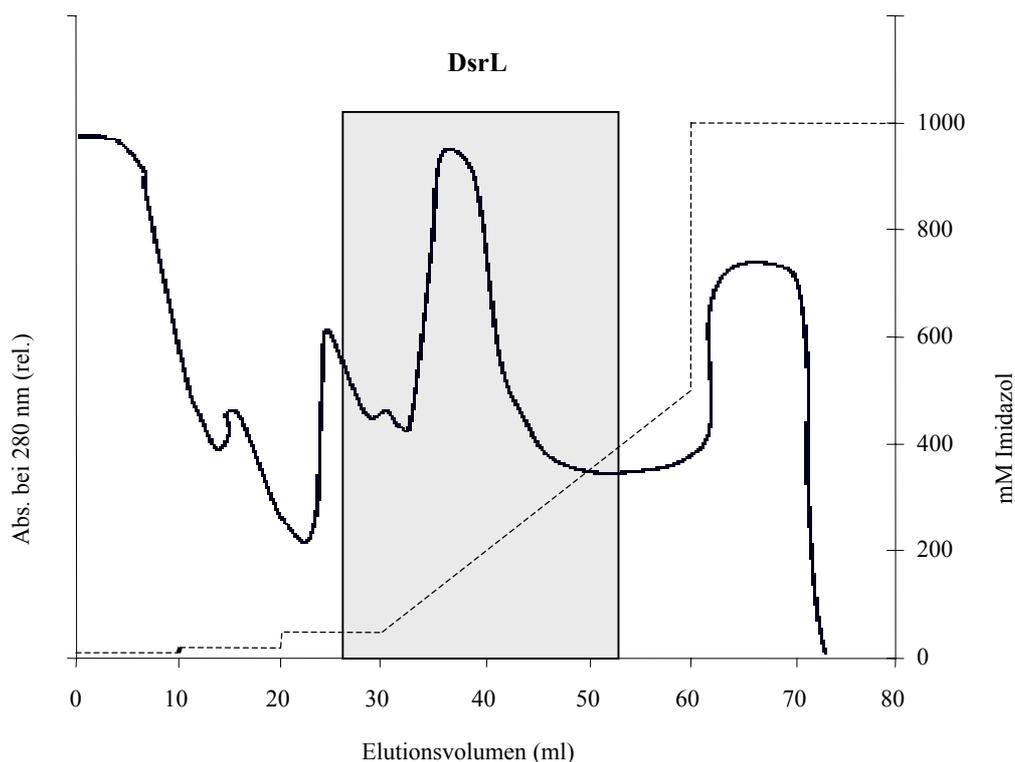


Abb. 3.21: Charakteristisches Elutionsprofil der Affinitätschromatographie (NiNta-Agarose, Quiagen) zur Aufreinigung von rekombinatem DsrL; der Elutionsbereich von DsrL ist durch den grauen Kasten markiert, die gestrichelte Linie stellt den Imidazolgradienten dar, die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel. Einheiten) wieder.

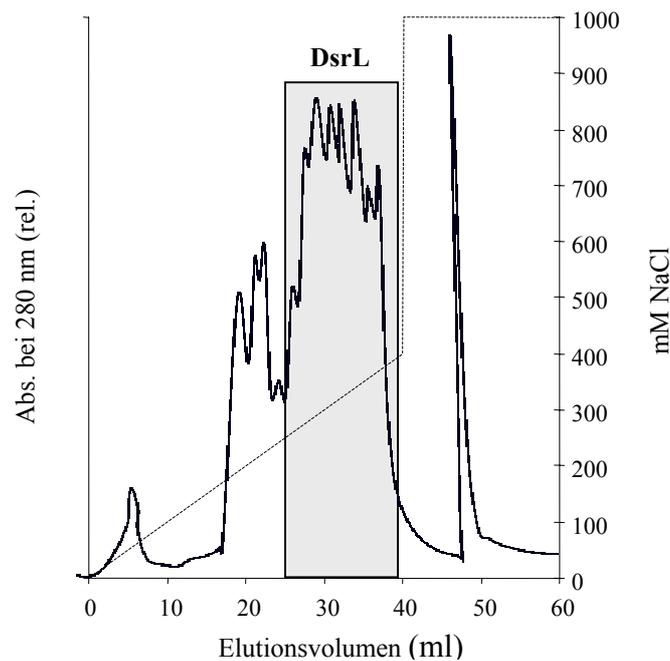


Abb. 3.22: Charakteristisches Elutionsprofil nach der Ionenaustauschchromatographie (MonoQ) zur Aufreinigung von rekombinantem DsrL; der Elutionsbereich von DsrL wird durch den grauen Kasten markiert; die gestrichelte Linie zeigt den NaCl-Gradienten, die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel. Einheiten) wieder.

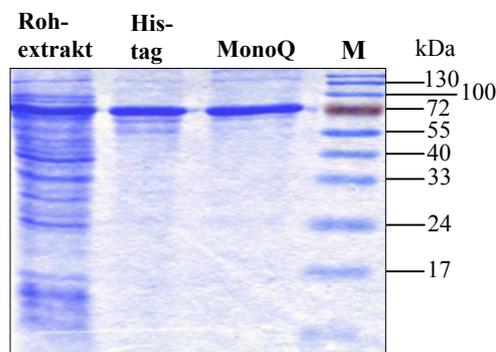


Abb. 3.23: SDS-Gel (Coomassie-gefärbt) zum Nachweis der erfolgreichen Aufreinigung von rekombinantem DsrL aus *E.coli* BL21(DE3); es wurden jeweils die nach der Säule vereinigten Proben aufgetragen, M: Marker.

3.3.3 Nachweis und Lokalisation von DsrL in *A. vinosum*

Die *in vivo* Bildung von DsrL in *A. vinosum* wurde durch Western-Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen DsrL untersucht. Dieser immunologische Nachweis wurde mit Rohextrakt, der löslichen Fraktion und der Membranfraktion von photolithoautotroph angezogenen *A. vinosum*-(Wildtyp)-Zellen durchgeführt. Gleichzeitig sollte damit nachgewiesen werden, dass es sich bei DsrL, wie vermutet, um ein lösliches cytoplasmatisches Protein handelt (Pott-Sperling, 2000). Der Großteil des DsrL-Proteins befindet sich, wie erwartet, in der löslichen

Fraktion (s. Abb. 3.24), was die postulierte cytoplasmatische Lokalisation des Proteins bestätigt. Ein kleiner Teil des Proteins scheint sich auch in der Membranfraktion zu befinden. Dies könnte darauf hindeuten, dass DsrL möglicherweise mit membrangebundenen Proteinen interagiert.

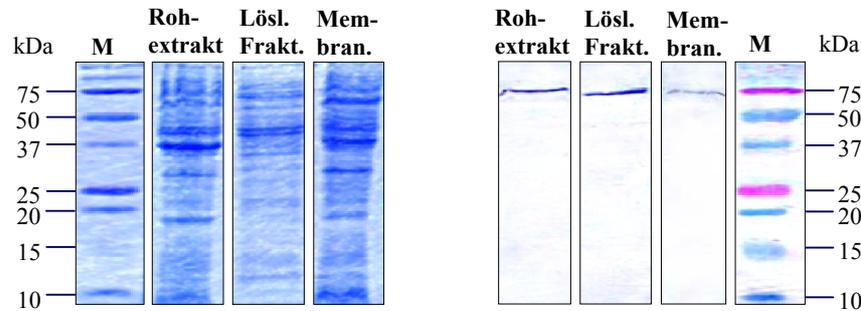


Abb. 3.24: SDS-Gel (Coomassie-gefärbt) und Western-Blot mit Antikörpern gegen DsrL zum Nachweis und Lokalisation des Proteins in *A. vinosum* DSM 180^T; Membran. = Membranfraktion, M: Marker.

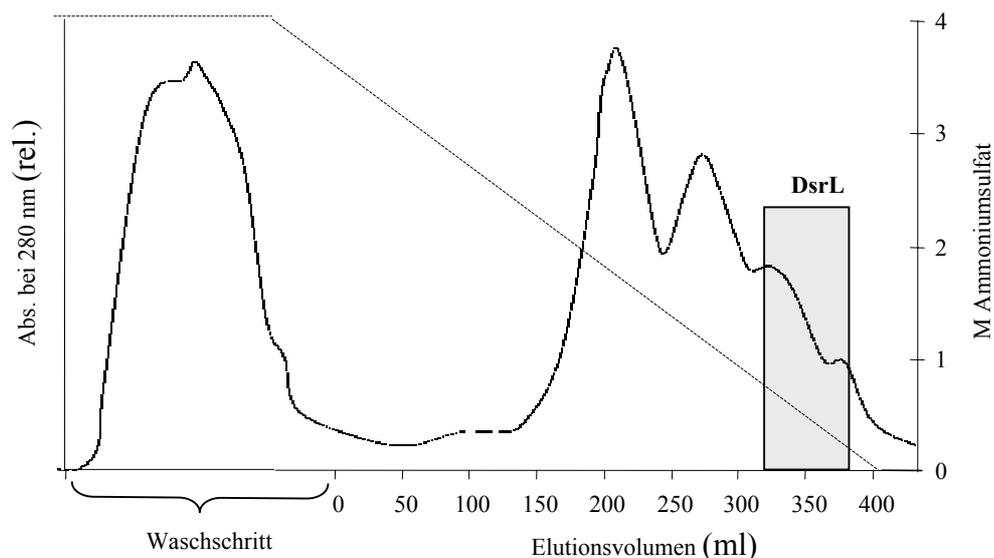


Abb. 3.25: Charakteristisches Elutionsprofil nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie (Phenyl-sepharose 4 Fast Flow) zur Aufreinigung von DsrL; der Elutionsbereich des Proteins wird durch den grauen Kasten markiert, die gestrichelte Linie stellt den absteigenden Ammoniumsulfatgradienten dar (3,7 M – 0 M), die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel.) wieder.

3.3.4 Aufreinigung von DsrL aus *A. vinosum*

Die Aufreinigung von DsrL erfolgte aus 40 g photolithoautotroph angezogenen *A. vinosum* Zellen. Der Überstand einer 40%igen Ammoniumsulfatfällung der löslichen Proteinfraction wurde auf eine äquilibrierte Phenylsepharose 4 Fast Flow-Säule (70 ml) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen der Säule mit Hochsalzpuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen absteigenden Gradienten von 3,7 M bis 0 M NH_4SO_4 (s. Abb. 3.25) in einem Volumen von 450 ml. Die Aufreinigung von DsrL wurde durch Western-Blot-Analysen verfolgt. Das DsrL-Protein eluierte bei einer Konzentration von 0,5 - 0,25 M NH_4SO_4 von der Säule. In den gleichen Fraktionen wurde auch die Sulfitreduktase (s. 3.1.2.1) nachgewiesen. Die DsrL-enthaltenen Proben wurden vereinigt, dialysiert und auf eine MonoQ-Säule aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift mit Puffer ohne NaCl entfernt. Die Elution von DsrL erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 - 600 mM NaCl in einem Volumen von 60 ml.

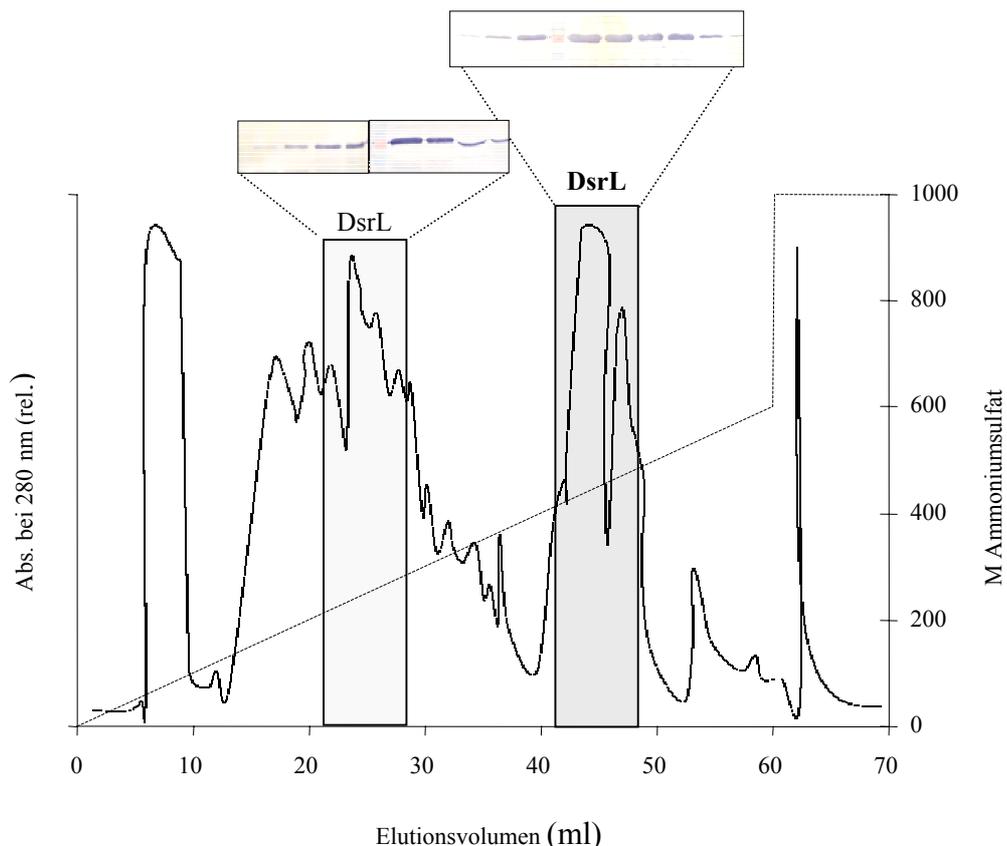


Abb. 3.26: Charakteristisches Elutionsprofil nach der Ionenaustauschchromatographie (MonoQ) zur Aufreinigung von DsrL; der 1. Elutionsbereich des Proteins wird durch den hellen Kasten markiert, der 2. Elutionsbereich des Proteins ist durch den grauen Kasten markiert; über den jeweiligen Elutionsmaxima ist der Western-Blot der Fraktionen mit DsrL-Antikörper dargestellt; die gestrichelte Linie zeigt den NaCl-Gradienten, die graue Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel. Einheiten) wieder.

Die Western-Blot-Analyse der MonoQ-Fractionen zeigte, dass DsrL in zwei voneinander getrennten Peaks von der Säule eluierte (s. Abb. 3.26). Im Bereich des ersten Peaks, zwischen 240 und 280 mM NaCl sind die DsrL enthaltenen Fraktionen noch stark mit anderen Proteinen verunreinigt, die Fraktionen des zweiten Elutionspeaks von 440 bis 480 mM NaCl zeigten im SDS-Page nur noch wenige Kontaminationen (Abb. 3.27). Die vereinigte Fraktionen des ersten MonoQ-Peaks wurden über eine Gelfiltrationssäule (Superdex Tm 200-Fertigsäule, Pharmacia, Uppsala, S) aufgetrennt. Western-Blot-Analysen zeigten, dass DsrL von der Säule in nur einem Peak mit einem Maximum bei 72 ml eluierte. Das entspricht einer Grösse von ~ 130 kDa. Natives DsrL bildet demnach ein Homodimer. Diese DsrL- enthaltenen Proben waren jedoch noch stark mit anderen Proteinen kontaminiert. Deshalb wurden die DsrL- enthaltenen Fraktionen des zweiten MonoQ-Peaks, die neben DsrL nur noch wenige kontaminierende Proteine enthielten, ebenfalls vereinigt, konzentriert und über eine Gelfiltration aufgereinigt (s. Abb. 3.28).

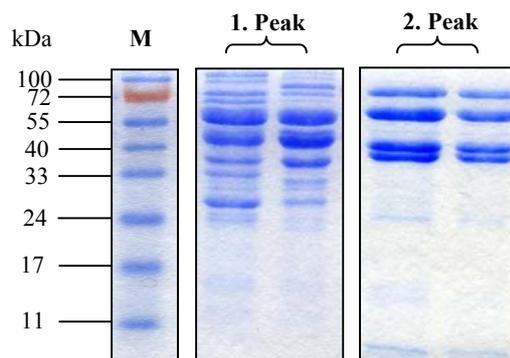


Abb. 3.27: SDS-Gel (Coomassie gefärbt) von jeweils zwei Fraktionen des 1. und des 2. DsrL-Elutionspeaks der MonoQ-Aufreinigung; M: Marker.

Von dieser Säule eluierte DsrL wiederum in zwei Peaks. Ein Teil des Proteins eluierte ebenfalls bei einem Maximum von 72 ml von der Säule, das wiederum einem DsrL-Dimer entspricht. Der größte Teil des DsrL-Proteins eluierte jedoch bei einem Volumen von 63 ml von der Säule, was einer Grösse von ~310 kDa entspricht. SDS-Gel und Western-Blot zeigten, dass DsrL in diesen Fraktionen in viel höheren Konzentrationen vorlag, als in dem Peak bei 72 ml. Möglicherweise handelt es sich hier um ein DsrL-Multimer. Neben der 72 kDa-Bande für DsrL, sind im SDS-Gel der Fraktionen um 63 ml noch drei weitere kontaminierende Peptidbanden zu erkennen, die auch schon im SDS-Gel des zweiten Peaks nach der MonoQ detektiert wurden (s. Abb. 3.27). Durch das charakteristische Spektrum und die 40 und 45 kDa Banden im SDS-Gel konnte die Sulfitreduktase als eins der kontaminierenden Proteine identifiziert werden, die das gleiche Elutionsma-

ximum wie DsrL bei 63 ml zeigt. Die für das Elutionsmaximum berechnete Grösse von ~ 310 kDa lässt sich nicht mit der Größe von 170 kDa für die $\alpha_2\beta_2$ -Struktur der Sulfitreduktase vereinbaren. Das gleiche Elutionsmaximum der Sulfitreduktase und des DsrL-Proteins legen jedoch die Vermutung einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen nahe. Die berechnete Grösse von ~ 310 kDa könnte durch ein Molekül Sulfitreduktase (~ 170 kDa) plus ein Molekül DsrL-Dimer (~ 140 kDa) erreicht werden.

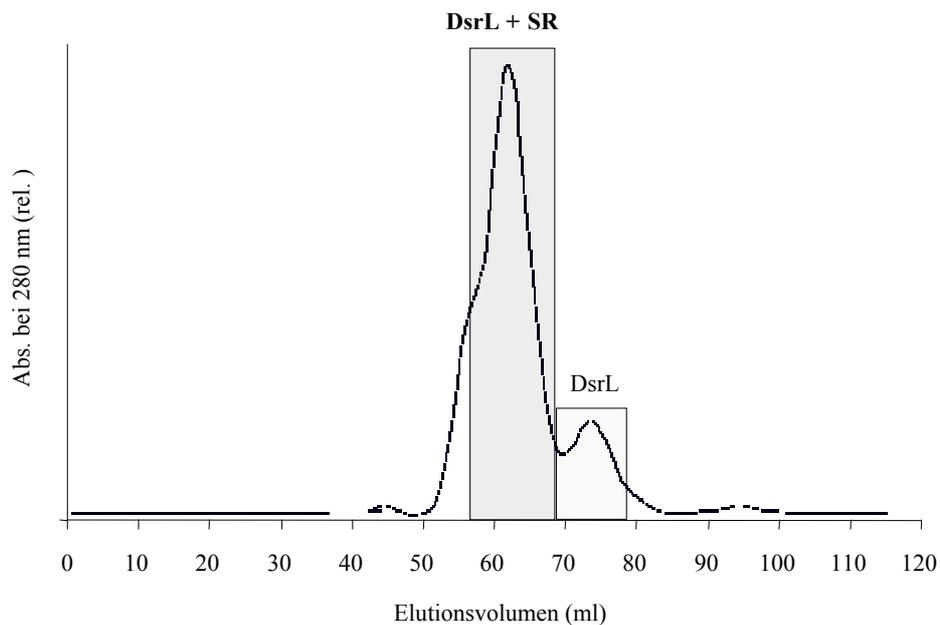


Abb. 3.28: Charakteristisches Elutionsprofil nach Gelfiltration (Superdex Tm 200) zur Aufreinigung von DsrL; der 1. Elutionsbereich von DsrL hellen Kasten markiert, der 2. Elutionsbereich von DsrL und DsrAB (SR) ist durch den grauen Kasten markiert; die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel. Einheiten) wieder.

Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, wurden die DsrL- und DsrAB-enthaltenen Fraktionen dieses Peaks im nativen Gel aufgetrennt. Alle untersuchten Fraktionen zeigten das gleiche Bandenmuster (s. Abb. 3.29) von vier verschiedenen Banden, von denen die Dritte (von unten) die schwächste ist. Nach dem SDS-Gel, in dem die zwei Banden der beiden Untereinheiten der Sulfitreduktase DsrA/DsrB, die DsrL-Bande und die 60 kDa-Bande eines unbekanntes Proteins zu sehen sind, waren in der nativen Page drei Banden zu erwarten. Die zusätzliche vierte Bande deutet auf ein Interaktionsprodukt hin, möglicherweise ein DsrL-Multimer oder der vermutete Interaktionskomplex aus DsrL und der Sulfitreduktase. Western-Blot-Analysen mit dem Antikörper gegen DsrL zeigten, dass die erste (unterste) und die Dritte Bande (von unten) im nativen Gel DsrL enthalten, wobei die unterste Bande ein sehr viel stärkeres Signal zeigt. Der Antikörper gegen DsrB hybridisiert mit der zweiten und ebenfalls mit der dritten Bande im nativen Gel

(s. Abb. 3.29). Die dritte Bande im nativen Gel ist demnach der nach der Gelfiltration vermutete Komplex aus DsrL und der Sulfitreduktase. Die Bindung zwischen den beiden scheint jedoch nicht sehr stark zu sein. Nach der Auftrennung im nativen Gel sind die Banden für die einzelnen Proteine viel stärker, als die gemeinsame Bande. Trotzdem binden sie so fest zusammen, dass sie von der Gelfiltrationssäule zum größten Teil gemeinsam eluieren. Ein deutlicher Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine *in vivo*.

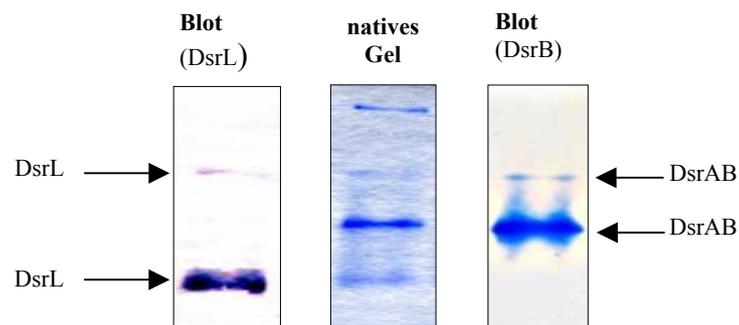


Abb. 3.29: Natives Gel und Western-Blot-Analyse des gemeinsamen Elutionspeaks von DsrL und DsrAB nach der Gelfiltration mit DsrL Antikörper und DsrB Antikörper.

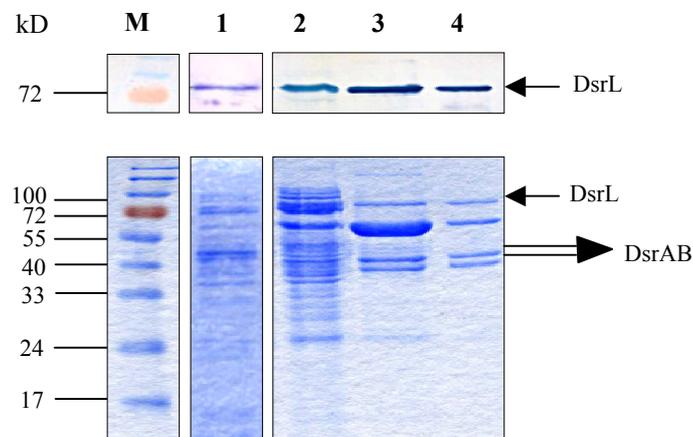


Abb. 3.30: Western-Blot (oben) und SDS-Page (Coomassie-gefärbt, unten) zum Nachweis der erfolgreichen Aufreinigung von DsrL aus *A. vinosum*; 1: Überstand nach Ammoniumsulfatfällung; 2: vereinigte Proben nach Hydrophober Interaktionschromatographie; 3: vereinigte Proben nach Ionenaustauschchromatographie; 4: vereinigte Proben des gemeinsamen Elutionspeaks von DsrL + DsrAB (s. Text) nach der Gelfiltrationschromatographie; M: Marker.

In der Gelfiltration der Fraktionen des 2. MonoQ-Peaks konnten die ~ 40 und ~ 45 kDa-Banden für DsrB und DsrA, außer in den Fraktionen des gemeinsamen Elutionsmaximums mit DsrL, auch in den Fraktionen des 72 ml-Peaks detektiert werden. Das für den 72 ml-Peak bestimmte Elutionsmaximum lässt sich jedoch nicht mit dem Molekulargewicht der Sulfitreduktase

(~170 kDa) vereinbaren. Außerdem konnte im SDS-Gel kein weiteres Elutionsmaximum der Sulfitreduktase detektiert werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um die restlichen Ausläufer des Elutionsmaximums der freien Sulfitreduktase. Dieses Maximum konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Im SDS-Gel nach der MonoQ war neben der Sulfitreduktase und DsrL noch ein drittes ca. 60 kDa grosses Protein zu erkennen. Zum größten Teil konnte dieses abgetrennt werden, ein Teil des Proteins war allerdings immer noch in den DsrL + DsrAB enthaltenen Proben vorhanden. Die Gelfiltrationschromatographie erbrachte damit nur einen geringen weiteren Aufreinigungseffekt für DsrL nach der MonoQ, doch zeigte sie entscheidende Hinweise auf eine Interaktion von DsrL mit der Sulfitreduktase *in vivo*. Weitere Reinigungsschritte wurden nicht durchgeführt. Die erfolgte Reinigung und der Nachweis von DsrL über Western-Blot ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Die vereinigten Proben wurden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Der größte Teil des in der Zelle vorhandenen DsrL interagiert demnach mit der Sulfitreduktase, wodurch es zu einer relativ festen Bindung der beiden Proteine aneinander kommt. Ein Teil des DsrL-Proteins (und wahrscheinlich auch der Sulfitreduktase) liegt vermutlich frei in der Zelle vor, jedoch in so geringer Menge, dass eine Aufreinigung des freien DsrL nicht verfolgt wurde.

3.3.5 Biochemische Charakterisierung von DsrL

3.3.5.1 Untersuchungen zum Multimersierungszustand von DsrL

Die Größe des nativen und des rekombinanten DsrL wurde experimentell durch Gelfiltration bestimmt. Für DsrL aus *A. vinosum* wurde als Teil der Aufreinigung des Proteins eine Gelfiltration durchgeführt (Abb. 3.28), die zeigte, dass DsrL vermutlich zum größten Teil mit der Sulfitreduktase verbunden ist, zum anderen vermutlich als Dimer frei vorliegt. Den Elutionsmaxima von 63 ml und 72 ml konnten mit Hilfe der erstellten Eichgerade molekulare Größen von ~ 330 kDa und ~ 130 kDa zugeordnet werden. Die Eichgerade wurde mit Cytochrom c (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), RSA (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Catalase (232 kDa) und Ferritin (440 kDa) erstellt.

Aufgereinigtes rekombinantes DsrL aus *E. coli* wurde ebenfalls über eine Superdex Tm 200-Gelfiltrationsäule wie unter 3.3.4 beschrieben aufgetrennt. DsrL eluierte über einen sehr grossen Bereich nach einem Volumen von 43-78 ml von der Säule. Das Gelfiltrationschromatogram (s. Abb. 3.31.) zeigt drei Elutionsmaxima in diesem Bereich, das stärkste bei einem Elutionsvo-

lumen von 70 ml. Dies entspricht einer Molekulargröße von ~160 kDa, was sich keinem Oligomerisierungszustand von DsrL genau zuordnen lässt. Möglicherweise liegt ein Teil des rekombinanten DsrL, wie das native DsrL aus *A. vinosum*, als Dimer vor, aber auch höhere Oligomerisierungszustände sind denkbar. Die Analyse des isolierten rekombinanten DsrL über eine native Page bestätigt diese Vermutung. Im nativen Gel und im Western-Blot (Abb. 3.31 B) sind mindestens fünf definierte Banden zu erkennen, was das breite Elutionsvolumen des Proteins von der Gelfiltrationssäule erklärt. Die native Größe des rekombinanten DsrL konnte daher nicht bestimmt werden. Aufgrund des höchsten Elutionsmaximums bei 70 ml ist zu vermuten, dass das rekombinante Protein zum größten Teil als Dimer bzw. als Trimer vorliegt.

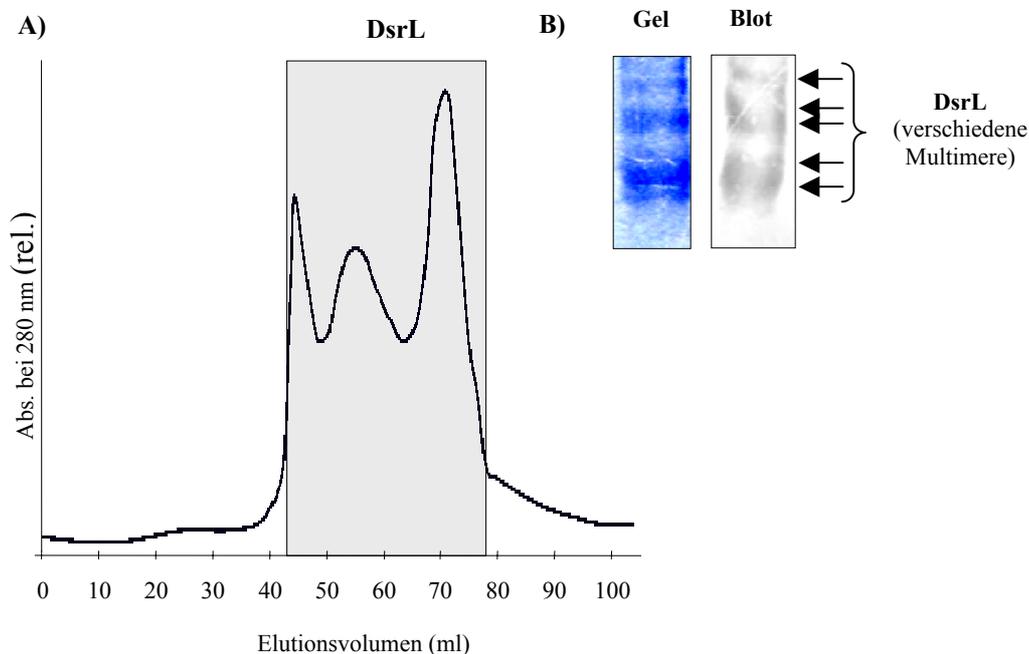


Abb. 3.31: A) Charakteristisches Elutionsprofil nach Gelfiltration (Superdex Tm 200) des aufgereinigten rekombinanten DsrL; der DsrL - Elutionsbereich wird durch den grauen Kasten markiert, die schwarze Kurve gibt die Absorption bei 280 nm (rel. Einheiten) wieder; B) Western-Blot des im nativen Gel aufgetrennten aufgereinigten rekombinanten DsrL.

3.3.5.2 Bestimmung der Cofaktoren

Bestimmung des Eisen-Schwefel-Gehaltes

Für das aufgereinigte rekombinante Protein wurde eine Bestimmung des Eisen-Schwefel-Gehaltes durchgeführt, es konnten jedoch keine Eisen-Schwefel-Cluster in dem rekombinanten Protein detektiert werden. Möglicherweise werden in dem rekombinanten Protein die Eisen-Schwefel-Cluster, sofern vorhanden, nicht korrekt eingebaut. Da das aus *A. vinosum* aufgereinigte DsrL nur zusammen mit der Sulfitreduktase, die ebenfalls Eisen-Schwefel-Cluster enthält,

aufgereinigt wurde, konnte dieses nicht zum Nachweis von Eisen-Schwefel-Cluster herangezogen werden. Eine Bestätigung der Sequenzhinweise auf Eisen-Schwefel-Cluster in DsrL konnte deshalb nicht erfolgen.

Bestimmung des Flavingehaltes

Das aufgereinigte rekombinante DsrL zeigte eine starke gelbe Färbung, was erste Hinweise auf die nach der Sequenzanalyse vermutete FAD-Bindung des Proteins zeigte. Das Absorptionsspektrum des aufgereinigten rekombinanten Proteins zeigt das typische Spektrum von Flavoproteinen, mit Extinktionsmaxima bei 272, 379 und 455 nm und Schultern bei 430 und 482 nm (Abb. 3.32 A). Durch Kochen bzw. Fällen des Proteins mit TCA konnte das Flavin vom Protein abgelöst werden, was eine nichtkovalente Bindung an das Protein beweist. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für FAD ($\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, bei einer Wellenlänge von 450 nm (Vanoni et al., 1996)) wurde ein Gehalt von 0,61 mol FAD pro mol DsrL Monomer bestimmt. In Anbetracht der vielen vom rekombinanten DsrL gebildeten Multimere, ist es möglich, dass nicht alle Formen korrekt FAD eingebaut haben. DsrL bindet vermutlich ein FAD pro Monomer. Der Flavingehalt des nativen DsrL aus *A. vinosum* wurde nicht bestimmt, da das charakteristische Sirohäm-spektrum der Sulfitreduktase (Schedel et al., 1979) das Flavinspektrum überlagert (Abb. 3.32 B).

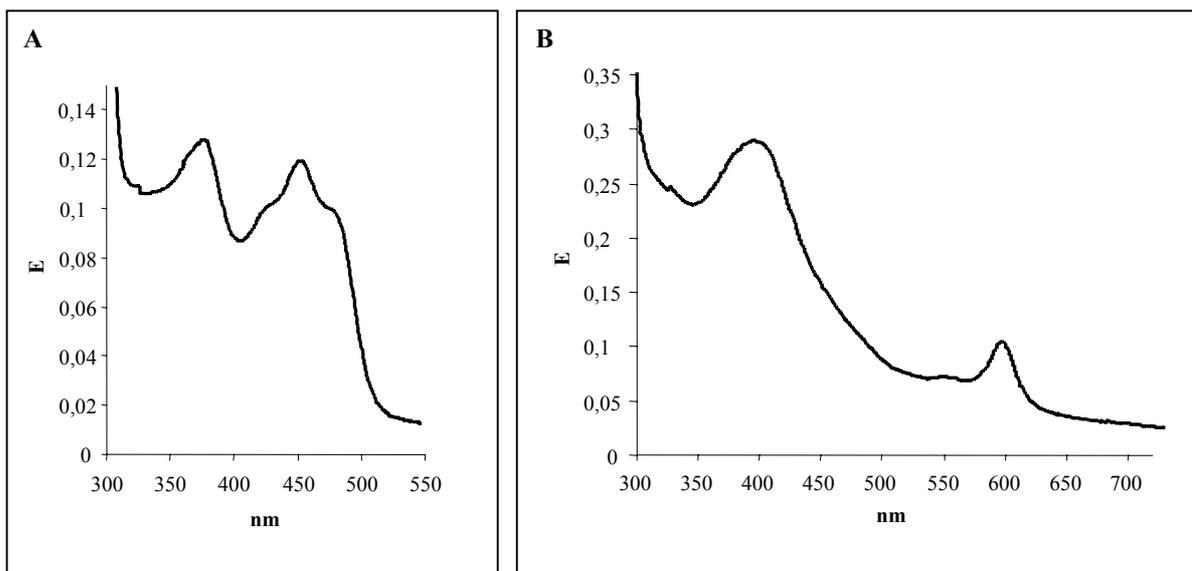


Abb. 3.32: UV/Vis Spektrum des rekombinanten aufgereinigten DsrL(A) und der DsrL/DsrAB-Aufreinigung aus *A. vinosum* (B); die Absorptionsmaxima des rekombinanten DsrL (A) liegen bei 272, 379 und 455 nm, die zwei Schultern liegen bei 430 und 482 nm.

3.3.5.3 Versuche zum Nachweis der Glutamatsynthaseaktivität von DsrL

Das zu DsrL-homologe Protein GltA aus *Thermococcus kodakarensis* zeigt, wie auch DsrL, signifikante Homologien zu den kleinen Untereinheiten von Glutamatsynthasen. In beiden Fällen wurde in der Nähe der für das Protein kodierenden Gensequenz kein Gen gefunden, das für die grössere Untereinheit der Glutamatsynthasen kodiert. Für GltA aus *T. kodakarensis* konnte jedoch in vitro Glutamatsynthaseaktivität nachgewiesen werden (Jongsareejit et al., 1997). Das Protein ist ein Homotetramer und katalysiert in vitro die Bildung von zwei Glutamat aus L-Glutamin und 2-Oxoglutarat unter Oxidation von NADPH zu NADP⁺. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass DsrL möglicherweise ebenfalls als Glutamatsynthase fungiert und das für die von DsrN katalysierte Amidierungsreaktion benötigte L-Glutamin in einer umgekehrten Glutamatsynthasereaktion zur Verfügung stellt. Diese Hypothese wurde mit zwei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Zum einen wurde getestet, ob DsrL einen Glutamatsynthase-defizienten *E. coli*-Stamm komplementieren kann, zum anderen wurde rekombinantes DsrL mittels Enzymtest auf Glutamatsynthaseaktivität untersucht.

Komplementation des *gltD*-defizienten *E. coli* EB5001 mit DsrL

Für das Komplementationsexperiment wurde ein *gltD*-defizienter *E. coli* (*gltD*::Mud11-1734) (Ernsting et al., 1993; Goss et al., 2001; Metcalf et al., 1990) eingesetzt (*E. coli* EB5001), der von Dr. Thomas Goss von der University of Michigan zur Verfügung gestellt wurde. Das *gltD*-Gen für die kleine Untereinheit der Glutamatsynthase (GOGAT) wurde in diesem Stamm durch Transposonmutagenese mit Mud1, einem defekten Mu-1 Bakteriophagen, unterbrochen (Metcalf et al., 1990). Dieser Stamm zeigt keine GOGAT-Aktivität mehr. Im Unterschied zum Wildtyp kann dieser Stamm deshalb u.a. auf Arginin als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen. In den Zellen wird das aus dem Arginin gebildete Glutamat durch die Glutaminsynthetase (GS) zu Glutamin umgesetzt. Das vorhandene Glutamin kann durch die fehlende GOGAT-Aktivität nicht effizient zur Glutamatbildung eingesetzt werden, wie es im Wildtyp normalerweise der Fall wäre. Das Wachstum der Mutante wird somit durch das Fehlen bzw. durch zu geringe Mengen an Glutamat gehemmt (Goss et al., 2001).

Als Komplementationsvektor wurde der Vektor pBAD22A (Guzman et al., 1995) eingesetzt. Dieser Vektor enthält den P_{BAD}-Promotor des *araBAD* (Arabinose)-Operons und das *araC*-Gen, dessen Genprodukt die Transkription der Gene *araBAD* über den Promotor reguliert. Durch die Zugabe von Arabinose zum Medium wird die Expression des Vektors induziert. Das *dsrL*-Gen wurde über PCR mit den Primern ComLf und ComLr amplifiziert und über die eingefügten *NcoI*

und eine *Xba*I-Schnittstellen in den pBAD22A-Vektor eingefügt. Für die Komplementation wurde der Vektor in den *E. coli* EB5001 transformiert. Das Komplementationsexperiment wurde in 100 ml W4-Minimalmedium durchgeführt, dem als Kohlenstoffquelle 0,2 % Glucose, als Stickstoffquelle 0,2 % Arginin und zur Induktion der Expression des Vektors 0,2 % Arabinose zugesetzt wurden.

Die Expression von *dsrL* wurde über Western-Blot mit Zellmaterial der Kulturen überprüft. DsrL wurde in der Komplementationsmutante gebildet, dies führte jedoch nicht zur Wiederherstellung des Wildtypphänotyps (s. Abb. 3.33). Die Komplementationsmutante verhielt sich im Wachstum genau wie die Mutante *E. coli* EB5001. Dieser Versuch konnte eine Glutamatsynthaseaktivität von DsrL nicht bestätigen.

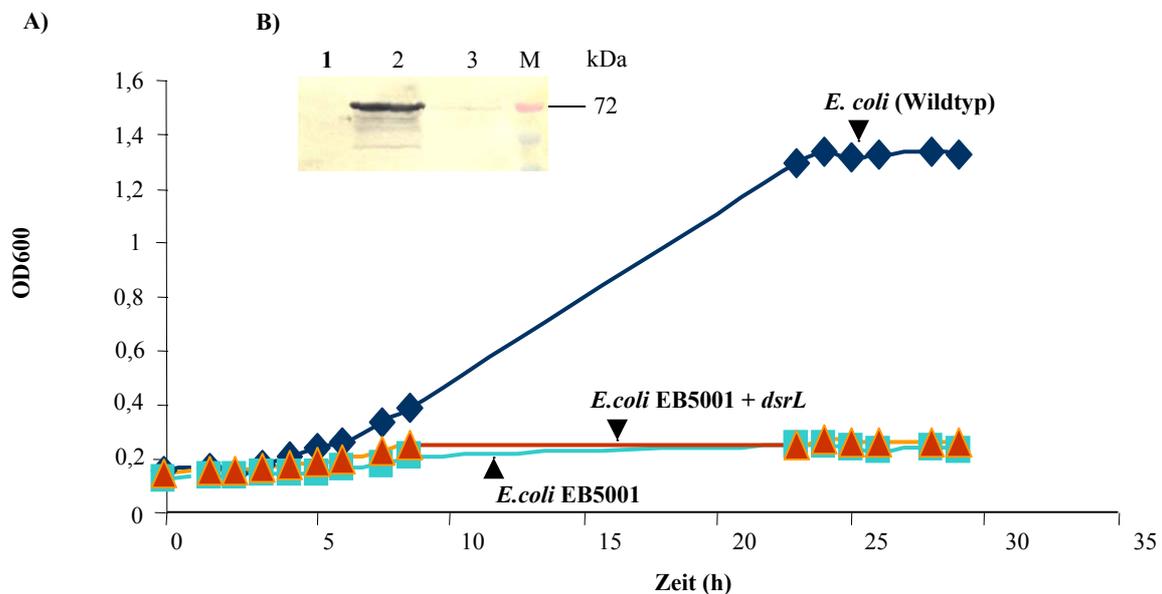


Abb. 3.33: Komplementationsexperiment des *gltD*-defizienten *E. coli* EB5001 mit *dsrL* aus *A. vinosum*; **A)** Vergleich des Wachstums (OD₆₀₀) von *E. coli* (Wildtyp), *E. coli* EB5001 und *E. coli* EB5001 + *dsrL* in Medium mit Arginin als einziger N-Stickstoffquelle; **B)** Western-Blot-Analyse der Kulturen mit DsrL-Antikörper; 1: *E. coli* (Wildtyp), 2: *E. coli* EB5001 + *dsrL*; 3: *E. coli* EB5001; M: Marker

Glutamatsynthase-Aktivitätstest

Glutamatsynthasen katalysieren den Transfer der Amidgruppe von L-Glutamin auf 2-Oxoglutarat wodurch 2 Moleküle L-Glutamat entstehen. Bei dieser Reaktion wird ein Molekül NADPH zu NADP⁺ oxidiert. Die enzymvermittelte Oxidation von NADPH kann durch die Extinktionsabnahme bei 340 nm verfolgt werden. Der Glutamatsynthaseaktivitätstest wurde, wie unter 2.8.12.1 beschrieben, durchgeführt. Als Enzymlösung wurde aufgereinigtes rekombinantes DsrL eingesetzt, außerdem erfolgten Versuche mit partiell angereichertem nativem DsrL aus

A. vinosum nach Aufreinigung über die MonoQ-Säule. In keinem der Versuchsansätze konnte Glutamatsynthaseaktivität detektiert werden.

3.3.5.4 Diaphoraseaktivität in rekombinantem und nativen DsrL

FAD-enhaltende Enzyme, wie z.B. Glutamatsynthasen, sind in der Lage den Elektronentransfer von NAD(P)H auf einen zugegebenen Elektronenakzeptor zu übertragen. Für diese als Diaphoraseaktivität bezeichnete Reaktion können synthetische Elektronenakzeptoren, wie z.B. Tetrazoliumsalze (Altman, 1976), Metallkomplexe (z.B. Ferricyanid) und substituierte Phenolderivate, oder auch biologische Elektronenakzeptoren, wie Chinone und Cytochrom c eingesetzt werden. Die Messungen zur Diaphoraseaktivität von DsrL erfolgten nach dem unter 2.8.12.2 beschriebenen Standardansatz ggf. unter Zusatz oder Substitution der zu testenden Substanzen. Als Elektronenakzeptoren wurden MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid), INT (Iodonitrotetrazoliumchlorid), Dichloroindophenol, Ferricyanid und Cytochrom c aus Pferdeherz getestet. Als Elektronendonoren wurden NADH und NADPH eingesetzt.

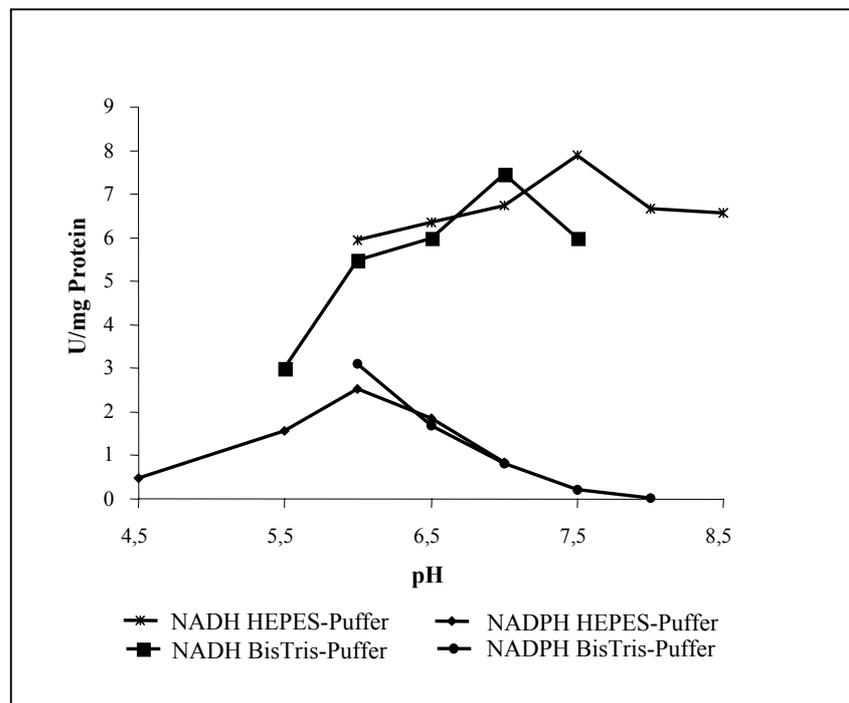


Abb. 3.34: pH-Optimum der Diaphoraseaktivität des rekombinanten DsrL-Proteins mit NADH und NADPH als Elektronendonoren und MTT als Elektronenakzeptor in HEPES und BisTris-Puffer in U/mg Protein.

pH-Optimum der Diaphoraseaktivität des rekombinanten DsrL-Proteins

Das pH-Optimum der Diaphoraseaktivität des rekombinanten DsrL wurde in 50 mM HEPES und in 50 mM BisTris-Puffer zwischen pH 4,5 und pH 8,5 sowohl für NADH als auch für NADPH als Elektronendonator bestimmt (s. Abb. 3.34). Als Elektronenakzeptor wurde in den Reaktionen MTT eingesetzt. Das pH-Optimum für die Reaktion mit NADPH als Elektronendonator liegt bei pH 6,0, mit NADH als Elektronendonator liegt das pH-Optimum der Reaktion, je nach Puffer, zwischen pH 7,0 (BisTris-Puffer) und pH 7,5 (HEPES-Puffer).

Neben dem unterschiedlichen pH-Optimum zeigte sich außerdem, dass die spezifische Aktivität des Enzyms mit NADH höher ist, als mit NADPH als Elektronendonator. Die spezifische Aktivität des Enzyms mit NADH bei pH 6,0 ist fast doppelt so hoch, wie die spezifische Aktivität mit NADPH bei dem pH-Optimum von 6,0. Die maximale spezifische Aktivität mit NADH bei pH 7,5 (HEPES-Puffer) ist fast dreifach so hoch, wie die höchste spezifische Aktivität mit NADPH bei pH 6,0. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass DsrL bevorzugt NADH bindet. Die Verschiebung des pH-Optimums von pH 7/7,5 auf 6 durch den Einsatz von NADPH als Elektronendonator ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der negativ geladene Aminosäurerest der NADH-Bindestelle (s. 3.3.1), der für die Bindung der 2'-Hydroxylgruppe der NAD(H)-Ribose verantwortlich ist, bei einem pH-Wert von pH 6 protoniert vorliegt und damit die Bindung der negativ geladenen 2'-Phosphatgruppe des NADPH ermöglicht.

Apparente K_M -Werte für NADH und NADPH

Zur Bestimmung der katalytischen Kenndaten der DsrL-Diaphoraseaktivität wurden Enzymmessungen durchgeführt, bei denen jeweils eine Komponente des Enzymtests (Elektronendonator oder Elektronenakzeptor) im sättigenden Bereich eingesetzt wurde. Die kinetischen Daten wurden mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots ausgewertet. Für die Bestimmung des K_M -Wertes von NADH wurden Konzentrationen zwischen 50 und 1000 μM eingesetzt, für NADPH zwischen 250 und 2000 μM . Die Bestimmung erfolgte für NADH bei pH 7,5 in 50 mM HEPES-Puffer, für NADPH bei pH 6,0 in 50 mM BisTris-Puffer, mit jeweils MTT als Elektronenakzeptor. Für NADH wurde ein K_M -Wert von 260 μM , für NADPH ein K_M -Wert von 830 μM bestimmt (Abb. 3.35). Die Affinität des Enzyms zu NADH ist damit mehr als dreimal so hoch, wie die zu NADPH bezogen auf die jeweiligen pH-Optima.

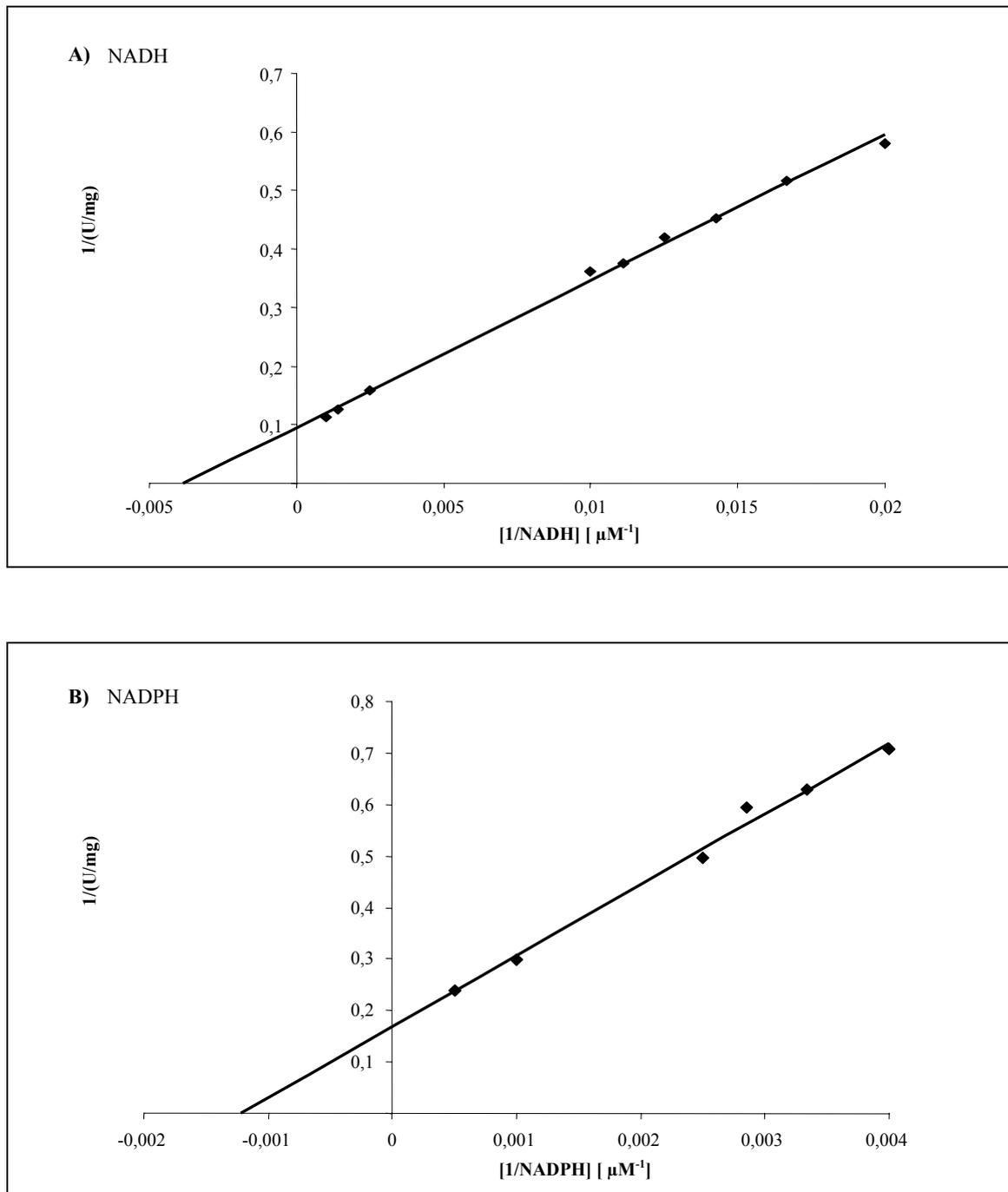


Abb. 3.35: Bestimmung des K_M -Wertes des rekombinanten DsrL aus *E. coli* für A) NADH (pH 7,5) und B) NADPH (pH 6,0) mit MTT (5 mM) als Elektronenakzeptor mittels Lineweaver-Burk-Plot; für A) wurde ein K_M -Wert von 260 μM , für B) ein K_M -Wert von 830 μM bestimmt. V_{\max} mit A) betrug 10,5 U/mg, mit B) 5,9 U/mg.

Die V_{\max} für NADH und MTT bei pH 7,5 wurde mit 10,5 U/mg Protein bestimmt, für NADPH mit MTT bei pH 6,0 wurde für V_{\max} ein Wert von 5,9 U/mg Protein berechnet. Diese Daten bestätigen das Ergebnis aus der Darstellung der spezifischen Aktivitäten in Abb. 3.33 zur Bestimmung des pH-Optimums. DsrL hat eine höhere Affinität zu NADH und die Oxidation von NADH in Gegenwart von MTT als Elektronenakzeptor erfolgt doppelt so schnell, wie mit

NADPH als Substrat bei den jeweiligen pH-Optima der Reaktion. Bei pH 7,5 ist fast keine Diaphoraseaktivität mit NADPH als Elektronendonator messbar. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung (s. Bestimmung des pH-Optimums), dass DsrL in vivo mit NADH und nicht mit NADPH interagiert.

Die oben genannten Daten wurden alle mit dem rekombinanten aufgereinigtem DsrL bestimmt. Das aus *A. vinosum* aufgereinigte DsrL zeigte ebenfalls Diaphoraseaktivität. Da von diesem Enzym nur geringe Mengen zur Verfügung standen, wurde nur der K_M -Wert für NADH mit MTT bestimmt. Die Messungen erfolgten in 50 mM HEPES pH 7,5 mit NADH-Konzentrationen zwischen 50 und 115 μM . Für das native DsrL aus *A. vinosum* wurde ein K_M -Wert von 120 μM berechnet (s. Abb. 3.36), für V_{\max} wurde ein Wert von 30 U/mg Protein bestimmt. Das aus *A. vinosum* aufgereinigte DsrL zeigte wie das rekombinante Protein aus *E. coli* deutliche Diaphoraseaktivität. Der K_M -Wert für NADH ebenso wie der Wert für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} zeigen jedoch, dass das DsrL aus *A. vinosum* unter den getesteten Bedingungen deutlich reaktiver ist als das rekombinante DsrL.

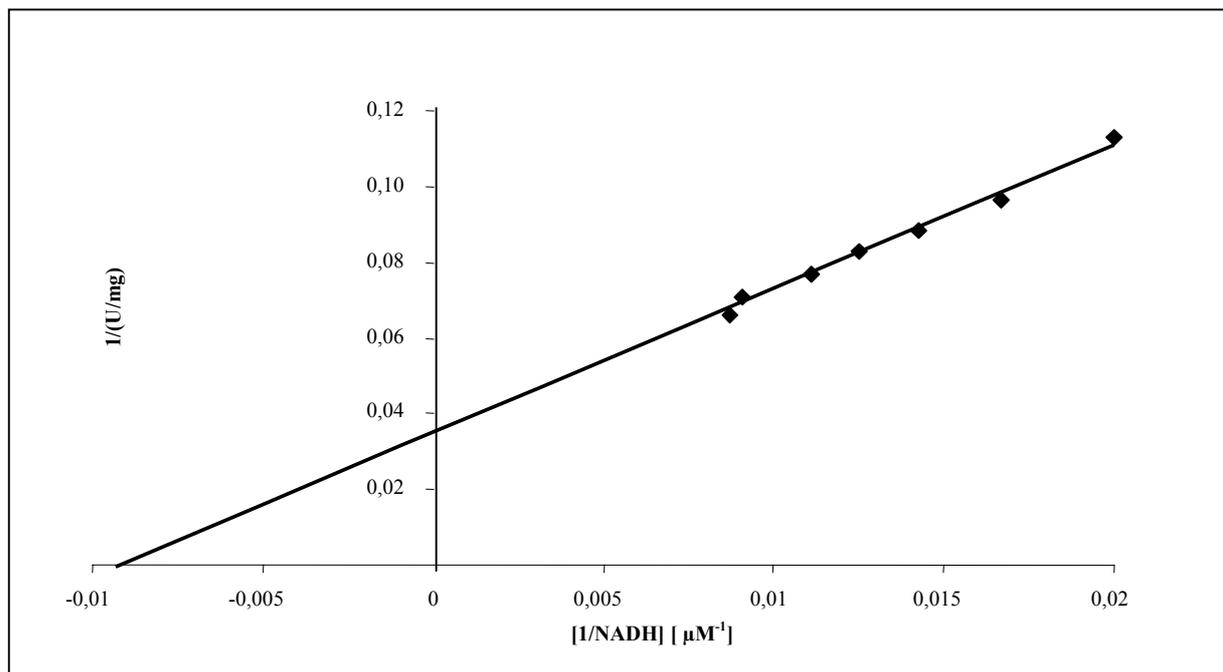


Abb. 3.36: Bestimmung des K_M -Wertes des nativen DsrL aus *A. vinosum* für NADH (pH 7,5) mit MTT (5 mM) als Elektronenakzeptor mittels Lineweaver-Burk-Plot; der K_M -Wert betrug 120 μM , V_{\max} 30 U/mg.

Durch Aktivitätsfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass die mit dem rekombinanten Protein beobachtete höhere Reaktivität mit NADH im Vergleich zu NADPH auch für das aus *A. vinosum* isolierte Protein zutrifft (s. Abb. 3.37). Mit NADH erfolgte eine deutlich stärkere Anfärbung der

DsrL-enthaltenen Banden als mit NADPH². Mit dieser Methode konnte außerdem gezeigt werden, dass die gemessene Diaphoraseaktivität definitiv auf DsrL zurückzuführen ist. Weder die Sulfitreduktase, noch das kontaminierende 60 kDa grosse Protein (s. 3.3.4) in der DsrL-Anreicherung aus *A. vinosum*, wurden im Aktivitätsgel angefärbt. Das rekombinante DsrL liegt in verschiedenen Multimeren vor, die alle mit der Aktivitätsfärbung angefärbt wurden. Die Bildung verschiedener Multimere scheint die Diaphoraseaktivität des rekombinanten DsrL nicht zu beeinträchtigen.

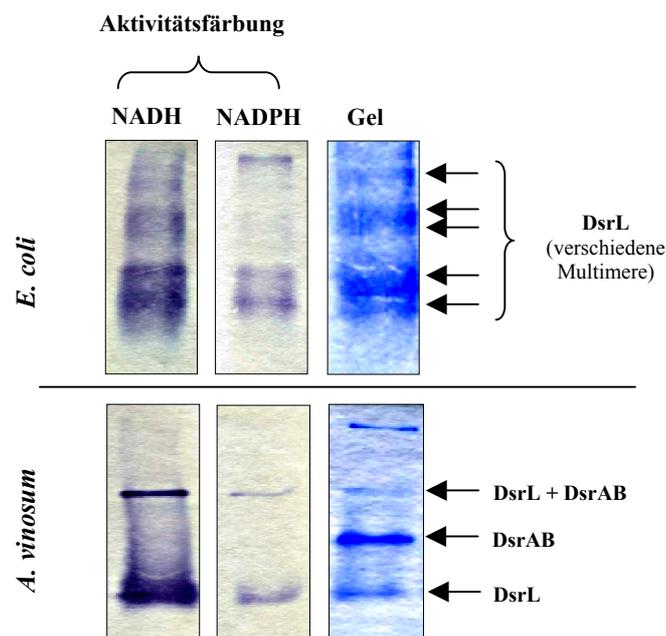


Abb. 3.37: Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Diaphoraseaktivität des im nativen Gel aufgetretenen rekombinanten DsrL aus *E. coli* (oben) und des nativen DsrL aus *A. vinosum* (unten); als Elektronenakzeptor wurde MTT eingesetzt; zum Vergleich der Banden wurde das Coomassie-gefärbte SDS-Gel gezeigt.

Elektronenakzeptoren der DsrL-Diaphoraseaktivität

Für MTT als Elektronenakzeptor wurde der K_M -Wert sowohl mit NADH, als auch mit NADPH bei den entsprechenden pH-Optima von 7,5 und 6,0 bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit Konzentrationen zwischen 10 und 150 μM . Mit NADH bei pH 7,5 wurde ein K_M -Wert von 15 μM , mit NADPH bei pH 6,0 wurde ein K_M -Wert 110 μM bestimmt (s. Tab. 3.2).

V_{\max} wurde für NADH mit 6,6 U/mg Protein bestimmt, für NADPH betrug V_{\max} 2,8 U/mg Protein. Ein Vergleich der für MTT berechneten V_{\max} -Werte mit den entsprechenden V_{\max} -Werten für

² Beide Elektronendonoren wurden in gleicher Konzentration eingesetzt, die Inkubation erfolgte mit beiden Ansätzen für 30 min bei 30 °C.

NADH und NADPH mit MTT zeigen, dass die für MTT berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten um ca. 50 % niedriger sind, als die entsprechenden für NADH und NADPH. Möglicherweise waren die eingesetzten NADH und NADPH-Konzentrationen (jeweils 10 mM) so hoch, dass sie wiederum zu einer Hemmung der Enzymreaktion führten. Für den Vergleich der Enzymaktivität mit den anderen getesteten Elektronendonoren sind diese Werte jedoch ausreichend, weshalb Experimente zum Nachweis einer möglichen Substrathemmung durch sehr hohe Konzentrationen von NADPH und NADH nicht durchgeführt wurden.

Neben MTT wurden noch weitere Elektronenakzeptoren mit NADH als Elektronendonator der DsrL-Diaphoraseaktivität bei pH 7,5 (HEPES-Puffer) getestet. Mit INT, Dichloroindophenol, Cytochrom c aus Pferdeherz und Ferricyanid als Elektronenakzeptor konnte ebenfalls Diaphoraseaktivität festgestellt werden. Mit den ersten drei Elektronenakzeptoren wurde jeweils der K_M -Wert³ bestimmt (s. Tab. 3.2). Die Reaktion mit Ferricyanid war jedoch so gering, dass keine K_M -Wert-Bestimmung erfolgte.

Tab.3.2: Vergleich der verschiedenen getesteten Elektronenakzeptoren bzw. – donoren der DsrL Diaphoraseaktivität in Bezug auf die bestimmten K_M - und V_{max} -Werte.

| Elektronen-donor | Elektronen-akzeptor | K_m Donor (μ M) | K_m Akzeptor (μ M) | V_{max} U/mg |
|-------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| NADH ¹ | MTT ¹ | 130 | nb | 30 |
| NADPH | MTT | 830 | | 5,9 |
| NADPH | MTT | | 110 | 2,8 |
| NADH | MTT | 260 | | 10,5 |
| NADH | MTT | nb | 16 | 6,6 |
| NADH | INT | nb | 25 | 2,7 |
| NADH | Dichloroindophenol | nb | 310 | 21 |
| NADH | Cytochrom c | nb | 37 | 1 |
| NADH | Ferricyanid | nb | nb | nb |

¹ die Bestimmung erfolgte im Gegensatz zu den anderen Werten mit nativem DsrL aus *A. vinosum*
nb = nicht bestimmt

³ Die Bestimmung erfolgte nur mit 5 Werten jeweils in Doppelbestimmung und ist deshalb nur als Näherungswert in Vergleichen untereinander zu gebrauchen.

Der Vergleich der erhaltenen Werte für die getesteten Elektronenakzeptoren zeigt, dass die Affinität von DsrL zu den Tetrazoliumsalzen (MTT und INT) am höchsten ist. Die Affinität zu Cytochrom c aus Pferdeherz ist ebenfalls sehr hoch, die Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch sehr gering. Am schnellsten erfolgt die Reduktion von Dichloroindophenol, zu dem das Enzym jedoch eine sehr geringe Affinität besitzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Aktivität von DsrL *in vitro* mit 2-Elektronenakzeptoren, wie MTT, INT und Dichloroindophenol, deutlich höher ist, als mit den 1-Elektronenakzeptoren Ferricyanid und Cytochrom c.

Mit dem Nachweis der Diaphoraseaktivität konnte eine Funktion von DsrL als elektronentransportierendes Enzym nachgewiesen werden, das *in vitro* eine höhere spezifische Aktivität mit 2-Elektronenakzeptoren zeigt. Die Sequenzanalyse (s. 3.3.1) von DsrL erbrachte hohe Homologien zu Proteinen der Dinukleotid-Disulfid Oxidoreduktase Familie, zu denen Enzyme gehören, wie z.B. Thioredoxinreduktasen, die Disulfidbrücken reduzieren. Diese beiden Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass DsrL möglicherweise die Reduktion von Disulfidbrücken katalysiert.

3.3.5.5 Versuche zur möglichen Disulfidreduktaseaktivität

Die mögliche Disulfidreduktaseaktivität wurde mit Liponamid (2 mM), Liponsäure (5 mM), oxidiertem Gluthation (10 mM) und DTNB (5'5'Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) = Ellmans Reagenz) (2 mM) getestet. Der Versuch wurde wie unter 2.12.8.2 für die Diaphorasereaktion beschrieben durchgeführt. Dem Reaktionsansatz wurden jeweils rekombinantes DsrL und NADH (1 mM) als Elektronenakzeptor bei pH 7,5 (HEPES-Puffer) zugesetzt. Mit keinem der aufgeführten Co-substrate konnte eine signifikante Oxidation des eingesetzten NADH gemessen werden.

3.3.5.6 Versuche zur Reduktion von Sulfit

Die assimilatorische Sulfitreduktase aus *E. coli* enthält, im Gegensatz zu den dissimilatorischen Sulfitreduktasen, eine NADPH-bindende Flavoprotein-Untereinheit, die die Oxidation des NADPH katalysiert und die Elektronen über die Sirohäm-Untereinheit auf Sulfit überträgt, dass zu Sulfid reduziert wird. Enzymtests mit dem aufgereinigten DsrL/DsrAB-Komplex, NADH (1 mM) und Sulfit (2 mM) als potentiellen Elektronenakzeptor zeigten jedoch keine NADH-Oxidation.

3.3.6 Physiologische Untersuchung zur Funktion von DsrL

Die Untersuchung der Funktion von DsrL auf genetischer Ebene erfolgte mit Hilfe von *dsrL*-Deletionsmutanten, die, wie für die *dsrN*-Deletionsmutante unter 3.2.3.2 beschrieben, durch „in frame“-Mutagenese erzeugt wurden.

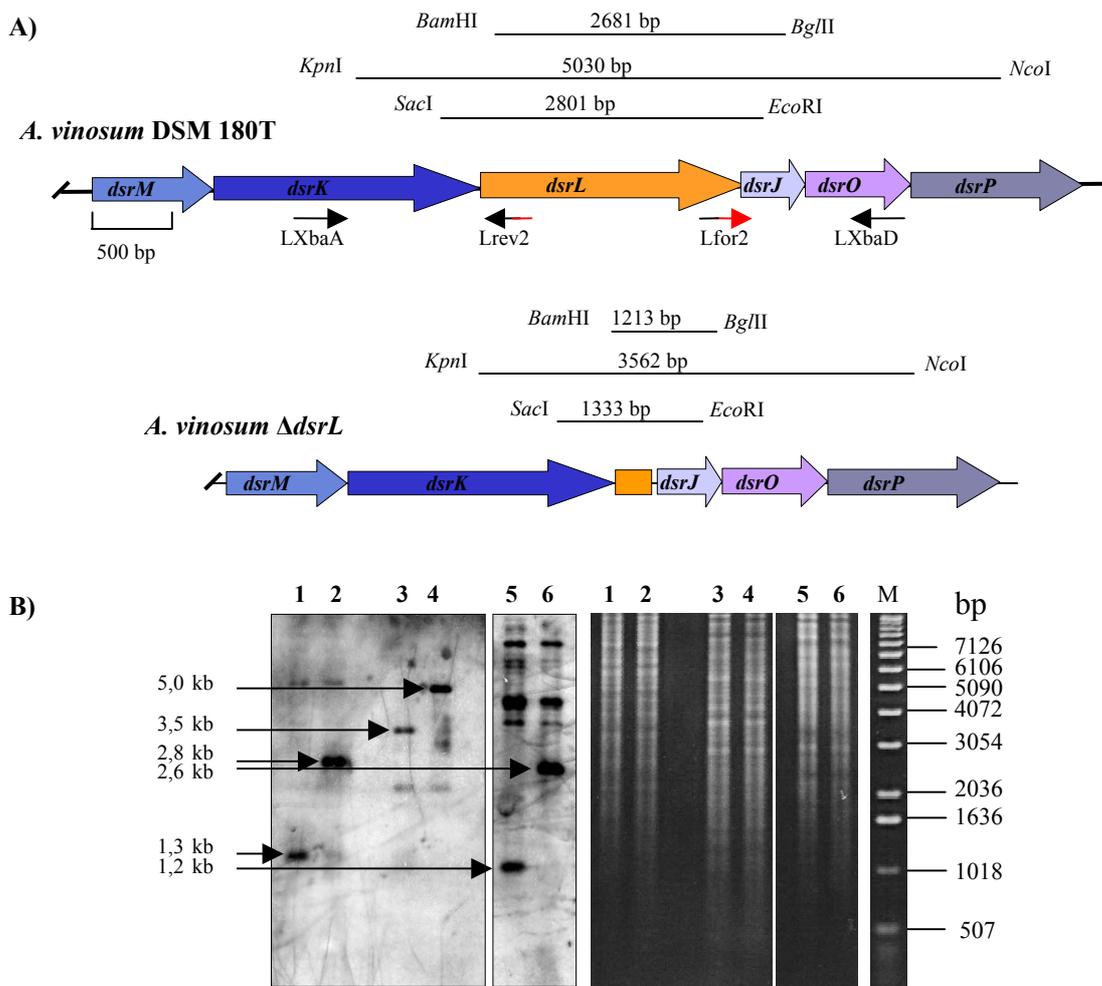


Abb. 3.38: A) Schematische Darstellung der genomischen Region um *dsrL* in Wildtyp und Mutante und Lage der für die Herstellung des Deletionsvektors benutzten Primer; B) Southern-Blot-Hybridisierung der *dsrL*-Deletionsmutante *A. vinosum* $\Delta dsrL$ im Vergleich zum Wildtyp *A. vinosum* Rif50; 1/2: *A. vinosum* $\Delta dsrL$ / *A. vinosum* Rif50 mit *SacI*/*EcoRI* restringiert; 3/4: *A. vinosum* $\Delta dsrL$ / *A. vinosum* Rif50 mit *KpnI*/*NcoI* restringiert; 5/6: *A. vinosum* $\Delta dsrL$ / *A. vinosum* Rif50 mit *BamHI* /*BglII* restringiert; M: 1 kb DNA-Marker.

3.3.6.1 Konstruktion des *dsrL*-Deletionsvektors pK18*mobsacB* Δ *dsrL*

Die PCR-Fragmente zur Klonierung des *dsrL*-Deletionsvektors pK18*mobsacB* Δ *dsrL* wurden mit den Primern LxbaA/Lrev2 (1. Fragment, 1532 bp) und Lfor2/NXbaD (2. Fragment, 1494 bp) amplifiziert. Die Fragmente eins und zwei dienten in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize. Es entstand ein 3026 kb grosses Amplifikat der genomischen Region um *dsrL* mit einer Deletion der *dsrL*-Gensequenz von 1443 bp. Dieses Fragment wurde über die durch die Primer LXbaA und LXbaD eingefügten *XbaI*-Schnittstellen in den ebenfalls mit *XbaI* restringierten pK18*mobsacB*-Vektor kloniert.

3.3.6.2 Konstruktion und Identifizierung von *A. vinosum* Δ *dsrL* auf genetischer Ebene

Die Konstruktion, Selektion und Identifizierung der *dsrL*-Deletionsmutanten wurde auf die gleiche Weise, wie für die *dsrN*-Deletionsmutante durchgeführt. Die Identifizierung von *dsrL*-Deletionsmutanten erfolgte über Kolonie-PCR und über Southern-Blot-Hybridisierung. Die Restriktion der DNA erfolgte mit *Bam*HI/*Bgl*II, *Kpn*I/*Nco*I und *Sac*I/*Eco*RI. Wie Abbildung 3.38 zeigt, lagen die Banden der Mutante um den Betrag der Deletion unter der Bande des Wildtyps, eine Wildtypbande ist in der Mutante nicht vorhanden. Die fertige Mutante wurde als *A. vinosum* Δ *dsrL* bezeichnet

3.3.6.3 Phänotypische Charakterisierung von *A. vinosum* Δ *dsrL*

Die Auswirkung der Deletion von *dsrL* wurde auf physiologischer Ebene, wie für *A. vinosum* Δ *dsrN* beschrieben, in Bezug auf die Fähigkeit zur Schwefeloxidation untersucht. Erste Hinweise auf den Phänotyp der Mutante wurden durch Wachstumsversuche auf 1 l Thiosulfatmedium erhalten. Im Gegensatz zu *A. vinosum* Δ *dsrN* zeigte die Δ *dsrL*-Mutante keine Hinweise auf eine Oxidation akkumulierten Schwefels. Die genauere Charakterisierung erfolgte auch mit dieser Mutante im Fermenter. Der zeitliche Verlauf der Sulfidoxidation in einem Fermenter mit O-Medium plus 2 mM Sulfid mit allen relevanten Zwischenprodukten bis zum Sulfat, ist exemplarisch für *A. vinosum* Δ *dsrL* und *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp) in Abbildung 3.39 dargestellt. Der Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante zeigt, dass die Oxidation des zugesetzten Sulfids und damit die Bildung des Schwefels in der Mutante schneller erfolgte als im Wildtyp. Die Berechnung der Sulfidoxidations- bzw. Schwefelbildungsrate ergab eine Erhöhung der Raten um bis zu 80 % in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 3.40 B). Die Oxidation des akkumulierten Schwefels ist dagegen in der Mutante komplett gehemmt. Dies ist vermutlich der Grund für die Erhöhung der Sulfidoxidations- bzw. Schwefelbildungsrate in der Mutante. Die Schwefel-

oxidationsrate beträgt im Wildtyp 7,4 nmol/(min*mg Protein), in der Mutante konnte dagegen gar keine Schwefeloxidation festgestellt werden. Die komplette Hemmung der Oxidation des akkumulierten Schwefels zeigt sich auch darin, dass in der *dsrL*-Deletionsmutante kein Sulfat gebildet wurde. Die Bildung/Oxidation von Sulfit und Polysulfiden zeigte in der Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp. Auch die Oxidation des Thiosulfats, das in sehr geringen Mengen (< 150 µM) als Kontamination immer in der Sulfidlösung vorhanden war, zeigte keine Unterschiede in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Menge, des aus dem Sulfanschwefel des Thiosulfats entstehenden Sulfats, war immer so gering, dass es nicht detektiert werden konnte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese drei Schwefelverbindungen in Abb. 3.39 nicht dargestellt. Die gesammelten Daten zeigen, dass DsrL absolut essentiell für die Oxidation des akkumulierten Schwefels ist. Die Deletion des *dsrL*-Gens führt zur kompletten Hemmung der Schwefeloxidation.

Zur Kontrolle der genetischen Reinheit der Kulturen, wurde Zellmaterial aus jedem Fermenter mit Kolonie-PCR überprüft.

3.3.6.4 Komplementation von *A. vinosum* $\Delta dsrL$ mit *dsrL*

Durch die Komplementation von *A. vinosum* $\Delta dsrL$ mit *dsrL* erfolgte ein weiterer Beweis dafür, dass die Deletion von *dsrL* allein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Die Komplementation erfolgte nach der gleichen Strategie, wie für *A. vinosum* $\Delta dsrN$. Das *dsrL*-Gen wurde mit dem Promotor des *dsr*-Operons und der Terminatorsequenz aus dem pET-Vektor in den in *A. vinosum* replizierbaren Vektor pBBR1MCS2 kloniert (Klonierungsstrategie s. Abb. 3.16).

Die Klonierung des Vektors erfolgte über PCR mit mutagenen Oligonukleotiden. Die Amplifikation des *dsr*-Promotors erfolgte mit den Primern Dsr-Promotor-forw und Dsr-Promotor-rev, über die eine *Xba*I-Schnittstelle und eine *Nde*I-Schnittstelle in das entstehende ca. 900 bp große Fragment eingeführt wurden. Dieses Fragment wurde in den ebenfalls mit *Xba*I und *Nde*I restringierten DsrL-Überexpressionsvektor pLEX2 (s. 3.3.2.1) direkt vor die *dsrL*-Gensequenz (*Nde*I-Schnittstelle direkt im Startcodon des *dsrL*-Gens) eingefügt. Dieses Konstrukt aus *dsr*-Promotor und *dsrL*-Gen wurde mit der im Vektor an das *dsrL*-Gen anschließenden Terminatorsequenz mit den mutagenen Oligonukleotiden Dsr-Promotor-forw und pet15b rev über PCR amplifiziert. Das ~ 2,8 kb große Fragment wurde mit *Xba*I und *Hind*III (*Hind*III-Schnittstelle über pet15b rev eingeführt) restringiert und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pBBR1MCS2 kloniert.

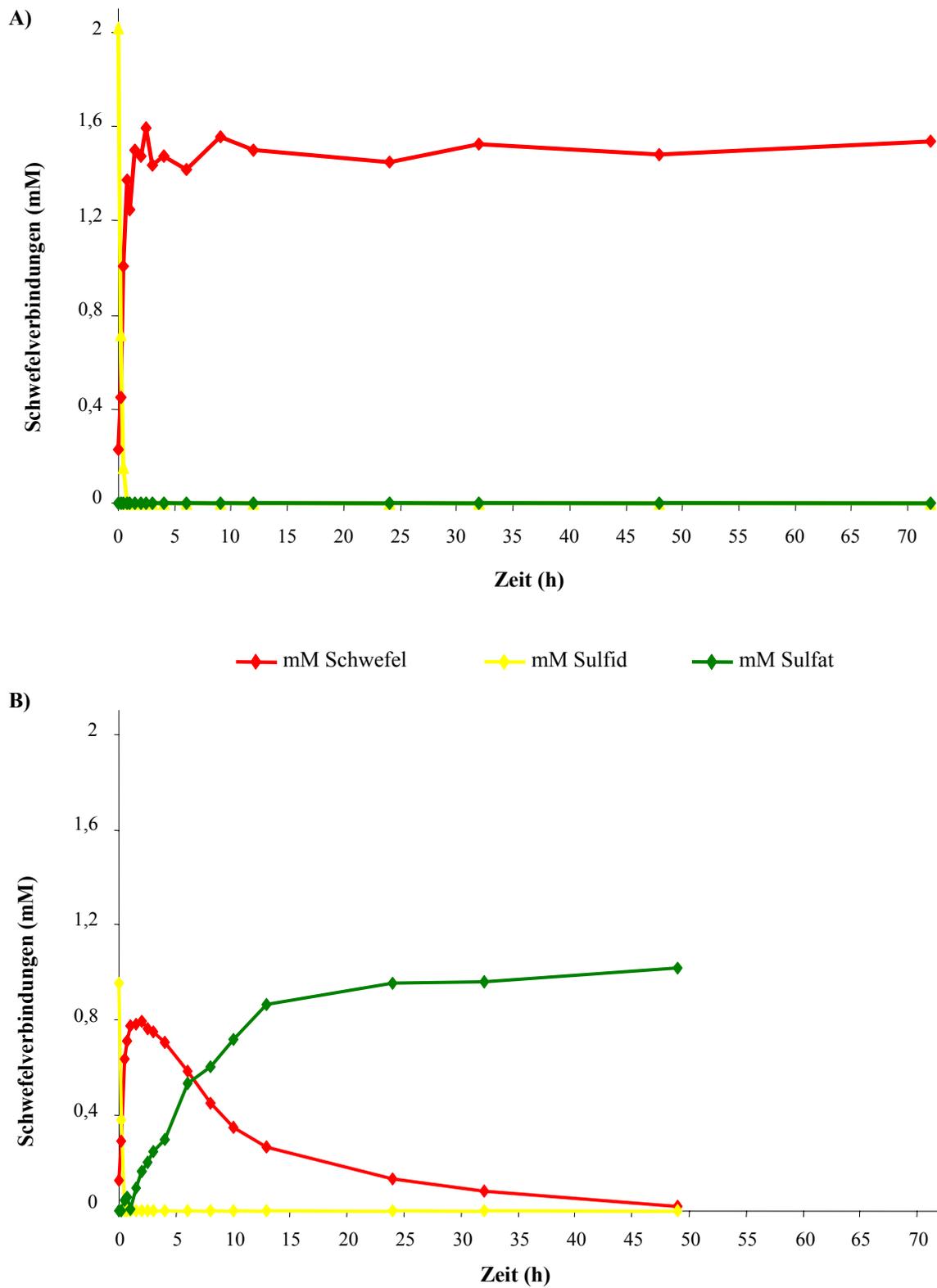


Abb. 3.39: Umsatz von Sulfid (2 mM) in A) *A. vinosum* $\Delta dsrL$ und B) *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp); dargestellt sind die Sulfidkonzentration (gelb), die Schwefelkonzentration (rot) und die Sulfatkonzentration (grün) der Kulturen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Der Proteingehalt betrug in *A. vinosum* $\Delta dsrL$ 166 $\mu\text{g/ml}$, in *A. vinosum* Rif50 140 $\mu\text{g/ml}$.

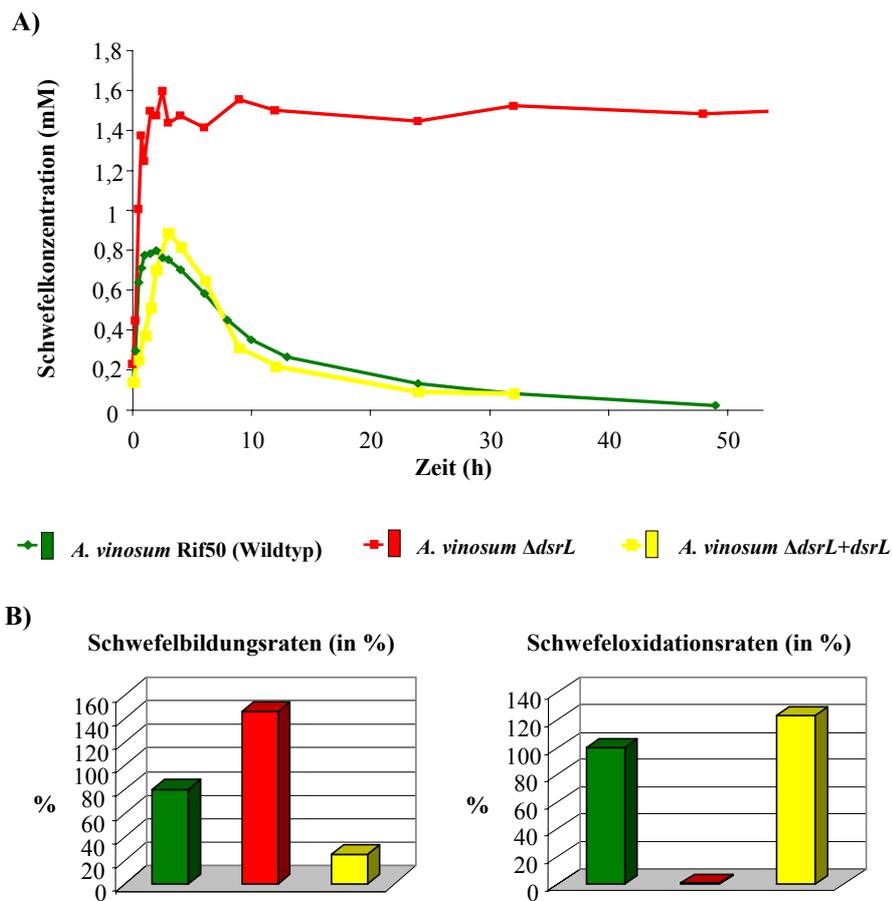


Abb. 3.40: A) Vergleich der Akkumulation und der Oxidation intrazellulären Schwefels und B) Vergleich der Schwefelbildungs- und Schwefeloxidationsraten (in %) in *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp, grün) und *A. vinosum* $\Delta dsrL$ (rot) und *A. vinosum* $\Delta dsrL + dsrL$ (gelb).

Der fertige Vektor pBBR1MCS2*dsrL* wurde über den *E. coli* S17.1 in *A. vinosum* $\Delta dsrL$ konjugiert. Die Selektion auf *A. vinosum* $\Delta dsrL$ -Klone, die das Plasmid enthielten, erfolgte auf RCV-Phytageplatten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. Kanamycinresistente Klone sollten den Vektor tragen, wurden jedoch zusätzlich mit Kolonie-PCR überprüft. Die Charakterisierung der Komplementationsmutante *A. vinosum* $\Delta dsrL + dsrL$ erfolgte ebenfalls im Fermenter auf O-Medium, dem 2 mM Sulfid zugegeben wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Schwefelkurven der Kulturen in Abb. 3.40 A. dargestellt. In der Komplementationsmutante ist die Sulfidoxidations- bzw. Schwefelbildungsrate im Verhältnis zum Wildtyp und zur Deletionsmutante stark beeinträchtigt. Die Schwefeloxidation erfolgte dagegen mit vergleichbaren bzw. höheren Raten als im Wildtyp (s. Abb. 3.40 B). Die verzögerte Sulfidoxidations-/Schwefelbildungsrate der Komplementationsmutante ist wahrscheinlich, wie schon bei der *dsrN*-Komplementationsmutante vermutet wurde, auf die verminderten Wachstumsraten durch die Expression der Kanamycinresistenz zurückzuführen. Die erfolgreiche Komplementation der

Mutante zeigt sich in der Wiederherstellung der Fähigkeit zur Oxidation akkumulierten Schwefels mit zum Wildtyp vergleichbaren Raten. In der Komplementationsmutante erfolgte die Schwefeloxidation mit 9,1 nmol/(min*mg Protein), im Wildtyp mit 7,4 nmol/(min*mg Protein).

3.3.6.5 Charakterisierung von *A. vinosum* $\Delta dsrL$ und *A. vinosum* $\Delta dsrL + dsrL$ über Western-Blot

Die erfolgreiche Ausschaltung des *dsrL*-Gens und die nachfolgende erfolgreiche Komplementation der Mutante mit *dsrL* wurde, außer auf genetischer Ebene, auch auf Proteinebene untersucht. Der immunologische Nachweis des Fehlens bzw. der Produktion von DsrL erfolgte aus der löslichen Fraktion der Zellen der Fermenterkulturen. Die Western-Blot-Analyse zeigt deutlich (Abb. 3.41 A), dass DsrL in *A. vinosum* $\Delta dsrL$ nicht mehr vorhanden ist. In der Komplementationsmutante ist dagegen eine deutliche Bande für DsrL zu erkennen. Neben dem Nachweis des erfolgreichen Ausschaltens bzw. Komplementierens zeigt der Western-Blot auch, dass der DsrL-Antikörper spezifisch an DsrL bindet.

Neben der Abwesenheit von DsrL in *A. vinosum* $\Delta dsrL$ und der erfolgreichen Produktion von DsrL über den Vektor pBBR1MCS2*dsrL* in der Komplementationsmutante, wurde die Expression der anderen Proteine des *dsr*-Operons exemplarisch für DsrE und DsrO über Western-Blot überprüft. Das für DsrE kodierende Gen liegt stromaufwärts von *dsrL*, das für DsrO kodierende Gen stromabwärts von *dsrL*. Für DsrE erfolgte der Nachweis aus der löslichen Fraktion, DsrO wurde aus der Membranfraktion nachgewiesen. Sowohl DsrE als auch DsrO konnten in *A. vinosum* $\Delta dsrL$ nachgewiesen werden (s. Abb.3.41 B.). Da gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden (20 µg/Spur), ist ein direkter Vergleich der Banden möglich. Die Expression der beiden Gene ist im Vergleich zum Wildtyp in der Mutante erhöht. Die Western-Blot-Analyse für DsrO und DsrE in der Komplementationsmutante zeigt dagegen, dass DsrE und DsrO in *A. vinosum* $\Delta dsrL + dsrL$ wieder in gleicher Menge, wie im Wildtyp gebildet wurden. Die Deletion von *dsrL* hat eindeutig keine negativen Auswirkungen auf die Expression der anderen *dsr*-Gene. Die erhöhte Produktion ist vermutlich auf regulatorische Effekte zurückzuführen (→ s. Regulation unter 3.3.7). DsrL konnte erfolgreich über den Vektor pBBR1MCS2*dsrL* exprimiert und die $\Delta dsrL$ -Mutante damit komplementiert werden.

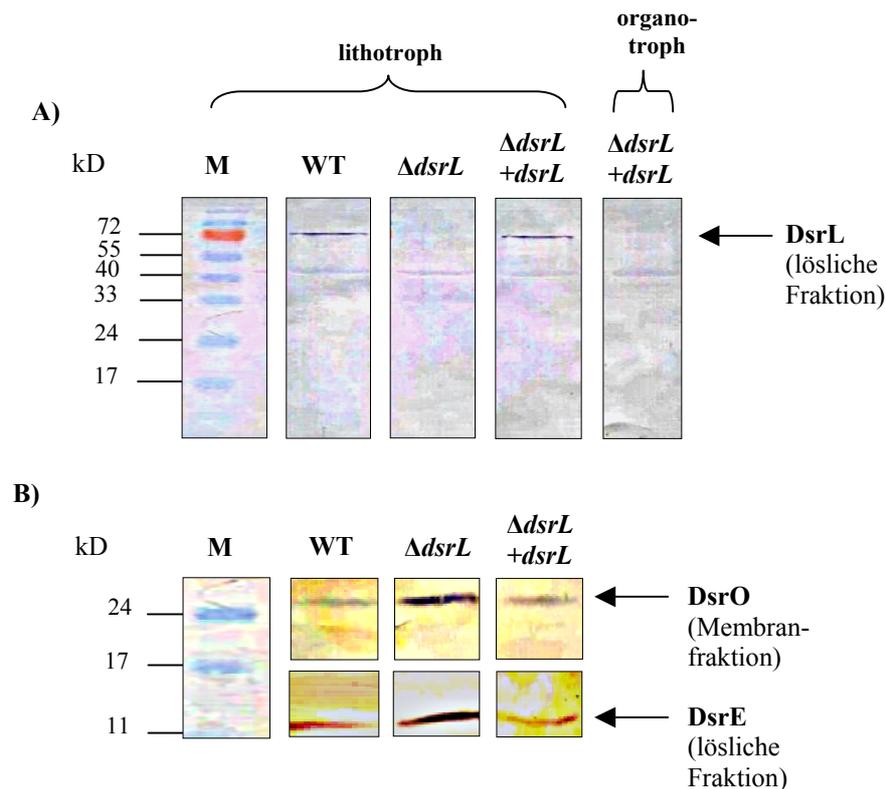


Abb. 3.41: Western-Blot zum Nachweis von A) DsrL und B) DsrO und DsrE in *A. vinosum* Rif50 (Wildtyp), *A. vinosum* $\Delta dsrL$ und *A. vinosum* $\Delta dsrL + dsrL$; die Zellen wurden entweder lithotroph oder organotroph angezogen; M: Marker.

3.3.7 Hinweise auf die Regulation der Dsr-Proteine am Beispiel von DsrL

Über Northern-Blot-Analysen wurde für die Gene des *dsr*-Operons gezeigt, dass die Zugabe von Sulfid zum Medium die Transkription der *dsr*-Gene induziert (Pott-Sperling, 2000). Mit Western-Blot-Analysen wurde nun untersucht, ob die Sulfidinduktion auch auf Proteinebene detektiert werden kann. Die Produktion von DsrL wurde dazu auf Medium mit und ohne Sulfid untersucht. In photoorganoheterotroph auf RCV-Medium angezogenen Zellen konnte DsrL nicht nachgewiesen werden, die Zugabe von Sulfid zu diesen Kulturen führte jedoch zu einer schwach erkennbaren DsrL-Bande im Western-Blot (nicht als Abbildung dargestellt).

Eindeutiger kann die Expression von DsrL in den photolithoautotroph auf Pfennigmedium kultivierten Zellen der Fermenter nachgewiesen werden (s. Abb. 3.41 A). Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt, wird die Produktion der anderen Proteine des *dsr*-Operons, gezeigt am Beispiel von DsrE und DsrO, durch die Deletion von *dsrL* erhöht. Die Komplementation der $\Delta dsrL$ -Mutante mit *dsrL* führt dagegen wieder zu einer zum Wildtyp vergleichbaren Bildung der Dsr-Proteine (s. Abb. 3.41 B). Da die Sulfidoxidation in der Mutante nicht beeinträchtigt ist, lässt

dieses Ergebnis vermuten, dass die Induktion der Transkription der *dsr*-Gene nicht durch das externe Sulfid selbst vermittelt wird.

Die Komplementation der $\Delta dsrN$ - und $\Delta dsrL$ -Mutanten erfolgte mit dem entsprechenden Gen in dem Vektor pBBR1MCS2. Als Promotor wurde dem jeweiligen Gen in dem Vektor die 900 bp-lange Sequenz vor *dsrA*, dem ersten Gen des *dsr*-Operons, vorangestellt. Die erfolgreiche Komplementation der beiden Mutanten zeigt die erfolgreiche Transkription der Gene mit diesem Promotor, was die vermutete Promotorregion des *dsr*-Operons bestätigt. Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Produktion von DsrL in der Komplementationsmutante zeigen, dass DsrL bei photolithotropher Anzucht auf Pfennig-Medium wie erwartet gebildet wird. Bei photoorganotropher Anzucht der Komplementationsmutante auf RCV-Medium konnte dagegen keine Produktion des Proteins festgestellt werden (s. Abb. 3.41 Spur 4). Die 900 bp vor *dsrA* enthalten daher wahrscheinlich den Promotor des *dsr*-Operons und die Bindestelle für das die Transkription induzierende Molekül.

3.3.8 Suche nach *dsrL*-homologen Genen im Genom von *A. vinosum*

Wie auch schon für das *dsrN*-Gen, wurde das Genom von *A. vinosum* auch nach möglichen homologen *dsrL*-Genen durchsucht. Die heterologe Hybridisierung mit einer *dsrL*-Gensonde wurde bei 60 °C durchgeführt. Es konnte jedoch kein weiteres *dsrL*-Gen detektiert werden.

4 Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Vermutungen über die Funktionen von DsrL und DsrN, die im Laufe der durchgeführten Experimente zum Teil bestätigt, zum Teil aber auch revidiert werden mussten. Den postulierten Funktionen der beiden Proteine war die grundlegende Annahme gemeinsam, dass die prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase in *A. vinosum* wahrscheinlich Siro(häm)amid und nicht Sirohäm ist. Diese Annahme basierte auf der Entdeckung von Matthews et al. (1995), die zeigen konnten, dass die prosthetische Gruppe der dissimilatorischen Sulfitreduktase in verschiedenen *Desulfovibrio* Arten die amidierete Form des Sirohäm, das Siro(häm)amid, ist. Das DsrN-homologe Protein aus *Desulfobacter vibriovormis* zeigt, wie auch DsrN aus *A. vinosum* hohe Homologien zu bakteriellen Cobyrynsäure-a,c-Diamidsynthasen. Diese Enzyme sind an der Cobalamin- (Vitamin B12-) Synthese beteiligt und katalysieren die Amidierung von Cobyrynsäure zu Cobyrynsäure-a,c-Diamid (Debussche et al., 1990). Sirohäm und Cobalamin sind verwandte tetrazyclische Strukturen, die beide, wie andere modifizierte Tetrapyrrole (Häm, Chlorophyll, Häm d1 und F₄₃₀), aus Uroporphyrinogen III synthetisiert werden (Raux et al., 2000) (s. Abb. 4.1). Die letzte gemeinsame Vorstufe von Sirohäm und Cobalamin ist Precorrin-2. (Raux et al., 2003; Woodcock et al., 1998). Für das zu DsrN homologe Protein aus *D. vibrioformis* wurde daher eine Funktion in der Amidierung von Sirohäm zu Siro(häm)amid vermutet (Larsen et al., 2000), die in Analogie für das DsrN-Protein aus *A. vinosum* übernommen wurde (Pott-Sperling, 2000). Die von Cobyrynsäure-a,c-Diamidsynthasen katalysierte Reaktion benötigt zwei Moleküle Glutamin, deren Amidgruppen unter ATP-Verbrauch auf Cobyrynsäure übertragen werden (Debussche et al., 1990). Die Tatsache, dass Glutamin als Aminogruppendonor dient, führte zu der postulierten Funktion für DsrL. Das zu DsrL-homologe Protein GltA aus *Thermococcus kodakarensis*, zeigt wie DsrL, signifikante Homologien zu den kleinen Untereinheiten von Glutamatsynthasen. Für GltA aus *T. kodakarensis* konnte eine Glutamin-abhängige Glutamatsynthaseaktivität festgestellt werden (Jongsareejit et al., 1997). Es wurde daher angenommen, dass DsrL in einer umgekehrten Glutamatsynthasereaktion das für die Amidierung benötigte Glutamin zur Verfügung stellt (Pott-Sperling, 2000).

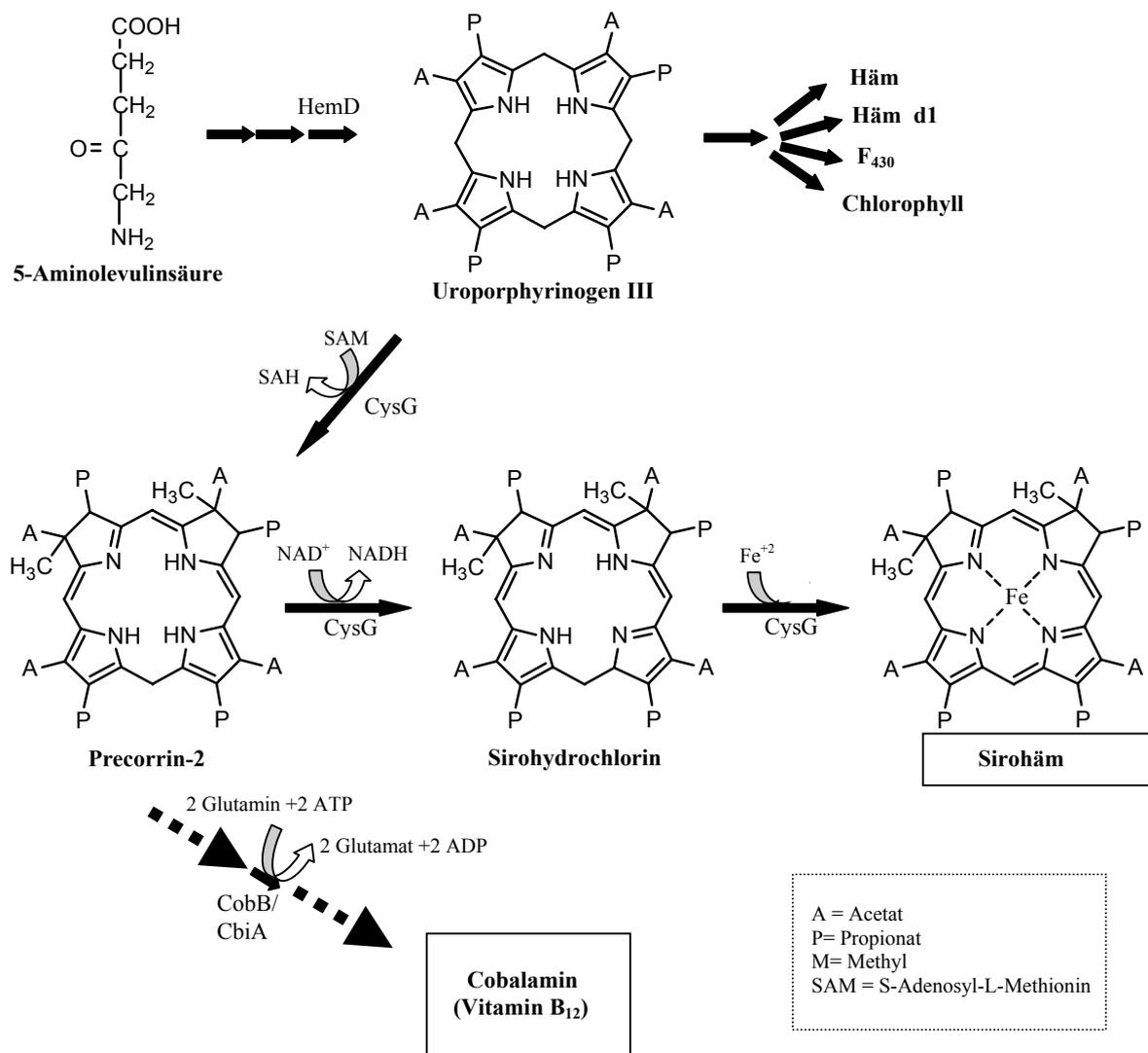


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Sirohäm biosynthese und die Beziehung zur Cobalamin- (Vitamin B₁₂), Häm-, Häm d1-, F₄₃₀- und Chlorophyllsynthese. Nur die für diese Arbeit relevanten Enzyme sind dargestellt.

4.1 DsrN

Siro(häm)amid ist die prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase

Die Analyse der löslichen Fraktion von photolithoautotroph auf reduzierten Schwefelverbindungen angezogenen Zellen zeigte, dass in *A. vinosum* Siro(häm)amid vorhanden ist. Im Unterschied zu *Desulfovibrio vulgaris* konnten jedoch aus *A. vinosum* nur sehr geringe Mengen an Siro(häm)amid aufgereinigt werden. Aus *D. vulgaris* wurden 70 nmol Siro(häm)amid pro Gramm Zellen isoliert (Prof. Dr. Russel Timkovich, pers. Mitteilung), aus *A. vinosum* jedoch nur 0,276 nmol Siro(häm)amid pro Gramm Zellen. Die geringe Ausbeute aus *A. vinosum* ist zum Teil ver-

mutlich auf grössere Verluste an Sulfitreduktase bei der Herstellung der lyophilisierten Ausgangsprobe zurückzuführen. Eine quantitative Entfernung der Membranbestandteile war notwendig, um die in hoher Konzentration vorhandenen tetrapyrrolhaltigen Bakteriochlorophylle abzutrennen. Durch Western-Blot Analysen wurde allerdings gezeigt, dass die Sulfitreduktase mit membrangebundenen Proteinen angereichert wird (Dahl et al., 2005). Die notwendige Abtrennung der Membranfraktion bringt daher einen größeren Verlust an Sulfitreduktase mit sich. Die notwendige Ultrazentrifugationszeit von 16 h führt vermutlich zur partiellen Sedimentation von relativ grossen cytoplasmatischen Proteinen, wie z.B. der Sulfitreduktase, was einen weiteren Verlust mit sich bringt.

Die Analyse der angereicherten Sulfitreduktase bestätigt das Ergebnis der Untersuchung der löslichen Fraktion. In der Sulfitreduktasepräparation ist eindeutig Siro(häm)amid vorhanden. Die prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase aus *A. vinosum* ist also ebenso, wie in *D. vulgaris* und anderen *Desulfovibrio*-Arten (Matthews et al., 1995), amidiertes Sirohäm. Dieses Ergebnis bestätigt die für das DsrN-Protein postulierte Funktion als Sirohäm-Monoamid-Synthase. Von den über den Extinktionskoeffizienten berechneten 45,7 nmol Siro(häm)amid aus der Sulfitreduktaseanreicherung konnten jedoch nur 3 nmol als Sirohydrochlorin-Heptamethylester-Monoamid isoliert werden. Möglicherweise wurde ein Teil des Siro(häm)amids unter den sauren Isolationsbedingungen zusammen mit dem Protein ausgefällt. Obwohl unter anaeroben Bedingungen gearbeitet wurde, konnte aus der Sulfitreduktaseanreicherung nur die hydroxylierte Form isoliert werden. Dies ist jedoch eine unmittelbare Folge der geringen Menge isolierten Siro(häm)amids. Schon kleinste Konzentrationen von Sauerstoff reichen aus, um das isolierte Material zu oxidieren (Russel Timkovich, pers. Mitteilung).

Funktion von DsrN

Aus *A. vinosum* wurden im Gegensatz zu *D. vulgaris* mehrere Siro(häm)amidisomere isoliert. Ein Teil der gefundenen Isomere ist vermutlich auf nicht-enzymatische Redoxreaktion während der Isolierung zurückzuführen (s.o.), eine Reaktion, die während der Präparation von Sirohydrochlorin öfter beobachtet wurde (Battersby et al., 1977). Dieses Ergebnis könnte aber auch darauf hindeuten, dass das die Amidierung katalysierende DsrN-Protein nicht konsequent stereospezifisch arbeitet. Das zu DsrN- homologe Protein CobB aus *Pseudomonas denitrificans* arbeitet dagegen strikt stereospezifisch (Debussche et al., 1990). Zuerst wird die Cobyrynsäure an der

c-Position, dann an der a-Position amidiert. Die Übertragung weiterer Amidgruppen an andere Stellen des Tetrapyrrolrings wird von CobB nicht katalysiert.

In *P. denitrificans* erfolgt die Cobalaminsynthese über den aeroben sauerstoffabhängigen Weg, in *Salmonella thyphimurium*, *Bacillus megaterium* und *Propionibacterium freudenreichii* (*shermanii*) dagegen über den alternativen anaeroben sauerstoffunabhängigen Biosyntheseweg ((Scott und Roessner, 2002) und die darin zitierte Literatur). Diese beiden Wege sind sich sehr ähnlich, die meisten Katalyseschritte sind sogar identisch. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch darin, dass im anaeroben Biosyntheseweg das zentrale Cobaltatom schon sehr früh in das Makromolekül eingebaut wird (Scott und Roessner, 2002). Im aeroben Biosyntheseweg erfolgt der Einbau des Cobaltatoms dagegen erst gegen Ende der Synthese. CobB aus *P. denitrificans* katalysiert bevorzugt die Amidierung der cobaltfreien Form der Cobyrynsäure (Debussche et al., 1990). Das CobB homologe Protein aus *S. thyphimurium*, CbiA (Roth et al., 1993), katalysiert dagegen die Amidierung des metallhaltigen Makromoleküls (Scott und Roessner, 2002). Die DsrN-Sequenz zeigt eine geringfügig höhere Ähnlichkeit zu CbiA, was die Vermutung unterstützt, dass DsrN nicht die metallfreie Sirohämvorstufe Sirohydrochlorin amidiert. Wahrscheinlich wird das Sirohäm direkt von DsrN amidiert. In diesem Zusammenhang ist der Phänotyp der hergestellten $\Delta dsrN$ -Deletionsmutante interessant. Diese zeigte eine signifikante Verzögerung in der Schwefeloxidation, die Fähigkeit zur Oxidation akkumulierten Schwefels war jedoch nicht komplett gehemmt. Das Fehlen von DsrN in der Mutante führt vermutlich dazu, dass Sirohäm und nicht Siro(häm)amid als Cofaktor in die dissimilatorische Sulfitreduktase eingebaut wird. Die Isolation der Sulfitreduktase aus der $\Delta dsrN$ -Mutante zeigte, dass die Bildung und Stabilität des Proteins durch das Fehlen von DsrN nicht beeinträchtigt ist. Über das charakteristische Spektrum konnte ebenfalls Sirohäm als prosthetische Gruppe in der Sulfitreduktase der Mutante nachgewiesen werden (die Anwesenheit der Amidgruppe kann über das Spektrum nicht nachgewiesen werden (Matthews et al., 1995)). Die fehlende Amidgruppe des Sirohäms führt offensichtlich zu einer geringeren Aktivität der Sulfitreduktase, die sich in der stark erniedrigten Schwefeloxidationsrate der Mutante zeigt. Durch die Komplementation der Mutante mit *dsrN* konnte der beobachtete Phänotyp wieder aufgehoben werden. Erwartungsgemäß lagen die Oxidationsraten der Komplementationsmutanten ungefähr in der Höhe der Wildtypen. Die Schwankungen zwischen 80 – 120 % im Vergleich zu den Wildtyp-Schwefeloxidationsraten sind auf unterschiedliche Wachstumsraten der Kulturen zurückzuführen.

Die Synthese von Sirohäm aus Uroporphyrinogen III wird in *E. coli* von CysG katalysiert (Spencer et al., 1993; Warren et al., 1990) (s. Abb.4.1). *cysG*-defiziente *E.coli*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage Sulfit zu reduzieren und daher Cystein auxotroph (Kredich, 1996). DsrN-

defiziente Mutanten sind dagegen in der Schwefeloxidation nicht komplett gehemmt. Die Anwesenheit der Sulfitreduktase konnte nicht nur im Western-Blot mit DsrB-Antikörpern nachgewiesen werden, sondern auch über das charakteristische Sirohäm-Spektrum (s.o.). Dies spricht ebenfalls für die oben aufgestellte Vermutung, dass DsrN die Übertragung der Amidgruppe direkt auf Sirohäm und nicht auf eine Vorstufe katalysiert.

Die Deletion des *cysG*-Gens in *Klebsiella aerogenes* führt nicht zu einer Cystein-Auxotrophie (Kolko et al., 2001). In diesem Organismus wurde zusätzlich zu *cysG* ein *cysG*-homologes Gen *cysF* gefunden, das ebenfalls die Synthese von Sirohäm aus Uroporphyrinogen III katalysiert. Die Anwesenheit eines zweiten *dsrN*-Gens in *A. vinosum* konnte durch heterologe Hybridisierung der genomischen DNA ausgeschlossen werden. Neben der erfolgreichen Komplementation ist dies ein weiterer Beweis dafür, dass der beobachtete Phänotyp nur auf die *dsrN*-Deletion zurückzuführen ist.

Ein direkter Nachweis der Sirohäm-Monoamid-Synthaseaktivität von DsrN über einen Enzymtest konnte nicht durchgeführt werden, da Sirohäm, das Substrat der DsrN-katalysierten Reaktion, nicht käuflich erhältlich ist. In *E. coli* wird Sirohäm, als prosthetische Gruppe für die assimilatorische Sulfite- und Nitritreduktase synthetisiert, Siro(häm)amid wurde in *E. coli*-Zellen jedoch nicht gefunden (Matthews et al., 1995). Dies bietet für die Zukunft die Möglichkeit eines einfacheren direkteren Nachweises für die Funktion von DsrN. Die Expression von *dsrN* in *E. coli* sollte, im Falle eines funktionierenden Enzyms, zu detektierbaren Mengen an Siro(häm)amid in *E. coli* führen. Da in diesem Fall keine grossen Mengen an DsrN benötigt würden, könnte das Problem der „inclusion bodies“, das bei der Überexpression von *dsrN* auftrat, durch ein schwaches Expressionssystem vermieden werden. Das Problem des negativ Nachweises, wie der Nachweis des Fehlens von Siro(häm)amid in der $\Delta dsrN$ -Mutante, würde sich in diesem Fall nicht ergeben. Die Detektion von Siro(häm)amid in *E. coli* könnte damit direkt die postulierte Funktion von DsrN bestätigen.

Sirohäm biosynthese gene in direkter Nachbarschaft zu *dsr*-Genen

Auch andere Gene, die möglicherweise an der Synthese von Sirohäm bzw. Siro(häm)amid beteiligt sind, befinden sich in einigen Organismen in der Nähe der *dsr*-Gene. Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, sind in *Chlorobaculum tepidum* *dsr*-Gene an zwei verschiedenen Stellen im Genom lokalisiert (Dahl et al., 2005; Eisen et al., 2002). Einige der Gene sind dabei in beiden Clustern vorhanden, DsrN wurde jedoch nur einmal gefunden. Interessanterweise finden sich im Anschluss an die *dsr*-Gene des ersten Clusters, in dem auch DsrN lokalisiert ist, zwei Gene deren Genprodukte Ähnlichkeiten zu Sirohäm biosynthese genen haben. Das erste Gen *cysG* kodiert,

wie oben schon erwähnt, für eine Uroporphyrinogen III Methyltransferase, die in *E. coli* die Synthese von Sirohäm aus Uroporphyrinogen III katalysiert. Das zweite Gen ist eine Fusion aus einem *cysG*- und einem *hemD*-Gen (Dahl et al., 2005; Eisen et al., 2002). Das von *hemD* abgeleitete Genprodukt ist eine Uroporphyrinogen III Synthase, die den letzten Syntheseschritt, den Ringschluss zum Uroporphyrinogen III, katalysiert (Scott und Roessner, 2002). In dem chemotrophen Schwefeloxidierer *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 wurden ebenfalls *dsr*-Gene gefunden. Die in der Genbank verfügbaren Rohdaten (NZ_AAFH0100005, NZ_AAFH01000021) zeigen eine *dsrEFHCMKLJOPNR* –Anordnung, die der in *A. vinosum* entspricht. Ob diesen Genen, wie in *A. vinosum* die *dsrAB*-Gene direkt vorangehen, kann aufgrund der unvollständigen Sequenz nicht belegt werden (Dahl et al., 2005). Im Anschluss an *dsrR*, das letzte Gen des *dsr*-Clusters in *T. denitrificans*, ist auch in diesem Organismus ein Gen mit hohen Homologien zu *cysG*-Genen lokalisiert. Auch in dem sulfatreduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* wurden *dsr*-homologe Gene an verschiedenen Stellen im Genom gefunden (Klenk et al., 1997). Vor dem *dsrA*-Gen befindet sich ebenfalls ein *cysG*-homologes Gen, das auf dem Gegenstrang kodiert ist.

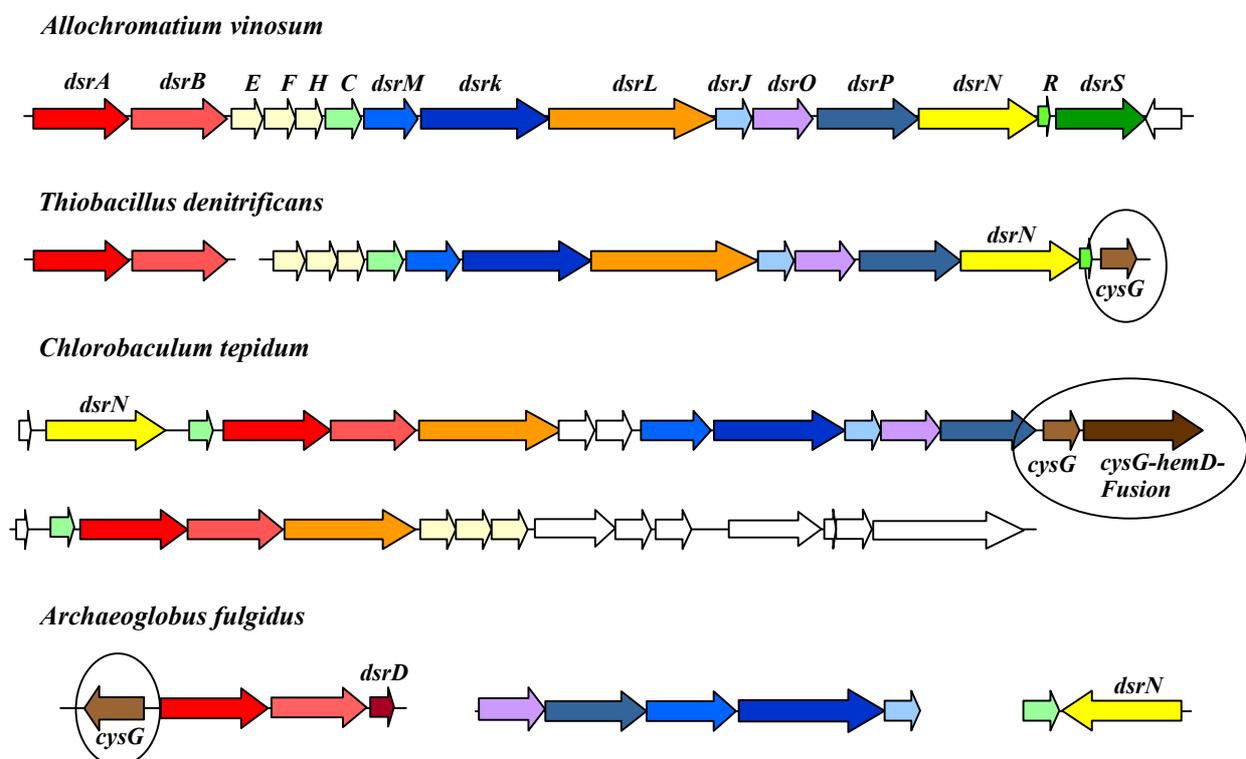


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Anordnung der *dsr*-Gene in *A. vinosum* (Dahl et al., 2005), *Thiobacillus denitrificans* (NZ_AAFH0100005, NZ_AAFH01000021), *Chlorobaculum tepidum* (Dahl et al., 2005) und *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997).

Tab. 4.1: Mit dem BLAST-Programm (Altschul et al., 1997) ermittelte Ähnlichkeiten von DsrN zu in den Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen; die zehn ähnlichsten Sequenzen die mit Standard BLAST (blastp) detektiert wurden sind dargestellt.

| Identifikation, Genbank | mögl. Funktion bzw. Sequenzähnlichkeiten des homologen Proteins, Organismus | Identische Aminosäuren | Ähnliche Aminosäuren |
|--|---|------------------------|----------------------|
| gi 46202287 ref ZP_00208467.1 (ZZ_AAAP01003754.1) | COG1797: Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1 | 52 % | 63 % |
| gi 52006355 ref ZP00333736.1 NZAAFH01000005.1 | COG1797: Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259 | 51 % | 63 % |
| gi 48831131 ref ZP_00288209.1 NZ_AAAN02000064.1 | COG1797: Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Magnetococcus</i> sp. MC-1 | 46 % | 61 % |
| gi 49237224 ref ZP_00331279.1 NZ_AADT02000001.1 | COG1797: Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073 | 46 % | 60 % |
| gi 53685926 ref ZP_00099933.2 NZ_AAAW02000027.1 | COG1797: Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2 | 39 % | 58 % |
| gi 50877652 emb CAG37492.1 CR522870.1 | Mögliche Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase (CobB) <i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54 | 40 % | 54 % |
| gi 21675059 ref NP_663124.1 NP_663124 | DsrN Protein <i>Chlorobaculum tepidum</i> TLS | 38 % | 53 % |
| gi 8671006 emb CAB95045.1 CAB95045 | Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Desulfobacter vibrioformis</i> | 35 % | 54 % |
| gi 46578821 ref YP_009629.1 NC_002937.3 | Cobyriensäure a,c-Diamid Synthase <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. Hil- denborough | 38 % | 52 % |

Lokalisation und Verbreitung von *dsrN*

BLAST-Suchen (Altschul et al., 1997) mit der abgeleiteten DsrN-Proteinsequenz ergaben eine Vielzahl von homologen Sequenzen, von denen die zehn ähnlichsten in Tabelle 4.1 dargestellt sind. Die aufgeführten DsrN-homologen Proteine befinden sich meistens in direkter Nachbarschaft zu anderen *dsr*-Genen. Es handelt sich bei diesen demnach um „echte“ *dsrN*-Gene. Durch die Analyse von Stammbäumen - mit den dargestellten und weiteren homologen Sequenzen - konnte diese Vermutung bestätigt werden (Johannes Sander, pers. Mitteilung). *dsrN* ist, wie Tabelle 4.1 zeigt, nicht nur in schwefeloxidierenden Bakterien vorhanden, sondern kommt auch in allen daraufhin untersuchten Sulfat- bzw. Sulfitreduzierern vor, von denen die Genomsequenz zur Verfügung steht (Johannes Sander, pers. Mitteilung). Eine häufige Anordnung der *dsr*-Gene in Sulfatreduzierern ist *dsrABDN* (Zverlov et al., 2005). Das *dsrD*-Gen ist in allen bisher bekannten

dsr-Loci von Sulfatreduzierern gefunden worden (Zverlov et al., 2005), in phototrophen Schwefeloxidierern scheint dieses Gen nicht vorhanden zu sein (Dahl et al., 2005; Eisen et al., 2002). Die Funktion von DsrD ist bislang jedoch unbekannt. In den meisten Fällen folgt die *dsrD*-Sequenz auf die *dsrB*-Sequenz. In dem Sulfit- aber nicht Sulfat-reduzierenden Bakterium *Bilophila wadsworthia* ist das *dsrD*-Gen mit dem *dsrB*-Gen fusioniert (Laue et al., 2001). Dies lässt auf eine spezifische Funktion von DsrD in der Reduktion von Sulfit schließen (Dahl et al., 2005). Das häufige Vorkommen von *dsrN* in enger Verbindung mit den für die Sulfitreduktase kodierenden Genen *dsrA* und *dsrB* bestätigt weiter die postulierte Funktion von DsrN als Sirohäm-Amidase.

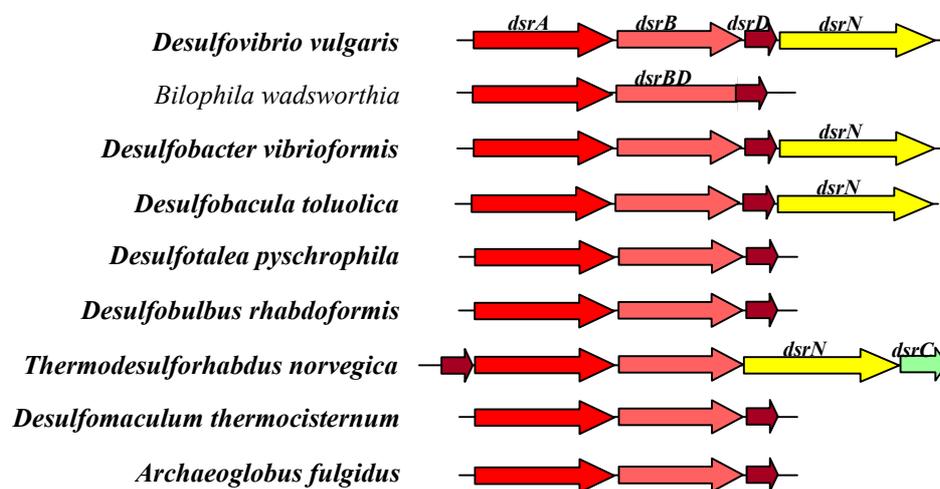


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der bekannten *dsr*-Loci in sulfatreduzierenden Bakterien und *Bilophila wadsworthia* (Sulfitreduzierer) (verändert nach (Zverlov et al., 2005)).

Dass *dsrN* bisher nicht in allen Sulfatreduzierern gefunden wurde ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass *dsrN* in diesen Fällen an anderer Stelle, im bisher nicht sequenzierten Genom lokalisiert ist. Im sequenzierten Genom von *A. fulgidus* wurde ein als *cbiA*-homolog annotiertes Gen in direkter Nachbarschaft zu einem *dsrC*-homologen Protein entdeckt, dass von dem *dsrAB*-Locus weit entfernt liegt (Klenk et al., 1997) (s. Abb. 4.2). Durch Stammbaumanalysen konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein „echtes“ *dsrN*-Gen handelt (Johannes Sander, pers. Mitteilung). Die Zuordnung bzw. die Identifizierung von „echten“ *dsr*-Genen ist demnach teilweise sehr schwierig, vor allem wenn die Gene an unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert sind und nicht durch die Anordnung in einem Cluster entscheidende Hinweise geben.

Neben dem phototrophen Schwefeloxidierer *Chlorobaculum tepidum* und dem chemotrophen Schwefeloxidierer *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 wurden *dsrN*-homologe Sequenzen zusammen mit anderen *dsr*-Sequenzen in den ebenfalls seit kurzem verfügbaren Rohsequenzen der magnetotaktischen Bakterien *Magnetospirillum magnetotacticum* und *Magnetococcus* sp. MC-1 gefunden. Über die Physiologie dieser Bakterien ist noch nicht sehr viel bekannt. *Magnetococcus* sp. MC-1 wurde jedoch als mikroaerophiles Bakterium beschrieben, das Thiosulfat oder Sulfid als Elektronenquelle nutzen kann (Meldrum et al., 1993) und intrazelluläre Schwefelkugeln bildet. Die Verwandtschaft von *M. magnetotacticum* zu *Magnetococcus* sp. MC-1 lässt, neben dem Vorhandensein verschiedener *dsr*-Gene, von denen einige, wie z.B. *dsrEFH* nur in Schwefeloxidierern vorkommen (Dahl et al., 2005), vermuten, dass diese Bakterien ebenfalls zu einem oxidativen Schwefelstoffwechsel in der Lage sind.

Die Anwesenheit von *dsrN* sowohl in Sulfat/Sulfitreduzierern als auch in Schwefeloxidierern macht die essentielle Bedeutung von DsrN im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel deutlich. Im Hinblick auf die von DsrN katalysierte Reaktion, die Amidierung der prosthetischen Gruppe der Sulfitreduktase, führt dies zu der Schlussfolgerung, dass Siro(häm)amid die prosthetische Gruppe der dissimilatorischen Sulfitreduktasen ist. Dabei ist es unwesentlich, ob die Sulfitreduktase den reduktiven Schritt vom Sulfit zum Sulfid katalysiert oder den umgekehrten oxidativen Weg vom Sulfid zum Sulfit. Für die assimilatorische Sulfitreduktase aus *E. coli* konnte eindeutig Sirohäm als prosthetische Gruppe bestätigt werden (Matthews et al., 1995), was zeigt, dass Siro(häm)amid im assimilatorischen Schwefelstoffwechsel keine Rolle spielt. Bei Siro(häm)amid handelt es sich demnach um einen speziellen Cofaktor im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel.

4.2 DsrL

DsrL ist keine Glutamatsynthase

Für die von DsrN katalysierte Amidierung des Sirohäm zum Siro(häm)amid werden vermutlich, in Anlehnung an die von Cobyrinsäure-a,c-Diamidsynthasen katalysierte Reaktion (Debussche et al., 1990), ATP und Glutamin benötigt. Für DsrL wurde daher, aufgrund der hohen Homologien zu GltA aus *T. kodakarensis*, eine Funktion in der Bereitstellung des Glutamins über eine reverse Glutamatsynthasereaktion postuliert. Die Komplementation eines Glutamatsynthase-defizienten *E. coli* mit *dsrL* konnte die vermutete Glutamatsynthasefunktion von DsrL nicht bestätigen. Dies

ist jedoch nicht zwangsläufig ein Beweis dafür, dass DsrL keine Glutamatsynthaseaktivität hat. Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 enthält zwei verschiedene Glutamatsynthasen, eine NADH-abhängige und eine Ferredoxin-abhängige (Navarro et al., 1995). Die Expression des *glsF*-Gens für die Ferredoxin-abhängige Glutamatsynthase in einer glutamatauxotrophen *E. coli*-Mutante führte ebenfalls nicht zur Wiederherstellung eines glutamatprototrophen Stammes (Navarro et al., 2000). Durch Enzymtests konnte jedoch in diesem Fall bestätigt werden, dass in dem *E. coli*-Stamm ein funktionelles Enzym gebildet wurde. Eine erfolgreiche Komplementation war in diesem Fall vermutlich nicht möglich, weil in *E. coli* kein Ferredoxin vom Cyanobakterium-Typ gebildet wird (Navarro et al., 2000). Die Komplementation mit dem Gen für die NADH-abhängige Glutamatsynthase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 stellte dagegen den Wildtypphänotyp wieder her (Chavez et al., 1995). Die Expression von *dsrL* konnte in dem getesteten Glutamatsynthase-defizienten *E. coli*-Stamm ebenfalls nachgewiesen werden, Glutamatsynthaseaktivität zeigte das aufgereinigte rekombinante Protein jedoch nicht. Das Ergebnis wird durch Untersuchungen an der zu DsrL homologen β -Untereinheit der Glutamatsynthase (GltD) aus *Azospirillum brasiliense* unterstützt. Rekombinantes aufgereinigtes GltD katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion verschiedener synthetischer Elektronendonoren (Diaphoraseaktivität), die auch mit dem rekombinanten DsrL detektiert wurde, jedoch nicht die Synthese von Glutamat aus L-Glutamin (oder Ammonium) und 2-Oxoglutarat (Vanoni et al., 1996). Außerdem wurde eindeutig bewiesen, dass die L-Glutamin-Amidotransferase-Domäne, die für die Glutamatsynthasereaktion essentiell ist, in der α -Untereinheit der Glutamatsynthasen (GltB) lokalisiert ist (Vanoni und Curti, 2005). Enzymtests mit partiell angereichertem nativem DsrL aus *A. vinosum* zeigten ebenfalls keine Glutamatsynthaseaktivität. Durch den Nachweis der Diaphoraseaktivität, sowohl mit rekombinanten, als mit dem nativen DsrL, konnte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Glutamatsynthaseaktivität auf inaktives Protein zurückzuführen ist. Bei DsrL handelt es sich demnach nicht um eine Glutamatsynthase. Ebenso ist es eher unwahrscheinlich, dass das *T. kodakarensis gltA*-Gen tatsächlich eine funktionelle Glutamatsynthase kodiert. Vermutlich handelt es sich in diesem Fall um die NADPH-abhängige Reduktaseuntereinheit einer „verkürzten“ archaealen Glutamatsynthase oder um die Untereinheit eines bis jetzt unbekanntes Enzyms (Vanoni und Curti, 2005).

Enthält DsrL Eisen-Schwefel-Cluster?

Der FAD-Gehalt des rekombinanten DsrL wurde über spektroskopische Messungen mit 1 Mol FAD pro Mol DsrL bestimmt, die postulierten Eisen-Schwefel-Cluster konnten jedoch über biochemische Analysen nicht detektiert werden. Das Vorhandensein von Eisen-Schwefel-Clustern

in dem rekombinanten GltA aus *T. kodakarensis* wurde ebenfalls nur aufgrund der Sequenzanalyse angenommen (Jongsareejit et al., 1997), eine experimentelle Bestätigung wurde nicht durchgeführt. Im Aminoterminus der kleinen Glutamatsynthasen wurden zwei Gruppen mit konservierten Cysteinresten gefunden, von denen einige - wenn nicht alle - in die Bindung von [4Fe-4S]-Clustern involviert sind (Pelanda et al., 1993; Vanoni und Curti, 1999). In DsrL fehlt jedoch das zweite konservierte Cystein im ersten Cluster, eine mögliche Erklärung für das Fehlen von mindestens einem Eisen-Schwefel-Cluster in DsrL. In dem rekombinanten GltD-Protein aus *A. brasiliense* konnten ebenfalls keine Eisen-Schwefel-Cluster nachgewiesen werden (Vanoni et al., 1996), da für die korrekte Bildung der Eisen-Schwefel-Cluster ein intaktes $\alpha\beta$ -Protomer (d.h. α - und β -Untereinheit der Glutamatsynthase) notwendig ist (Vanoni und Curti, 2005). In der Nähe der *dsrL*-Sequenz konnte jedoch kein zu der großen (α -) Untereinheit von Glutamatsynthasen homologes Gen entdeckt werden, das möglicherweise zusammen mit DsrL einen Glutamatsynthase-ähnlichen Komplex bildet. Dies stellt das Vorhandensein der N-terminalen Eisen-Schwefel-Cluster in DsrL in Frage. Allerdings ist das rekombinante GltD aus *A. brasiliense* ein Monomer (Vanoni et al., 1996), während das rekombinante DsrL verschiedene Multimere ausbildet und das native DsrL als Homodimer vorliegt. Da die Aufreinigung von nativem DsrL nur in Verbindung mit der Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Sulfitreduktase möglich war, konnte das entsprechende Präparat nicht zur Bestimmung des Eisen-Schwefel-Gehaltes herangezogen werden. Eine Bestätigung der postulierten Eisen-Schwefel-Cluster in DsrL konnte daher nicht erbracht werden.

Ähnlichkeiten von DsrL zu weiteren Proteinen bekannter Funktion

Da eindeutig festgestellt wurde, dass es sich bei DsrL nicht um eine Glutamatsynthase handelt, stellte sich die Frage, welche Funktion DsrL stattdessen in der Schwefeloxidation von *A. vinosum* ausgeübt. Durch die Herstellung einer $\Delta dsrL$ „in frame“-Deletionsmutante konnte eindeutig gezeigt werden, dass DsrL für die Schwefeloxidation essentiell ist. Im Gegensatz zur $\Delta dsrN$ -Mutante war die $\Delta dsrL$ -Mutante komplett in der Schwefeloxidation gehemmt. Dies ist im übrigen ein weiterer Beweis dafür, dass DsrL und DsrN nicht in der postulierten Art und Weise in Zusammenhang stehen. Durch die Komplementation der $\Delta dsrL$ -Mutante mit *dsrL* (in trans) konnte die Fähigkeit zur Oxidation akkumulierten Schwefels mit zum Wildtyp vergleichbaren Raten wiederhergestellt werden. Der Verlust von DsrL ist damit eindeutig der einzige Grund für den beobachteten Phänotyp der Mutante.

Durch Sequenzvergleiche wurden bisher eine Vielzahl von Proteinen gefunden, die wie DsrL Homologien zu der β -Untereinheit der Glutamatsynthase zeigen, vermutlich jedoch keine Glutamatsynthaseaktivität aufweisen (Vanoni und Curti, 2005). Eines dieser Proteine ist SudA, das zusammen mit SudB die Untereinheiten der Sulfid-Dehydrogenase (SuDH) aus *Pyrococcus furiosus* bildet (Hagen et al., 2000a). Dieses hyperthermophile Archaeon betreibt eine Art fermentativen Stoffwechsel, bei dem Schwefel/Polysulfide als zusätzlicher Elektronen-„Sink“ genutzt werden können. SuDH katalysiert die Reduktion von Polysulfiden zu H_2S und zeigt außerdem eine Funktion als Ferredoxin:NADP-Oxidoreduktase, eine Glutamatsynthaseaktivität konnte mit diesem Enzym jedoch nicht festgestellt werden (Hagen et al., 2000a; Hedderich et al., 1999; Ma und Adams, 1994). In Verbindung mit der nachgewiesenen essentiellen Funktion von DsrL in der Oxidation des akkumulierten Schwefels in *A. vinosum*, wäre eine zu SuDH ähnliche Enzymreaktion von DsrL sehr gut möglich. Phylogenetische Analysen mit den β -Untereinheiten von Glutamatsynthasen und dazu homologen Proteinen zeigten jedoch, dass DsrL aus *A. vinosum* und SudA aus *P. furiosus* nicht in die gleiche Gruppe fallen (Andersson und Roger, 2002). Außerdem ist das aktive SuDH, wie die bakterielle NADPH-Glutamatsynthase ein Heterodimer. Die zweite Untereinheit SudB ist ebenfalls ein Flavoprotein mit einer NADPH-Bindestelle und einem Eisen-Schwefel-Cluster (Hagen et al., 2000a), zeigt jedoch keine Homologien zu SudA und DsrL. Durch die Bildung des DsrL-Homodimers könnte das Fehlen von SudB möglicherweise ausgeglichen werden. Über den genauen Reaktionsmechanismus von SuDH aus *P. furiosus* und die Aufgabe der einzelnen Untereinheiten, sowie Substratbindestellen und den Elektronenfluss im Protein ist bisher jedoch noch nichts bekannt.

DsrL zeigte, wie auch die kleinen Untereinheiten der Glutamatsynthasen, hohe Ähnlichkeiten zu FAD-enhaltenen Pyridin-Nukleotid-Disulfidreduktasen (FDR) (Vanoni und Curti, 2005). Dies schließt jedoch nicht den N-terminalen Sequenzbereich mit ein, der den FDR's fehlt und in dem bei den GltD-Proteinen (und Homologen) die Eisen-Schwefel-Cluster koordiniert werden (s.o.). Zu der FDR-Familie gehören eine ganze Reihe von Enzymen, die untereinander hohe Sequenzhomologien und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Alle katalysieren die Pyridin-Nukleotid-abhängige Reduktion einer ganzen Reihe von meist Disulfidbrücken enthaltenden Substraten (Argyrou und Blanchard, 2004). In allen Enzymen dieser Familie wurden zwei Dinukleotidbindestellen gefunden, von denen die N-terminal gelegene FAD und die C-terminale NAD(P)H bindet. Im Gegensatz zur NADPH-Glutamatsynthase und zur Sulfid-Dehydrogenase handelt es sich bei diesen Proteinen, wie bei dem nativen DsrL, in den meisten Fällen um ein Homodimer. Alle Enzyme dieser Klasse nutzen neben dem nichtkovalent gebundenen Flavincofaktor mindestens

ein weiteres Redoxzentrum, bei dem es sich in den meisten Fällen um ein redoxaktives Disulfid handelt (Argyrou und Blanchard, 2004). Zu der FDR-Familie gehören unter anderem Glutathion- (Schulz et al., 1978) und Thioredoxinreduktasen (Waksman et al., 1994), sowie Liponamiddehydrogenasen (Mattevi et al., 1991) und Alkylhydroperoxidasen (Wood et al., 2003). In Glutathionreduktasen (GR), wie auch in Liponamiddehydrogenasen und einigen anderen Mitgliedern der FDR-Familie, ist das redoxaktive Cysteinpaar durch ein charakteristisches CXXXXC-Motiv konserviert, das in diesen Enzymen in der FAD-Domäne lokalisiert ist (Argyrou und Blanchard, 2004). Diese Enzyme katalysieren die Reduktion von Disulfidbrücken in relativ kleinen Molekülen, wie Glutathion und Liponamid. Im Gegensatz dazu reduzieren Thioredoxinreduktasen (TR) und Alkylhydroperoxidasen (AhpF) Disulfidbrücken in wesentlich größeren Substraten, wie Thioredoxin und Peroxiredoxinen (wie AhpC, s.u.) (Poole und Ellis, 1996; Wang et al., 1996). Diese Enzyme enthalten ebenfalls ein konserviertes Disulfid, das jedoch durch ein charakteristisches CXXC-Motiv repräsentiert wird. Im Gegensatz zu der oben genannten Gruppe ist dieses CXXC-Motiv nicht in der FAD- sondern in der NAD(P)H-Bindedomäne lokalisiert (Kuriyan et al., 1991; Poole, 1996) (s. Abb. 4.4.). Peroxiredoxine, wie AhpC aus *Salmonella typhimurium* sind kleine (~22 kDa) ubiquitär verbreitete Proteine, die ein Cysteinpaar zur Reduktion und damit Detoxifizierung von H₂O₂ und organischen Peroxiden nutzen (Poole, 1996; Wood et al., 2003). Nach dieser Reaktion müssen die Peroxiredoxine selbst wieder reduziert werden, ein Prozess, der von Alkylhydroperoxidasen (AhpF) katalysiert wird. Das AhpF/AhpC-System aus *S. typhimurium* gehört in diesem Bereich zu den bestuntersuchtesten Systemen (Poole, 2005). Das zu Thioredoxinreduktasen ähnliche AhpF enthält wie diese ein in der NAD(P)H-Domäne gelegenes redoxaktives Cysteinpaar (CXXC). Darüber hinaus enthalten diese Enzyme jedoch einen um ~200 Aminosäuren längeren N-Terminus, der den Thioredoxinreduktasen fehlt (Poole, 2005). In diesem Sequenzabschnitt ist ein weiteres CXXC-Motiv lokalisiert, dessen Cysteinreste wie das erste Cysteinpaar an der Reduktion des Substrats (AhpC) beteiligt sind (Poole, 1996). In DsrL ist jedoch an keiner der oben beschriebenen Positionen ein konserviertes Cysteinpaar (weder CXXXXC noch CXXC) zu finden. Ein einzelner Cysteinrest befindet sich in der DsrL-Sequenz zwischen dem FAD- und dem NADH-Bindemotiv. Der Sequenzvergleich (s. Abb.3.20) mit den anderen detektierten „echten“-DsrL-Proteinen (s.u.) zeigt jedoch, dass dieser Cysteinrest an derselben Position nur in den drei zu DsrL ähnlichsten Sequenzen konserviert ist. Die drei anderen „echten“ DsrL-Sequenzen zeigen dagegen einen untereinander konservierten Cysteinrest nach der NADH-Bindestelle. Aufgrund des fehlenden zweiten Cysteinrestes und der wenig konservierten Position in den ansonsten sehr homologen „echten“-DsrL-Proteinen, ist eine katalytische Funktion dieses Restes eher unwahrscheinlich. Durch En-

zymtests konnte eine mögliche Disulfidreduktaseaktivität von DsrL, unter den hier getesteten Versuchsbedingungen mit den eingesetzten Disulfidbrücken enthaltenden Substraten, nicht nachgewiesen werden.

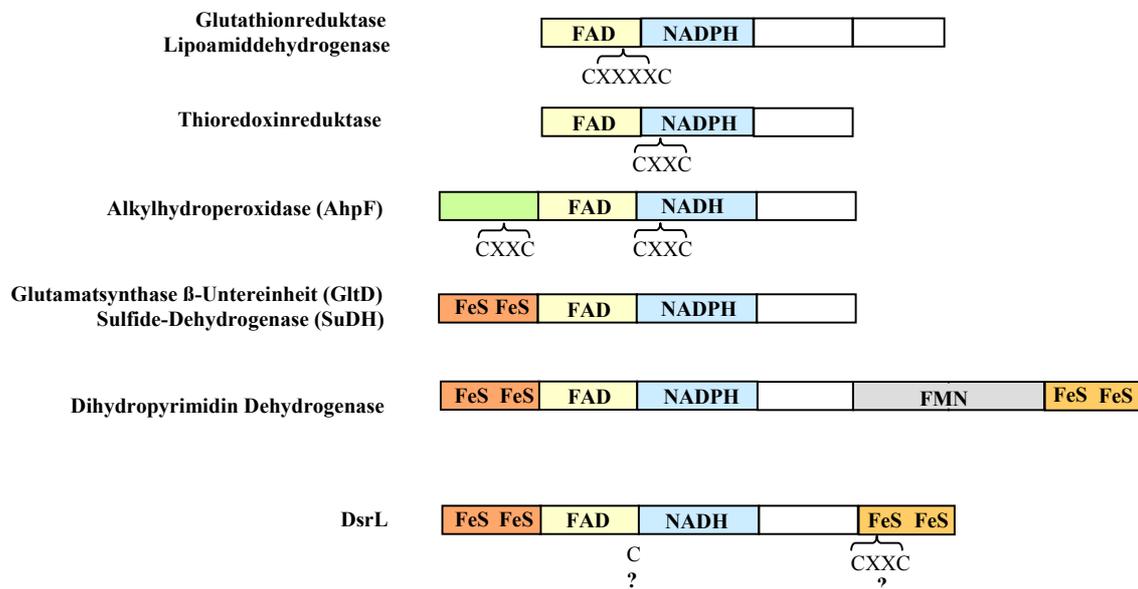


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Domänenanordnungen in verschiedenen Flavoproteinen; bei den gezeigten Proteinen handelt es sich Homodimere; einzige Ausnahmen sind die β-Untereinheit der Glutamatsynthase (GltD) und die Sulfidehydrogenase (SudA), beide bilden ein Heterodimer (GltD + GltB und SudA + SudB).

Im Gegensatz zu den bisher in diesem Abschnitt beschriebenen Proteinen, enthält die DsrL-Sequenz einen zusätzlichen C-Terminus, der hohe Homologien zu den zwei [4Fe-4S]-Cluster enthaltenden Ferredoxinen aufweist und auf die „zusätzliche“ Bindung von Eisen-Schwefel-Clustern hinweist. Dieser Sequenzabschnitt und vor allem die Cysteinreste sind unter den detektierten „echten“-DsrL-Proteinen hochkonserviert, was eine essentielle Funktion in der DsrL-katalysierten Reaktion nahe legt. Das erste Cysteincluster im C-Terminus enthält sechs konservierte Cysteinreste, für die Bindung von [4Fe-4S]-Clustern sind nur die letzten vier notwendig. Möglicherweise bilden die zwei davorliegenden Cysteine, die in einem CXXC-Motiv angeordnet sind, das für eine Disulfidreduktaseaktivität notwendige Cysteinpaar. Möglich ist jedoch auch, dass die potentiellen Eisen-Schwefel-Cluster selbst an der Substratbindung und Aktivierung beteiligt sind. Eine solche Aufgabe, wie auch eine Funktion in der Stabilisierung des Proteins, wurde für eine Reihe von Eisen-Schwefel-Clustern in Proteinen nachgewiesen (Beinert et al., 1997; Beinert, 2000; Vanoni und Curti, 1999). Für die Heterodisulfidreduktase aus dem Archaeon *Methanothermobacter marburgensis* wurde vor kurzem eine direkte Bindung des Coenzym M an ein [4Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum gezeigt. Da Heterodisulfidreduktasen aus methanogenen Archaea die Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB zu Coenzymen M (CoM-SH) und

Coenzym B (CoB-SH) katalysieren, bindet das Disulfid vermutlich während der Reduktion an das Eisen-Schwefel-Cluster (Shokes et al., 2005).

Auch in der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase aus Schweineleber wurde eine Ferredoxin-ähnliche Domäne gefunden (Hagen et al., 2000b; Rosenbaum et al., 1998). Dieses Enzym ist ebenfalls ein homodimeres Eisen-Schwefel-Flavoenzym, das den ersten Schritt in der NADPH-abhängigen Reduktion von Pyrimidinen katalysiert. Neben der wie in DsrL C-terminal gelegenen Ferredoxindomäne, enthält das Protein eine N-terminale Domäne, die, wie in DsrL, hohe Homologien zu den kleinen Untereinheiten von Glutamatsynthasen aufweist. Zwischen diesen beiden Domänen ist jedoch eine weitere Domäne inseriert, die Homologien zu Dihydroorotat-Dehydrogenasen aufweist und das Pyridinsubstrat bindet. Für die C-terminal gelegenen Eisen-Schwefel-Cluster konnte aufgrund des geringen gemessenen Redoxpotentials bisher keine katalytische Funktion gefunden werden. Die N-terminal gelegenen Cysteinreste sind vermutlich, wie die aus Glutamatsynthasen, in den Elektronentransfer vom NADPH zum Substrat notwendig (Hagen et al., 2000b; Vanoni und Curti, 2005).

Wie Abbildung 4.4 zeigt, konnten sehr viele Ähnlichkeiten zu den Domänen verschiedener Proteine mit bekannten Funktionen gezeigt werden, dennoch gibt es zum Teil starke Unterschiede, die eine Funktion von DsrL, identisch mit der eines bisher bekannten Proteins, ausschließen. Keines der genannten Proteine entspricht in vollständiger Länge der DsrL-Sequenz. Für den Nachweis einer essentiellen Funktion der diskutierten Cysteinreste in der von DsrL katalysierten Enzymreaktion sind weitere experimentelle Untersuchungen erforderlich.

Lokalisation, Verbreitung und mögliche Funktion von DsrL

Wie schon für DsrN so wurde auch mit der abgeleiteten DsrL-Proteinsequenz eine BLAST-Suche (Altschul et al., 1997) durchgeführt. Tabelle 3.2 zeigt nur die zehn ähnlichsten Proteinsequenzen zur DsrL-Sequenz. Bei den ersten fünf Organismen handelt es sich um dieselben schwefeloxidierenden Bakterien, die schon bei der DsrN-BLAST-Suche detektiert wurden, d.h. in diesen Organismen wurden weitere *dsr*-Gene gefunden. Die detektierten *dsrL*-homologen Gene sind damit „echte“-*dsrL*-Gene. Die folgenden aufgeführten fünf Proteine zeigen viel geringere Ähnlichkeiten zu DsrL, außerdem wurden in diesen Organismen keine weiteren *dsr*-Gene gefunden (bei der dritten *Chlorobaculum tepidum* – Sequenz (10. Stelle) handelt es sich vermutlich um eine echte Glutamatsynthaseuntereinheit), was deutlich macht, dass es sich hierbei nicht um DsrL-Proteine handelt. Durch Stammbaumanalysen konnte diese Vermutung bestätigt werden (Johannes Sander, pers. Mitteilung). „Echte“ DsrL-Proteine wurden damit bisher nur in schwefeloxidierenden Bakterien gefunden, was eine spezielle Bedeutung des Proteins in der Schwefeloxidation nahe

legt, wie sie für das DsrD-Protein (s.o.) in der Sulfitreduktion beschrieben wurde. In *Chlorobaculum tepidum* liegen *dsr*-Gene in zwei verschiedenen Clustern vor (s. Abb. 4.2). Dabei treten *dsrCABL* in beiden Clustern auf, was möglicherweise ein Hinweis auf eine zentrale Rolle der Proteine in der Schwefeloxidation sein könnte. Die Verdopplung von *dsrL* mit *dsrAB* könnte auf eine nähere katalytische Verbindung der beiden hindeuten.

Durch die Aufreinigung des nativen DsrL aus *A. vinosum* konnten interessante Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins gefunden werden. Ein Teil des nativen DsrL wurde nach der Gelfiltration als freies Homodimer detektiert, ein Großteil des Proteins eluierte nach der Gelfiltration jedoch in einem gemeinsamem Peak mit der Sulfitreduktase. Durch das gemeinsame Elutionsvolumenmaximum, das einer berechneten Grösse von ~310 kDa entspricht, wurde ein Komplex aus Sulfitreduktase (170 kDa) und DsrL-Dimer (140 kDa) vermutet. Dieser konnte durch Western-Blot-Analysen eindeutig nachgewiesen werden, was eine Interaktion der beiden Proteine *in vivo* nahe legt. Dass die Bande des jeweils einzelnen freien Proteins im nativen Gel stärker erschien, als die Bande des gemeinsamen Komplexes, ist vermutlich auf die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine zurückzuführen, durch die der Komplex anscheinend teilweise zerstört wird.

Eine Aufreinigung der Sulfitreduktase aus *A. vinosum* wurde bereits von (Schedel et al., 1979) durchgeführt. Das Protein konnte bis auf zwei kontaminierende Polypeptide sauber dargestellt werden. Dies entspricht damit exakt der in dieser Arbeit dargestellten Aufreinigung von DsrL zusammen mit der Sulfitreduktase und noch einem weiteren nicht identifizierten Protein. Die Grösse der kontaminierenden Proteine wurde jedoch nicht beschrieben, so dass eine genaue Identifizierung von DsrL als kontaminierendes Protein nicht durchgeführt werden konnte. Dass die kontaminierenden Proteine im Verhältnis zur Sulfitreduktase als viel schwächer beschrieben wurden (Schedel et al., 1979), ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass keine stabilisierenden Agenzien zur Aufreinigung eingesetzt wurden. Die Zugabe von TCEP, Glycerol und EDTA hat sich im Zuge dieser Arbeit für die Stabilisierung von DsrL als sehr wichtig herausgestellt. Die Sulfitreduktasepräparation, die in dieser Arbeit zum Siro(häm)amidnachweis durchgeführt wurde, enthält DsrL in sehr viel geringerer Konzentration, obwohl das Aufreinigungsschema zu dem der DsrL-Aufreinigung sehr ähnlich ist. Diese Aufreinigung wurde jedoch ohne die oben genannten Agenzien durchgeführt. In diesem Fall kann DsrL leicht als Kontamination angesehen werden. Interessanterweise wurde die über Gelfiltration bestimmte Grösse der Sulfitreduktase von (Schedel et al., 1979) mit 280 kDa angegeben, was zu der Vermutung führte, dass DsrAB in

vivo eine $\alpha_4\beta_4$ -Struktur ausbildet. Möglicherweise handelte es sich auch in diesem Fall um einen Komplex aus DsrAB und DsrL.

Für DsrL konnte sowohl mit dem rekombinanten, als auch mit dem nativen Enzym aus *A. vinosum*, über die Diaphoraseaktivität eine Funktion als elektronentransportierendes Enzym nachgewiesen werden. Durch die Bestimmung der K_M -Werte und der pH-Optima für NADPH und NADH konnte eindeutig gezeigt werden, dass die DsrL-katalysierte Reaktion in vivo NADH als Elektronendonator nutzt. Die bevorzugte Reaktion mit NADH weist eher auf eine Beteiligung am Energiestoffwechsel, als auf eine Beteiligung an biosynthetischen Prozessen hin. Da DsrL bisher nur in schwefeloxidierenden Bakterien gefunden wurde (s.o.), übt dieses Enzym vermutlich eine essentielle Funktion in der Schwefeloxidation aus. Die gezeigte enge Interaktion von DsrL mit der Sulfitreduktase grenzt die möglichen Funktionen von DsrL weiter ein. Möglicherweise ist DsrL das Pendant zu der Flavoproteinuntereinheit der assimilatorischen Sulfitreduktasen. In diesen Enzymen werden die Elektronen von NADPH über die Flavoproteinuntereinheit auf die Sirohämuntereinheit und dann auf Sulfit übertragen (Crane et al., 1997). In der umkehrten Reaktion könnte die dissimilatorische Sulfitreduktase aus *A. vinosum* die Elektronen von Sulfid auf DsrL übertragen, das dann NAD^+ zu NADH reduziert. Durch Enzymtests mit dem aufgereinigten DsrL-Sulfitreduktase-Komplex konnte die Reaktion der assimilatorischen Sulfitreduktase, d.h. die Oxidation von NAD(P)H mit Sulfit als Elektronenakzeptor, jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den von Schedel et al. (1979) durchgeführten Untersuchungen an der aufgereinigten Sulfitreduktase aus *A. vinosum* (s.o.) überein, bei denen weder mit NADPH, noch mit NADH Sulfitreduktaseaktivität festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse stellen die Übertragung der Elektronen von DsrAB über DsrL auf NAD^+ in Frage. Zudem würde eine solche Reaktion sozusagen einen „Kurzschluss“ im Elektronentransport verursachen, die außerdem die Funktion/Notwendigkeit der anderen Dsr-Proteine ebenfalls in Frage stellen würde. Dass DsrL eine solche Funktion ausübt, ist daher eher unwahrscheinlich.

Sehr viel einleuchtender erscheint dagegen eine Funktion von DsrL in der „Anlieferung“ des Substrats für die Sulfitreduktase. DsrAB ist, wie die meisten der *dsr*-Proteine, im Cytoplasma lokalisiert (Dahl et al., 2005; Hipp et al., 1997; Pott und Dahl, 1998), die Schwefelkugeln liegen jedoch extracytoplasmatisch im Periplasma (Pattaragulwanit et al., 1998). Da die reverse Sulfitreduktase zudem einen sechs-Elektronenschritt vom Sulfid zum Sulfit katalysiert, wird vermutet, dass zunächst eine reduktive Aktivierung des Schwefels zur Oxidationsstufe -2 erfolgt, der dann durch eine reverse Sulfitreduktase zu Sulfit oxidiert wird (Pott und Dahl, 1998). In *Thiobacillus ferrooxidans* wurde festgestellt, dass während der aeroben und anaeroben Inkubation auf

elementarem Schwefel, kleine Mengen von H_2S freigesetzt wurden (Bacon und Ingledew, 1989), was für den oben schon erwähnten initialen Reduktionsschritt in der Aktivierung des Schwefels spricht (Pronk et al., 1990). Eine direkte Umsetzung zu Sulfid im Periplasma, das dann über Diffusion ins Cytoplasma gelangt, ist unwahrscheinlich. Zum einen stellt sich die Frage, wie eine direkte Reoxidation des Sulfids zum Schwefel verhindert werden soll und zum anderen, wieso nicht parallel zur periplasmatischen Oxidation des Sulfids, die zur Bildung von Schwefelkugeln führt, die durch die Sulfitreduktase katalysierte Oxidation vom Sulfid zum Sulfit stattfinden sollte (Pott und Dahl, 1998). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Schwefelkugelschwefel in einer bisher jedoch noch unbekannt Form (möglicherweise als Perthiol) ins Cytoplasma transportiert und dort reduktiv aktiviert wird, um dann von DsrAB weiter oxidiert werden zu können. Möglicherweise katalysiert DsrL diese reduktive Abspaltung des Hydrogensulfids, das durch die enge Interaktion von DsrL mit der Sulfitreduktase direkt übertragen werden kann.

Untersuchungen intrazellulärer Thiole in *A. vinosum* zeigten, dass in diesem Bakterium, wie auch in anderen *Chromatium*-Arten, anstelle von Glutathion grosse Mengen an Glutathionamid vorhanden sind (Bartsch et al., 1996). Während des photoautotrophen Wachstums auf Sulfid steigt der Anteil der Persulfidform des Glutathionamids - das Glutathionamidperthiol - stark an, weshalb vermutet wurde, dass das Glutathionamid als der gesuchte Carrier fungieren würde, der durch einen steten Wechsel zwischen der Monosulfid- und Persulfidform den Schwefel transportieren könnte (Pott und Dahl, 1998). Eine mögliche Beteiligung von Glutathionamid am Schwefelstoffwechsel in *A. vinosum* wird außerdem durch die mit XANES- (X-ray absorption near edge structure) Spektroskopie durchgeführten „in situ“-Messungen zur Bestimmung der Struktur des Schwefels in den Schwefelkugeln von *A. vinosum* unterstützt (Prange et al., 2002b; Prange, 2002; Prange et al., 2002a). Die gemessenen „in situ“-Spektren ließen sich am besten durch Referenzspektren mit einem Gemisch aus Polymerschwefel und Glutathion darstellen. Da Glutathionamid in diesen Messungen vom Glutathion nicht zu unterscheiden ist, wurde aufgrund der oben genannten Ergebnisse spekuliert, dass Glutathionamid als organische Restgruppe an den Schwefelketten vorhanden ist und/oder als Schwefelcarrier in der Schwefeloxidation fungiert (Prange et al., 2002b; Prange, 2002; Prange et al., 2002a). Der Schwefel aus den Schwefelkugeln könnte über das Glutathionamidperthiol über einen bisher noch unbekannt (Transport-)Weg ins Cytoplasma gelangen, wo das Perthiol wieder zum Thiol reduziert werden muss, um das Hydrogensulfid als Substrat für die Sulfitreduktase freizusetzen. Möglicherweise wird dieser Schritt von DsrL unter Oxidation von NADH katalysiert. Untersuchungen mit Zellextrakten haben gezeigt, dass die in *A. vinosum* vorhandene Glutathionamid-Reduktase bevorzugt mit NADH interagiert. Der Einsatz von NADPH verringert die Enzymaktivität auf < 2% der Aktivität mit

NADH (Bartsch et al., 1996). Das gleiche wurde beim Austausch von oxidiertem Glutathionamid gegen oxidiertes Glutathion beobachtet. Die aus *Chromatium gracile* isolierte Glutathionamid-Reduktase zeigt ebenfalls eine hohe Spezifität für NADH und Glutathionamid (Vergauwen et al., 2001a; Vergauwen et al., 2001b). DsrL reagiert ebenso bevorzugt mit NADH, mit oxidiertem Glutathion konnte keine Enzymreaktion detektiert werden. Da Glutathionamid nicht käuflich erhältlich ist, konnte diese Verbindung nicht getestet werden. Die beobachtete enge Verbindung von DsrL mit der Sulfitreduktase wäre jedoch optimal für eine effiziente Übertragung des Sulfids als Substrat für die Sulfitreduktasereaktion. Ein Modell zur möglicherweise von DsrL katalysierten Reaktion mit Glutathionamid als Schwefelcarrier ist in Abb. 4.5 dargestellt.

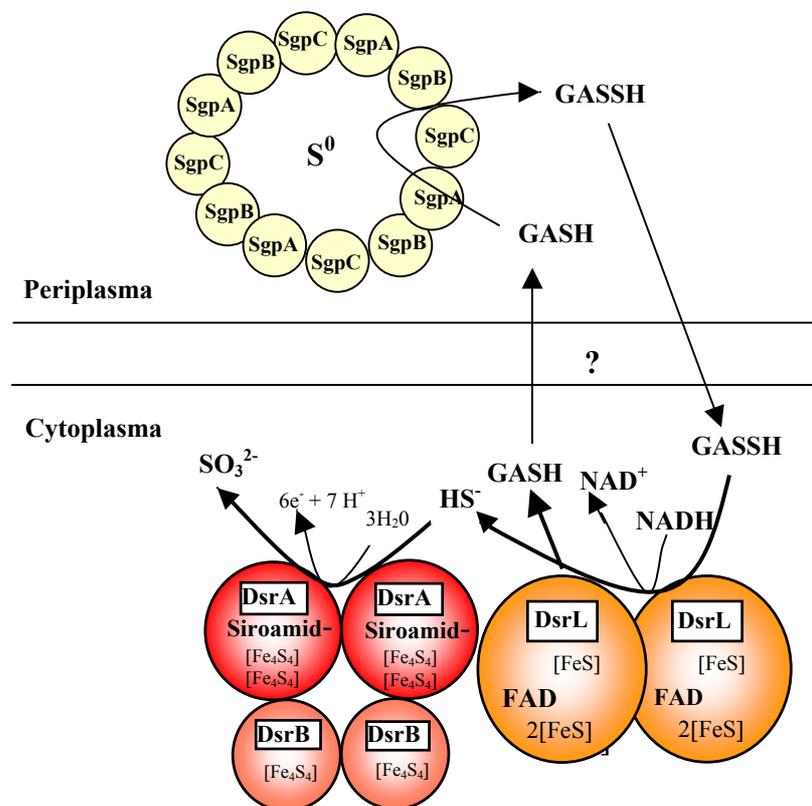


Abb. 4.5.: Modell zur möglichen Funktion von DsrL in der Schwefeloxidation von *A. vinosum*; eine Schwefelkugel ist schematisch durch die Anordnung der umgebenden Schwefelkugelproteine SgpA, SgpB und SgpC dargestellt (Brune, 1995a; Pattaragulwanit et al., 1998); GASH : Glutathionamid, GASSH : Glutathionamidperthiol.

Bei Drucklegung dieser Arbeit wurden Rohsequenzen der schwefeloxidierenden *Bakterien Chlorobium limicola* (AAHJ01000000) und *Chlorobium phaeobacteroides* (AAIB01000016.1) veröffentlicht. In beiden Organismen wurden mehrere *dsr*-Gene gefunden, darunter auch *dsrN*- und *dsrL*- homologe Gene. Diese Daten unterstützen weiter die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Funktion von DsrN und DsrL.

5 Zusammenfassung

- Aus photolithoautotroph angezogenen Zellen des phototrophen Schwefelpurpurbakteriums *Allochromatium vinosum* konnte Siro(häm)amid isoliert werden. Auch angereicherte Sulfitreduktase enthält Siro(häm)amid, wenn auch nur die hydroxylierte Form detektiert werden konnte. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Siro(häm)amid die prosthetische Gruppe der reversen dissimilatorischen Sulfitreduktase in *A. vinosum* ist.
- Der Nachweis von Siro(häm)amid als prosthetische Gruppe der Sulfitreduktase bestätigt die aufgrund von Sequenzhomologien postulierte Funktion von DsrN als Sirohäm-Amidase. Die Bildung des Proteins in *A. vinosum*, seine Lokalisation im Cytoplasma und die vermutete molekulare Masse von 50 kDa konnten ebenfalls bestätigt werden.
- Eine „in frame“-Deletion des *dsrN*-Gens führt zu einer signifikant verlangsamten Schwefeloxidation, die durch Komplementation mit *dsrN* wieder aufgehoben werden kann. DsrN ist demnach für die Schwefeloxidation in *A. vinosum* nicht essentiell, aber für eine effiziente Oxidationsreaktion notwendig.
- Die Bildung bzw. Stabilität der Sulfitreduktase ist in der $\Delta dsrN$ -Deletionsmutante nicht beeinträchtigt. Für das aus der Mutante angereicherte Protein konnte über das charakteristische Spektrum Sirohäm als prosthetische Gruppe nachgewiesen werden. Die fehlende Amidgruppe der prosthetischen Gruppe führt wahrscheinlich zu einer geringeren Aktivität der Sulfitreduktase und damit zu einer verlangsamten Schwefeloxidation.
- Das *dsrN*-Gen ist sowohl in Sulfat/Sulfitreduzierern, als auch in Schwefeloxidierern weit verbreitet. Dies deutet auf eine wichtige Funktion des Proteins im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel hin und lässt vermuten, dass in den meisten, wenn nicht allen am Energiestoffwechsel beteiligten Sulfitreduktasen, Siro(häm)amid die prosthetische Gruppe ist. In assimilatorischen Sulfitreduktasen ist dagegen Sirohäm die prosthetische Gruppe.
- Die in vivo Bildung von DsrL in *A. vinosum* und die postulierte Lokalisation im Cytoplasma konnte bestätigt werden. Das Protein ist ein ~140 kDa großes Homodimer.
- Rekombinantes DsrL aus *E. coli* wurde homogen dargestellt. Das isolierte Protein bildet verschiedene Multimere und enthält 1 Mol FAD pro Mol DsrL-Monomer. Die vermuteten Eisen-Schwefel-Cluster konnten nicht nachgewiesen werden.
- Die postulierte Glutamatsynthaseaktivität von DsrL konnte weder über die Komplementation eines Glutamatsynthase-defizienten *E. coli*-Stammes, noch über Enzymtests mit

aufgereinigtem rekombinanten und nativen DsrL nachgewiesen werden. DsrL hat keine Glutamatsynthaseaktivität.

- Sowohl für das rekombinante, als auch das native DsrL aus *A. vinosum* konnte über den Nachweis der Diaphoraseaktivität eine Funktion als elektronentransportierendes Enzym gezeigt werden. Das pH-Optimum der Reaktion liegt zwischen pH 7 und pH 7,5. Als Elektronendonator wird NADH (K_M -Wert: 260 μ M bei pH 7,5) gegenüber NADPH (K_M -Wert: 830 μ M bei pH 6,0; keine Aktivität bei pH 7,5) bevorzugt.
- Natives DsrL wurde zusammen mit der Sulfitreduktase (DsrAB) aus *A. vinosum* aufgereinigt. Die Proteine bilden in vivo einen DsrA₂B₂L₂-Komplex, der sowohl nach einer Gelfiltration, als auch nach Auftrennung im nativen Gel detektiert werden konnte.
- Die Deletion des *dsrL*-Gens führt zu einer kompletten Hemmung der Schwefeloxidation, die durch Komplementation mit *dsrL* wieder aufgehoben werden kann. DsrL ist demnach für die Oxidation akkumulierten Schwefels essentiell. Die Expression von anderen Genen des *dsr*-Operons wird durch die Deletion von *dsrL* nicht negativ beeinflusst.
- Da DsrL bisher nur in schwefeloxidierenden Bakterien nachgewiesen werden konnte, wird eine essentielle Funktion des Proteins in Zusammenhang mit der umgekehrten Sulfitreduktasereaktion vermutet. In Verbindung mit den erhaltenen Ergebnissen konnte damit ein neues Modell zur Funktion von DsrL im oxidativen Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* erstellt werden.

6 Literatur

Altman FP (1976), Tetrazolium salts and Formazans, *Prog.Histochem.Cytochem.* 9: 1-56

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402

Andersson JO, Roger AJ (2002), Evolutionary analyses of the small subunit of glutamate synthase: gene order conservation, gene fusions, and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfers, *Eukaryot.Cell* 1: 304-310

Arendsen AF, Verhagen MFJM, Wolbert RBG, Pierik AJ, Stams AJM, Jetten MSM, Hagen WR (1993), The dissimilatory sulfite reductase from *Desulfosarcina variabilis* is a desulforubidin containing uncoupled metalated sirohemes and S = 9/2 iron-sulfur clusters, *Biochemistry* 32: 10323-10330

Argyrou A, Blanchard JS (2004), Flavoprotein Disulfide Reductases. Advances in Chemistry and function, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 78: 90-142

Atomi H, Fukui T, Kanai T, Morikawa M, Imanaka T (2004), Description of *Thermococcus kodakarensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1, *Archaea* 1: 263-267

Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1997), *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York

Bacon M, Ingledew WJ (1989), The reductive reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulphur and selenium, *FEMS Microbiology Letters* 58: 189-194

Bartlett PD, Skoog DA (1954), Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons, *Analyt.Chem.* 26: 1008-1011

Bartsch RG, Newton GL, Sherrill C, Fahey RC (1996), Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria, *Journal of Bacteriology* 178: 4742-4746

Battersby AR, McDonald E, Morris HR, Thompson M, Williams DC (1977), Biosynthesis of Vitamin B12: Structural Studies on the Corriphyrins from *Propionibacterium shermanii* and the Link with Sirohydrochlorin, *Tet.Lett.* 25: 2217-2220

Bazara M, Helinski DR (1968), Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology* 36: 185-194

Beinert H (2000), Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5: 2-15

Beinert H, Holm RH, Münck E (1997), Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures, *Science* 277: 653-659

Birnboim HC, Doly J (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1522

- Bork P, Grunwald C (1990)**, Recognition of different nucleotide-binding sites in primary structures using a property-pattern approach., *Eur.J Biochem.* 191: 347-358
- Brühl A, Haverkamp T, Gisselmann G, Schwenn JD (1996)**, A cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* encoding plastidic ferredoxin:sulfite reductase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1295: 119-124
- Brune DC (1989)**, Sulfur oxidation by phototrophic bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 189-221
- Brune DC (1995a)**, Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina*, *Archives of Microbiology* 163: 391-399
- Brune DC (1995b)**, Sulfur compounds as photosynthetic electron donors, in *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, ed. Blankenship RE, Madigan MT, and Bauer CE, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,NL p 847-870
- Brüser T, Lens P, Trüper HG (2000a)**, The biological sulfur cycle, in *Environmental Technologies to treat sulfur pollution*, ed. Lens P and Pol LH, IWA Publishing, London p 47-86
- Brüser T, Selmer T, Dahl C (2000b)**, "ADP sulfurylase" from *Thiobacillus denitrificans* is an adenylylsulfate:phosphate adenylyltransferase and belongs to a new family of nucleotidyltransferases, *Journal of Biological Chemistry* 275: 1691-1698
- Bryantseva IA, Gorlenko VM, Tourova TP, Kuznetsov BB, Lysenko AM, Bykova SA, Galchenko VF, Mityushina LL, Osipov GA (2000)**, *Heliobacterium sulfidophilum* sp nov and *Heliobacterium undosum* sp nov.: Sulfide-oxidizing heliobacteria from thermal sulfidic springs, *Microbiology* 69: 325-334
- Burkhalter RS, Timkovich R (1997)**, ¹H and ¹³C NMR Assignments for 3- and 8-Episirohydrochlorin Methyl Esters, *Magn.Reson.Chem.* 650-652
- Champier L, Sibille N, Bersch B, Brutscher B, Blackledge MJ, Coves J (2002)**, Reactivity, Secondary Structure, and Molecular Topology of the *Escherichia coli* Sulfite Reductase Flavodoxin-like Domain, *Biochemistry* 41: 3770-3780
- Chavez S, Reyes JC, Chauvat F, Florencio FJ, Candau P (1995)**, The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803: cloning, transcriptional analysis and discription of the *gdhA*-gene, *Plant.Mol.Biol.* 28: 173-188
- Crane BR, Getzoff ED (1996)**, The relationship between structure and function for the sulfite reductases, *Current Opinion in Structural Biology* 6: 744-756
- Crane BR, Siegel LM, Getzoff ED (1995)**, Sulfite reductase structure at 1.6 angstrom: Evolution and catalysis for reduction of inorganic anions, *Science* 270: 59-67
- Crane BR, Siegel LM, Getzoff ED (1997)**, Probing the catalytic mechanism of sulfite reductase by x- ray crystallography: Structures of the *Escherichia coli* hemoprotein in complex with substrates, inhibitors, intermediates, and products, *Biochemistry* 36: 12120-12137
- Crouzet J, Cameron B, Cauchois L, rigault S, Rouyez M-C, Blanche F, Thibaut D, Debussche L (1990)**, Genetic and sequence analysis of an 8.7-kilobase *Pseudomonas denitrificans* fragment carrying eight genes involved in tranformation of precorrin-2 to cobyrinic acid, *Journal of Bacteriology* 172: 5980-5990

- Dagert M, Ehrlich SD (1974)**, Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells, *Gene* 6: 23-28
- Dahl C (1996)**, Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*, *Microbiology* 142: 3363-3372
- Dahl C, Engels S, Pott-Sperling AS, Schulte A, Sander J, Lübbe Y, Deuster O, Brune DC (2005)**, Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*, *Journal of Bacteriology* 187: 1392-1404
- Dahl C, Kredich NM, Deutzmann R, Trüper HG (1993)**, Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes, *Journal of General Microbiology* 139: 1817-1828
- Dahl C, Prange A, Steudel R (2002)**, Natural polymeric sulfur compounds, in *Miscellaneous biopolymers and biodegradation of synthetic polymers*, ed. Steinbüchel A, Wiley-VCH, Weinheim p 35-62
- Dahl C, Speich N, Trüper HG (1994)**, Enzymology and molecular biology of sulfate reduction in the extremely thermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *Methods in Enzymology* 243: 331-349
- Dahl C, Trüper HG (1994)**, Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria, *Methods in Enzymology* 243: 400-421
- de Smet L, Kostanjevecki V, Guisez Y, van Beeumen J (2001)**, A novel system for heterologous expression of flavocytochrome XcX in phototrophic bacteria using the *Allochromatium vinosum rbcA* promoter, *Archives of Microbiology* 176: 19-28
- Debussche L, Thibaut D, Cameron B, Crouzet J, Blanche F (1990)**, Purification and characterization of cobyrinic acid *a,c*-diamide synthase from *Pseudomonas denitrificans*, *Journal of Bacteriology* 172: 6239-6244
- Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P, Witholt B (1990)**, Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints, *Journal of Molecular Biology* 212: 135-142
- Eisen JA, Nelson KE, Paulsen IT, Heidelberg JF, Wu M, Dodson RJ, Deboy R, Gwinn ML, Nelson WC, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Durkin AS, Kolonay JL, Yang F, Holt I, Umayam LA, Mason T, Brenner M, Shea TP, Parksey D, Nierman WC, Feldblyum TV, Hansen CL, Craven MB, Radune D, Vamathevan J, Khouri H, White O, Gruber TM, Ketchum KA, Venter JC, Tettelin H, Bryant DA, Fraser CM (2002)**, The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9509-9514
- Embury SH, Scharf S, Saiki RK, Gholson MA, Golbus M, Arnheim N, Erlich HA (1987)**, Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis, *N.Engl.J.Med.* 316: 656-661
- Ernsting BR, Denninger JW, Blumenthal RM, Matthews RG (1993)**, Regulation of the *gltBDF* Operon of *Escherichia coli*: How Is a Leucine-Insensitive Operon Regulated by the Leucine-Responsive Regulatory Protein?, *J.Bacteriol* 175: 7160-7169

Fauque G, LeGall J, Barton LL (1991), Sulfate-reducing and sulfur-reducing bacteria, in *Variations in autotrophic life*, ed. Shively JM and Barton LL, Academic Press, New York p 271-337

Fodor BD, Kovács ÁT, Csáki R, Hunyadi-Gulyás E, Klement E, Maróti G, Mészáros LS, Medzihradzsky KF, Rákhely G, Kovács KL (2004), Modular broad-host range expression vectors for single protein and protein complex purification, *Applied and Environmental Microbiology* 70: 712-721

Friedrich CG (1998), Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria, *Advances in Microbial Physiology* 39: 235-289

Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A, Fischer J (2001), Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?, *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2873-2882

Gehrke T (2000), *Identifizierung und Charakterisierung niedermolekularer Thiole in dem phototrophen Schwefelbakterium Allochromatium vinosum*, Diplomarbeit, Universität Bonn

Gisselmann G, Klausmeier P, Schwenn JD (1993), The ferredoxin - sulphite reductase gene from *Synechococcus* PCC7942, *Biochimica et Biophysica Acta* 1144: 102-106

Goss TJ, Perez-Matos A, Bender R.A. (2001), Roles of Glutamate Synthase, *gltBD*, and *gltF* in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*, *Journal of Bacteriology* 183: 6607-6619

Grimm F (2004), *In-frame-Mutagenese der Gene dsrAB, dsrEFH, dsrC, dsrR und dsrS in A. vinosum*, Diplomarbeit, Universität Bonn

Guzman L, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995), Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter, *Journal of Bacteriology* 177: 4121-4130

Hagen WR, Silva PJ, Amorim MA, Hagedoorn P-L, Wassink H, Haaker H, Robb FT (2000a), Novel structure and redox chemistry of the prosthetic groups of the iron-sulfur flavoprotein sulfide dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus*; evidence for a [2Fe-2S] cluster with Asp(Cys) ligands, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5: 527-534

Hagen WR, Vanoni MA, Rosenbaum K, Schnackerz KD (2000b), On the iron-sulfur clusters in the complex redox enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase, *Eur.J Biochem.* 267: 3640-3646

Hall TA (1999), BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl.Acids.Symp.Ser.* 41: 95-98

Hanahan D (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580

Hatchikian EC, Zeikus JG (1983), Characterization of a new type of dissimilatory sulfite reductase present in *Thermodesulfobacterium commune*, *Journal of Bacteriology* 153: 1211-1220

Hedderich R, Klimmek O, Kröger A, Dirmeier R, Keller M, Stetter KO (1999), Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides, *FEMS Microbiology Reviews* 22: 353-381

- Hipp WM, Pott AS, Thum-Schmitz N, Faath I, Dahl C, Trüper HG (1997)**, Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes, *Microbiology* 143: 2891-2902
- Horton RM (1995)**, PCR-mediated recombination and mutagenesis, *Mol.Biotechn.* 3: 93-99
- Imhoff JF (2003)**, Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 941-951
- Imhoff JF, Süling J, Petri R (1998)**, Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa*, and *Thermochromatium*, *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1129-1143
- Imhoff JF, Trüper HG (1989)**, The purple nonsulfur bacteria, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, and Holt JG, Williams and Wilkins, Baltimore p 1658-1661
- Jäger W, Schäfer A, Prühler A, Labes G, Wohlleben W (1992)**, Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*, *J.Bacteriol* 174: 5462-5465
- Jongsareejit B, Rahman RNZA, Fujiwara S, Imanaka T (1997)**, Gene cloning, sequencing and enzymic properties of glutamate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1, *Molecular and General Genetics* 254: 635-642
- Kappler U (1999)**, *Molekularbiologie und Enzymologie der direkten Oxidation von Sulfid durch die Sulfit-Akzeptor Oxidoreduktase in photo- und chemotrophen Schwefelbakterien*, Dissertation, Universität Bonn
- Kappler U, Bennett B, Rethmeier J, Schwarz G, Deutzmann R, McEwan AG, Dahl C (2000)**, Sulfite : Cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus* - Purification, characterization, and molecular biology of a heterodimeric member of the sulfite oxidase family, *Journal of Biological Chemistry* 275: 13202-13212
- Kappler U, Dahl C (2001)**, Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation (minireview), *FEMS Microbiology Letters* 203: 1-9
- Karkhoff-Schweizer RR, Bruschi M, Voordouw G (1993)**, Expression of the g-subunit gene of desulfovibrin-type dissimilatory sulfite reductase and of the a- and b-subunit genes is not coordinately regulated, *European Journal of Biochemistry* 211: 501-507
- Karkhoff-Schweizer RR, Huber DPW, Voordouw G (1995)**, Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR, *Applied and Environmental Microbiology* 61: 290-296
- King TE, Morris RO (1966)**, Determination of acid-labile sulfide and sulhydryl groups, *Methods in Enzymology* 10: 634-637
- Klenk H-P, Clayton RA, Tomb J-F, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Peterson S, Reich CI, McNeil LK, Badger JH, Glodek A, Zhou L, Overbeek R, Gocayne JD, Weidman JF, McDonald L, Utterback T, Cotton MD,**

Spriggs T, Artiach P, Kaine BP, Sykes SM, Sadow PW, D'Andrea KP, Bowman C, Fujii C, Garland SA, Mason TM, Olsen GJ, Fraser CM, Smith HO, Woese CR, Venter JC (1997), The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *Nature* 390: 364-370

Kobayashi K, Katsura E, Kondo T, Ishimoto M (1978), *Chromatium* sulfite reductase. I. Characterization of thiosulfate-forming activity at the cell extract level, *J.Biochem.(Tokyo)* 84: 1209-1215

Kolko MM, Kapetanovich LA, Lawrence JG (2001), Alternative Pathways for Siroheme Synthesis in *Klebsiella aerogenes*, *J.Bacteriol* 183: 328-335

Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RMII, Peterson KM (1995), Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, *Gene* 166: 175-176

Kredich NM (1996), Biosynthesis of cysteine, in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and molecular biology*, ed. Neidhardt FC, American Society for Microbiology, Washington D.C. p 514-527

Kuriyan J, Krishna TS, Wong L, Guenther B, Pahler A, Williams CH, Model P (1991), Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes, *Science* 352: 172-174

Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685

Larsen O, Lien T, Birkeland N-K (2000), Characterization of the desulforubidin operons from *Desulfobacter vibrioformis* and *Desulfobulbus rhabdoformis*, *FEMS Microbiology Letters* 186: 41-46

Laue H, Friedrich M, Ruff J, Cook AM (2001), Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit, *Journal of Bacteriology* 183: 1727-1733

Lee J-P, Peck HD, Jr. (1971), Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from *Desulfovibrio gigas* and its identification as desulfoviridin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 583-589

Lee J-P, Yi C-S, LeGall J, Peck HD, Jr. (1973), Isolation of a new pigment, desulforubidin, from *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway strain) and its role in sulfite reduction, *Journal of Bacteriology* 115: 453-455

Ma K, Adams MWW (1994), Sulfide dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new multifunctional enzyme involved in the reduction of elemental sulfur, *Journal of Bacteriology* 176: 6509-6517

Mander GJ, Duin EC, Linder D, Stetter KO, Hedderich R (2002), Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea, *European Journal of Biochemistry* 269: 1895-1904

Massey V (1957), Studies on succinic dehydrogenase. VII. valency state of the iron in beef heart dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry* 229: 763-770

Mattevi A, Schierbeck AJ, Hol WGJ (1991), The refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2,2 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* 220: 975-994

Matthews JC, Timkovich R, Liu MY, LeGall J (1995), Siroamide: A prosthetic group isolated from sulfite reductases in the genus *Desulfovibrio*, *Biochemistry* 34: 5248-5251

Meldrum FC, Mann S, Heywood BR, Frankel RB, Bazylinski D (1993), Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium, *Proc.R.Soc.Lond.* 251: 231-236

Metcalf WW, Steed PM, Wanner BL (1990), Identification of Phosphate Starvation-Inducible Genes in *Escherichia coli* K-12 by DNA Sequence Analysis of *psi::lacZ*(Mu d1) Transcriptional Fusions, *J Bacteriol.* 172: 3191-3200

Miller JH (1972), in *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold-Spring Harbor, NY p 431-433

Molitor M, Dahl C, Molitor I, Schäfer U, Speich N, Huber R, Deutzmann R, Trüper HG (1998), A dissimilatory sirohaem-sulfite reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*, *Microbiology* 144: 529-541

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. 51, 263-273. Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol.

Murphy MJ, Siegel LM (1973), Siroheme and sirohydrochlorin. The basis for a new type of porphyrin-related prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductase, *Journal of Biological Chemistry* 248: 6911-6919

Murphy MJ, Siegel LM, Kamin H, Rosenthal D (1973), Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. II. Identification of a new class of heme prosthetic group: an iron-tetrahydroporphyrin (isobacteriochlorin type) with eight carboxylic acid groups, *Journal of Biological Chemistry* 248: 2801-2814

Murphy MJ, Siegel LM, Tove SR, Kamin H (1974), Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 612-616

Navarro F, Chavez S, Candau P, Florencio FJ (1995), Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes, *Plant.Mol.Biol.* 27: 753-767

Navarro F, Martin-Figueroa, Candau P, Florencio FJ (2000), Ferredoxin-Dependent Iron-Sulfur Flavoprotein Glutamate Synthase (GlsF) from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Expression and Assembly in *E. coli*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379: 267-276

Neumann S, Wynen A, Trüper HG, Dahl C (2000), Characterization of the *cys* gene locus from *Allochromatium vinosum* indicates an unusual sulfate assimilation pathway, *Molecular Biology Reports* 27: 27-33

Pattaragulwanit K, Brune DC, Trüper HG, Dahl C (1998), Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum*, *Archives of Microbiology* 169: 434-444

- Pattaragulwanit K, Dahl C (1995)**, Development of a genetic system for a purple sulfur bacterium: conjugative plasmid transfer in *Chromatium vinosum*, *Archives of Microbiology* 164: 217-222
- Pelanda R, Vanoni MA, Perego M, Piubelli L, Galizzi A, Curti B, Zanetti G (1993)**, Glutamate synthase genes of the diazotroph *Azospirillum brasilense*. Cloning, sequencing, and analysis of functional domains, *Journal of Biological Chemistry* 268: 3099-3106
- Pfennig N, Trüper HG (1971)**, Type and neotype strains of the species of phototrophic bacteria maintained in pure culture, *International Journal of Systematic Bacteriology* 21: 19-24
- Pfennig N, Trüper HG (1989)**, Anoxygenic phototrophic bacteria, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 3, ed. Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, and Holt JG, Williams & Wilkins, Baltimore p 1635-1653
- Pfennig N, Trüper HG (1992)**, The family *Chromatiaceae*, in *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, ed. Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, and Schleifer K-H, Springer-Verlag, New York p 3200-3221
- Pierik AJ, Duyvis MG, van Helvoort JMLM, Wolbert RBG, Hagen WR (1992)**, The third subunit of desulfovirdin-type dissimilatory sulfite reductases, *European Journal of Biochemistry* 205: 111-115
- Poole LB (1996)**, Flavin-Dependent Hydroperoxide Reduktase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cysteine Disulfides Involved in Catalysis of Peroxide Reduction, *Biochemistry* 35: 65-75
- Poole LB (2005)**, Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433: 240-254
- Poole LB, Ellis HR (1996)**, Flavin-Dependent Alkyl Hydroperoxide Reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and Enzymatic Activities of Overexpressed AhpF and AhpC Proteins, *Biochemistry* 35: 56-64
- Pott A (1996)**, Interposonmutagenese der Gene für die "reverse" Sirohäm-Sulfitreduktase in *Chromatium vinosum*, Diplomarbeit, Universität Bonn
- Pott AS, Dahl C (1998)**, Sirohaem-sulfite reductase and other proteins encoded in the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur, *Microbiology* 144: 1881-1894
- Pott-Sperling AS (2000)**, Das *dsr*-Operon von *Allochromatium vinosum*: molekularbiologische Charakterisierung der Gene für die Schwefeloxidation, Dissertation, Universität Bonn
- Prange A. (2002)**, Molekulargenetische und physikalisch-chemische Untersuchungen an den Schwefelkugeln photo- und chemotropher Schwefelbakterien, Dissertation, University of Bonn.
- Prange A, Arzberger I, Engemann C, Modrow H, Schumann O, Trüper HG, Steudel R, Dahl C, Hormes J (1999)**, *In situ* analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1428: 446-454
- Prange A, Chauvistre R, Modrow H, Hormes J, Trüper HG, Dahl C (2002a)**, Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different speciations of sulfur, *Microbiology* 148: 267-276

- Prange A, Dahl C, Trüper HG, Behnke M, Hahn J, Modrow H, Hormes J (2002b)**, Investigation of S-H bonds in biologically important compounds by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy, *Eur.Phys.J.D* 20: 589-596
- Prange A, Engelhard H, Trüper HG, Dahl C (2004)**, The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by Real-time RT PCR, *Archives of Microbiology* 182: 165-174
- Pronk JT, Meulenberg R, Hazeu W, Bos P, Kuenen JG (1990)**, Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli, *FEMS Microbiology Reviews* 75: 293-306
- Raux E, Leech HK, Beck R, Schubert HL, Santander PJ, Roessner CA, Scott AI, Martens JH, Jahn D, Thermes C, Rambach A, Warren MJ (2003)**, Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*, *Biochemical Journal* 370: 505-516
- Raux E, Schubert HL, Warren MJ (2000)**, Biosynthesis of Cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum, *Cell.Mol.Life Sci.* 57: 1880-1893
- Reinartz M, Tschäpe J, Brüser T, Trüper HG, Dahl C (1998)**, Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*, *Archives of Microbiology* 170: 59-68
- Rethmeier J, Rabenstein A, Langer M, Fischer U (1997)**, Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high- performance liquid chromatography methods, *Journal of Chromatography A* 760: 295-302
- Rosenbaum K, Jahnke K, Curti B, Hagen WR, Schnackerz KD, Vanoni MA (1998)**, Porcine Recombinant Dihydropyrimidine Dehydrogenase: Comparison of the Spectroscopic and Catalytic Properties of the Wild-Type and C671A Mutant Enzymes, *Biochemistry* 37: 17598-17609
- Rossi M, Pollock BR, Reiji MW, Keon RG, Fu R, Voordouw G (1993)**, The *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex, *Journal of Bacteriology* 175: 4699-4711
- Roth JR, Lawrence JG, Rubenfield M, Kieffer-Higgins S, Church GM (1993)**, Characterization of the Cobalamin (Vitamin B₁₂) Biosynthetic Genes of *Salmonella typhimurium*, *J.Bacteriol* 175: 3303-3316
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Andersen JF, Erlich HA (1986)**, Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes, *Nature* 324: 163-166
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985)**, Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230: 1350-1354
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)**, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schäfer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994)**, Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*, *Gene* 145: 69-73

- Schedel M, LeGall J, Baldensperger J (1975)**, Sulfur metabolism in *Thiobacillus denitrificans*. Evidence for the presence of a sulfite reductase activity, *Archives of Microbiology* 105: 339-341
- Schedel M, Trüper HG (1979)**, Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties, *Biochimica et Biophysica Acta* 568: 454-467
- Schedel M, Trüper HG (1980)**, Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*, *Archives of Microbiology* 124: 205-210
- Schedel M, Vanselow M, Trüper HG (1979)**, Siroheme sulfite reductase from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties, *Archives of Microbiology* 121: 29-36
- Schulz GE, Schirmer RH, Sachsenheimer W, Pai EF (1978)**, The structure of the flavoenzyme glutathione reductase, *Nature* 273: 120-124
- Scott AI, Roessner CA (2002)**, Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂), *Biochemical Society Transactions* 30: 613-620
- Scrutton NS, Berry A, Perham RN (1990)**, Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering, *Nature* 343: 38-43
- Seibl R, Höltke H-J, Rüger R, Meindl A, Zauchau HG, Raßhofer R, Wolf H, Arnold N, Wienberg J, Kessler C (1990)**, Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids, *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 371: 939-951
- Shokes JE, Duin EC, Bauer C, Jaun B, Hedderich R, Koch J, Scott RA (2005)**, Direct interaction of Coenzyme M with the active-site Fe-S cluster of heterodisulfide reductase, *FEBS Letters* 579: 1741-1744
- Siegel LM, Davis PS (1974)**, Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sulfite reductase of Enterobacteria. IV. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: subunit structure and dissociation into hemoprotein and flavoprotein components, *Journal of Biological Chemistry* 249: 1587-1598
- Siegel LM, Murphy MJ, Kamin H (1973)**, Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of Enterobacteria. I. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: molecular parameters and prosthetic groups, *Journal of Biological Chemistry* 248: 251-264
- Siegel LM, Murphy MJ, Kamin H (1978)**, Siroheme: methods for isolation and characterization, *Methods in Enzymology* 52: 436-447
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983)**, A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria, *Bio/Technology* 1: 784-791
- Smith AJ, Lascelles J (1966)**, Thiosulphate metabolism and rhodanese in *Chromatium* sp. strain D, *Journal of General Microbiology* 42: 357-370
- Southern EM (1975)**, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517
- Southern EM (1979)**, Gel electrophoresis of restriction fragments, *Methods in Enzymology* 68: 152-176

- Spencer JB, Stolowich NJ, Roessner CA, Scott AI (1993)**, The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes the multifunctional siroheme synthase, *FEBS Letters* 335: 57-60
- Sperling D (2001)**, Molekularbiologische und enzymologische Untersuchungen zum dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in *Allochromatium vinosum*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Archaeoglobus veneficus*, Dissertation, Universität Bonn.
- Steuber J, Arendsen AF, Hagen WR, Kroneck PMH (1995)**, Molecular properties of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex) and comparison with the enzyme from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), *European Journal of Biochemistry* 233: 873-879
- Studel R, Holdt G, Visscher PT, van Gemerden H (1990)**, Search for polythionates in cultures of *Chromatium vinosum* after sulfide incubation, *Archives of Microbiology* 155: 432-437
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994)**, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice., *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680
- Towbin H, Staehelin TL, Gordon J (1979)**, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4356
- Trudinger PA (1970)**, Carbon monoxide-reacting pigment from *Desulfotomaculum nigrificans* and its possible relevance to sulfite reduction, *Journal of Bacteriology* 104: 158-170
- Trüper HG (1984a)**, Microorganisms and the sulfur cycle, in *Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio-, and cosmosphere and technology*, ed. Müller A and Krebs B, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam p 351-365
- Trüper HG (1984b)**, Phototrophic bacteria and their sulfur metabolism, in *Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio-, and cosmosphere and technology*, ed. Müller A and Krebs B, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam p 367-382
- Vallon O (2000)**, New Sequence Motifs in Flavoproteins: Evidence for Common Ancestry and Tools to Predict Structure, *Protein Struct.Funct.Genet.* 38: 95-114
- van Gemerden H (1987)**, Competition between purple sulfur bacteria and green sulfur bacteria: role of sulfide, sulfur and polysulfides, in *Ecology of photosynthetic prokaryotes with special reference to meromictic lakes and coastal lagoons*, ed. Lindholm T, Abo Academy Press, Abo p 13-27
- Vanoni MA, Curti B (1999)**, Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein, *Cell.Mol.Life Sci.* 55: 617-638
- Vanoni MA, Curti B (2005)**, Structure-function studies on the iron-sulfur flavoenzyme glutamate synthase: an unexpectedly complex self-regulated enzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433: 193-211
- Vanoni MA, Verzotti E, Zanetti G, Curti B (1996)**, Properties of the recombinant b subunit of glutamate synthase, *European Journal of Biochemistry* 236: 937-946
- Vergauwen B, Pauwels F, Jacquemotte F, Meyer TE, Cusanovich MA, Bartsch RG, van Beeumen JJ (2001a)**, Characterization of glutathione amide reductase from *Chromatium grac-*

ile. Identification of a novel thiol peroxidase (Prx/Grx) fueled by glutathione amide redox cycling., *Journal of Biological Chemistry* 276: 20890-20897

Vergauwen B, Van Petegem F, Remaut H, Pauwels F, van Beeumen J (2001b), Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of glutathione amide reductase from *Chromatium gracile*, *Acta Crystallographica D* 58: 339-340

Vogelstein B, Gillespie D (1979), Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 615-619

Waksman G, Krishna TS, Williams CHJ, Kuriyan J (1994), Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis, *Journal of Molecular Biology* 236: 800-816

Wallace DM (1987), Large and small-scale phenol extractions, *Methods in Enzymology* 152: 33-41

Wang PF, Veine DM, Ahn SH, Williams CH (1996), A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: Preparation and characterization, *Biochemistry* 35: 4812-4819

Warren MJ, Roessner CA, Santander PJ, Scott AI (1990), The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes S-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen III methylase, *Biochemical Journal* 265: 725-729

Weaver PF, Wall JD, Gest H (1975), Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*, *Archives of Microbiology* 105: 207-216

Widdel F (1988), Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, in *Biology of anaerobic microorganisms*, ed. Zehnder JB, John Wiley & Sons, New York p 469-585

Widdel F, Hansen TA (1992), The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria, in *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, ed. Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, and Schleifer K-H, Springer Verlag, New York p 583-624

Wierenga RK, De Maeyer MCH, Hol WGJ (1985), Interaction of Pyrophosphate Moieties with α -Helices in Dinucleotide Binding Proteins, *Biochemistry* 24: 1346-1357

Wierenga RK, Terpstra P, Hol WGJ (1986), Prediction of the occurrence of the ADP-binding bab-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint, *Journal of Molecular Biology* 187: 101-107

Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB (2003), Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem.Sci.* 28: 32-40

Woodcock SC, Raux E, Levillayer F, Thermes C, Rambach A, Warren MJ (1998), Effect of mutations in the transmethylase and dehydrogenase/chelatase domains of sirohaem synthase (CysG) on sirohaem and cobalamin biosynthesis, *Biochemical Journal* 330: 121-129

Youn H-S, Burkhalter RS, Timkovich R (2002), Identification of hemes and related cyclic tetrapyrroles by matrix-assisted laser desorption/ionization and liquid secondary ion mass spectrometry, *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 16: 1147-1152

Young LJ, Siegel LM (1988a), Activated conformers of *Escherichia coli* sulfite reductase heme protein subunit, *Biochemistry* 27: 4991-4999

Young LJ, Siegel LM (1988b), Superoxidized States of *Escherichia coli* Sulfite Reductase Heme Protein Subunit, *Biochemistry* 27: 5984-5990

Zdobnov EM, Apweiler R (2001), InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro Bioinformatics, *Bioinformatics* 17: 847-848

Zeghouf M, Fontecave M, Coves J (2000), A Simplified Functional Version of the *Escherichia coli* Sulfite Reductase, *Journal of Biological Chemistry* 275: 37651-37656

Zverlov V, Klein M, Lückner S, Friedrich MW, Kellermann J, Stahl DA, Loy A, Wagner M (2005), Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited, *J.Bacteriol* 187: 2203-2208

Veröffentlichungen

Artikel

Dahl C, Engels S, Pott-Sperling AS, Schulte A, Sander J, Lübbe Y, Deuster O, Brune DC (2005), Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*, *Journal of Bacteriology* 187: 1392-1404

Tagungsbeiträge

Lübbe Y, Correia T, Tudzynski P (2002); Molecular genetics and regulation of the alkaloid-biosynthesis in *Claviceps purpurea*. Abstract, Frühjahrstagung der VAAM, Berlin, Biospektrum Sonderausgabe, S. 115.

Dahl C, Engels S, Hensen D, Lübbe Y, Sander J, Schulte A (2003); Sulfide and thiosulfat oxidation in phototrophic sulfur bacteria: two merging pathways. Abstract, FEMS Congress of European Microbiologists Ljubljana, Slovenia.

Lübbe Y, Youn H-S, Timkovich R, Dahl C (2003), Siroamide and its biosynthesis in *Allochromatium vinosum*. Abstract, FEMS Congress of European Microbiologists Ljubljana, Slovenia.

Lübbe Y, Youn H-S, Timkovich R, Dahl C (2003), Siroamide in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. Abstract, Frühjahrstagung der VAAM, Berlin, Biospektrum Sonderausgabe, S. 88.

Lübbe Y, Youn H-S, Timkovich R, Dahl C (2003), Siroamide sulfite reductase (DsrAB) and the iron-sulfur flavoprotein DsrL from *Allochromatium vinosum*. Abstract, Physiology, Biochemistry and Genetic Regulation of Electron Transfer in Bacteria, Kloster Walberberg.

Lübbe Y, Dahl C (2004), DsrN and DsrL from *Allochromatium vinosum*: proteins involved in the formation of siroamide, the prosthetic group of DsrAB sulfite reductase? Abstract, Biospektrum Sonderausgabe zur Frühjahrstagung der VAAM, Braunschweig, S. 125.

Danksagung

Ich danke Frau Priv. Doz. Dr. Christiane Dahl für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Betreuung meiner Arbeit. Ihr großes Interesse und die stete Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Hans G. Trüper möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Herrn Prof. Dr. Russel Timkovich von der University of Alabama und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Siro(häm)amid-Bestimmung danken.

Herrn Prof. Dr. L. Schreiber und Herrn Prof. Dr. H.-G. Sahl möchte ich für die freundliche Einwilligung zur Mitwirkung am Promotionsverfahren danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts und vor allem den Mitgliedern der Schwefelarbeiten-Gruppe möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken. Ganz besonders möchte ich in diesem Rahmen Birgitt Hüttig für die vielen Male danken, in denen sie mir unkompliziert und schnell geholfen hat.

Eine ganz großer Dank gilt Tobias, der mich in allen tiefen Krisen wieder aufgebaut hat und mir vor allem seelische Unterstützung geleistet hat.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich für ihre großartige Unterstützung danken, ohne die ich niemals soweit gekommen wäre.