

# Funktion des Eisen-Schwefel Flavoproteins DsrL im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Maria Isabell Löffler**

aus

Berlin

Bonn 2024

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

1. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl
2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

Tag der Promotion: 26.04.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Publikationen:**

**Löffler, M., Feldhues, J., Venceslau, S. S., Kammler, L., Grein F., Pereira, I. A. C. & Dahl, C. (2020)**

“DsrL mediates electron transfer between NADH and rDsrAB in *Allochromatium vinosum*.”

*Environmental Microbiology*. Volume 22, Seiten 783-795

DOI: 10.1111/1462-2920.14899

**Löffler, M., Wallerang, K. B., Venceslau, S. S., Pereira, I. A. C. & Dahl, C. (2020)**

“The iron-sulfur flavoprotein DsrL as NAD(P)H:acceptor oxidoreductase in oxidative and reductive dissimilatory sulfur metabolism.”

Frontiers in Microbiology; Volume 11, Artikel Nr. 578209.

DOI: 10.3389/fmicb.2020.578209

**Tagungsbeiträge:**

**VAAM 2019:**

**Maria I. Löffler**, Julia Feldhues, Vanessa Klingbeil, Sofia S. Venceslau, Inês A. C. Pereira und Christiane Dahl:

“Role of the Iron-Sulfur Flavoprotein DsrL in sulfur-oxidizing and sulfate reducing bacteria.”

**Posterpräsentationen**

**VAAM 2017**

**Maria Löffler**, Julia Feldhues, Sofia S. Venceslau, André A. Santos, Inês A. C. Pereira and Christiane Dahl

“New insights into the essential role of DsrL during sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*”

**EMBO Course 2017: Breathless microbes: Techniques and theory in anaerobic microbiology**

**Maria Löffler**, Julia Feldhues, Sofia S. Venceslau, André A. Santos, Inês A. C. Pereira and Christiane Dahl

“Function of DsrL a FeS-cluster containing flavoprotein essential for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*.”

**International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism Wien 2018**

**Maria Löffler**, Julia Feldhues, Sofia S. Venceslau, Inês A. C. Pereira und Christiane Dahl

“DsrL - a protein essential for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*.”

**Förderung:**

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DA 351/6-2)

FEMS Research Grant (FEMS-RG-2017-0053)

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1.1 Dissimilatorische Schwefeloxidation – Dsr-System.....	2
1.2 Die <i>dsr</i> -Gene als Marker in (meta)genomischen Studien.....	4
1.3 DsrL in Organismen mit reduktivem und oxidativem Schwefelmetabolismus.....	5
1.4 DsrL im reduktiven und oxidativen Schwefelmetabolismus.....	6
2. Material und Methoden.....	7
2.1 Materialien und Chemikalien.....	7
2.1.1 Verwendete Geräte- und Einrichtungsgegenstände.....	7
2.1.2 Verwendete Enzyme und Standards.....	8
2.1.3 Antikörper und Antiseren.....	8
2.1.4 Oligonukleotide und Plasmide.....	8
2.1.5 Bakterienstämme.....	10
2.1.6 Molekularbiologische Kits.....	11
2.1.7 Spezielle Materialien für die Proteinreinigung.....	12
2.1.8 Software-/ Datenbanken und Internet-Tools.....	12
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	13
2.2.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.2.2 Anzucht von <i>Clostridium tetanomorphum</i> .....	13
2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	14
2.2.4 Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	14
2.2.5 Heterologe Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) <i>ΔiscR</i> .....	15
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	16
2.3.1 Amplifikation des Zielgens durch Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.3.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	17
2.3.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren.....	17
2.3.4 Agarosegelelektrophorese.....	17
2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	18
2.4.1 Proteinreinigung mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie.....	18
2.4.2 Affinitätschromatographische Reinigung von Ferredoxin.....	19
2.4.3 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren.....	20
2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	20
2.4.5 Western Blot.....	21
2.4.6 Bestimmung Cofaktor-Gehalt.....	23
2.5 Spektroskopische Methoden.....	24
2.5.1 UV-Vis Spektroskopie.....	24
2.5.2 UV/Vis Redoxtitration.....	26
2.5.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	26
2.5.4 Die EPR-basierte potentiometrische Titration.....	27

2.5.5 Bestimmung der Oxidoreduktaseaktivität .....	28
2.6 Bioinformatische Methoden .....	28
2.6.1 Aminosäuren-Sequenzvergleich .....	28
2.6.2 Phylogenetische Stammbaumanalysen .....	29
2.6.3 Vorhersage der Proteinstruktur .....	29
3. Ergebnisse .....	30
3.1 DsrL - Ein komplexes Eisen-Schwefelprotein .....	30
3.2 Identifizierung von DsrL in Organismen und Metagenomen .....	32
3.3 Zusammenhang der Phylogenie von DsrL und DsrA .....	35
3.4 Vorkommen von DsrEFH in DsrL-enthaltenden Organismen .....	37
3.5 Besondere <i>dsr</i> -Genkombinationen .....	38
3.6 Charakteristische Aminosäuresequenzen der DsrL-Typen .....	39
3.7 Heterologe Produktion von DsrL-Proteinen .....	42
3.8 Reinigung der rekombinanten DsrL Proteine .....	43
3.9 UV-Vis-Spektroskopie .....	44
3.10 EPR-Spektroskopie und Redoxtitration .....	57
3.11 NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität .....	59
3.12. Charakterisierung funktioneller Untereinheiten von AvDsrL-1A .....	63
3.13. Ferredoxin als putativer Reaktionspartner für AvDsrL-1A .....	68
3.14 Interaktion von AvDsrL-1A mit Av-rDsrAB .....	71
4. Diskussion .....	76
4.1 Phylogenetische und enzymatische Diversität von DsrL .....	76
4.2 NAD(P)H- Oxidoreduktase-Aktivität von DsrL .....	78
4.3 Interaktion DsrL mit DsrAB .....	79
4.4 Funktion der C-terminalen Ferredoxin-ähnlichen Domäne von DsrL .....	81
4.5 Eigenschaften der Cofaktoren von DsrL .....	85
4.6 Flavin-abhängige Elektronenbifurkation oder Confurkation .....	91
4.7 Funktion DsrL im dissimilatorischen Schwefelmetabolismus .....	95
5. Zusammenfassung .....	98
6. Literaturverzeichnis .....	99
7. Danksagung .....	108

## Abkürzungsverzeichnis

[4Fe4S]-Cluster	Eisenschwefelcluster mit 4 Eisen- und 4 Schwefelatomen
[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/v]	Gewicht pro Volumen
aa	Aminosäuren
bp	Basenpaare von Desoxyribonukleinsäuren
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Substratkonzentration bei halber V <sub>max</sub>
OD <sub>xx</sub>	Optische Dichte bei angegebener Wellenlänge in nm
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
U	Units/Einheit enzymatischer Reaktion in $\mu\text{mol}$ pro Minute
V <sub>max</sub>	Maximale Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
x g	Relative Zentrifugalkraft
BA und PA	Bachelor- und Projektarbeiten
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-Spektroskopie	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FeS-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
isc	Eisen-Schwefel-Cluster
LB-Medium	Liquid-Broth-Medium
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
N-terminal	Aminoterminal am Polypeptid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Qmo	Chinon-interagierendermembrangebundener Oxidoreduktasekomplex
rDsr	Reverse dissimilatorische Sulfitreduktase
rH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
SQR	Residuenquadratsumme
Sat	Sulfat-Adenylyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Wasser demin.	Demineralisiertes Wasser

## 1. EINLEITUNG

Schwefel ist durch seine chemischen Eigenschaften ein sehr vielseitiges Element und kommt in verschiedenen stabilen Oxidationsstufen vor. Diese reichen von -2 in Sulfid oder reduziertem organischem Schwefel bis zu +6 in Sulfat. Der natürliche Schwefelkreislauf der Erde wird hauptsächlich durch biologische, aber auch durch geochemische Prozesse angetrieben. Dabei findet ein dynamischer Austausch zwischen biologisch gebundenem Schwefel und anorganischem Schwefel in der Geosphäre statt. Sulfat und Sulfid in Gewässern und im Boden und Sedimenten, sowie Schwefeldioxid in der Atmosphäre, bilden dabei den Hauptteil des Schwefelreservoirs auf der Erde. Der größte Teil ist in den Ozeanen in Form von Sulfat oder in Form sedimentierter Verbindungen wie Gips oder Pyrit gespeichert. Der Kreislauf wird vor allem durch mikrobielle Sulfatreduktion und durch die Oxidation von Schwefelverbindungen aufrechterhalten. Auch weitere wichtige Stoffwechselaktivitäten wie die Schwefeldisproportionierung sind Teil des Schwefelkreislaufs (Dahl 2020).

Unser Wissen über die Stoffwechselprozesse, die die Basis des globalen Schwefelkreislaufs bilden, hat sich in den letzten Jahren vor allem auch durch den Einsatz moderner molekularbiologischer Techniken wie Metagenomanalysen, Einzelzell-Genomik und Proteomanalysen rasant vermehrt. Trotz der großen Fülle der neuen Erkenntnisse gibt es allerdings noch viele offene Fragen, die beantwortet werden müssen.

Die Relevanz einer umfassenden Grundlagenforschung im Bereich des Schwefelstoffwechsels zeigt sich heute deutlicher als je zuvor. Der bakterielle Schwefelstoffwechsel nimmt großen Einfluss auf für unser Leben entscheidende Bereiche. Bereits seit einigen Jahren gibt es deutliche Hinweise, dass mikrobieller Schwefelstoffwechsel nicht zu vernachlässigende Auswirkungen auf unsere Gesundheit hat und möglicherweise sogar an der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Parkinson beteiligt ist (Wolf et al. 2022; Murros 2022).

Zudem ist der bakterielle Schwefelmetabolismus bzw. dessen Regulation relevant beteiligt an der Ausprägung von Antibiotikaresistenzen (Xu et al. 2021) beispielsweise im klinisch relevanten multiresistenten Krankheitserreger *Pseudomonas aeruginosa* (Xuan et al. 2020).

Auch biotechnologisch ist der mikrobielle Schwefelstoffwechsel von wachsender Bedeutung. Die biologische Entschwefelung von Abwässern, Biogas oder Rohöl (Agarwal und Sharma 2010; Sipma et al. 2006; Pokorna und Zabranska 2015; Lens und Kuenen 2001) sind nur einige Beispiele. Auch die Entwicklung von verbesserten Gewinnungs- und Recyclingmethoden wertvoller Rohstoffe sind in Zeiten der zunehmenden Limitierung von Rohstoffen und zunehmender Umweltproblematik wichtige Entwicklungs- und Forschungsgebiete. So können

mit Hilfe schwefelmetabolisierender Organismen Methoden zur Gewinnung von seltenen Edelmetallen verbessert werden (Pourhossein und Mousavi 2023) oder Polymere wie Gummi oder Latex recycelt werden (Cheng et al. 2023; Li et al. 2011; Yao et al. 2013). Dabei stecken viele dieser biotechnologischen Fortschritte noch in den Forschungs- und Entwicklungsphasen und eine verbesserte und detaillierte Kenntnis der zugrundeliegenden Stoffwechselmechanismen erscheint unerlässlich für die Entwicklung wirtschaftlich umsetzbarer Biotechnologien.

## 1.1 Dissimilatorische Schwefeloxidation – Dsr-System

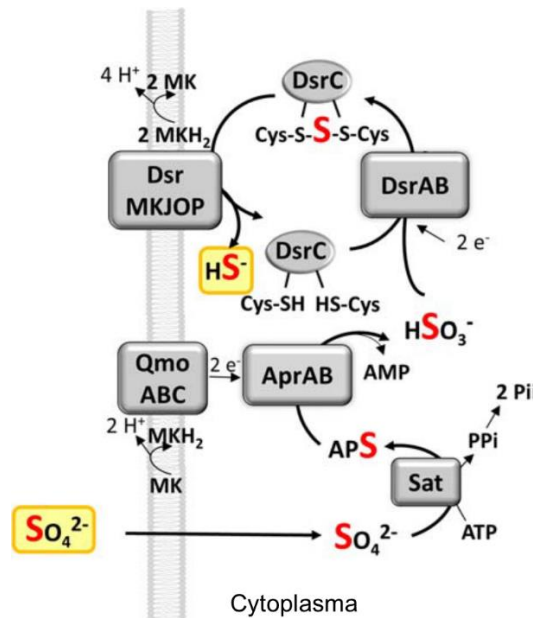
Für die Oxidation von Schwefelverbindungen sind heute verschiedene Stoffwechselwege bekannt. Darunter findet sich das erst seit kurzem bekannte Heterodisulfidreduktase-ähnliche System (Koch und Dahl 2018) und das für diese Arbeit relevante dissimilatorische Sulfitreduktase-(Dsr)-System.

Das Enzym dissimilatorische (Bi)Sulfitreduktase DsrAB ist eines der Schlüsselenzyme des mikrobiellen schwefelbasierten Energiestoffwechsels. Dieses kommt nicht nur in dissimilatorischen sulfatreduzierenden Prokaryonten vor (Rabus et al., 2015; Santos et al., 2015), sondern auch bei Schwefel-disproportionierenden Bakterien (Finster, 2008; Finster et al., 2013), Sulfit- und Thiosulfatreduzierern und Organosulfonat abbauenden Organismen, die intern Sulfit für die Atmung produzieren (Laue et al., 2001). Darüber hinaus enthalten viele - wenn auch nicht alle photo- und chemolithotrophe Schwefeloxidierer - ein entgegengesetzt funktionierendes reverses DsrAB (rDsrAB). Insgesamt betreiben mikrobielle Schwefeloxidierer verschiedene, teilweise redundante Enzymsysteme für die Oxidation einer Reihe von reduzierten Schwefelverbindungen. Wenn rDsrAB vorhanden ist, dann ist das Enzym für die Bildung von Sulfit durch die Oxidation von proteingebundenem Persulfidschwefel im Cytoplasma verantwortlich (Pott und Dahl, 1998; Dahl et al., 2005; Frigaard und Dahl, 2009; Dahl, 2015; Tanabe et al., 2019).

Die dissimilatorische Sulfatreduktion (siehe Abb. 1) beginnt mit der Aktivierung von Sulfat zu Adenosin-5-phosphosulfat (APS), die von der Sulfat-Adenylyltransferase (Sat) katalysiert wird. Die Zwei-Elektronenreduktion von APS zu Sulfit erfolgt durch APS-Reduktase (AprAB), mit Elektronen, die durch den membrangebundenen QmoABC-Komplex aus dem Menachinonpool zur Verfügung gestellt werden (Ramos et al. 2012). Schließlich wird das Sulfit reduziert. In diesem Schritt arbeitet das Schlüsselprotein DsrC als physiologischer Partner von DsrAB (Venceslau et al., 2014). Ein DsrC-Trisulfid, in dem ein Schwefelatom durch zwei konservierte Cysteinreste gebunden ist, wird als Produkt der DsrAB-katalysierten Reaktion



freigesetzt (Santos et al., 2015). Der membranständige DsrMKJOP-Proteinkomplex ist vermutlich am Elektronentransfer und der Reduktion des DsrC-Trisulfids und der damit verbundenen Freilassung des Sulfids aus der DsrC-gebundenen Form beteiligt (Grein et al., 2013; Santos et al., 2015).



**Abbildung 1: Zusammenfassung der dissimilatorischen Sulfatreduktion.** Sulfat wird in das Cytoplasma importiert und unter Aufwendung von ATP zu Adenosin-5-Phosphosulfat (APS) durch die ATP-Sulfurylase (Sat) aktiviert. Anschließend erfolgt die Reduktion zu Sulfid, katalysiert durch die APS-Reduktase (AprAB) mit Elektronen aus dem Menachinonpool, zur Verfügung gestellt durch den QmoABC-Komplex. Sulfid wird durch die dissimilatorische Sulfitreduktase (DsrAB) zu DsrC-Trisulfid reduziert, wobei der Elektronendonator für diese Reaktion unbekannt ist. Das DsrC-Trisulfid wird reduziert zu Sulfid, wobei diese Reaktion wahrscheinlich durch den DsrMKJOP-Komplex katalysiert wird (Abbildung aus Dahl 2020).

Das umgekehrt arbeitende (reverse) DsrAB aus Schwefeloxidierern ist homolog, aber physiologisch und phylogenetisch eindeutig zu unterscheiden von den DsrAB-Enzymen, welche die Reduktion von Sulfid katalysieren (Wagner et al., 1998; Loy et al., 2009). In den meisten Fällen ist DsrAB ein Heterotetramer in einer  $\alpha_2\beta_2$ -Anordnung. DsrA und DsrB sind verwandt und beide Untereinheiten tragen ein Eisen-Tetrahydrophorphyrin (Sirohäm), das über einen axialen Cystein-Häm-Liganden an ein [4Fe4S]-Cluster gekoppelt ist (Dahl et al., 1993; Karkhoff-Schweizer et al., 1995; Hipp et al., 1997; Pott und Dahl, 1998; Rabus et al., 2015). In den DsrB-Untereinheiten ist die gekoppelte prosthetische Sirohäm-[4Fe4S]-Gruppe katalytisch aktiv, während sie in DsrA lediglich eine strukturelle Rolle zu spielen scheint (Oliveira et al., 2008 (Schiffer et al. 2008)). Sowohl DsrA als auch DsrB enthalten außerdem eine Ferredoxin-Domäne, die ein zweites [4Fe4S]-Cluster bindet, welches höchstwahrscheinlich für den Elektronentransfer zwischen dem physiologischen Elektronendonator und dem katalytischen Zentrum verantwortlich ist. Die dissimilatorische

Schwefeloxidation kann als umgekehrter Prozess zur Sulfatreduktion betrachtet werden, wobei eine Reihe weiterer essentieller Enzyme beteiligt ist. Im Modellorganismus *Allochromatium vinosum* wird über ein System aus Schwefeltransferasen DsrC als Reaktionspartner von rDsrAB mit Schwefel beladen. Der genaue Reaktionsmechanismus und in welcher Form das DsrC als Substrat für rDsrAB dient, konnte bisher nicht abschließend aufgeklärt werden. Wahrscheinlich ist ein an DsrC gebundenes Persulfid das Substrat für die rDsrAB-katalysierte Reaktion (Lofi 2020). Der an DsrC gebundene Schwefel wird durch rDsrAB oxidiert. Sowohl für die durch das Dsr-System katalysierte Sulfatreduktion, wie auch für die Schwefeloxidation, ist der Elektronendonator beziehungsweise der Elektronenakzeptor bisher unbekannt.

## 1.2 Die *dsr*-Gene als Marker in (meta)genomischen Studien

Die Gene des Dsr-Stoffwechsels werden in der molekularen Ökologie standardmäßig als Markergene bei der Analyse großer Umweltproben eingesetzt. DsrAB-Sequenzen lassen sich in drei große Familien einteilen: Einen reduktiven bakteriellen Typ, einen reduktiven archaealen Typ und einen oxidativen bakteriellen Typ (Müller et al., 2015). Auf dieser Grundlage haben *dsrAB*-Gene schon in zahlreichen sequenzbasierten Umweltstudien als robuste phylogenetische Marker gedient (Dhillon et al., 2005; Wagner et al., 2005; Hansel et al., 2008; Loy et al., 2009; Ijssennagger et al., 2015). Darüber hinaus werden mehrere andere *dsr*-Gene als Marker zur Unterscheidung von Sulfat-/Sulfitreduzierern und Schwefeloxidierern diskutiert. Während alle Organismen, die die *dsrAB*-Gene beherbergen auch *dsrC* und in der Regel *dsrMK* enthalten (Grein et al., 2013; Venceslau et al., 2014), scheint das Gen *dsrD* (Ferreira et al. 2022) auf Sulfat/Sulfit-reduzierende Prokaryoten beschränkt zu sein, wobei Schwefel-disproportionierende Organismen wie *Desulfurivibrio alkaliphilus* eine bemerkenswerte Ausnahme bilden (Thorup et al., 2017). Die Gene *dsrEFH* kodieren für ein cytoplasmatisches Schwefeltransport-Enzym, welches als effektiver Schwefeldonor für DsrC fungiert. Das DsrEFH-Enzym wurde als Marker für Schwefeloxidierer oder Schwefel-disproportionierende Organismen angesehen (Stockdreher et al., 2012; Venceslau et al., 2014; Thorup et al., 2017). Dies wurde ebenfalls für das Gen *dsrL* vorgeschlagen, das in allen bisher analysierten *dsr*-Genclustern aus schwefeloxidierenden Prokaryonten vorhanden ist und dessen Genprodukt für die Schwefeloxidation im Schwefelpurpurbakterium *Allochromatium vinosum* unverzichtbar ist (Lübbe et al., 2006; Frigaard und Dahl, 2009). Auf der Grundlage der obigen Überlegungen können Vorhersagen über die Physiologie und Umweltaktivität von Organismen getroffen werden, die nur aus Metagenomen bekannt sind. Dieser Ansatz führt jedoch nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen und lässt eine Reihe von Fragen offen, da unerwartete

Genkombinationen, wie z. B. das gleichzeitige Vorhandensein von *dsrEFH*- und *dsrD*-Genen oder Kombinationen von *dsrL* mit reduktiven bakteriellen *dsrAB*- und *dsrD*-Genen beobachtet werden (Anantharaman et al., 2018; Hua et al., 2018; Tan et al., 2019).

### 1.3 DsrL in Organismen mit reduktivem und oxidativem Schwefelmetabolismus

In der Vergangenheit wurde DsrL als klassisches Enzym der prokaryotischen Schwefeloxidation eingeordnet, da es in den Genomen der meisten, über das Dsr-System Schwefel oxidierenden Bakterien, vorkommt. Des Weiteren konnte bereits nachgewiesen werden, dass DsrL essentiell für die Schwefeloxidation in *Allochromatium vinosum* ist (Lübbe et al. 2006). In den letzten Jahren konnten durch moderne Sequenzierungsmethoden jedoch auch zahlreiche weitere Organismen mit *dsrL*-verwandten Sequenzen in Genomen und Metagenomen gefunden werden (Florentino et al. 2016; Florentino et al. 2017; Florentino et al. 2019; Anantharaman et al. 2018; Hausmann et al. 2018; Mussmann et al. 2005). Die dabei aufgetretenen Organismen sind nicht als Schwefeloxidierer, sondern als Sulfat-/Sulfit-/Thiosulfat- und/oder Schwefelreduzierer oder Schwefel-disproportionierende Prokaryonten eingeordnet, vor allem durch das Auftreten der *dsrL*-ähnlichen Sequenzen in Kombination mit Genen für DsrAB vom reduktiven Typ.

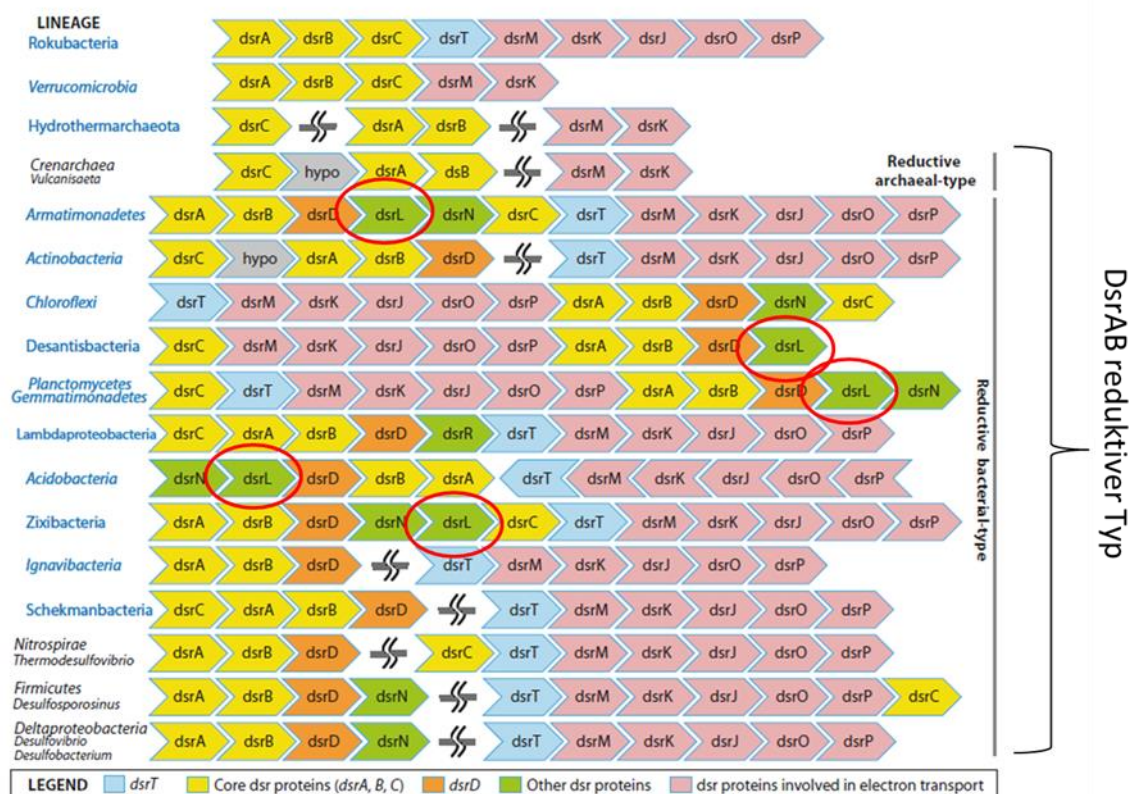


Abbildung 2: Beispiele für das Vorkommen von *dsrL* in Organismen mit *dsrAB* vom reduktiven Typ und *dsrD*. Abbildung aus (Anantharaman et al. 2018).

Diese unerwartet weite Verbreitung von DsrL in Kombination mit DsrAB vom reduktiven Typ legt nahe, dass die ursprüngliche Annahme, DsrL sei ausschließlich für die Schwefeloxidation essentiell, überdacht werden muss.

#### **1.4 DsrL im reduktiven und oxidativen Schwefelmetabolismus**

Tatsächlich wäre die Ableitung allgemeiner physiologischer Eigenschaften wie Sulfat-/Sulfit-Reduktion oder Schwefeloxidation aus Sequenzdaten viel besser begründet, wenn die Funktion jedes einzelnen Dsr-Proteins genau definiert wäre. Doch selbst bei den Schlüsselkomponenten des reduktiven und oxidativen Dsr-Weges bestehen große Wissenslücken. So ist beispielsweise weder die Natur des physiologischen Elektronendonors/-akzeptors für DsrAB (Frigaard und Dahl, 2009; Venceslau et al., 2014; Rabus et al., 2015; Santos et al., 2015) noch die Funktion des essentiellen Eisen-Schwefel-Flavoproteins DsrL geklärt (Dahl et al., 2005; Lübke et al., 2006; Dahl, 2015, 2017). Ziel dieser Arbeit war daher vornehmlich die Charakterisierung von DsrL und die Untersuchung der Funktion des Enzyms im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel. Die bereits bekannte essentielle Funktion in der Schwefeloxidation von *Allochromatium vinosum* sollte näher charakterisiert werden und die Interaktion des Proteins mit DsrAB ausgeleuchtet werden. Zudem sollte DsrL aus Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel vergleichend untersucht werden. Ziel war es, Unterschiede in der enzymatischen Funktion auf Unterschiede in der Primärsequenz zurück zu führen, um diese zukünftig für Vorhersagen aus Sequenzierungsdaten besser nutzen zu können.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien und Chemikalien

Standard-Verbrauchsmaterialien wie Glas- und Plastikgefäße, Pipettenspitzen oder Einmalspatel und auch die standardmäßig im Labor vorrätigen Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe/Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht/Deutschland), VWR (Darmstadt/Deutschland), Eppendorf (Hamburg/Deutschland), Merck (Darmstadt/Deutschland), Schott (Mainz/Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA) bezogen. Spezielle Glaswaren wie zum Beispiel Quarzküvetten und Glasgefäße zur anaeroben Kultivierung wurden von Glasgerätebau Ochs (Bovenden/Deutschland) bezogen. Spezielle seltener verwendete Chemikalien, die für das Gelingen einer Methode entscheidend waren, sind bei erster Nennung in der Beschreibung der Methoden mit Herstellerangaben und im Folgenden aufgeführt.

#### 2.1.1 Verwendete Geräte- und Einrichtungsgegenstände

In der nachfolgenden Tabelle sind Geräte und Einrichtungsgegenstände, die zur Anfertigung dieser Arbeit nötig waren mit Herstellerangaben aufgelistet.

**Tabelle 1: Verwendete Geräte und Einrichtungsgegenstände mit Herstellerangaben**

Gerät oder Einrichtungsgegenstand	Hersteller
Agilent 8453 (Diodenarray-UV/Vis-Spektralphotometer)	Agilent Technologies (Waldbronn/Deutschland)
Äkta Purifier (FPLC)	GE Healthcare (Little Chalfont/Großbritannien)
Anaerobenzelt	Coy Laboratory Products (Grass Lake/USA)
Bandelin Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic (Berlin/Deutschland)
Biophotometer D30	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
GENESYS 20 Visible (Spektrophotometer)	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Horizon 50 (horizontale Gelelektrophoresekammer)	Biometra (Göttingen/Deutschland)
Mini Trans-Blot Cell (SDS-PAGE-Kammer)	BioRad (München/Deutschland)
Minitron (Schüttelinkubator)	Infors HT (Bottmingen/Schweiz)
My Cycler	BioRad (München/Deutschland)
Sonifier Cell-disruptor B15	Branson (Danbury/USA)
Specord 210 (UV/Vis-Spektralphotometer)	Analytik Jena (Jena/Deutschland)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München/Deutschland)

### 2.1.2 Verwendete Enzyme und Standards

In dieser Arbeit verwendete Enzyme sowie Größenstandards für elektrophoretische Methoden sind in Tabelle 2 mit Herstellerangaben aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Größenmarker**

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI-HF	NEB (Ipswich; USA)
Phusion-DNA-Polymerase	NEB
Q5-DNA-Polymerase	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB
Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Waltham, USA)
1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

### 2.1.3 Antikörper und Antiseren

Zum Nachweis der heterolog produzierten Proteine mit Strep-Tag wurden die in Tabelle 3 zusammengefassten Antikörper und Antiseren verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Antikörper mit Herstellerangaben.**

Antikörper	Anwendung	Hersteller
StrepTactin-HRP-Konjugat	Strep-Tactin mit gekoppelter HRP-Peroxidase	IBA Lifesciences (Göttingen/Deutschland)
StrepMAB Classic	Monoklonaler Antikörper gegen Strep-tag II aus Maus	IBA Lifesciences (Göttingen/Deutschland)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP Konjugat	HRP-Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG aus Ziege	Merck (Darmstadt/Deutschland)

### 2.1.4 Oligonukleotide und Plasmide

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide zur spezifischen DNA-Vervielfältigung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Nukleotidsequenz aufgelistet. Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden im Rahmen der Arbeit oder im Rahmen der zu diesem Thema betreuten Bachelor- (BA) und Projektarbeiten (PA) konstruiert und über die Firma Eurofins (Nantes, Frankreich) bezogen oder die entsprechenden Quellen wurden angegeben.

**Tabelle 4: Oligonukleotide.** Die jeweiligen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind fett geschrieben und die entsprechenden Enzyme in Klammern oder in der Bezeichnung angegeben. NSt/CSt steht für N- beziehungsweise C-terminaler Strep-Tag, welcher unter Verwendung dieser Primer an das *dsrL* angehängen wurde.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Nukleotidsequenz von 5' nach 3'</b>	<b>Quelle</b>
<b>Klonierung <i>dsrL</i> oder trunkierte Versionen von <i>dsrL</i> aus <i>Allochromatium vinosum</i></b>		
LEXf (NdeI)	AGAACGATTCATATG GCGACTTCCAGC	(Lübbe et al., 2006)
Rev_BamHI_CSt_AvDsrL	GCATAGGATCCT CATTITTCG AACTGCGGGTGGCTCCAAGCG CTC TCGCCAGACCCATCTTG AT	Feldhues 2016
For_NdeI_NSt_AvDsrL	GCTATCATATGGCTAGCTGGAGCC ACCCGCAGTTCGAAAAAGGCGCGG CGACTTCCAGCGACGAGATG	Diese Arbeit
Rev_AvDsrL-Linker-CtermFdx (BamHI)	TGTACGGATCCTCACGGACGGCGC TTGTGCTCGGC	BA Ines Volkert
Rev_AvDsrL+Linker-CtermFdx (BamHI)	AGTCGGATCCTCACGGCTCGGTCA GACCGA	BA Ines Volkert
For_DsrL-CtermFdx (NdeI)	GATCCATATGGAAGCGATCGACGA GGCC	BA Ines Volkert
For_AvDsrLLinker+CtermFdx (NdeI)	AGCTCCATATGAAAGTCGACGTGC ACCAC	BA Ines Volkert
<b>Klonierung <i>dsrL</i> aus <i>Desulfurella amilsii</i></b>		
For_NdeI_DaDsrL	ATTCATATGGCTGTAGTGAAGGTT AAA	BA Vanessa Klingbeil
Rev_BamHI_CSt_DaDsrL	ATGGGATCCCTATTTTTCGAACTGC GGGTGGCTCCAAGCGCTCATTITTTT CTATATAGCCGCACGGGCA	BA Vanessa Klingbeil
<b>Klonierung <i>dsrL</i> aus <i>Chlorobaculum tepidum</i></b>		
For_NdeI_CtepDsrL	ATTCATATGAATGCAGAATCAAAC CCGA	PA Kai Wallerang
Rev_BamHI_CSt_CtepDsrL	ATAGGATCCTTATTTTTCGAACTGC GGGTGGCTCCAGCTAGCCAGTCCGT CGCCATGCCCA	PA Kai Wallerang

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit zur Proteinexpression klonierten und verwendeten Plasmide mit auf diesen kodierte relevanten Merkmalen und Quellenangaben verzeichnet.

**Tabelle 5: Plasmide**

Bezeichnung	Merkmale	Quelle
pET22b	Ap <sup>r</sup>	Novagen
pET22bAvDsrL-CSt	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment von <i>dsrL</i> mit C-terminalem Strep-Tag in pET22b	(Löffler <i>et al.</i> 2019)
pET22bAvDsrL-NSt –Linker-Fdx	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment N-terminaler Teil von <i>dsrL</i> mit N-terminalem Strep-tag ohne Linker-Region und Fdx-ähnl. Domäne in pET22b	(Ines Volkert 2017)
pET22bAvDsrL-NSt + Linker-Fdx	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment N-terminaler Teil von <i>dsrL</i> mit N-terminalem Strep-tag mit Linker Region ohne Fdx-ähnl. Domäne in pET22b	(Ines Volkert 2017)
pET22b AvDsrLLinker + Fdx-CSt	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment der Linker-Region und Fdx-ähnl. Domäne von <i>dsrL</i> mit C-terminalem Strep-tag in pET22b	(Ines Volkert 2017)
pET22b AvDsrLFdx-CSt	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment der Fdx-ähnl. Domäne von <i>dsrL</i> mit C-terminalem Strep-tag in pET22b	(Ines Volkert 2017)
pET22bCtepDsrL-CSt	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment von <i>dsrL</i> mit C-terminalem Strep-Tag in pET22b	Diese Arbeit
pET22bDaDsrL-CSt	Ap <sup>r</sup> , NdeI/BamHI Fragment von <i>dsrL</i> mit C-terminalem Strep-Tag in pET22b	Diese Arbeit
pRKISC	Tet <sup>r</sup> , Derivat von pRK415 (Keen <i>et al.</i> 1988)	(Takahashi und Nakamura 1999)

### 2.1.5 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 6 aufgelistet. Dabei wurde zu Beginn dieser Arbeit *E. coli* DH5 $\alpha$  als Klonierungsstamm genutzt. Im späteren Verlauf wurde auf den Stamm *E. coli* NEB 10 $\beta$  gewechselt. Dieser Wechsel erfolgte aufgrund eines Wechsels im allgemeinen Laborstandard. Dem Stamm *E. coli* NEB 10 $\beta$  wird eine höhere Transformationseffizienz und eine zeitgleich niedrigere Rekombinationsrate der klonierten DNA zugesprochen. Für die in dieser Arbeit klonierten und transformierten Plasmide ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen und die Klonierungen konnten mit beiden Stämmen erfolgreich durchgeführt werden.



**Tabelle 6: Bakterienstämme**

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17</i> ( $r_K^m r_K^+$ ) <i>supE44</i> <i>thi-1 gyrA relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> NEB 10 $\beta$	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta$ <i>lacX74 galK16 galE15 e14-</i> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>recA1 relA1 endA1</i> <i>nupG rpsL</i> (SmR) <i>rph spoT1</i> $\Delta$ ( <i>mrr-</i> <i>hsdRMS-mcrBC</i> )	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen (Darmstadt/Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) $\Delta$ <i>iscR</i>	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> $\Delta$ <i>iscR::an</i> (DE3)	Akhtar & Jones (2008)
<i>Clostridium</i> <i>tetanomorphum</i> DSM 528	ATCC 15920	Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

### 2.1.6 Molekularbiologische Kits

Folgende kommerziell erhältliche Kits zur DNA-Aufreinigung oder zur Proteinbestimmung oder Proteindetektion nach Westernblot wurden nach Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 7: Molekularbiologische Kits**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Gene-Jet-Gelextraction-Kit	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	Thermo Scientific (Waltham, USA)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Plasmidisolierung aus Zellen	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Proteinbestimmung	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Simplex Easy DNA-Extraktionskit	Isolierung genomischer Template-DNA aus <i>Desulfurella amilsii</i> TR1 DSM 29984 zur DNA-Amplifikation von DaDsrL-2	GEN-IAL GmbH (Troisdorf/Deutschland)
SignalFire ECL Reagenz	Immunologische Detektion von Proteinen nach Westernblot mittels Chemolumineszenz	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)

### 2.1.7 Spezielle Materialien für die Proteinreinigung

Für die Reinigung von Proteinen wurden die in Tabelle 8 zusammengestellten Chromatographie-Säulen, Säulenmaterialien und Filter verwendet.

**Tabelle 8: Chromatographie-Säulen und Säulenmaterialien**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Polystyren-Säulen	Leere Säulen zur Anfertigung von Affinitätschromatographischen Säulen in gewünschtem Volumen	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Strep-Tactin® Superflow®	Reinigung rekombinanter Proteine mit Strep-Tag	IBA GmbH (Göttingen/ Deutschland)
StrepTrap HP (5 ml)	StrepTactin Sepharose High Performance, Reinigung rekombinanter Proteine mit Strep-Tag	GE Healthcare (Little Chalfont/ Großbritannien) (Chicago/USA)
DEAE-Sepharose	Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung von Ferredoxin aus <i>C. tetanomorphum</i>	GE Healthcare (Little Chalfont/ Großbritannien)
Superdex 75 (Hiload 16/60)	Gelfiltration zur Reinigung Ferredoxin aus <i>C. tetanomorphum</i>	GE Healthcare (Little Chalfont/ Großbritannien)
HiTrap Desalting	Entsalzen Protein haltiger Lösungen	GE Healthcare (Little Chalfont/ Großbritannien)
Amicon Ultracel-3K,10K,30K Zentrifugationsfilter	Konzentrieren und Waschen von Proteinlösungen	Merck Millipore (Tullagreen/ Ireland)

### 2.1.8 Software-/ Datenbanken und Internet-Tools

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Datenbanken, Onlineanwendungen und Softwareapplikationen verwendet.

**Tabelle 9: Software, Datenbanken und Onlineanwendungen**

Software oder Onlineanwendungen	Hersteller oder Internetadresse
ChemStationSystem	Agilent Technologies
Citavi 6	Swiss Academic Software
Clone Manger 9	Sci-Ed Software
ClustalΩ	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
ExPASy	<a href="https://www.expasy.org/">https://www.expasy.org/</a>
i-Tasser	<a href="https://zhanggroup.org/I-TASSER/">https://zhanggroup.org/I-TASSER/</a>
KEGG Genome	<a href="http://www.genome.jp/kegg/genome.html">http://www.genome.jp/kegg/genome.html</a>
MEGA X	<a href="https://www.megasoftware.net">https://www.megasoftware.net</a>
MOTIF Search	<a href="http://www.genome.jp/tools/motif/">http://www.genome.jp/tools/motif/</a>
NCBI Genome	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome</a>
NCBI Standard Protein BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins</a>
Office	Microsoft
Pfam-Datenbank	<a href="https://pfam.xfam.org/">https://pfam.xfam.org/</a>
Phyre2	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index">http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index</a>
ProtParam - ExPASy	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
SignalP 4.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
UCSF Chimera	<a href="https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/">https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</a>
Unicorn 5.0	GE Healthcare
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
WinASPECT 2.2	Analytik Jena

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Organismen genutzt. Insbesondere aber wurde sich die genetische Modifizierbarkeit und einfache Anzucht von verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen zu Nutze gemacht, um DsrL aus *Allochromatium vinosum*, *Desulfurella amilsii* und *Chlorobaculum tepidum* heterolog produzieren zu können. Des Weiteren wurde auch *Clostridium tetanomorphum* angezogen, um aus diesen Zellen Ferredoxin zu reinigen.

### 2.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

**LB (Liquid-Broth) -Medium:** 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid (NaCl); ad 1 L Wasser demin.

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde standardmäßig aerob in LB-Medium durchgeführt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C und 180 rpm. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren (121 °C, 20 Minuten) noch 1,5 % [w/v] Agar hinzugefügt. Die Antibiotika-Zugabe wurde erst nach Abkühlung der LB-Agarlösung auf etwa 50 °C durchgeführt. Die Antibiotikazugabe erfolgte zur Selektion plasmidhaltiger *E. coli*-Stämme. Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Wachstumsbedingungen und Medien der zur Proteinexpression verwendeten und angezogenen *E. coli*-Stämme wurden während der Produktionsphase von Proteinen stark variiert und sind im Abschnitt 2.2.5 beschrieben.

### 2.2.2 Anzucht von *Clostridium tetanomorphum*

*Clostridium tetanomorphum* DSM 528 wurde unter anaeroben Bedingungen in dem in Tabelle 10 aufgeführten Medium angezogen. Die Anzucht erfolgte in luftdicht verschließbaren Serumflaschen. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C über Nacht oder bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde. Das Medium wurde nach Lösen aller Bestandteile mit Stickstoff begast und anschließend für 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert, um Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen. Zur Kontrolle der anoxygenen Bedingungen im Medium wurde Resazurin als Sauerstoffindikator zugesetzt. Die Kulturen wurden 1%ig [v/v] mit einer über Nacht dicht gewachsenen Vorkultur angeimpft. Für die Proteinreinigung wurden zwei bis vier Liter Kultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) zwischen zwei und vier durch Zentrifugation (11000 x g, 15 min, 4 °C) unter möglichst anaeroben Bedingungen geerntet. Die Zellen wurden anaerob bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

**Tabelle 10: Medium zur Anzucht von *Clostridium tetanomorphum*.** Alle Bestandteile wurden in demineralisiertem Wasser gelöst.

Bestandteil	Menge pro Liter
Natriumglutamat	18 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumthioglykolat	1 g
Natriumphosphatpuffer 1M, pH 7,4	20 ml
Spurenelementlösung SL10	10 ml
Resazurin	4 mg

### 2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Um *E. coli*-Zellen chemisch die Kompetenz zu vermitteln, externe DNA aufzunehmen, wurden die Zellen chemisch behandelt (Dagert und Ehrlich 1979). Eine 70 ml Hauptkultur mit LB-Medium wurde mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur des gewünschten *E. coli*-Stammes 1 %ig [v/v] angeimpft. Die Hauptkultur wurde anschließend bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3-0,5 inkubiert. Die Zellen wurden nachfolgend durch Zentrifugation bei 4°C und 4000 g für 10 min pelletiert der Überstand wurde sorgfältig abgenommen. Das Pellet wurde in 10,5 ml einer vorgekühlten Lösung mit 70 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend erneut pelletiert, wie zuvor beschrieben, und nochmals in 3,5 ml der CaCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation von 40 Minuten auf Eis wurde der Zellsuspension 875 µl steriles Glycerin zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Zellsuspension aliquotiert und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.4 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für den Transfer von Plasmid-DNA in die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Hitzeschock-Methode (Hanahan 1983) verwendet. Zu diesem Zweck wurden 100 µl der kompetenten Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA oder mit einem 20 µl Ligationsansatz versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte dann bei 42 °C für 90 Sekunden. Zum Abkühlen wurden die Zellen dann nochmals 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann mit 500 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für mindestens eine Stunde inkubiert. Je nach auf den Plasmiden kodierter Antibiotikaresistenz wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) versetzt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten bei gelungener Transformation entsprechend Kolonien positiver Transformanden von den Platten gepickt und in Flüssigkultur gebracht werden. Für die Transformation von Ligationsansätzen wurde *E. coli* DH5α und später *E. coli* 10β verwendet und aus diesen wurden die benötigten

Plasmide anschließend isoliert. Nach Kontrolle durch Restriktionsverdau und Sequenzierung wurden die Plasmide mit identischer Methodik in die Proteinproduktionsstämme transformiert.

### **2.2.5 Heterologe Proteinexpression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta$ iscR**

Das heterolog zu produzierende Protein DsrL enthält neben FAD mehrere [4Fe4S]-Cluster. Diese konnten in der Vergangenheit bei der heterologen Produktion nicht erfolgreich in das Protein eingebaut werden (Lydia Kammler 2009). Zudem erwiesen sich die FeS-Cluster als Sauerstoff-empfindlich. Daher wurde für die heterologe Proteinexpression *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR gewählt. Dieser Stamm wurde speziell für die heterologe Produktion von FeS-Clusterhaltigen Proteinen modifiziert. Mikroorganismen nutzen verschiedene Mehrkomponentensysteme für die Synthese von FeS-Clusterhaltigen Proteinen. Ein weit verbreitetes System ist das isc-(iron-sulfur-cluster)-System, welches in *E. coli*, aber auch zum Beispiel im Menschen zu finden ist (Py und Barras 2010). Der transkriptionelle Regulator IscR reprimiert als reifes Holoprotein, welches mit FeS-Clustern beladen ist, die Expression der übrigen *isc*-Gene (Schwartz et al. 2001). Durch die Deletion von *iscR* im *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR-Stamm kommt es nicht mehr zu einer solchen Repression, was zu einer dauerhaften Expression der übrigen *isc*-Gene führt und so zu einer gesteigerten FeS-Clustersynthese (Akhtar und Jones 2008). Dieser Stamm wurde auch von Kuchenreuther *et al.* (2010) zur heterologen Produktion von [FeFe]-Hydrogenasen aus *Clostridium pasteurianum* und *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet. Diese etablierten dabei ein Protokoll für das Wachstum des Expressionsstammes unter Zugabe von L-Cystein und Ammonium-Eisen(III)-Citrat als zusätzliche Schwefel- und Eisenquelle (Kuchenreuther et al. 2010). Diese Bedingungen wurden ebenfalls für die Expression von DsrL angewandt, wobei das Protokoll für eine maximale Proteinausbeute modifiziert und angepasst wurde.

Zur Expression wurden die jeweiligen Expressionsplasmide (siehe Tabelle 5) in den *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR-Stamm transformiert. Zur Proteinexpression wurden je zwei Ein-Liter-Kulturen in LB-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS-Puffer (pH 7.4), 25 mM Glucose und 2 mM Ammonium-Eisen (III)-Citrat, sowie Ampicillin und Kanamycin zur Selektion, mit einer über Nacht angezogenen Vorkultur *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR mit dem jeweiligen Expressionsplasmid 5 %ig [v/v] inokuliert. Die Expressionskulturen wurden bei 37 °C und 180 rpm in einem Rotationsinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in das Anaerobenzelt transferiert mit 96-98 % [v/v] N<sub>2</sub>- und 2-4 % [v/v] H<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Kulturen wurden in kleinere mit Gummistopfen dicht verschließbare 500 ml-Kolben umgefüllt und mit Cystein (0,5 mM) und Natriumfumarat (25 mM) versetzt und

die Expression wurde mit 0.4 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach einigen Minuten Inkubation im Anaerobenzelt wurden die Kulturen dicht verschlossen und bei 16 °C, 120 rpm, bei AvDsrL für 65-72 h inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss unter möglichst anoxischen Bedingungen geerntet. Hierzu wurden die Kulturen erneut in das Anaerobenzelt verbracht. Dort wurden die Kulturen in dicht verschließbare Zentrifugationsbecher umgefüllt und bei 11,000 x g, 15 min, 4 °C geerntet (Avanti<sup>TM</sup> J-20 XP Centrifuge, Beckman Coulter). Die Zellen wurden unter anoxischen Bedingungen im anaeroben Zelt in Puffer W (siehe Abschnitt 2.4.1) resuspendiert und unter Kühlung mit Hilfe von Ultraschall für 15 Minuten (Cycle 5, 50 % Leistung) (Bandelin Sonoplus HD 2070) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden entfernt durch 45 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 x g in einer Zentrifuge für 2 ml Reaktionsgefäße im Anaerobenzelt (Micro Star 17R Zentrifuge, VWR).

Das allgemeine oben beschriebene Vorgehen konnte für alle heterolog produzierten DsrL-Proteine und -proteinvarianten übernommen werden. Modifiziert wurde die Produktionsmethode jedoch hinsichtlich der Inkubationszeit nach Induktion und der Inkubationstemperatur, sowie der Schüttlergeschwindigkeit. Die Produktionsbedingungen und -methoden wurden in verschiedenen Projekt- und Bachelorarbeiten, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit betreut wurden, optimiert. Dabei spielte nicht nur die möglichst hohe Proteinausbeute eine wichtige Rolle, sondern vor allem auch die Beladung der Proteine mit FAD und FeS-Clustern. Die Produktionsbedingungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der Bedingungen für die heterologe Expression von DsrL aus verschiedenen Organismen.**

Protein	Temperatur nach Induktion	Dauer der Inkubation nach Induktion	Rotationsinkubator Geschwindigkeit
AvDsrL-1A und Versionen von AvDsrL-1A	16 °C	65-72 Stunden	120 rpm
CtDsrL-1B	37 °C	Über Nacht	150 rpm
DaDsrL-2	37 °C	Über Nacht	150 rpm

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Amplifikation des Zielgens durch Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation des Zielgens und Varianten davon wurden die unter 2.1.4 in Tabelle 4 aufgeführten Oligonukleotide als Primer verwendet. Über diese Oligonukleotide wurde auch die Sequenz kodierend für den Strep-Tag wahlweise C- oder N-terminal an das spätere Polypeptid angebracht. Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden in einem MyCycler

(BioRad, München/Deutschland) durchgeführt. Als Polymerase wurde die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase und später auch die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Die PCR-Bedingungen wurden jeweils gemäß den Empfehlungen des Herstellers angewendet. Da teilweise sehr unterschiedlich lange Oligonukleotide für die PCR verwendet wurden, musste teilweise eine Gradienten-PCR durchgeführt werden um die optimale Annealing-Temperatur für das jeweilige Primerpaar zu ermitteln.

### **2.3.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Zur Reinigung von Nukleinsäuren in Form von PCR-Amplifikaten oder DNA-Fragmenten nach Endonuklease-Restriktionsverdau wurde das Gene-Jet-Gelextraction-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Für die Reinigung von Plasmid-DNA aus ganzen Zellen wurde das Plasmidisolations-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde für die Elution der DNA steriles rH<sub>2</sub>O verwendet. Als Template-DNA konnte bereits zur Verfügung stehende genomische DNA aus *Allochromatium vinosum* und *Chlorobaculum tepidum* genutzt werden. Lediglich für *Desulfurella amilsii* TR1 musste der Stamm über die DSMZ bezogen werden (*Desulfurella amilsii* TR1 DSM 29984). Aus diesen Zellen wurde die genomische DNA mittels Simplex Easy DNA-Extraktionskit von GEN-IAL GmbH (Troisdorf/Deutschland) isoliert und anschließend zur Amplifikation von DsrL aus *Desulfurella amilsii* verwendet.

### **2.3.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**

Die Restriktion und anschließende Ligation von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte mit den in Tabelle 2 angegebenen Enzymen nach Herstellerangaben.

### **2.3.4 Agarosegelelektrophorese**

Zur Separation von DNA nach ihrer Größe wurde Agarosegelelektrophorese verwendet, insbesondere zur Überprüfung der PCR-Amplifikate und der Plasmid-DNA nach Einfügen des Zielgens. Die Proben wurden mit 6-fachem Ladepuffer (New England Biolabs, Ipswich/USA) versetzt oder mit Bromphenolblau-Ladepuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 15 % [w/v] Ficoll400 ad 1 l Wasser demin.) und auf 1,5 %ige [w/v] Agarosegele aufgetragen, Die Gelelektrophorese wurde in Horizon50-Gelkammern (Biometra, Göttingen/Deutschland) bei 90 V für circa eine Stunde durchgeführt. Als Laufpuffer und Puffer zum Ansetzen der Agaroselösung wurde TAE-Puffer verwendet (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA). Die DNA-Fragmente wurden durch Färbung mit GelRed-Puffer nach Herstellerangaben (Biometra, Göttingen/Deutschland) unter UV-Licht visualisiert. Zur Extraktion von DNA aus

dem Agarosegel wurde das GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) verwendet.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

Um die Zielproteine nach heterologer Produktion (siehe Abschnitt 2.2.5) reinigen zu können, wurden diese mit einem C- oder N-terminalen Strep-Tag versehen. Dies wurde durch die Amplifikation des Gens, kodierend für das jeweilige Protein, mit Primern, welche zusätzlich die für den Strep-Tag kodierende DNA-Sequenz enthielten, erzielt. Mit Hilfe des Strep-Tags konnten die Proteine im Anschluss affinitätschromatographisch gereinigt werden. Auch wurde als Hilfsenzym Ferredoxin aus *Clostridium tetanomorphum* affinitätschromatographisch gereinigt. Bei der Proteinreinigung mussten streng anoxische Bedingungen eingehalten werden, da sonst sauerstoffempfindliche Eisen-Schwefel-Cluster verloren gingen. Daher wurden alle Reinigungsschritte nach Optimierung der Methode unter anoxischen Bedingungen in einem Anaerobenzelt der Firma Coy durchgeführt.

### 2.4.1 Proteinreinigung mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der mit Strep-Tag heterolog produzierten Proteine erfolgt mit Hilfe der Streptactin-Affinitätschromatographie. Das Säulenmaterial Streptactin Superflow® (IBA) oder StrepTrap HP (5 ml) (GEHealthcare), sowie das zur Elution benötigte Desthiobiotin waren kommerziell erhältlich (IBA, Göttingen, Deutschland).

**Tabelle 11: Für die Streptactin-Affinitätschromatographie benötigte Lösungen.**

Puffer W (Waschen, Bindung- und Probenpuffer)	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8
Puffer E (Elutionspuffer)	Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R (Regeneration Säulenmaterial)	Puffer W + 1 mM HABA

Die Prozedur wurde bei allen in dieser Arbeit isolierten Proteinen, nach Erprobung der heterologen Produktionsbedingungen in *E. coli*, im Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA) durchgeführt, da alle produzierten Proteine sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Cluster enthielten. Neben den oben gezeigten Bestandteilen enthielten die Puffer daher auch 5 mM Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel und Resazurin als Redoxindikator (1 mg/l). Nach der Zelllyse wurden zunächst Zelltrümmer und ganze Zellen durch Zentrifugation entfernt (15.000 x g, 45 min, 4 °C). Das geklärte Zell-Lysat wurde über eine zuvor mit Puffer W äquilibrierte Streptactin-Säule gegeben. Die beladene Säule wurde fünfmal mit einem einfachen Säulenvolumen Puffer W gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Danach erfolgte die Elution in sechs Schritten mit je einem halben Säulenvolumen Puffer E. Schließlich wurde die Säule so lange mit Puffer R versetzt, bis das Säulenmaterial



eine orange Färbung besaß und final wieder mit Puffer W bis zur vollständigen Entfernung von HABA gespült. Um im Verlauf dieser Arbeit Proteine für die enzymatischen und spektroskopischen Analysen zu reinigen wurden DTT als Reduktionsmittel und Resazurin als Redoxindikator aus den Proteinlösungen ausgewaschen nach der Reinigung oder schon aus den Reinigungspuffern weggelassen, wenn im Anaerobenzelt stabil anoxische Bedingungen herrschten, verifiziert über Sauerstoffindikatoren im Zelt. Dies geschah, um einen Einfluss dieser Zusätze auf die Ergebnisse zu vermeiden.

### **2.4.2 Affinitätschromatographische Reinigung von Ferredoxin**

Die Reinigung von Ferredoxin aus *Clostridium tetanomorphum* erfolgte aus 2,5 l anaerober Kultur. Mittels Anionen-Austausch-Chromatographie und Gelfiltration konnte Ferredoxin unter anoxischen Bedingungen im Anaerobenzelt gereinigt werden. Zunächst wurden die bei -20 °C anaerob gelagerten Zellpellets in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 resuspendiert und mittels Ultraschallgerät (Bandelin Sonoplus HD 2070) aufgeschlossen. Unlösliche Zelltrümmer und Reste des Mediums wurden durch Zentrifugation bei 16100 x g für 30 Minuten bei 4 °C entfernt. Anschließend wurden Membran und lösliche Fraktion durch eine zweistündige Ultrazentrifugation (145000 x g, 4 °C) getrennt. Aus der löslichen Fraktion wurde Ferredoxin gereinigt. Der erste Schritt war dabei die Anionen-Austausch-Chromatographie mit einer DEAE-Sepharose, equilibriert mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0). Mit einem schrittweisen Gradienten NaCl in 50 mM Kaliumphosphatpuffer wurden die Proteine von der Säule eluiert. Die Ferredoxin-haltige Fraktion eluierte von der DEAE-Sepharose bei 300 mM NaCl. Diese Fraktion wurde mit einer HiTrap-Entsalzungssäule (GE Healthcare) entsalzt. Die mit Ferredoxin angereicherte Fraktion wurde mit einer Amicon Ultracel-3K Zentrifugationssäule (Merck) aufkonzentriert bevor sie für die Gelfiltration verwendet wurde. Eine Superdex 75 (Hiload 16/60, GE Healthcare) Gelfiltrationssäule wurde für die weitere Reinigung mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 150 mM NaCl equilibriert bevor die Ferredoxin enthaltene Fraktion aufgebracht wurde. Nach Gelfiltration wurden die Ferredoxin enthaltenden Fraktionen, die gut erkennbar waren durch ihre bräunliche Färbung, mit Hilfe von UV-Spektroskopie und SDS-PAGE geprüft. Das Protein wurde aufkonzentriert mit Amicon Ultracel-3K Zentrifugationssäulen (Merck). Das gewonnene Ferredoxin wurde anschließend anaerob bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zusätzlich wurden für die Enzymassays mit Ferredoxin das Hilfsenzym Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (IOR) aus *Methanosarcina mazei* verwendet. Das Plasmid zur heterologen Proteinproduktion wurde freundlicherweise durch die AG

Deppenmeier zur Verfügung gestellt. Die IOR konnte so für die Enzymassays selbst produziert und gereinigt werden. Das rekombinante Protein wurde in Enzymassays eingesetzt. Die Produktion und der Einsatz der IOR in die Enzymassays erfolgte wie von Lena Kröninger und Kollegen 2019 (Kröninger et al. 2019) beschrieben.

### 2.4.3 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren

Nach erfolgter Reinigung wurden die Proteine, falls notwendig, entsalzt und umpuffert. Zum Entsalzen wurden 5 ml HiTrap-Entsalzungssäule (GE Healthcare) verwendet. Zum Umpuffern und Konzentrieren der proteinhaltigen Lösungen wurden Filtrationseinheiten zur Zentrifugation der Firma Merck verwendet. Diese wurde nach Herstellerangaben und angepasst an die Größe der Proteine eingesetzt. Eine gründliche Umpufferung mit mehreren Spülvorgängen wurde insbesondere für Proteine, die für Enzymassays oder UV/Vis-Spektroskopie verwendet wurden, vorgenommen, insbesondere wenn Reduktionsmittel (DTT) im Puffer für die Reinigung enthalten waren.

### 2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Verlauf dieser Arbeit wurden klassische SDS-Gele verwendet, wie auch Tricine-SDS-Gele. In den Ergebnissen wird dies nicht differenziert, da es keinen Einfluss auf die Aussage der Ergebnisse hatte. Die Tricine-SDS-Gele erwiesen sich im Verlauf aber als besser geeignet, da sie häufig ein klareres Bandenbild lieferten.

Komponenten SDS-Gele:

**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.

**Tabelle12: Zusammensetzung der SDS-Gele mit 12,5%igem Trenngel und 4,5%igem Sammelgel.**

	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Acrylamid	5	0,75
rH <sub>2</sub> O	4	3
Lösung A	3	0
Lösung B	0	1,25
APS	0,1	0,1
TEMED	0,005	0,005

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach Laemmli, 1970 mit einer Trenngel-Konzentration von 12,5 % in einer Mini-PROTEAN II Gelkammer (Bio-Rad, München, D) durchgeführt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und anschließend kurz zentrifugiert. Anschließend wurden bis zu 25 µl Probe in die

Taschen des Sammelgels geladen. Die Elektrophorese wurde mit 80 V gestartet, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 120 V für circa 45 bis 60 Minuten fortgesetzt.

#### **Komponenten Tricine-SDS-Gele:**

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

3-fach Gelpuffer: 3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45

10-fach Anodenpuffer: 1 M Tris, 0,225 M HCl, pH 8,9

10-fach Kathodenpuffer: 1 M Tris, 1 M Tricin, 2 % SDS, pH 8,25 (nicht einstellen)

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Tricine-SDS-Gele mit 12,5 %igem Trenngel und 4 %igem Sammelgel.**

	<b>Trenngel [ml]</b>	<b>Sammelgel [ml]</b>
<b>Acrylamidlösung</b>	<b>5</b>	<b>0,4</b>
<b>rH<sub>2</sub>O</b>	<b>3</b>	<b>1,65</b>
<b>3-fach Gelpuffer</b>	<b>4</b>	<b>1,25</b>
<b>10% APS</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>TEMED</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zur SDS-Page. Die Elektrophorese wurde mit 1-fach konzentriertem Anoden- und Kathodenpuffer als Laufpuffer bei 60 V und anschließen 100 V durchgeführt. Nach Gelelektrophorese wurden die Gele mittels Coomassie-Färbung gefärbt. Hierzu wurden Sie 30 bis 60 Minuten in einer Färbelösung (0,25 % Coomassie Blue R250, 50 % Methanol, 10 % Eisessig, 40 % rH<sub>2</sub>O) und anschließend in Entfärberlösung (20 % Methanol, 10 % Eisessig, 70 % rH<sub>2</sub>O) bis zum gewünschten Färbungsgrad entfärbt.

#### **2.4.5 Western Blot**

Zum immunologischen Nachweis der rekombinanten DsrL-Proteine oder Versionen dieser wurde nach SDS-PAGE ein Western-Blot durchgeführt. Der immunologische Nachweis erfolgte anhand des Strep-Tags.

**Towbin-Puffer:** 1,52 g Tris, 7,2 g Glycin, ad 400 ml Wasser demin., 100 ml Methanol, pH 8,3

Für den immunologischen Nachweis des Strep-Tags wurden die Proteine nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm Porengröße, Roth) übertragen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte über eine Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München). Das Gel und die Membran wurden für 20 Minuten in Towbin-Puffer inkubiert. Anschließend wurden sechs Whatman 3 MM-Papiere in Towbin-Puffer gelegt. Auf die Anode der Semi-Dry Transfer Cell wurden zunächst drei Lagen des mit Towbin-Puffer getränkten Whatman-Papiers gelegt. Auf

dem Papier wurde dann die Membran platziert und deckungsgleich darauf das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurden weitere drei Lagen des getränkten Whatman-Papiers gelegt und die Semi-Dry Transfer Cell wurde durch Aufsetzen der Kathode geschlossen. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran bei 15 V für circa 25 Minuten. Anschließend wurde die Membran kurz in PBS-Puffer (4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 115 mM NaCl) gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in PBS mit 5 % Milchpulver [w/v] blockiert. Am nächsten Tag wurde die Blockierung noch mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur fortgeführt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten gründlich mit je 50 ml PBS-Puffer gewaschen und leicht schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 1:500 verdünntem primärem, in der Maus produzierten Antikörper StrepMAB Classic (IBA) oder mit dem Strep-Tactin-HRP-Konjugat ebenfalls (1:500) in 20 ml PBS-Lösung mit 0,5 % BSA für drei Stunden. Die Inkubation erfolgte ebenfalls leicht schüttelnd bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimalig mit PBS-Lösung für jeweils fünf Minuten gewaschen und für eine Stunde mit 20 ml PBS mit 0,5 % BSA [w/v] sowie dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000) inkubiert. Wurde das Strep-Tactin-HRP-Konjugat verwendet, musste kein sekundärer Antikörper verwendet werden. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um ein Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP Konjugat (Merck). Nach zwei Waschstufen mit PBS-Lösung mit 0,05% Tween [v/v] für jeweils fünf Minuten erfolgte die Entwicklung. Dazu wurden 30 mg 4-Chloro-1-Naphthol in 7 ml eisgekühltem Ethanol gelöst und anschließend mit Wasser demin. auf 50 ml aufgefüllt und auf die Membran gegeben. Durch die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde die Reaktion gestartet. Wurde eine ausreichende Farbentwicklung erreicht, konnte die Reaktion durch wiederholtes Waschen der Membran mit Wasser demin. gestoppt werden. Des Weiteren wurde alternativ auch eine Detektion durch Chemilumineszenz durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte dabei nach Herstellerangaben in der Dunkelkammer mit den Lösungen des SignalFire™ ECL Reagent-Kits (Cell Signaling Technology). Diese Technik wurde bei Proben mit geringem Proteingehalt bevorzugt, da diese deutlich sensitiver ist.

#### **2.4.6 Bestimmung Cofaktor-Gehalt**

Neben vergleichender Betrachtung zwischen den UV-Vis-Spektren der Proteine wurden auch der FAD-Gehalt, sowie der Eisen- und Schwefelgehalt exemplarisch bestimmt.

##### **Bestimmung FAD-Gehalt**

Der FAD-Gehalt wurde bestimmt nach einer modifizierten Methode, empfohlen für FeS-Flavoproteine (Aliverti et al. 1999). Dazu wurde eine Probe mit 5-10  $\mu\text{M}$  Protein mit 10 % [w/v] Trichloressigsäure versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 15.000  $\times g$ ). Anschließend wurde die Probe mit 0.1 % SDS [w/v] versetzt und für 5 Minuten erhitzt bei 95 °C im Thermoblock. Erneut wurde denaturiertes Protein durch Zentrifugation entfernt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Die Kombination aus Säure-und-Hitze- Denaturierung führt zur Hydrolyse von FAD zu FMN. Ein UV-Vis-Spektrum des Zentrifugationsüberstandes wurde aufgenommen und der Flavingehalt wurde berechnet anhand des molaren Extinktionskoeffizienten 11,1  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 446 nm.

##### **Eisenbestimmung von Nicht-Häm-Eisen in Proteinen (Massey 1957)**

20% Trichloressigsäure  
0,1% 1,10-O-Phenanthrolin  
60 mM Ascorbinsäure  
gesättigte Ammoniumacetatlösung

Zu 750  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung (0 - 150 nmol Eisen) wurden 250  $\mu\text{l}$  der 20 %igen Trichloressigsäure zugegeben, um das Protein zu denaturieren und somit das enthaltene Eisen freizusetzen. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Denaturiertes Protein wurde durch 5 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15000  $\times g$  abzentrifugiert. Von dem nun klaren Überstand wurden 400  $\mu\text{l}$  abgenommen und zu 360  $\mu\text{l}$  demin. Wasser gegeben. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Phenanthrolin, 50  $\mu\text{l}$  Ascorbinsäure und 40  $\mu\text{l}$  Ammoniumacetatlösung. Der Ansatz wurde gemischt und die Extinktion bei 510 nm gemessen. Zur Quantifizierung des Eisengehaltes wurde im Bereich von 0 - 150 nmol Eisen eine Kalibriergerade erstellt. Hierzu wurde  $\text{Fe(II)SO}_4$  im Proteinpuffer gelöst und ebenso wie die Proteinprobe behandelt.

### **Schwefelbestimmung (King & Morris, 1967)**

Zur Schwefelbestimmung wurden 200  $\mu\text{L}$  Lösung des zu untersuchenden Proteins in einer geeigneten Verdünnung mit einem Gemisch aus 300  $\mu\text{L}$  1 % [w/v] Zinkacetat und 15  $\mu\text{L}$  12 % [w/v] NaOH versetzt, einmal invertiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 75  $\mu\text{L}$  0,1 % [w/v] Dimethylphenyldiamin (in 5 M HCl) hinzugefügt und die Probe zweimal invertiert, gefolgt von einer Zugabe von 75  $\mu\text{L}$  2 mM Eisen(III)-chlorid (in 1,2 M HCl). Nach einer weiteren Inkubation für 20 Minuten (RT, dunkel), wurde die Probe zentrifugiert (10 min 10.000 g, RT) und die Absorption vom Überstand bei 670 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Sulfidgehalt (2,5–20 nmol). Die Schwefelmenge wurde anhand der Kalibriergeraden berechnet.

## **2.5 Spektroskopische Methoden**

Mit Hilfe spektroskopischer Methoden wurden die produzierten DsrL-Proteine untersucht, um Aufschluss über den Cofaktor-Gehalt dieser zu gewinnen. Nach jeder Reinigung wurden UV-Vis-Spektren der gewonnenen Proteine aufgenommen. Anhand der Absorption konnte beurteilt werden, ob die Produktion der Proteine inklusive Cofaktoren erfolgreich war. Außerdem wurde EPR-Spektroskopie durchgeführt, um die Eisenschwefelcluster in DsrL nachzuweisen und ihren Typ zu bestimmen. Anhand von Titrations sollte mehr Aufschluss über die redoxchemischen Eigenschaften von DsrL gewonnen werden. Hierzu wurden unter anderem Redox titrationen durchgeführt, um die redoxchemischen Veränderungen im Protein mittels UV-Vis-Spektroskopie für das enthaltene FAD und mittels EPR-Spektroskopie für die Eisenschwefelcluster zu beobachten. Da insbesondere die FeS-Cluster in DsrL Sauerstoffempfindlich sind, wurden alle analytischen Spektren unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Eine Ausnahme waren nur die Kontrollspektren im Anschluss an die Proteinreinigungen. Hierfür wurden kleine Mengen Protein entnommen und diese UV/Vis-Spektren wurden im Nanodrop direkt gemessen, um schnell Aufschluss über den Reinigungserfolg zu erlangen, bevor weiterer Aufwand und Ressourcen für Entsalzen, Waschen und Aufkonzentrieren der Proteine im Anaerobenzelt investiert werden mussten.

### **2.5.1. UV-Vis Spektroskopie**

Direkt nach der Reinigung der Proteine im Anaerobenzelt wurden Proben entnommen und mittels NanoDrop BioPhotometer D30 (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Dies war notwendig, um möglichst schnell Aufschluss über Proteingehalt und Cofaktor-Gehalt der Reinigungsfraktionen zu gewinnen, da diese im Anschluss an die Reinigungen am gleichen Tag

noch vereinigt, gewaschen, aufkonzentriert und für die anaerobe Lagerung aliquotiert werden mussten. Der Proteingehalt der Reinigungsfraktionen wurde anhand der Absorption bei 280 nm (A) und dem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) (berechnet von ProtParam anhand der AS-Sequenz) mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet. Zu Beginn dieser Arbeit wurde diese Methodik verifiziert und die über den Extinktionskoeffizienten berechneten Proteinkonzentrationen wurden mit den chemisch bestimmten Konzentrationen aus BCA-Assays verglichen. Die BCA-Assays wurden nach Herstellerangaben des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Da es nur zu sehr geringen Abweichungen kam und dank der Nanodrop-Messung nur sehr geringe Mengen Protein verwendet werden mussten, wurde die spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration als Standardmethode verwendet.

$$A = \epsilon * c * d$$

A = Absorption bei 280 nm  
 $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient  
 c = Konzentration  
 d = Schichtdicke Küvette

Analytische UV-Vis-Spektren wurden entweder in Quarzglasküvetten (Hellma Analytics/Mühlheim, DE) verschlossen mit Gummistopfen unter bestmöglichem Sauerstoffausschluss mit dem Specord 210 UV/Vis-Spektralphotometer (Analytik Jena/ Jena, DE) oder unter anoxischen Bedingungen im Anaerobenzelt mit einem Diodenarray-Spektrophotometer (Agilent 8453) aufgenommen. Gemessen wurden die UV/Vis-Spektren zwischen 200 bis 800 nm.

Zur Aufnahme von UV/Vis-Spektren außerhalb des Anaerobenzeltes wurde die gewünschte Menge Protein unter anaeroben Bedingungen abgenommen und ausgeschleust. Das Protein wurde dann in 50 mM Tris/HCl-Puffer oder 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 7.0 auf die gewünschte Konzentration verdünnt und in der verschlossenen Quarzküvette mindestens 10 Minuten mit Stickstoffgas begast um den Sauerstoff zu verdrängen. Alle Lösungen von Reduktions- oder Oxidationsmitteln, die zur Titration verwendet worden sind, wurden in mit Gummistopfen verschlossenen Glasgefäßen angesetzt und ebenfalls 10 Minuten mit Stickstoff begast, um Sauerstoff zu entfernen. Die Zugabe der Zusätze in die Glasküvette erfolgte mittels gasdichter Hamilton-Spritzen, die ein Durchstechen der Gummistopfen ermöglichen und eine exakte Zugabe der Reduktions- und Oxidationsmittel unter möglichst wenig Sauerstoffeintrag gewährleisten. Im Anaerobenzelt konnte die Zugabe der Oxidations- und Reduktionsmittel direkt erfolgen. Die Zusätze wurden aber entweder zuvor mit Stickstoff begast und dann in das

Zelt eingeschleust oder erst im Anaerobenzelt in bereits anoxisch gelagerten Lösungsmitteln gelöst, um auch hier den Sauerstoffeintrag zu verringern. Die Auswertung und graphische Darstellung der UV/Vis-Spektren erfolgte in Excel (Microsoft Office). Dabei wurden die Spektren bei 800 nm auf 0 normiert und in der Regel bei 280 nm auf 1, um den Verdünnungsfaktor durch die Zugabe der Zusätze im Verlauf der Titrations auszugleichen.

### 2.5.2 UV/Vis Redoxtitration

Um genauere Informationen über die Redoxeigenschaften des in DsrL enthaltenen FADs zu erlangen, wurde eine Redoxtitration unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die redoxchemischen Veränderungen des FADs wurden durch UV/Vis-Spektren im Verlauf der Titration aufgezeichnet. Die Titration erfolgte bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren. Die 20  $\mu$ M oder 40  $\mu$ M AvDsrL-1A Protein wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 eingesetzt. Die Mischung von Redox-Mediatoren umfasste: Ferricyanid (+420 mV), Dichlorphenolindophenol (DICIP) (+217 mV), Trimethylhydroquinone (+115 mV), 1,4-Napthoquinone (+60 mV), Duroquinone (+50 mV), Indigo-Disulfonat (-110 mV), Antrachinon-2,6-disulphonate Na<sup>+</sup> (-182 mV), Anthrachinon-2-sulfonat (-225 mV), Phenosafranin (-255 mV), Safranin (-280 mV), Neutralrot (-325 mV), Benzylviologen (-360 mV) und Methylviologen (-446 mV). Die Redoxmediatoren wurden jeweils in einer Konzentration von 1  $\mu$ M in die Titrationslösung eingesetzt. Die Messung der Redoxpotentiale erfolgte mit der InLab Redox Micro Ag/AgCl Elektrode (Mettler-Toledo, Gießen Deutschland). Die Elektrode wurde vor Beginn der Messungen und nach Ende der Messungen gegen eine gesättigte Chinhydron-Lösung, bei pH 7.0 als Referenz abgeglichen. Zur Oxidation wurde Ferricyanid hinzugegeben, zur Reduktion wurde Na-Dithionit verwendet. Bei verschiedenen Redoxpotentialen wurden UV-Vis-Spektren aufgezeichnet und in Microsoft-Excel ausgewertet. Die Absorption bei 450 nm wurde zur Ermittlung des Redoxpotentials ausgewertet. Zur Berechnung der Redoxpotentiale wurde die Nernst-Gleichung verwendet. Durch Umstellung der Nernst-Gleichung wurden verschiedene Simulationen mit variierenden Redoxpotentialen und Zahl der übertragenen Elektronen erstellt. Das Ergebnis mit der geringsten Abweichung zu den realen Messwerten wurde in dieser Arbeit dargestellt und diskutiert.

### 2.5.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Art der FeS-Cluster in DsrL wurde Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie) durchgeführt. Diese Experimente wurden am ITQB in Oeiras, Portugal mit Hilfe unserer Kooperationspartnerinnen Sofia Venceslau und Ines Pereira durchgeführt und unterstützt. Hierzu wurde das Protein im Anaerobenzelt vorbereitet und im



„as isolated“ Zustand oder im reduzierten Zustand in die für die EPR-Spektroskopie verwendeten dünnen Glasröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zur Durchführung der Messungen eingefroren. Ebenso wurde mit den Proben nach der Redoxtitration verfahren, siehe 3.4.4. Zum Zeitpunkt des Forschungsaufenthaltes konnten aufgrund technischer Probleme keine EPR-Spektren aufgenommen werden. Alle Proben für die Messungen wurden daher eigenhändig vorbereitet und in flüssigem Stickstoff eingefroren gelagert. Die EPR-Spektren wurden durch Sofia Venceslau aufgenommen, ausgewertet und formatiert. Die EPR-Spektren auf dem X-Band wurden mit einem Bruker-EMX-Spektrometer unter Verwendung eines ESR-900 X-Band Helium Kryostat von Oxford Instruments aufgenommen. Die EPR-Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgezeichnet: Mikrowellenfrequenz, 9,39 GHz; Mikrowellenleistung, 20 mW; Modulationsfrequenz, 100 kHz; Modulationsamplitude, 1 mT; Temperatur, 15 K. EPR-Spektren wurden von AvDsrL-1A und DaDsrL-2 im isolierten Zustand und nach Natriumdithionit-Reduktion aufgenommen.

### **2.5.4 Die EPR-basierte potentiometrische Titration**

Die potentiometrische Titration von AvDsrL-1A wurde durchgeführt, um Aufschluss über das Redoxpotential der im Protein enthaltenen FeS-Cluster zu gewinnen. Die Titration erfolgte in einem Anaerobenzelt bei 20°C unter Verwendung von 115 mM AvDsrL-1A und 50 mM einer Mischung von Redox-Mediatoren in 100 mM MOPS pH 7,5 mit 5 mM EDTA. Die Mischung von Redox-Mediatoren umfasste: Metylenblau (+11mV), Indigo-Tetrasulfonat (-30 mV), Indigo-Disulfonat (-110 mV), 2-Hydroxy-1,4-naftochinon (-152 mV), Safranin (-280 mV), Anthrachinon-2-sulfonat (-225 mV), Neutralrot (-325 mV), Benzylviologen (-360 mV) und Methylviologen (-446 mV). Da das Protein im „as isolated“-Zustand vollständig oxidiert vorliegt, wurde die potentiometrische Titration des isolierten Proteins in der Reduktionsrichtung mit Natriumdithionit als Reduktionsmittel durchgeführt. Die Redoxpotentiale wurden mit einer kombinierten Ag/AgCl-Elektrode gemessen, die gegen eine gesättigte Chinhydron-Lösung bei pH 7 kalibriert wurde. Die Standard-Wasserstoffelektrode wurde als Referenz verwendet. Sobald das gewünschte Redoxpotential erreicht war, wurden die Proben vorbereitet und im Anaerobenzelt in EPR-Röhrchen überführt, verschlossen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Messung und Auswertung der EPR-Rohdaten wurde durch unsere Kooperationspartner Dr. Sofia Venceslau und Prof. Dr. Ines Pereira unterstützt. Die Messdaten wurden aufgetragen und mit Hilfe der Nernst-Gleichung konnte das Redoxpotential bestimmt werden. Hierzu wurde die

Nernst-Gleichung umgestellt und eine Simulationskurve wurde erstellt. Die in die Gleichung eingesetzten Redoxpotentiale ändern den Verlauf der Simulationskurve. Die jeweils um die Redoxpotentiale modifizierte Simulationskurve mit der geringsten Abweichung zu den realen Messdaten ergeben einen Hinweis auf das Redoxpotential der FeS-Cluster.

### 2.5.5 Bestimmung der Oxidoreduktaseaktivität

Alle Enzymassays wurden im Anaerobenzelt durchgeführt (98% (v/v) N<sub>2</sub>, 2% (v/v) H<sub>2</sub>) in einem Reaktionsvolumen von 1 ml. Die Oxidation/Reduktion des Elektronendonors/-akzeptors wurde mit einem Diodenarray-Spektrophotometer (Agilent 8453) bei entsprechenden Wellenlängen verfolgt. Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert und unterschiedlichen Temperaturen wurden getestet, um die Optima der Enzyme zu bestimmen. Die NAD(P)H-oxidierenden Aktivitäten der DsrL-Proteine wurden durch Verfolgung der Reduktion von 300 µM Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT) bei 578 nm ( $\epsilon = 13 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) gemessen (Bergmeyer, 1983). MTT wurde in 75% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) TritonX-100 und 20% (v/v) rH<sub>2</sub>O gelöst. Methylviologen wurde als Elektronendonator verwendet für NAD(P)<sup>+</sup>-Assays, die bei 585 nm verfolgt wurden ( $\epsilon = 11,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Auch hier wurden unterschiedliche Konzentrationen von NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> verwendet. 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 bei 30 °C, einem pH-Wert von 8,0 bei 40 °C und einem pH-Wert von 6,5 bei 45 °C wurden für AvDsrL-1A, CtDsrL-1B und DaDsrL-2 verwendet. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 0,25 bis 1 µg Protein gestartet. Alle Messungen wurden bei der jeweiligen Substratkonzentration in Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert wurde für alle späteren Berechnungen verwendet.  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden berechnet und die Abbildungen der Enzymkinetiken wurden mit GraphPad Prism 7 erstellt und ausgewertet.

## 2.6 Bioinformatische Methoden

Zur Gewinnung grundlegender Erkenntnisse über DsrL wurden verschiedene bioinformatische Methoden angewandt. Die verwendeten bioinformatischen Tools sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Hier wird nur auf einzelne zu beachtende Besonderheiten eingegangen.

### 2.6.1 Aminosäuren-Sequenzvergleich

Die online verfügbaren Tools BLASTP und TBLASTN wurden genutzt, um Homologe zu DsrL von *A. vinosum* zu finden. Dabei wurde darauf geachtet, dass es sich bei den gefundenen Homologen wirklich um DsrL handelte. Es wurde überprüft, ob die funktionellen Abschnitte von DsrL vollständig vorhanden waren und dass andere *dsr*-Gene in der Nachbarschaft der für die gefundenen Proteine kodierenden Gene zu finden sind.

### **2.6.2 Phylogenetische Stammbaumanalysen**

Für die phylogenetischen Stammbaumanalysen von DsrL und DsrA wurde die Maximum Likelihood Methode verwendet. In die endgültige Analyse wurden 143 Aminosäuresequenzen von DsrL-Proteinen und 146 Aminosäuresequenzen von DsrA einbezogen. Alle mehrdeutigen Positionen wurden für jedes Sequenzpaar entfernt (Option der paarweisen Deletion). Insgesamt umfassten die Datensätze 852 und 522 Positionen für DsrL bzw. DsrA. Die phylogenetischen Analysen wurden in MEGA X (Kumar et al. 2018) durchgeführt. Details sind in (Löffler et al. 2020b) beschrieben.

### **2.6.3 Vorhersage der Proteinstruktur**

Zur Vorhersage der Proteinstruktur wurde I-Tasser (Yang und Zhang 2015; Roy et al. 2010) verwendet. Dabei wurden für die Proteine AvDsrL-1A, CtDsrL-1B und DaDsrL-2 separate Modelle für den Hauptteil der Proteine (AS-Sequenzalignment Position 1-627) modelliert und für den carboxyterminalen Teil bestehend aus Linkerdomäne und Ferredoxin-ähnlicher Domäne. Die vorhergesagten Strukturen wurden mit dem Programm UCSF Chimera kombiniert und vergleichend dargestellt (Pettersen et al. 2004).

### 3. ERGEBNISSE

Die Aminosäuresequenz von DsrL aus verschiedenen Organismen wurde näher analysiert und verglichen. Als Ausgangspunkt dieser Arbeit wurden verschiedene funktionelle Bereiche mit ihren konservierten Aminosäuren herausgestellt, um erste Informationen über die mögliche Funktion von DsrL zu erhalten. Mit Hilfe der DsrL-Aminosäuresequenz-Charakteristika aus Organismen, die bekannterweise DsrL besitzen, wurden in weiteren prokaryotischen Genomen DsrL-Sequenzen identifiziert. Diese wurden zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums und dessen Vergleich mit dem DsrA-Stammbaum herangezogen und deckten so eine zuvor unerwartete physiologische Diversität von DsrL auf, die sich nicht auf die dissimilatorische Schwefeloxidation beschränkt. Im Weiteren wurden die biochemischen Eigenschaften von verschiedenen DsrL-Proteinen analysiert. Eine Korrelation zwischen den phylogenetischen Ergebnissen und den biochemischen Eigenschaften von DsrL konnte dargestellt werden.

#### 3.1 DsrL - Ein komplexes Eisen-Schwefelprotein

DsrL gehört zur Familie der FAD- und [FeS]-Cluster-haltigen Pyridinnukleotid:Disulfid-Oxidoreduktasen (Pyr\_redox, Pfam PF00070). Zu dieser Proteinfamilie gehören Klasse I- und II-Oxidoreduktasen, sowie Peroxidasen und NADH-Oxidasen. NfnB, die große Untereinheit der Transhydrogenase NfnAB, einer NADH-abhängigen Ferredoxin<sub>red</sub>:NADP-Oxidoreduktase aus *Thermotoga maritima* (TmNfnAB) (Demmer et al. 2015) und die großen Untereinheiten von Xfn (früher NfnII) (Nguyen et al. 2017) und NfnI aus *Pyrococcus furiosus* (PfNfnI\_L) (Lubner et al. 2017) sind die strukturell charakterisierten Vertreter der Disulfidoxidoreduktase-Superfamilie, die am engsten mit DsrL-Proteinen verwandt sind. NfnAB katalysiert die reversible Bifurkation der zwei aus NADPH stammenden Elektronen auf Ferredoxin und NAD in einem komplexen Reaktionsmechanismus, auf welchen später noch eingegangen wird. Die größere Untereinheit NfnB bindet NADPH und reduziert das Ferredoxin, während NfnA mit NAD interagiert. Beide Untereinheiten enthalten FeS-Cluster und FAD (Huang et al. 2012; Buckel und Thauer 2013; Lubner et al. 2017). DsrL hat einen mit NfnB vergleichbaren Aufbau und beide Enzyme haben viele entscheidende Elemente gemeinsam. In Abbildung 3 ist exemplarisch ein Aminosäuresequenzvergleich von DsrL aus *A. vinosum* (AvDsrL) mit NfnB aus *T. maritima* (TmNfnB) dargestellt.

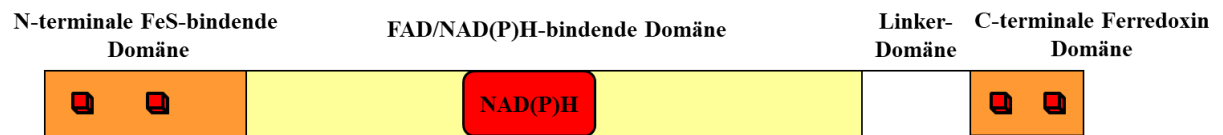
AvDsrL (AAG13082)	MATSSDEMKM---KPTWRRFEDGEHVWDNLTKIFNQDRSHKPTVYHKTPPCQGS	57
TmNfnB (4YRY_D)	MKNRKTMPKEQSPESRRRNFEVAL-GYTLEEALEEAQRLLQIP----THPVS	54
	* . . ** : *.** : . * : : : * . : ** * * * . . **	
AvDsrL (AAG13082)	EDIRGWLQIVRGMEKPPQGMWQVEYAFRRSTDANFPFAMMGRVCPAP--CQDGNRNELE	115
TmNfnB (4YRY_D)	IDIPGFIRKLRDGKLD-----EESYRI LKSYNNLPAVCGRVCPEVQCESR	106
	** * : : : * . : : * : * * . . * : * * : * * * * * * * * . : * . . : : *	
AvDsrL (AAG13082)	D--FVGINSVQFIGDTAIANGYTFEAP-ELDTGKRIAIVGGGFAGLAAAYQLRRKGHS	172
TmNfnB (4YRY_D)	DSEPVAIGRLERFVADWAAENLEEDVKPLAGSKKEKVAVVGSGPAGLTAADLAKMGYHV	166
	* * . * . : * : * . * * * * * * * . . : : * : * * . * * * * * : * * : * : *	
AvDsrL (AAG13082)	TIFEANDGLGGMFRFGIPGYRVPDKLDAEIQRILDMGRVEVRLKTRIGTDVTVTEQLEKD	232
TmNfnB (4YRY_D)	DI FEAFHKPGGLVYGIPEFRLPKRIVEREVS YIRKLG-VNFHLNTVVGKTVKVKELLSE	225
	**** . ** : : * * * : * * * : : * . * . * * : * * : * * : * * * * * . : *	
AvDsrL (AAG13082)	YDAILWAIQCQSRGLPVPGWEG-----TPNCVTGVAFLKAFN--EGRMKVTAG-KVVCV	284
TmNfnB (4YRY_D)	YDAVFIGTGAGTPEKFMGIPGTNLGVYSANEFLTRVNLKAYLFPEYDTPIRVGGKVAVI	285
	** : : . * . : : : * * * : : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * . : *	
AvDsrL (AAG13082)	GGGDTSIDVVSVARRLGHVNKSNPNLEPETVIRDGYVAHDAASAAAQGAEVTLTSLFTR	344
TmNfnB (4YRY_D)	GAGNTAMDAARSALRLGAE-----KVIYVIRTE	314
	* . * : * : * . . * . : *	
AvDsrL (AAG13082)	DKMTASEHEVDATREGVTILDGVMPVEVIKDANGRAIGLKVADCT-----MTDGRPTP	398
TmNfnB (4YRY_D)	REMPARREYHHALEEGIEFLWLTLP IRYIGDANGNVEAMECVRMELKEADGSGRFPVP	374
	: * * . . * . . * . * : * . : * . : * * * * * . . : : . * * * *	
AvDsrL (AAG13082)	VEGTERVLEADLIVSAIGGGDLSGLEQLD---NGRGLMDSDKFYQVPGKAGHFVAGDI	454
TmNfnB (4YRY_D)	IEGSNFVLEVDMVI EAI GQGNRVLLESEFPGLELNERGYIKADEDTGATSVKGVFAGGDI	434
	: * * : * * * . : : * * * * * : * * : * * * : * * : * * . . * * . * * * *	
AvDsrL (AAG13082)	IRPHLL-TTAIGQAWIAADS IDAYV MQAEHKRRPKVDVHFNLLDKLTEAHLAPESFVAG	513
TmNfnB (4YRY_D)	VTGAATVIKAMGAGKKAQFIHSYLTGEWNP-----WQK-----	468
	: . . * : * . . * * : * : * : : : * : * : * * * * * : *	
AvDsrL (AAG13082)	QAGDMRGTSDANYA IHN YEDRSGAEVIPHEELFLGHFNYVPRNLRKEEVPSADEVLGHFH	573
TmNfnB (4YRY_D)	-----	468
AvDsrL (AAG13082)	ERVIGLTEPEAIDEAKRMSGLPFDNVI FQDAVFRVDKGSRTTGRYVDTDYAK	633
TmNfnB (4YRY_D)	-----	468
AvDsrL (AAG13082)	IGHIADVPTGYIKMGLGE	654
TmNfnB (4YRY_D)	-----	468

**Abbildung 3: Aminosäuresequenzvergleich von DsrL aus *A. vinosum* mit NfnB aus *T. maritima*.**

Die anhand der Kristallstruktur von NfnB aus *T. maritima* identifizierte Domänen sind durch farbige Boxen markiert. Blaue Box: Helikale Domäne, die zwei [4Fe4S]-Cluster enthält. Cysteine, die das distale [4Fe4S]-Cluster in NfnB koordinieren, sind grün markiert. Blau markiert sind drei Cysteine und ein Glutamat, die das proximale [4Fe4S]-Cluster in NfnB koordinieren. Gelb umrandet ist die FAD-bindende Domäne mit Rossmann-Faltungstyp. Die NAD(P)-bindende Domäne, ebenfalls vom Rossmann-Typ, ist rot umrandet. Arginine, die in NfnB essentiell für die Bindung von NADP<sup>+</sup> sind, wurden rot markiert. Grün umrandet ist die Ferredoxin-ähnliche Domäne von DsrL aus *A. vinosum*. Grau markiert wurden Cysteine, die putativ zwei [4Fe4S]-Cluster koordinieren können.

Mit Hilfe der Kristallstruktur von NfnB aus *T. maritima* konnten einige Erkenntnisse über den Aufbau von DsrL aus *A. vinosum* gewonnen werden. Es ergibt sich ein modularer Aufbau von DsrL (siehe Abbildung 4) mit einer N-terminalen [4Fe4S]-Cluster-bindenden Domäne (aa 1-140 in AvDsrL), einer darauf folgenden FAD-bindenden Domäne vom Rossmann-Faltungstyp (aa 140-240 und 406-486 in AvDsrL) und einer zweiten Domäne vom Rossmann-Faltungstyp (aa 241-405 in AvDsrL), die NAD(P) bindet und in der FAD-bindenden Domäne

eingeschlossenen ist. Der Hauptunterschied zwischen NfnB und DsrL ist das Vorhandensein einer ~170-Aminosäuren umfassenden Carboxy-terminalen Verlängerung (487-654 in AvDsrL), deren letzte 70 Reste eine Ferredoxin-Domäne bilden, die zwei [4Fe4S]-Cluster bindet (Abb.4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus von DsrL.** Alle DsrL Proteine bestehen aus einer N-terminalen FeS-bindenden Domäne (orange), einer zentralen NAD(P)H-bindenden Domäne (rot), die eingebettet ist in die FAD-bindende Domäne (gelb). C-terminal ist nach einer als Linker-Domäne bezeichneten Region (weiß) eine zweite Ferredoxin-ähnliche Domäne, charakteristisch für DsrL. Die roten Würfel repräsentieren putative [4Fe4S]-Cluster im Modell.

### 3.2 Identifizierung von DsrL in Organismen und Metagenomen

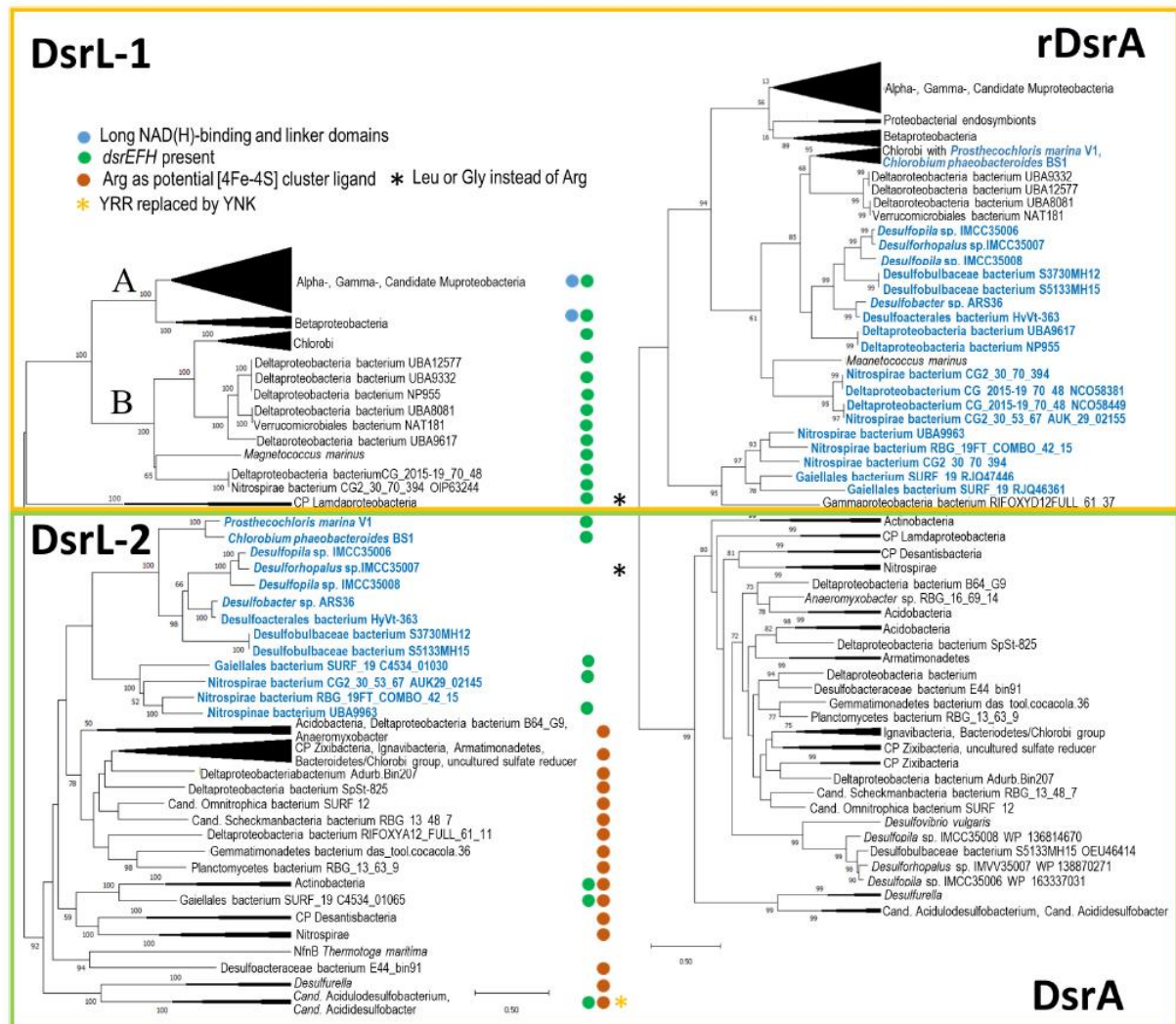
Um die Verbreitung von *dsrL* in den vielen heute verfügbaren Genom-/Metagenomsequenzen zu prüfen, wurden mit Hilfe von BLAST-Analysen (Altschul et al. 1990) *dsrL*-ähnliche Gene identifiziert. Sequenzähnliche, aber funktionell klar andere Proteine, wie beispielsweise die kleine Untereinheit der Glutamatsynthase (GltD) oder auch das strukturell zu DsrL ähnliche NfnB tauchen bei diesen Analysen ebenfalls in den Ergebnissen auf. Daher sind weitere Kriterien nötig, um die relevanten Sequenzen einzugrenzen. Folgende Kriterien wurden daher verwendet, um DsrL-Sequenzen zu identifizieren:

- 1) Das per BLAST-Analyse identifizierte Gen stammt aus einem Organismus, der auch *dsrAB* Gene enthält und bei dem das *dsrL*-Gen vollständig und nicht nur ein kurzes Fragment ist.
- 2) Das durch die erhaltene Gensequenz kodierte Protein enthält alle DsrL-typischen Domänen in der richtigen Reihenfolge (siehe Abb. 4).
- 3) Das Gen liegt nicht in direkter Nachbarschaft zu Genen für Untereinheiten von Pyruvat/Ketoisovalerat-Oxidoreduktasen. Diese wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Die Suche nach DsrL-Sequenzen ergab erwartungsgemäß eine hohe Zahl DsrAB-enthaltender Schwefel-oxidierender Bakterien, darunter Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien, aber auch Grüne Schwefelbakterien (Chlorobi). Die Gruppe der DsrAB enthaltenden und möglicherweise Schwefeloxidation betreibenden Organismen wurde kürzlich ausgeweitet um drei weitere Organismengruppen, die der Nitrospirae, Nitrospinae und Candidatus Muproteobacteria (Anantharaman et al. 2018). Tatsächlich finden sich auch in diesen Organismen *dsrL*-kodierende Gene. Des Weiteren findet sich DsrL in Vertretern der

Lambdaproteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Armatimonadetes, Gemmatimonadetes, Ignavibacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes und in den Kandidatenphyla Schekmanbacteria, Desantisbacteria und Zixibacteria. Vorhersagen zum dissimilatorischen Schwefelmetabolismus der Vertreter von Actinobacteria, Acidobacteria, Lambdaproteobacteria und Verrucomicrobia waren bisher nicht abschließend möglich (Sulfat/Sulfit-Reduktion oder Schwefeloxidation) und die Fähigkeit Sulfat/Sulfit zu reduzieren wurde für die anderen Taxa angenommen (Anantharaman et al. 2018). Außerdem fand sich überraschenderweise auch im wahrscheinlich Sulfat/Schwefel-reduzierenden Isolat *Candidatus Omnitrophica bacterium SURF\_12* ein *dsrL* Gen, obwohl dieses in einer vorherigen Studie unentdeckt blieb (Momper et al. 2017).

DsrL findet sich, trotz DsrAB basierter Sulfatreduktion, nicht in den Kandidatenphyla Falkowbacteria, Hydrothermarchaeota, Riflebacteria (Anantharaman et al. 2018) und auch nicht in Sulfat-reduzierenden Archaea.



**Abbildung 5: Vergleich von DsrL- (links) und DsrA- (rechts) in phylogenetischen Stammbäumen.** Die Stammbäume wurden mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen erstellt. Zunächst wurden die besten Aminosäure-Substitutionsmodelle in MEGA X (Kumar et al. 2018) berechnet. Sowohl für DsrA als auch für DsrL hatte das Modell Le\_Gascuel\_2008 den niedrigsten BIC-Wert (Bayesian Information Criterion) und wurde als das Modell angesehen, welches das Substitutionsmuster am besten beschreibt (Details in (Löffler et al. 2020b)). Ein gelber Kasten umschließt alle DsrA-Proteine vom oxidativen Typ (rDsrA) sowie alle DsrL-1-Typ-Proteine. Ein grüner Kasten kennzeichnet alle bakteriellen reduktiven DsrA-Typen und DsrL-2-Typ-Proteine. Die blau geschriebenen Organismen enthalten DsrA vom oxidativen Typ und ein DsrL-Protein vom Typ DsrL-2. Alle DsrL-Sequenzen der Gruppe DsrL-2 weisen ein YRR-Motiv auf, das auf eine Präferenz für NADP(H) gegenüber NAD(H) hinweist. Die einzigen Ausnahmen sind die Arten *Candidatus Acidulodesulfobacterium* und *Candidatus Acididesulfobacter*. Hier ist YRR durch YNK (gelbes Sternchen) ersetzt. Blaue Punkte zeigen das Vorhandensein von langen Substratbindungs- und Linker-Domänen an. Braune Punkte markieren DsrL-Proteine mit einem Arginin anstelle von Cystein als potenziellen [4Fe4S]-Cluster-Liganden in der N-terminalen Ferredoxin-Domäne. Mit einem schwarzen Sternchen hervorgehobene Organismen weisen Leucin oder Glycin an dieser Position auf. Grüne Punkte kennzeichnen alle Organismen, die Gene für die Sulfur-Transferase DsrEFH enthalten. Abbildung entnommen aus (Löffler et al. 2020b).

Neuere Studien zeigen ein sehr interessantes Bild in Deltaproteobakterien, das es notwendig macht, alte Annahmen zu revidieren. Wie früher angenommen, enthalten Vertreter der klassischen und lange bekannten sulfatreduzierenden Deltaproteobacteria (z.B. *Desulfovibrio*) kein DsrL. Außerdem ist DsrL nicht in filamentösen Kabelbakterien der Kandidatengattungen



Electothrix und Electronema enthalten (Risgaard-Petersen et al. 2015; Trojan et al. 2016; Kjeldsen et al. 2019; Müller et al. 2020). Auch Sulfid-oxidierende *Desulfurivibrio* Spezies, die sich nicht von klassischen Sulfatreduzierern unterscheiden lassen, da sie die gleichen Gene nutzen (Thorup Casper et al. 2017), enthalten kein DsrL. Im Gegensatz dazu überrascht die Anwesenheit von DsrL im Schwefel- und Thiosulfat-reduzierenden Organismus *Desulfurella amilsii*, der zusätzlich auch noch Schwefeldisproportionierung betreiben kann (Florentino et al. 2019). Auch in *Candidatus Acicidesulfobacter* und in *Candidatus Acidulodesulfobacterium* Stämmen konnte *dsrL* gefunden werden, wobei vermutet wird, dass diese Organismen zur Sulfatreduktion und zur Sulfidoxidation fähig sind (Tan et al. 2019). In unklassifizierten Metagenomen von Deltaproteobakterien wie auch in Metagenomen aus den Familien der Desulfobacteraceae und Desulfobulbaceae wurden ebenfalls entsprechende *dsrL* Sequenzen gefunden, die bisher noch keine Beachtung gefunden haben. Diese Verbreitung von DsrL auch außerhalb der klassischen Schwefeloxidierer zeigt, dass es notwendig ist, das Bild von DsrL als klassisches Enzym der Schwefeloxidation zu revidieren und die Funktion von DsrL im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel genauer zu betrachten.

### 3.3 Zusammenhang der Phylogenie von DsrL und DsrA

Wie zuvor beschrieben findet sich DsrL sowohl in Organismen mit oxidativem wie auch in Organismen mit reduktivem Dsr-basiertem Schwefelstoffwechsel. Außerdem in Organismen, die Schwefel disproportionieren können oder zwischen den Stoffwechseln hin und her schalten können. Um diese Diversität näher zu untersuchen, wurden die Sequenzen ausgewählter Organismen für phylogenetische Analysen genutzt und zusätzlich in Beziehung gesetzt zur Phylogenie von DsrA der gleichen Organismen.

Die phylogenetischen Analysen von DsrL zeigen, dass es in den verschiedenen Organismen klare Unterscheidungsmerkmale für DsrL-Proteine gibt.

Es lässt sich herausstellen, dass DsrL in zwei Hauptgruppen unterteilt werden kann, die als DsrL-1 und DsrL-2 bezeichnet werden. Augenfalliges Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Gruppen ist das Vorhandensein des YRR-Motives in DsrL-2, welches in DsrL-1 nicht konserviert vorliegt (siehe Abb. 5). Das YRR-Motiv dient der Bindung des NAD(P)-Cofaktors und wird im Folgenden noch näher betrachtet.

Die große Gruppe DsrL-1 lässt sich nochmals in zwei Gruppen unterteilen. Die so genannte Gruppe DsrL-1A ist fast ausschließlich in klassischen als Schwefeloxidierer eingeordneten Organismen vertreten. In der Gruppe DsrL-1B sind ebenfalls Schwefeloxidierer vertreten wie Grüne Schwefelbakterien und *Magnetococcus marinus*.

Auch unklassifizierte Deltaproteobakterien, *Nitrospira bacterium* CG2\_30\_70\_394 und *Verrucomicrobiales bacterium* NAT181 enthalten DsrL-1B. Von diesen Organismen ist allerdings vollkommen unbekannt, welche stoffwechselphysiologischen Eigenschaften diese besitzen.

Die zweite große Gruppe DsrL-2 umfasst Organismen aus den Familien der Nitrospirae, ein Mitglied der Nitrospinae, Actinobacteria (*Gaiellales bacterium* SURF\_19) und verschiedenen Deltaproteobacteria so zum Beispiel aus den Gattungen *Desulfopila* und *Desulforhopalus*. Bei den Organismen dieser Gruppe ist unbekannt, welche physiologischen Eigenschaften sie haben. Einige Vertreter der Gattungen *Desulfopila* und *Desulforhopalus* wurden allerdings bereits als Sulfatreduzierer charakterisiert (Isaksen und Teske 1996; Suzuki, D. et al. 2007).

Andere Zweige im phylogenetischen Stammbaum von DsrL-2 beinhalten Organismen von sehr diverser Taxonomie, darunter viele Deltaproteobakterien wie *Desulfurella*-Spezies, Vertreter der Acidobacteria, Armatimonadetes aber auch Kandidatenphyla wie Zixibacteria, Desantisbacteria und Schekmanbacteria.

Der phylogenetische Baum von DsrA mit den gleichen Organismen, die auch für die phylogenetische Analyse von DsrL genutzt wurden, ergab ein ähnliches Bild. Erwartungsgemäß lassen sich auch für DsrA zwei Hauptgruppen unterscheiden. Dabei handelt es sich um DsrA vom oxidativen reversen Typ (rDsrA) und um den reduktiven Typ DsrA (Abb. 5B). Alpha-, Beta-, Gamma- und Candidatus Muproteobacteria enthalten rDsrA, ebenso die Grünen Schwefelbakterien. Außerdem finden sich Nitrospirae-Vertreter mit rDsrA, darunter auch RBG\_19FT\_COMBO\_42\_15, wobei DsrA aus diesem Organismus auch in anderen Studien bereits als rDsrA eingeordnet wurde (Anantharaman et al. 2018). DsrA vom oxidativen Typ findet sich aber auch in zahlreichen Deltaproteobakterien, zum Beispiel in den Metagenomen von Spezies, die den Gattungen *Desulfopila* und *Desulforhopalus* zugeordnet werden. Wie schon von Anantharaman et al. 2018 gezeigt, haben auch in unserer Analyse die Kandidatphyla Zixibacteria, Schekmanbacteria und Desantisbacteria wie auch Lambdaproteobacteria, Actinobacteria und Armatimonadetes DsrA vom reduktiven Typ (Anantharaman et al. 2018).

Vergleicht man den phylogenetischen Baum von DsrL und DsrA in Abbildung 5 stellt man fest, dass das Auftreten von DsrL-1 durchaus mit dem Auftreten vom oxidativem Typ rDsrA korreliert. Alle Organismen mit DsrL-1 enthalten zugleich rDsrA vom oxidativen Typ. Umgekehrt enthalten auch alle Organismen/Metagenome mit DsrA vom reduktiven Typ DsrL-2. Die einzige Ausnahme von dieser Regel bildet eine Gruppe von Organismen, die rDsrA enthalten und DsrL-2. Enthalten in dieser Gruppe sind Deltaproteobacteria, Nitrospirae,

Nitrospinae bacterium UB9963, ein Vertreter der Actinobacteria (*Gaiellales bacterium* SURF19) und zwei Vertreter der Chlorobi, *Prosthecochloris marina* V1 und *Chlorobium phaeobacteroides* BS1 (siehe Abbildung 5). Die einzigen Organismen in dieser „Ausnahmegruppe“, deren Physiologie untersucht ist, sind die beiden Grünen Schwefelbakterien, die klar als Oxidierer von Schwefelverbindungen beschrieben sind (Imhoff und Thiel, Vera 2010; Bryantseva et al. 2019).

### 3.4 Vorkommen von DsrEFH in DsrL-enthaltenden Organismen

Das Protein DsrEFH ist ebenso wie DsrL essentiell für die Schwefeloxidation in *A. vinosum*. Dieses Schwefeltransferprotein vermittelt den Transport von Schwefelatomen von der Schwefeltransferase TusA zu DsrC, welches den Schwefel DsrAB zur Oxidation zur Verfügung stellt (Dahl et al. 2008; Stockdreher et al. 2014; Stockdreher et al. 2012; Tanabe et al. 2019). Auch die *dsrEFH*-Gene wurden in der Vergangenheit, ähnlich wie *dsrL* als Markergene für die Schwefeloxidation vorgeschlagen, da diese Gene in den klassischen Sulfat/Sulfit-reduzierenden Organismen ebenso wie in Schwefeldisproportionierenden Organismen fehlen (Sander et al. 2006; Stockdreher et al. 2012; Venceslau et al. 2014). Wie auch für DsrL muss dieses Bild jedoch überdacht werden, da *dsrEFH* auch in Organismen wie beispielsweise in *Candidatus* Rokubacteria entdeckt wurde, die sehr wahrscheinlich keine Schwefeloxidierer sind (Anantharaman et al. 2018). Andere Organismen, die *dsrEFH* enthalten, können wahrscheinlich in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen Schwefelverbindungen sowohl oxidieren wie auch reduzieren, wie zum Beispiel für *Candidatus* Acidulodesulfobacterales (Tan et al. 2019). *D. alkaliphilus*, der zur Sulfid-Oxidation fähig ist aber mit dem typischen *dsr*-Genset von Sulfatreduzieren ohne *dsrEFH* ausgestattet ist (Thorup Casper et al. 2017), ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die Zuordnung von Markergenen nicht so simpel ist, wie vormals angenommen (Löffler et al. 2020b).

Dennoch konnte bei einer Betrachtung von *dsrL*-enthaltenden Organismen mit *dsrEFH* ein eindeutiger Zusammenhang hergestellt werden. Ein strikter Zusammenhang in Organismen mit DsrAB vom oxidativen Typ (rDsrAB) und DsrL-1, die zudem DsrEFH enthalten, kann beobachtet werden, sodass das Auftreten dieser Proteine in Kombination nach bisherigen Erkenntnissen belastbar als Vorhersage von dissimilatorischer Schwefeloxidation dienen kann. Nur einige wenige Organismen enthalten DsrEFH in Kombination mit DsrL-2 und dem reduktiven Typ DsrAB. Zu diesen Ausnahmen zählen Vertreter der Actinobacteria und drei Spezies der Ordnung *Candidatus* Acidulodesulfobacterales (Tan et al. 2019). Wie zuvor schon erwähnt, unterstreicht dies die Möglichkeit, dass diese Organismen möglicherweise in

der Lage sind, sowohl Schwefeloxidation wie auch Sulfatreduktion zu betreiben. Leider fehlen hierzu noch experimentelle Belege. Alle verbleibenden Organismen enthalten rDsrAB und DsrL-2, welches verwandt ist zu dem DsrL aus dem Grünen Schwefelbakterium *P. marina* V1. In dieser Gruppe folgt die Verbreitung von *dsrEFH* Genen keiner offensichtlichen Regel. Während die beiden Schwefel-oxidierenden Grünen Schwefelbakterien und die Vertreter der Actinobacteria, Nitrospirae und Nitrospinae *DsrEFH* enthalten, fehlen die Gene für *DsrEFH* in den Deltaproteobacteria, die mit in diesem Ast clustern (Abbildung 5) (Löffler et al. 2020b).

### 3.5 Besondere *dsr*-Genkombinationen

Einige Organismen haben bemerkenswerte Genkombinationen, die möglicherweise helfen, die Frage zu beantworten, in welcher Weise sie Schwefel metabolisieren können. In *Myxococcales bacterium* SURF\_8 ist DsrAB vom oxidativen Typ kombiniert mit DsrL-1A kodiert in einem *dsrABEFHCMKL<sub>1</sub>L<sub>2</sub>JOP* Gencluster, was auf Schwefeloxidation hindeutet. In *A. vinosum* liegt DsrL im aktiven Zustand als Homodimer vor (Löffler et al. 2020a). Daher ist es vorstellbar, dass ein DsrL1DsrL2 Heterodimer in *Myxococcales bacterium* SURF\_8 geformt wird. Vor dem *dsr*-Gencluster findet sich ein Gen annotiert als *tauD*, das in umgekehrter Richtung transkribiert wird. Ähnliche Genkombinationen wurden auch durch Lenk et al. 2012 in fast allen untersuchten Fosmidklonen von *Roseobacter* gefunden und ebenso in den meisten in dieser Studie untersuchten (fakultativen) aeroben chemotrophen Schwefeloxidieren. Daher nannten sie das *tauD*-ähnliche Gen *dsrQ*, um den Zusammenhang zum dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel herauszustellen (Lenk et al. 2012). In den von uns untersuchten *dsrL*-enthaltenden Organismen ist das Vorhandensein von *tauD/dsrQ* nicht beschränkt auf *Myxococcales bacterium* SURF\_8. Ebenso findet sich *tauD/dsrQ* in den Deltaproteobacterium Isolaten UBA12577, UBA9332 und UBA8081 und in *Verrucomicrobiales bacterium* isolate NAT181 in einem *dsrNCABL-hyp-dsrQ-dsrEFH* Gencluster. Es wird vermutet, dass TauD/DsrQ die Freilassung von Sulfit während der Oxidation von intrazellulären oder in der Umgebung befindlichen Sulfonaten katalysiert. Möglicherweise wird Sulfit dann disproportioniert zu Sulfat und Sulfid, so wie es für Cystat und Isethionate beobachtet wurde (Denger et al. 1999). Ein ähnliches Gencluster findet sich in den Deltaproteobacteria Isolaten UBA9617 und NP955, nur dass *tauD/dsrQ* ausgetauscht ist gegen ein *tusA*-ähnliches Gen. TusA ist eine gut beschriebene Schwefeltransferase, die Schwefel für *DsrEFH* und damit für den *Dsr*-Stoffwechselweg in *A. vinosum* zur Verfügung stellt (Stockdreher et al. 2014; Tanabe et al. 2019).

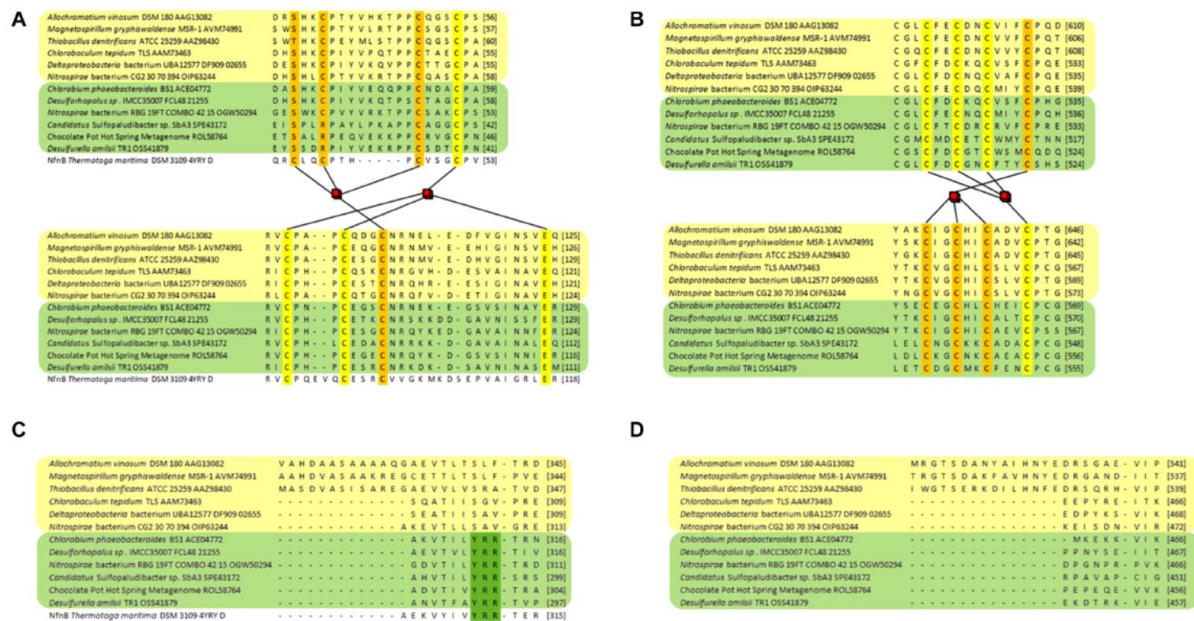
Neben *Myxococcales bacterium* SURF\_8 enthält auch *Nitrospirae bacterium* CG2\_30\_53\_67 zwei *dsrL*-Gene und auch zwei Kopien von *dsrAB*. Das erste *dsrL* Gen gehört in die zweite

Hauptgruppe von DsrL-2 und das Gen liegt in direkter Nachbarschaft zur *dsrAB*-Kopie, kodierend für DsrAB vom reduktiven Typ in einer *dsrABDL-2* Anordnung, wie zuvor schon beschrieben durch Tan et al. 2019. Das zweite DsrL ähnelt eher dem DsrL-2 von *P. marina* V1 und ist in einer Anordnung mit DsrAB vom oxidativen Typ (*rdsrABL-2*), ein Gencluster, das zuvor unentdeckt geblieben ist. Ein *dsrTMKJOPCEFH*-Gencluster findet sich an anderer Stelle ebenfalls im Genom (Tan et al. 2019). Daher ist es möglich, dass dieses *Nitrospirae bacterium* ein Gencluster speziell für die Schwefeloxidation und eines für die Sulfatreduktion besitzt. Ein weiterer Sonderfall liegt im *Gailellales bacterium* SURF19 vor. Dieses beinhaltet drei verschiedene *dsrAB*-Sets und drei verschiedene *dsrL*-Gene. Zwei der DsrA Proteine sind kodiert in einem *dsrNMCKJOPABDL-2-hyp*(PAS/Pac Sensordomäne-Protein)-*dsrEFHABL-2* Cluster. Diese DsrAB Proteine sind vom oxidativen Typ, während DsrL Proteine in die unterschiedlichen beiden Hauptgruppen von DsrL-2 fallen. Das dritte DsrA ist verwandt zu reduktivem DsrA aus Actinobacteria und kodiert in einem *dsrABL*-Cluster. Das in diesem Cluster vorhandene DsrL ist unvollständig und konnte daher nicht in die phylogenetischen Analysen einbezogen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Gailellales bacterium* SURF19 möglicherweise auch in der Lage ist, oxidativen und reduktiven Schwefelstoffwechsel zu betreiben.

Als weiterhin interessante Spezialisten erscheinen *Desulfopila* sp. strain IMC35006 und IMC35008, *Desulforhopalus* sp. IMC35007 und *Desulfobulbaceae* bacterium S5133MH15, die jeweils zwei Kopien *dsrAB* Gene besitzen. Eines dieser Gene in Kombination mit oxidativem rDsrAB (*rdsrABL-2*) und das andere mit reduktivem *dsrAB* (*dsrABD*), (Ausnahme ist der Stamm S5133MH15, in welchem der Leserahmen mit *dsrB* endet). Auch dies deutet darauf hin, dass diese Organismen die Möglichkeit haben, Schwefelmetabolismus in beide Richtungen zu betreiben, denn auch die anderen essentiellen Gene wie *dsrC* und *dsrMKJOP* sind ebenfalls an anderen Stellen im Genom kodiert. Nur *dsrEFH*-Gene fehlen in diesen Organismen (Löffler et al. 2020b).

### 3.6. Charakteristische Aminosäuresequenzen der DsrL-Typen

Angesichts unseres Interesses an einer möglichen Vorhersage von Stoffwechselmerkmalen anhand von (meta)genomischen Merkmalen und deren Verknüpfung mit biochemischen Erkenntnissen, habe ich die funktionellen Sequenzmerkmale der verschiedenen DsrL-Typen identifiziert und diese im Folgenden mit den katalytischen Eigenschaften in Beziehung gesetzt. Die Analyse der DsrL-Sequenzalignments zeigt mehrere entscheidende Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Vgl. Abb. 6).

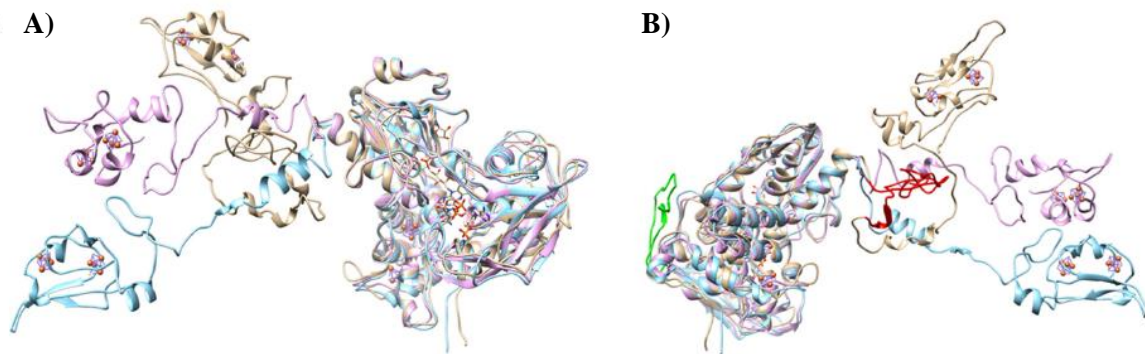


**Abbildung 6: Partielles Sequenzalignment von DsrL-Proteinen. Die Proteine der Gruppe DsrL-1 sind gelb und die Proteine der Gruppe DsrL-2 sind grün hervorgehoben.** DsrL aus *Allochromatium vinosum*, *Magnetospirillum gryphiswaldense* und *Thiobacillus denitrificans* fällt in den DsrL-1A-Zweig, während die Proteine aus *Chlorobaculum tepidum*, *Deltaproteobacteria* Bakterium UBA12577 und *Nitrospirae* Bakterium CG2\_20\_70\_394 Vertreter der DsrL-1B Gruppe sind. Die DsrL-2-Proteine aus *Chlorobium phaeoacetaeoides* BS1, *Desulfurohobalus* sp. IMCC35007 und *Nitrospirae*-Bakterium RBG\_19FT\_COMBO\_42\_15 stammen von Organismen mit rDsrA vom oxidativen Typ, während DsrL-2 aus *Candidatus Sulfohalobacter* sp. SBA3, dem Chocolate Pot Hot Spring Metagenom und *Desulfurella amilii* zusammen mit dem reduktiven Typ DsrA kodiert werden. **(A)** Dargestellt ist der aminoterminale Bereich, der zwei [4Fe4S]-Cluster bindet. Die vorhergesagten Eisenliganden sind für das distale und das proximale Cluster orange bzw. gelb hervorgehoben. **(B)** Eisen koordinierende Cysteine für die beiden [4Fe4S]-Cluster in der carboxyterminalen Ferredoxin-Domäne sind für jeden der Cluster gelb und orange markiert. **(C)** Die NAD(P)-bindende Domäne der verschiedenen DsrL-Proteine wird verglichen, hervorgehoben ist das Vorhandensein des YRR-Motivs das auf eine Interaktion mit NADP(H) in Enzymen des DsrL-2-Typs hinweist. Außerdem ist ein Teil der verlängerten Substratbindenden Domäne in den DsrL-1A-Proteinen erkennbar. **(D)** Teil der Linker-Domäne der den Hauptproteinkörper mit der carboxyterminalen Ferredoxin-Domäne verbindet, zeigt eine Verlängerung für Enzyme vom DsrL-1A-Typ. Die entsprechenden Regionen in dem strukturell charakterisierten und DsrL-verwandten Protein NfnB aus *Thermotoga maritima* (Demmer et al. 2015) sind zum Vergleich in den Feldern A und C dargestellt. Abbildung modifiziert nach (Löffler et al. 2020b).

In der N-terminalen Ferredoxin-Domäne der DsrL-Proteine sind die meisten der Aminosäuren, die zwei [4Fe4S]-Cluster im verwandten NfnB-Protein aus *Thermotoga maritima* (Demmer et al. 2015) binden, konserviert. Dies gilt für Cys47 und Cys100 (NfnB Nummerierung), die das distale Cluster koordinieren, sowie Cys51, Cys90, Cys96 und Glu117, die das proximale Cluster binden (Abb. 6 A). Bemerkenswert ist, dass Cys39, der dritte Ligand des distalen NfnB-Clusters in allen DsrL-Sequenzen entweder durch Serin oder Threonin ausgetauscht ist (Abbildung 6A). Beide Reste können als alternative Eisenliganden dienen (Bak und Elliott 2014; McLaughlin et al. 2016). Der vierte Ligand des distalen Clusters (entspricht Cys42 in NfnB) ist ein Cystein in vielen DsrL-1 und DsrL-2 Proteinen. In einigen DsrL-2 Proteinen ist

jedoch das Cystein durch Arginin ersetzt. Interessanterweise clustern diese DsrLs auch im phylogenetischen Stammbaum gemeinsam (Abb. 5). Arginin kann auch als Eisenligand dienen und wurde mit einer Verringerung des Cluster-Redoxpotentials in Verbindung gebracht (Bak und Elliott 2014). Zusammengefasst hat die große Mehrheit der N-terminalen-DsrL-Domänen die theoretische Fähigkeit, zwei [4Fe4S]-Cluster zu binden. Die einzigen Ausnahmen von dieser Regel sind die beiden Lambdaproteobakterien und *Desulfopila* sp. IMCC3006. Diese beinhalten Leucin bzw. Glycin an der entsprechenden Position, die dem Cys42 in NfnB entspricht. In den Carboxy-terminalen Ferredoxin-Domänen der DsrL-Proteine sind alle potentiell FeS-Cluster koordinierende Cysteine streng konserviert (Abb. 6 B). Auch in der NAD(P)-bindenden Domäne (Abb. 6 C) lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den DsrL-Typen erkennen. Das markante YRR-Motiv, welches in NfnB an der Koordinierung des NADP(H) beteiligt ist (Demmer et al. 2015), ist nur in DsrL-2 Proteinen konserviert. Zudem ist ein Teil der in DsrL-1A längeren Substrat-bindenden Domäne erkennbar, ein Unterschied, sowohl zu DsrL-1B wie auch zu DsrL-2 (Löffler et al. 2020b)

Proteine der Gruppe DsrL-1A weisen Linker-Domänen auf, die 30 Aminosäuren länger sind im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abb. 6D). Die Linker-Domänen scheinen das Carboxy-terminale Ferredoxin mit dem Hauptproteinkörper zu verbinden (Abbildung 7). Es wird vorhergesagt, dass diese Linkerregionen sehr flexible Strukturen annehmen, die eine Bewegung ermöglichen, wie die unterschiedlichen Positionen der carboxyterminalen Regionen in den drei überlagerten DsrL-Modellen verdeutlichen (Abb. 7A). Eine längere Linker-Region würde möglicherweise mehr Freiheit für die Positionierung der carboxyterminalen Ferredoxin-Domäne ermöglichen. Alle Proteine der Gruppe DsrL-1A weisen zudem eine deutlich längere Substratbindungsdomäne auf durch eine 32-Aminosäuren-Insertion in der NAD(P)-Bindungsstelle. Das eingefügte Polypeptid scheint eine zusätzliche Schleife zu bilden, wie ein Vergleich der modellierten Strukturen für die drei typischen DsrL-Proteine, DsrL-1A aus *Allochromatium vinosum* (AvDsrL-1A), DsrL-1B aus *Chlorobaculum tepidum* (CtDsrL-1B) und DsrL-2 aus *Desulfurella amilsii* (DaDsrL-2) verdeutlicht (Abb. 7B).



**Abbildung 7: Zwei verschiedene Ansichten der überlagerten modellierten Strukturen von AvDsrL-1A (beige), CtDsrL-1B (hellblau) und DaDsrL-2 (violett).** Zur Verdeutlichung sind FAD, NAD und [4Fe4S]-Cluster in der aminoterminalen Ferredoxin-Domäne nur für das Protein aus *A. vinosum* gezeigt. Alle diese prosthetischen Gruppen/Substrate wurden an den entsprechenden Positionen in CtDsrL-1B und DaDsrL-2 modelliert. **A)** Die hier gezeigte Ansicht veranschaulicht die verschiedenen möglichen Positionen für die Carboxy-terminalen Ferredoxin-Domänen, die im linken Teil der Abbildung dargestellt sind. **B)** In der hier gezeigten Ansicht sind die Erweiterungen in der Substrat-bindenden Domäne in grün (Aminosäuren 302-333) und der Linker-Domäne in rot (Aminosäuren 485-532) von AvDsrL-1A hervorgehoben.

### 3.7 Heterologe Produktion von DsrL-Proteinen

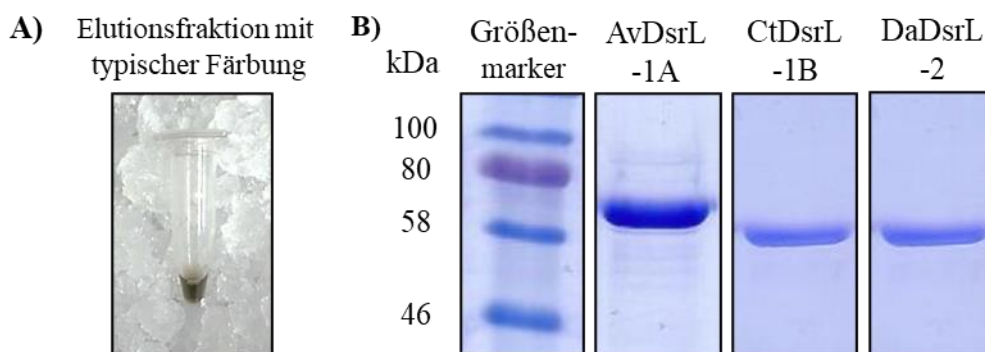
In der Vergangenheit konnte DsrL bereits erfolgreich heterolog in *E. coli* BL21 produziert werden, allerdings mit der entscheidenden Einschränkung, dass dieses Protein nur FAD enthielt und keine FeS-Cluster (Lübbe et al. 2006). Die heterologe Produktion wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung eines speziell für die Expression FeS-Clusterhaltiger Proteine angepassten *E. coli*-Stammes optimiert (siehe 2.2.5). Im *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR* Stamm wurde das *iscR*-Gen deletiert. Dieses kodiert den Regulator des *isc*-Operons (iron-sulfur-cluster), der die FeS-Cluster Assemblierungsmaschinerie bildet (Akhtar und Jones, 2008). Durch die Deletion wird die FeS-Cluster Assemblierungsmaschinerie dauerhaft exprimiert, was den Stamm zu einem sehr effizienten Produktionsstamm für FeS-Clusterhaltige Proteine macht (Akhtar and Jones, 2008; Kuchenreuther et al., 2010). Die Entwicklung optimaler Produktionsbedingungen des FeS-Flavoproteins DsrL wurde mit dem Protein aus *A. vinosum* begonnen, später waren dann nur leichte Änderungen am Protokoll notwendig für eine erfolgreiche Produktion der DsrL Proteine aus *Cbl. tepidum* und *D. amilsii* mit dieser Methode. Es wurden verschiedene Produktionsbedingungen wie Wachstumstemperatur vor und nach Induktion, Menge des Induktionsmittels und weitere Faktoren einzeln getestet und die optimalen Bedingungen, wie unter 2.2.5 beschrieben, wurden dann als Standard verwendet. Bei der Optimierung der Produktion war nicht nur die Proteinausbeute entscheidend, sondern vor Allem die Beladung der rekombinanten Proteine mit FAD und FeS-Clustern.



Um die verschiedenen DsrL-Proteine in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR produzieren zu können, wurden die entsprechenden Gene jeweils zunächst in den Expressionsvektor pET22b mit einem C-terminalen Strep-Tag kloniert und anschließend durch Transformation in chemisch kompetente Zellen des Produktionsstammes eingebracht. Die Expression wurde dann durchgeführt, wie unter 2.2.5 beschrieben und anschließend wurde DsrL unter anoxischen Bedingungen, zum Schutz der sauerstoffempfindlichen FeS-Cluster mit Strep-Tag-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 2.4.1).

### 3.8 Reinigung der rekombinanten DsrL Proteine

Die heterologe Produktion und anschließende Reinigung von AvDsrL-1A unter anoxischen Bedingungen war erfolgreich. Das gereinigte Protein zeigte eine deutliche braune Färbung (Abb. 8A). Im anschließend angefertigten Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist eine Bande zwischen 58 und 80 kDa in der Elutionsfraktion zu erkennen, die der Größe des rekombinanten Proteins mit C-terminalem Strep-Tag von 72,6 kDa entspricht (Abb. 8B). Insgesamt konnten unter den gewählten Bedingungen aus zwei Liter *E. coli* BL21(DE3)  $\Delta$ iscR Kulturen unter Verwendung der 5 ml StrepTrap-Säulen pro Reinigung zwischen 20 und 30 mg Protein gewonnen werden. Auch die heterologe Produktion der DsrL Proteine aus *D. amilsii* (DaDsrL-2) (Vanessa Klingbeil 2018) und *Cbl. tepidum* (CtDsrL-1B) (Kai Wallerang 2019) war erfolgreich. Beide Proteine konnten unter anoxischen Bedingungen mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie gereinigt werden. Auch bei diesen beiden Proteinen konnte nach Optimierung der Produktionsbedingungen eine ausreichende Proteinausbeute erreicht und braun gefärbtes Protein gereinigt werden. Die Proteinausbeuten schwankten dabei zwischen 15 bis zu 40 mg aus zwei Litern *E. coli*-Expressionskultur, womit die Produktionen ähnlich gut oder sogar besser funktionierten im Vergleich zu AvDsrL-1A. Im SDS-Gel zeigen die Elutionsfraktionen von *D. amilsii* und *Cbl. tepidum* Banden in Höhe der 58 kDa Markerbanden, was zu den erwarteten Größen von 63,6 kDa für DaDsrL-2 und 63 kDa für CtDsrL-1B passt (Abb. 8 B).



**Abbildung 8:** Erfolgreich gereinigte, rekombinant in *E. coli*  $\Delta$ *iscR* produzierte DsrL-Proteine aus *Allochromatium vinosum* (AvDsrL-1A), *Chlorobaculum tepidum* (CtDsrL-1B) und *Desulfurella amilsii* (DaDsrL-2). A) Typische Braunfärbung der Elutionsfraktion nach Strep-Tag Affinitätschromatographie, beispielhaft für AvDsrL-1A B) Elutionsfraktionen nach Reinigung AvDsrL-1A (72,6 kDa), DaDsrL-2 (63,6 kDa) und CtDsrL-1B (63 kDa) in mit Coomassie-gefärbtem 12,5 %igem SDS-Gel nach SDS-PAGE. Aufgetragen wurden auf das SDS-Gel für AvDsrL-1A 30 µg für DaDsrL-2 und für CtDsrL-1B je 25 µg. Als Proteingrößenmarker wurde hier der Color Prestained Protein-Standard, Broad Range von NEB, verwendet.

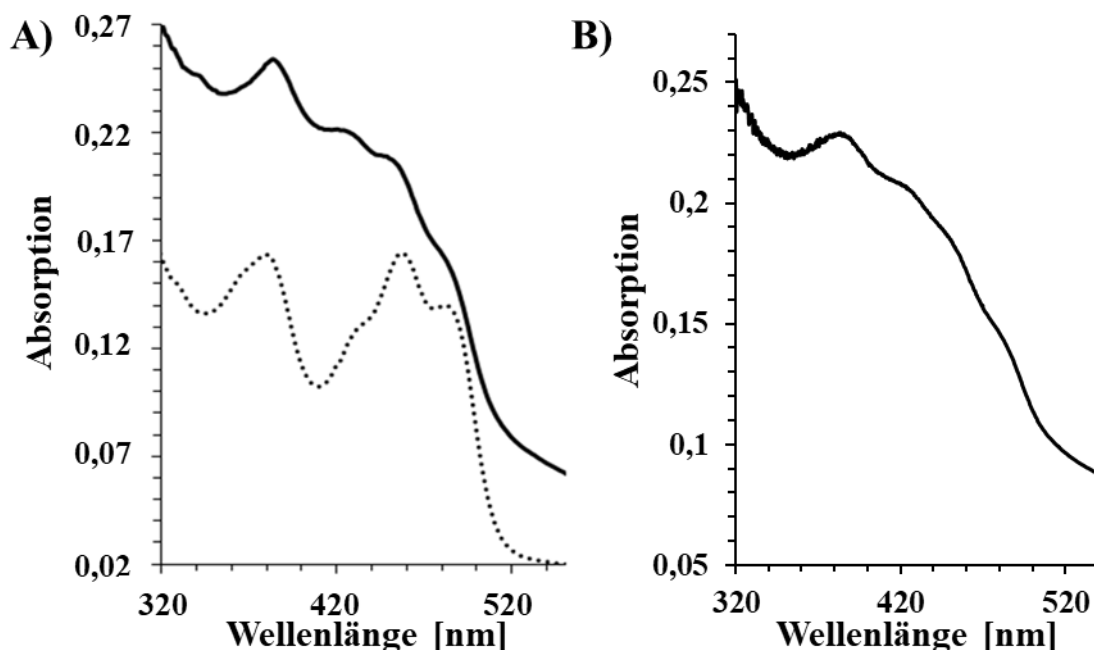
Nach erfolgreicher Reinigung wurden die Proteine, wie unter 2.4.3. beschrieben, aufkonzentriert und umgepuffert, um Rückstände der Reinigung zu entfernen. Anschließend wurde das gereinigte Protein für die weiterführenden Untersuchungen verwendet oder bis zur weiteren Verwendung anoxisch im Kühlschrank oder bei -20 °C und länger bei -70 °C gelagert. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zu CtDsrL-1B sind von Kai Wallerang im Rahmen der zu diesem Thema betreuten Arbeit erzielt worden (Kai Wallerang 2019). Die Produktion und Reinigung von DaDsrL-2 wurde durch Vanessa Klingbeil im Rahmen der Bachelorarbeit optimiert und erste Versuche zu den enzymatischen Eigenschaften wurden durchgeführt (Vanessa Klingbeil 2018). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zu den enzymatischen Eigenschaften von DaDsrL-2 wurden jedoch durch selbst produziertes und gereinigtes Protein erzielt.

### 3.9 UV-Vis-Spektroskopie

Zur Untersuchung des rekombinant produzierten DsrL und dessen Varianten wurden UV/Vis - Spektren angefertigt. Dabei konnten spektrale Charakteristika typisch für FAD und FeS-Cluster -haltige Proteine identifiziert werden. Die Spektren der verschiedenen Reinigungen im Vergleich gaben außerdem Aufschluss über die Qualität der Co-Faktorbeladung des Proteins und wurden daher routinemäßig nach jeder Proteinreinigung aufgenommen.

DsrL aus *A. vinosum* wurde früher schon erfolgreich unter aeroben Bedingungen gereinigt und wies schon da charakteristische Absorptionsmaxima für FAD-haltige Proteine bei 379 und 455 nm, sowie Schultern bei 430 und 482 nm auf (Lydia Kammler 2009). Allerdings waren in diesem aerob gereinigtem rekombinanten Protein keine FeS-Cluster enthalten und das Protein

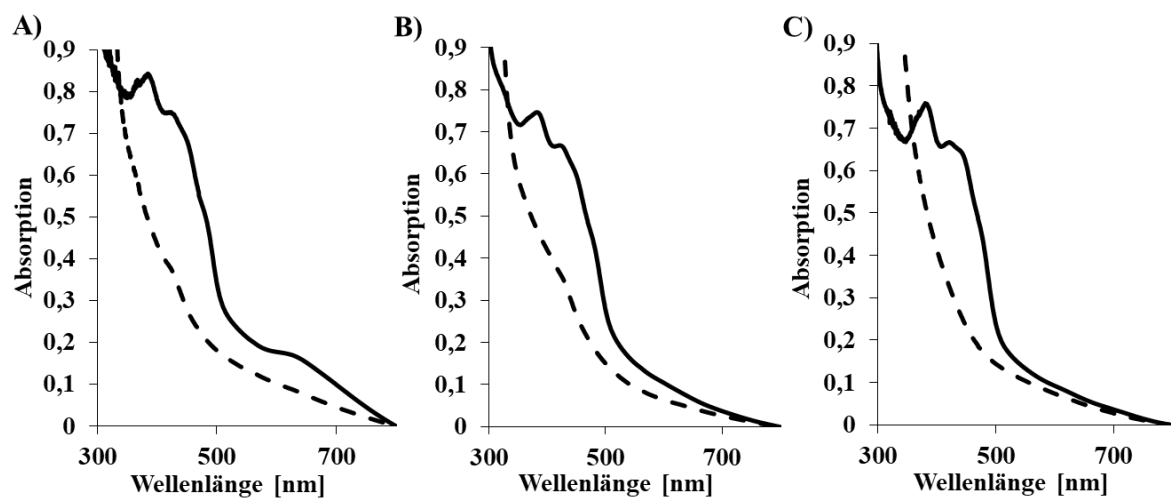
hatte nach Reinigung eine gelbe Farbe (Lydia Kammler 2009; Lübbe et al. 2006). Die FeS-Cluster konnten durch anschließende FeS-Clusterrekonstitution in das FAD-haltige Protein eingebaut werden, wodurch das Protein eine braune Farbe erhält und die Peaks des FAD-Spektrums durch die Absorption der FeS-Cluster aufgefüllt werden, siehe Abbildung 9. Durch die heterologe Produktion von *A. vinosum* DsrL-1A in *E. coli* BL21(DE3)  $\Delta$ iscR konnte das rekombinante Protein unter anaeroben Bedingungen direkt mit FAD und FeS-Clustern gereinigt werden. Das gereinigte Protein hatte eine intensive dunkelbraune Farbe und auch das UV/Vis-Spektrum unterschied sich deutlich von dem des aerob gereinigten Proteins, wie in Abb. 9 erkennbar ist.



**Abbildung 9: Typisches UV-Vis-Spektrum von rekombinantem AvDsrL-1A.** A) 32  $\mu$ M nach aerober Reinigung (gepunktete Linie) und Änderung der Absorption nach FeS-Clusterrekonstitution mit IscS (durchgehende Linie) von 25  $\mu$ M AvDsrL-1A (Lydia Kammler 2009). In der Anwesenheit von Sauerstoff gereinigtes AvDsrL enthielt nie mehr als 50 bis 60 % des erwarteten FAD-Gehalts (Lübbe 2005). B) Unter anoxischen Bedingungen produziertes und gereinigtes rekombinantes AvDsrL-1A circa 10  $\mu$ M.

Das UV/Vis-Spektrum des anaerob gereinigten DsrL Proteins hatte große Ähnlichkeit mit dem Spektrum des aerob gereinigten DsrL-Proteins nach FeS-Clusterrekonstitution und auch die braune Färbung zeigte, dass hier das Protein mit FAD und FeS-Clustern gereinigt werden konnte. Es sind die für FAD charakteristischen Absorptionsmaxima erkennbar, ein Peak bei 379 nm und, durch die FeS-Cluster-Absorption aufgefüllt, noch Schultern bei 422, 452 und 485 nm. Im Vergleich zu dem Spektrum des DsrL-Proteins nach FeS-Clusterrekonstitution erscheint die Absorption des FAD-typischen Spektrums bei dem anaerob gereinigten Enzym noch weiter mit der Absorption der FeS-Cluster aufgefüllt zu sein, insbesondere zwischen 430

und 450 nm, da die Absorptionspeaks, typisch für das FAD, noch weniger markant hervortreten (Vergleich Abb. 9 A und B). Zudem erscheint die Absorption des unter anoxischen Bedingungen produzierten und gereinigten AvDsrL-1A zwischen 300 und 500 nm insgesamt höher zu sein, was für eine bessere Beladung sowohl mit FAD wie auch mit FeS-Clustern spricht im Vergleich zur aeroben Methodik (Lübbe 2005). Auch die gereinigten DsrL -Proteine aus *D. amilsii* und aus *Cbl. tepidum* wiesen für FAD und FeS-clusterhaltige Proteine typische Absorptionen auf und zeigten vergleichbare UV-Vis-Spektren zu dem Protein aus *A. vinosum*, siehe Abbildung 10.



**Abbildung 10:** UV/Vis-Spektren der rekombinanten DsrL-Proteine, normalisiert auf 40  $\mu\text{M}$ , aus A) *A. vinosum* AvDsrL-1A, B) *Cbl. tepidum* CtDsrL-1B und C) *D. amilsii* DaDsrL-2, jeweils im as isolated und im vollständig reduzierten Zustand. Reduziert wurde mit 1 bis 4 molarem Überschuss Titan(III)-Citrat.

Alle drei DsrL-Proteine scheinen nach Reinigung unter anoxischen Bedingungen im oxidierten Zustand vorzuliegen und können mit Titan-Citrat reduziert werden, wodurch die Absorption des FADs und der FeS-Cluster nahezu vollständig abnimmt. Vergleicht man die auf 40  $\mu\text{M}$  normalisierten Spektren fällt auf, dass die Beladung mit Cofaktoren in den Proteinen aus *Cbl. tepidum* (CtDsrL-1B) und *D. amilsii* (DaDsrL-2) etwas geringer zu sein scheint. Vergleicht man die genauen Absorptionen der drei DsrL-Proteine bei den für FAD und FeS-Cluster charakteristischen Wellenlängen mit der Absorption bei 280 nm bestätigt sich dieser Eindruck, siehe Tabelle 12.

**Tabelle 12: Quotient der für die Cofaktoren charakteristischen Absorptionen zu 280 nm**

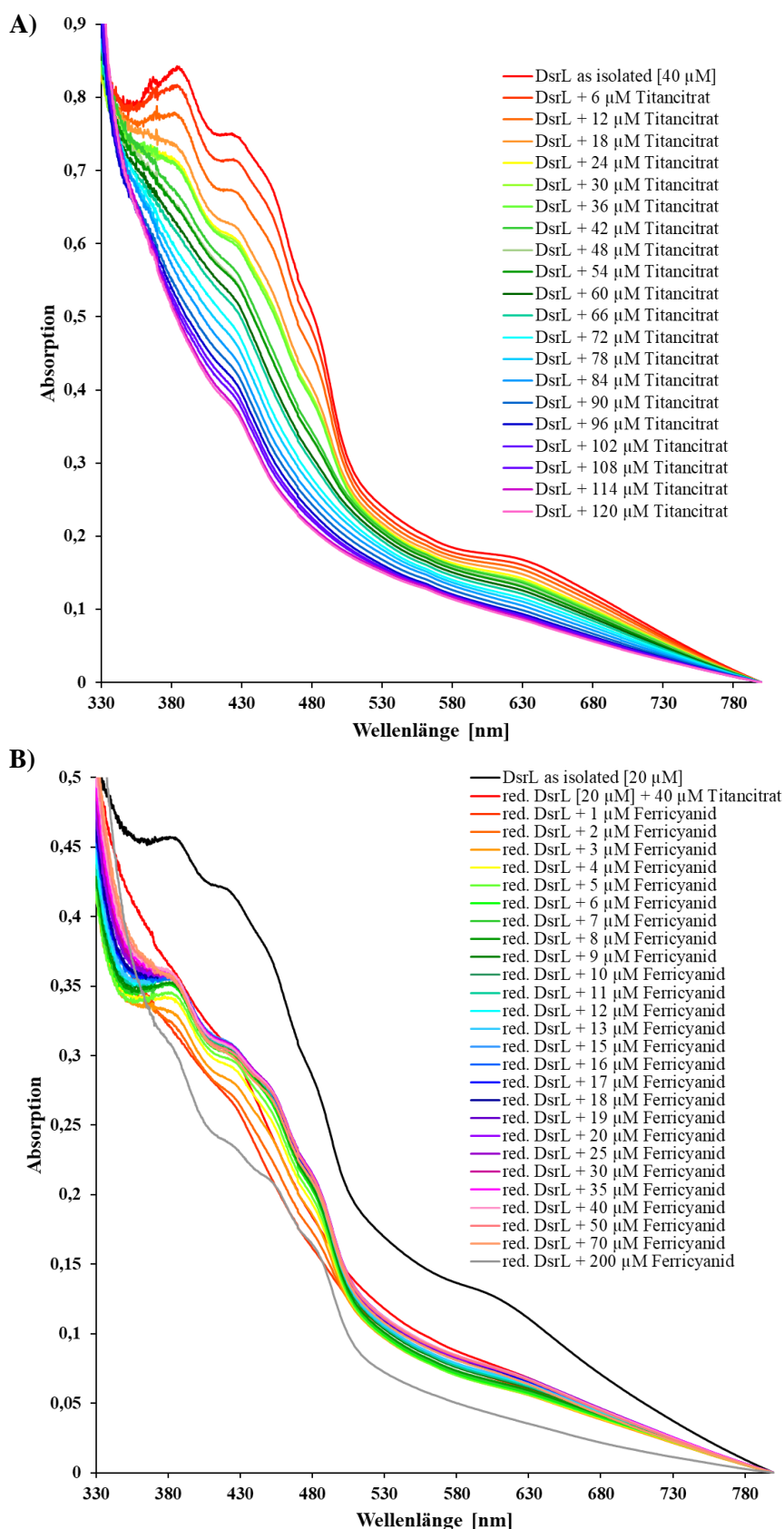
	AvDsrL-1A	CtDsrL-1B	DaDsrL-2
FAD [380 nm/280 nm]	0.31	0.36	0.36
FAD [450 nm/280 nm]	0.26	0.29	0.29
FeS [420 nm/280 nm]	0.30	0.32	0.32

Auffällig ist dabei, dass die Quotienten für DsrL aus *D. amilii* und *Cbl. tepidum* identisch sind (Kai Wallerang 2019). Die etwas andere Absorption der Co-Faktoren im Verhältnis zur Absorption des restlichen Proteins könnte also durchaus in der Proteinstruktur begründet liegen und muss nicht auf einen schlechteren Reinigungserfolg bzw. eine schlechtere Cofaktor-Beladung zurückzuführen sein. Die Reinigung aller drei rekombinanten DsrL-Proteine mit guter vergleichbarer Cofaktor-Beladung war erfolgreich.

### UV/Vis-Titrationen

Die Untersuchung von Redox Eigenschaften anhand von UV/Vis-Absorptionsspektren können Aufschluss über den Reaktionsmechanismus eines Enzyms geben. Insbesondere bei FAD-haltigen Proteinen kann der Zustand des FAD einen entscheidenden Einfluss auf die enzymatische Aktivität des Proteins haben. Insgesamt kann ein FAD in fünf verschiedenen Zuständen im Protein vorliegen. Diese Zustände umfassen das oxidierte FAD, zwei semireduzierte Semichinon-Zustände (neutrales Radikal  $\text{FADH}^\bullet$  und anionisches Radikal  $\text{FAD}^{\bullet-}$ ) oder das vollständig reduzierte Hydrochinon  $\text{FADH}^-$  oder  $\text{FADH}_2$  (Evans et al. 2013; Liu et al. 2010). Bestimmte Eigenschaften, wie die Ausbildung eines stabilen FAD-Semichinon-Radikals des FADs, lassen sich durch UV/Vis-Spektroskopie nachweisen (Liu et al. 2010; Evans et al. 2013). Die Ausbildung eines stabilen neutralen protonierten FAD-Semichinon-Radikals im Protein ist beispielsweise gekennzeichnet durch die Absorptionzunahme zwischen 600 und 650 nm und auch das anionische deprotonierte FAD Semichinon-Radikal hat eine charakteristische Absorption zwischen 350 und 400 nm. Für Elektronen bifurkierende FAD-haltige Enzyme ist es typisch, dass keine Ausbildung eines stabilen Semichinonzustandes im Protein mittels UV/Vis Spektroskopie beobachtet werden kann (Wagner et al. 2017). Dabei ist jedoch bekannt, dass die kurzzeitige Ausbildung eines Semichinon-Zustandes essentiell für den Mechanismus der Elektronenbifurkation ist. Allerdings ist dieses hochreaktive FAD-Semichinon, welches essentiell ist für die Elektronenübertragung an FeS-Cluster mit sehr negativem Redoxpotential, so kurzlebig und instabil, dass es durch UV/Vis-Spektroskopie nicht beobachtet werden kann. Da die Redoxzustände, die das FAD in einem Flavoprotein annehmen kann, einen entscheidenden

Einfluss auf den enzymatischen Reaktionsmechanismus des Proteins haben, sollten diese für DsrL mittels UV/Vis-Spektroskopie näher untersucht werden. Die Titrationsen wurden unter möglichst anoxischen Bedingungen, wie unter 2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Nach der anaeroben Reinigung liegt AvDsrL-1A vollständig oxidiert vor, da eine Zugabe von Ferricyanid und anderen Oxidationsmitteln keine weitere Erhöhung der FAD und FeS-Cluster spezifischen Absorption bewirken konnte. Nachfolgend wurden 40  $\mu\text{M}$  AvDsrL durch die Titration mit Titancitrat als Reduktionsmittel schrittweise reduziert (siehe Abbildung 11A). Die Spektren zeigen eine stetige Abnahme der FAD-typischen Absorption bei 385 nm und der Schultern bei 422, 452 und 485 nm mit zunehmender Reduktion. Bei einer Konzentration von 54  $\mu\text{M}$  Titancitrat ist kaum noch eine FAD-charakteristische Absorption der typischen FAD Peaks zu erkennen, deutlich aber noch eine Absorption mit einer Schulter bei 427 nm. Diese nimmt weiter ab bei Zugabe von Titancitrat, ist aber nicht ganz reduzierbar, denn selbst bei vollständiger Reduktion mit 120  $\mu\text{M}$  Titancitrat ist dieses Absorptionsmaximum noch leicht erkennbar. Durch eine weitere Zugabe von Titancitrat konnte keine weitere Abnahme der Absorption erreicht werden. Auch eine Absorption im Bereich zwischen 580 und 730 nm mit einem Maximum bei 627 nm konnte beobachtet werden. Auch diese Absorption nahm bei Reduktion mit Titancitrat stetig ab. Bei dieser Titration konnte kein Auftreten eines stabilen Semichinon-Zustandes beobachtet werden, da in keinem der erwarteten Bereiche eine charakteristische Absorption bei Reduktion auftrat und bei vollständiger Reduktion wieder verblasst ist, wie es typisch für einen solchen Zustand ist (Evans et al., 2013; Liu et al., 2010). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Reduktion mit Na-Dithionit erzielt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 11: UV/Vis-Spektren der Titration von rekombinantem AvDsrL-1A mit Reduktions- bzw. Oxidationsmitteln.** Für die UV/Vis-Spektroskopie wurden 40  $\mu\text{M}$  **A)** bzw. 20  $\mu\text{M}$  **B)** Protein in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 eingesetzt **A)** Schrittweise Reduktion des Proteins im as isolated Zustand durch schrittweise Zugabe von Titancitrat **B)** Vollständige Reduktion des Proteins mit Titancitrat und anschließende schrittweise Oxidation mit Ferricyanid.

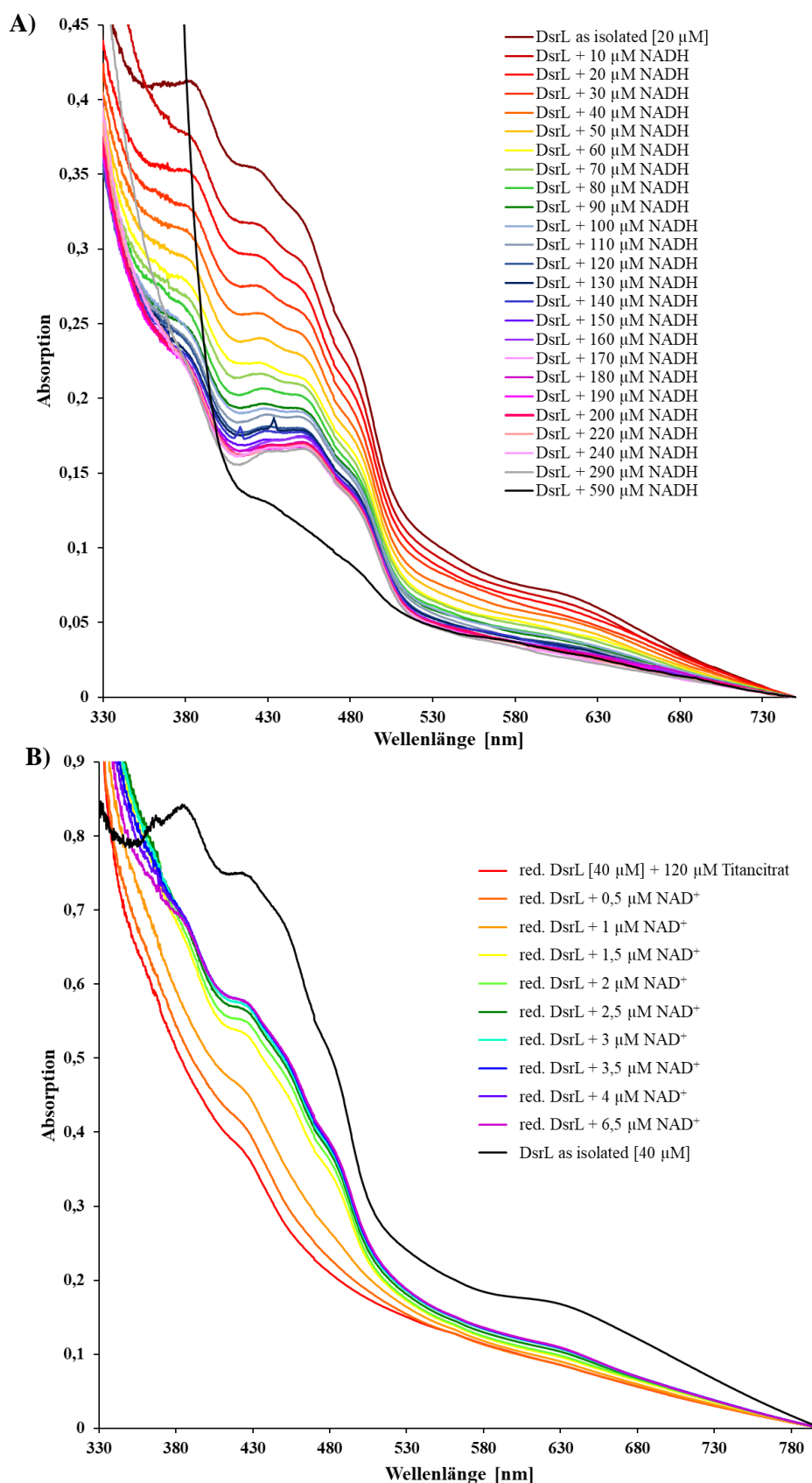
Um die Ausbildung eines stabilen Semichinons zu prüfen wurde ebenfalls das vollständig mit Titancitrat (oder Na-Dithionit, Daten nicht gezeigt) reduzierte AvDsrL-1A auch nochmals mit Ferricyanid (+420 mV) reoxidiert (siehe Abbildung 11B). Dabei wurde ein ungewöhnliches Verhalten auch bei mehrmaliger Wiederholung des Versuchs, auch mit anderen Oxidationsmitteln, wie Dichlorophenolindophenol (DICIP) (+217 mV), beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch die Verwendung von Natriumdithionit als Reduktionsmittel vor Reoxidation führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Titrationsen wurden mehrfach mit unterschiedlichen Kombinationen wiederholt. Die hier dargestellte Titration mit Ferricyanid ist exemplarisch, spiegelt aber das Resultat der anderen Titrationsversuche. Die Absorptionspeaks, typisch für FAD, erschienen wieder, aber insgesamt konnte das Absorptionsniveau des AvDsrL-1A trotz großer zugegebener Mengen Ferricyanid nicht wiederhergestellt werden. Eine vollständige Reoxidation des Proteins scheint mit dieser Methode nicht möglich. Die Ursache dafür bleibt unklar, da keine erhebliche Proteindenaturierung, auch nicht bei Zentrifugation des Versuchsansatzes, beobachtet werden konnte. Erst bei Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Ferricyanid auf 20  $\mu\text{M}$  Protein konnte eine Abnahme des Peaks bei 280 nm und ein leichter weißlicher Niederschlag in der Küvette beobachtet werden. Dieser Titrationsversuch wurde mehrfach wiederholt, führte aber immer zu dem gleichen Ergebnis, dass eine Reoxidation des Proteins nicht vollständig gelingt unter diesen Bedingungen. Trotz Abzug der Verdünnung ist zudem auffällig, dass die Absorption nach Zugabe von Ferricyanid sogar unter das Absorptionsniveau des vollständig reduzierten AvDsrL-1A sinkt, die charakteristischen Absorptionen des FAD aber dennoch wieder hervortreten. Ähnliches wurde auch bei Titrationsen mit Na-Dithionit als initiales Reduktionsmittel und anschließender Oxidation mit Ferricyanid beobachtet, wobei keine experimentelle Ursache für diesen Effekt gefunden werden konnte.

Außerdem wurden Titrationsen von AvDsrL-1A mit NADH und  $\text{NAD}^+$  als enzymatische Substrate durchgeführt. Eine Reduktion von AvDsrL-1A mit NADH war möglich, allerdings nur in nicht stöchiometrischen Mengen. Wie in Abbildung 12 zu erkennen, wurde 20  $\mu\text{M}$  AvDsrL-1A mit NADH in 10  $\mu\text{M}$ -Schritten reduziert. Die Gesamtabsorption nimmt stetig ab, bis nach Zugabe von 240/290  $\mu\text{M}$  NADH schließlich kaum noch eine Änderung erreicht wird, die Absorption, charakteristisch für FAD, ist noch deutlich erkennbar, obwohl hier bereits ein über 10-facher Überschuss in  $\mu\text{M}$  von NADH vorliegt. Erst die Zugabe von 590  $\mu\text{M}$  NADH führte zur vollständigen Reduktion von 20  $\mu\text{M}$  AvDsrL-1A (siehe Abbildung 12A). Auch dieser Versuch wurde mehrfach wiederholt, mit vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht dargestellt).



Auch die Oxidation von reduziertem AvDsrL-1A mit  $\text{NAD}^+$  stellte sich als schwierig heraus. Interessanterweise ergab sich ein ähnliches Verhalten wie bei dem Versuch, AvDsrL-1A mit Ferricyanid zu oxidieren. Das vollständig mit Titancitrat reduzierte DsrL wies nur noch die schon zuvor beobachtete Absorption bei 427 nm auf (siehe Abbildung 12B). Durch Zugabe von bereits nur  $0,5 \mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  erhöht sich diese Absorption schon leicht. Nach Zugabe von nur  $1,5 \mu\text{M}$  macht die Absorption einen Sprung und das FAD-typische Spektrum von AvDsrL-1A ist wieder erkennbar, mit Schultern bei 422, 452 und 485 nm. Diese Absorption erhöht sich noch leicht bei weiterer Zugabe von  $\text{NAD}^+$  aber nur bis  $6,5 \mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ , wobei auch hier, wie schon bei der Titration mit Ferricyanid, das Absorptionsniveau des vollständig oxidierten Proteins im Zustand nach der Reinigung nicht mehr erreicht werden konnte. Die Zugabe von größeren Mengen  $\text{NAD}^+$  führte zu keiner charakteristischen Absorptionzunahme mehr, auch hier konnten keine Anzeichen für eine Proteindenaturierung beobachtet werden.

Interessanterweise konnten auch für die anderen DsrL-Proteine aus *D. amilsii* (DaDsrL-2) und aus *Cbl. tepidum* (CtDsrL-1B) vergleichbare UV/Vis-Titrations bei der Reduktion mit Titancitrat oder Na-Dithionit aufgenommen werden (Vanessa Klingbeil 2018; Kai Wallerang 2019). Ein markanter Unterschied ergab sich jedoch bei der Reoxidation durch die Zugabe von Ferricyanid als Oxidationsmittel. Während bei CtDsrL-1B ein ähnliches Phänomen wie bei AvDsrL-1A auftrat und das reduzierte Protein nicht wieder vollständig bis zur Absorption des as isolated-Proteins oxidiert werden konnte, war dies bei DaDsrL-2 mit Ferricyanid möglich (Kai Wallerang 2019).

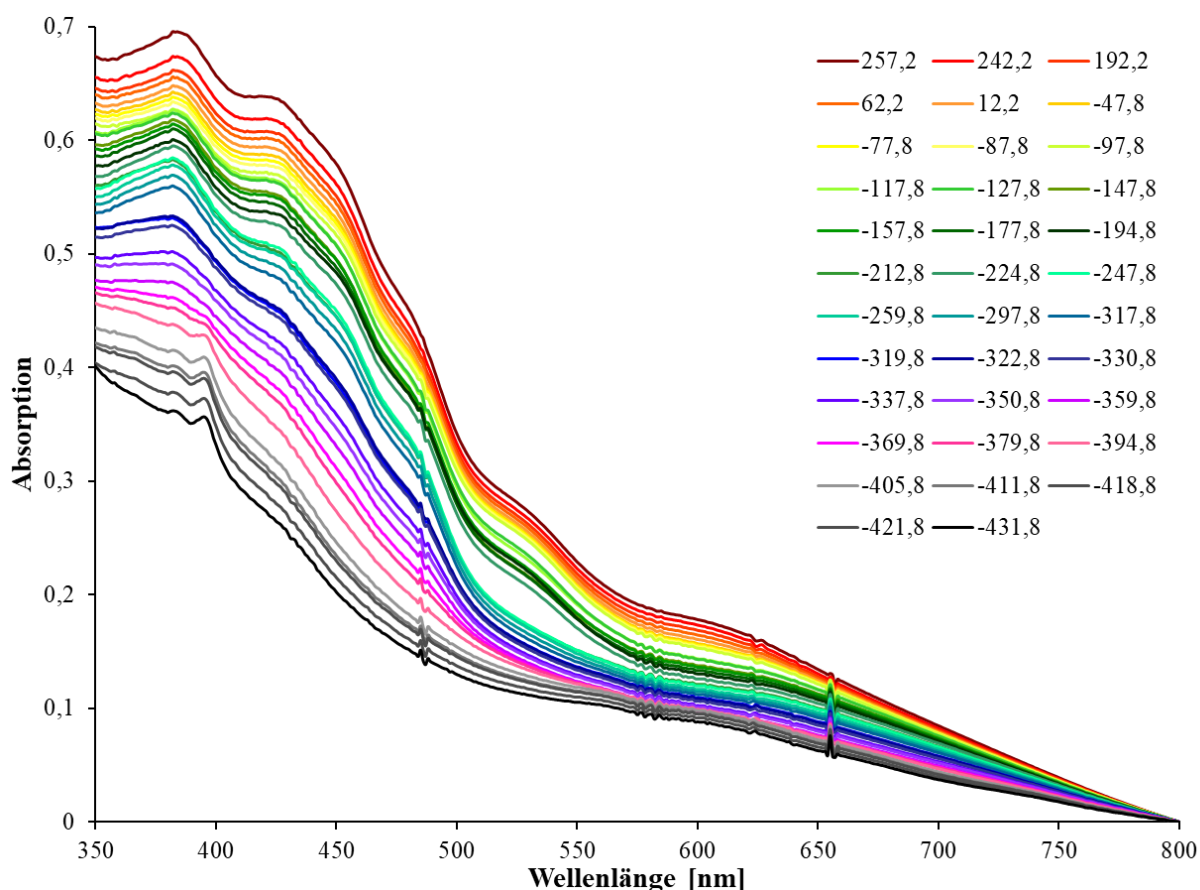


**Abbildung 12:** UV/Vis-Spektren der Titration von rekombinantem AvDsrL-1A mit NADH und NAD<sup>+</sup> als Reduktions- bzw. Oxidationsmitteln. Für die UV/Vis-Spektroskopie wurden 20  $\mu\text{M}$  **A)** bzw. 40  $\mu\text{M}$  **B)** AvDsrL-1A Protein in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 eingesetzt **A)** Schrittweise Reduktion des Proteins im wie isoliertem Zustand (as isolated) durch schrittweise Zugabe von NADH **B)** Vollständige Reduktion des Proteins mit Titancitrat und anschließende Oxidation mit NAD<sup>+</sup>.

### UV/Vis-Redoxtitration

Um das Redoxpotential der Cofaktoren in DsrL zu bestimmen wurden Redox titrationen durchgeführt. Für das in AvDsrL-1A enthaltene FAD wurden Redox titration unter anoxischen Bedingungen durchgeführt und die Änderungen der Absorption während der Titration wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie aufgezeichnet. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.5.2. beschrieben. Die Titrationen stellten eine große Herausforderung dar, da das Protein insgesamt ein sehr negatives Redoxpotential zu haben scheint. Nach der Zugabe von Reduktions- oder Oxidationsmitteln, insbesondere aber nach Zugabe von Oxidationsmitteln musste eine lange Zeit (teilweise über 60 Minuten) abgewartet werden, bis sich das Redoxpotential stabilisiert hatte. Manchmal musste erneut mehr Oxidationsmittel hinzugegeben werden, um das gewünschte positivere Redoxpotential zu erreichen. Die vorliegenden Versuchsbedingungen und die Methodik schienen nicht optimal, was anhand der stark von den Erwartungen abweichender Ergebnisse sichtbar wurde. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt. Unter anderem wurde mittels eines Wasserbades versucht, die Temperatur während des Versuches konstanter auf 21°C zu halten. Da das Labor nicht klimatisiert war, stieg die Raumtemperatur/Temperatur im Anaerobenzelt innerhalb der vielen Stunden des Versuches um mehrere Grad an, durch hohe Außentemperaturen sowie die Abwärme des Photometers und der Rührung. Zumindest teilweise auswertbare Ergebnisse mit einem auswertbaren Titrationsverlauf konnten nach Optimierung der Versuchsbedingungen für zwei Titrationen, eine bei pH 7.0 und eine bei pH 6.0, erzielt werden. In der folgenden Abbildung sind die aufgezeichneten UV/Vis-Spektren der Redox titration bei pH 7.0 zu den unterschiedlichen gemessenen Redoxpotentialen dargestellt. Die UV/Vis-Spektren der auswertbaren Titration bei pH 6.0 sind hier nicht gezeigt. Der generelle Verlauf und die Form der UV/Vis-Spektren war dabei vergleichbar. Auch bei den Redox titrationen konnte nach Reduktion keine vollständige Reoxidation trotz Anwesenheit von Redoxmediatoren erreicht werden, sodass immer von der as isolated oxidierten AvDsrL-1A Form das Redoxpotential weiter oxidiert/positiver titriert wurde und anschließend reduziert wurde. Titrationen in die andere Richtung ergaben keine für eine Nernst-Simulation auswertbaren Daten. Zudem blieb das Redoxpotential nicht stabil und wurde nach Zugabe von Oxidationsmitteln wieder schnell negativer, sodass ein Einstellen des gewünschten zu messenden Redoxpotentials auch über Stunden nicht stabil möglich war. Auffällig und inkonsistent war auch, dass nach Ansetzen der Redox titration (Puffer + Redoxmediatoren + as isolated-Protein) das Redoxpotential über einen langen Zeitraum sank und sich erst nach 2 bis 3 Stunden im Bereich zwischen -120 und -190 mV einpendelte. Dieser Wert schwankte zwischen den einzelnen Titrationsversuchen stark und die genaue Ursache

(schwankende Versuchstemperaturen,  $H_2$ -Konzentration u.ä. Faktoren) konnten im Verlauf der aufwendigen Versuchsreihen leider nicht ermittelt werden. Auch ist der genaue Mechanismus unbekannt. Da aber vom negativen Startpunkt ausgehend eine Erhöhung der Absorption durch die Zugaben von Oxidationsmitteln erreicht werden kann, ist zu vermuten, dass das Protein im Versuchsansatz und unter den gewählten Bedingungen leicht reduziert wird (siehe Abb. 13).



**Abbildung 13:** UV/VIS-Spektren 20 µM AvDsrL-1A, aufgenommen während der Redox Titration bei pH 7,0 und verschiedenen Redoxpotentialen, angegeben in mV. Start der Titration bei -147,8 mV zunächst in die positive Richtung durch Zugabe von Ferricyanid als Oxidationsmittel, anschließend durch Zugabe von Na-Dithionit in die reduktive Richtung.

Wie in der Abbildung 13 zu erkennen, nimmt die Absorption von AvDsrL-1A vom positiven zum negativen Redoxpotential stetig ab. Ein deutlicher Sprung in der Absorption ist zwischen -250 und -260 mV zu erkennen, wobei auch im negativeren Bereich, auch unter -300 mV, noch die für FAD charakteristischen Absorptionsmaxima erkennbar sind und erst ab circa -350 mV die für FAD charakteristischen Absorptionsmaxima verschwinden. Zur Berechnung des Redoxpotentials wurde die Absorption bei 450 nm verfolgt. Diese wurde normiert, sodass die Werte zwischen 0 und 1 aufgetragen werden konnten. Zur Bestimmung der Redoxpotentiale wurden die normalisierten Absorptionen bei 450 nm aufgetragen und mit Hilfe der Nernst-Gleichung Kurven bei verschiedenen Redoxpotentialen simuliert.

Dabei wurden die Redoxpotentiale in der Gleichung angepasst, bis die Kurve der Simulation bestmöglich zu den tatsächlich gemessenen Daten passte. Hierzu wurde die Residuenquadratsumme (SQR) ermittelt. Zur exakten Berechnung der Simulationskurven mit dem  $E^{0'}$ -Redoxpotential mit der geringsten Abweichung zu den Messwerten wurde mit Hilfe von Excel-Solver mit der GRC-Nicht linear-Lösungsmethode und der Variable  $E^{0'}$  sowie der Bedingung SQR möglichst minimal, die Simulationskurve ermittelt, die am besten die gemessenen Werte widerspiegelt (siehe Abb. 14).

Angepasste Nernst-Gleichung:

$$\Delta E = \frac{RT}{zeF} * \lg \frac{c_{ox}}{c_{red}}$$

Unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur gilt vereinfacht für die Titration folgende Annahme:

$$\Delta E = \frac{59 \text{ mV}}{ze} * \lg \frac{\text{Anteil oxidiert}}{\text{Anteil reduziert}}$$

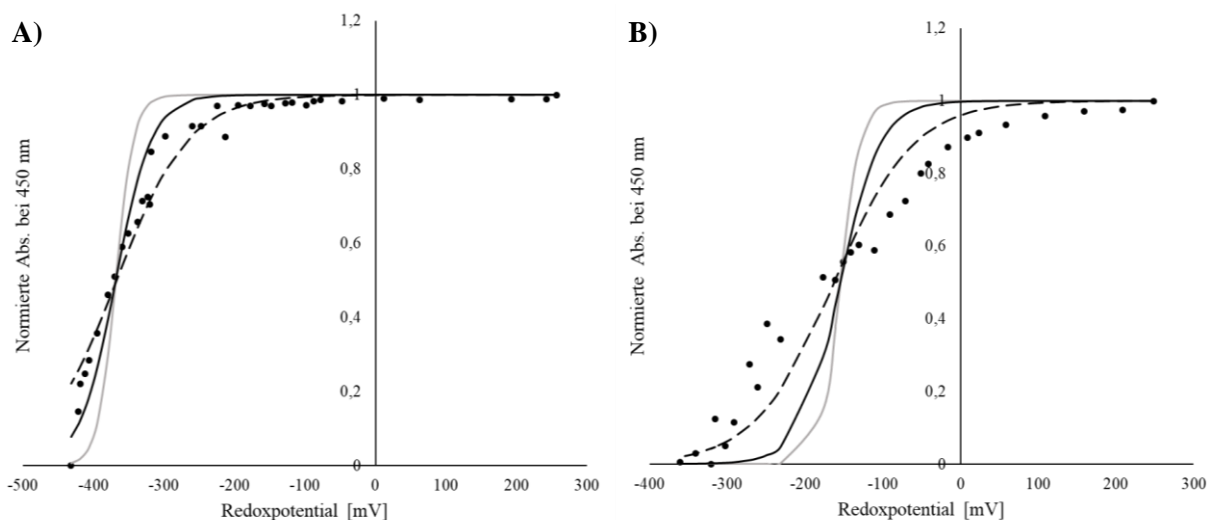
ze= Zahl der übertragenen Elektronen

$$\frac{\text{Anteil oxidiert}}{\text{Anteil reduziert}} = \frac{(1 - x)}{x}$$

Umgestellt und aufgelöst ergibt sich folgende Formel:

$$x = 1 / (1 + \left( 10^{\left( \frac{E - E_0}{59 \text{ mV}} \right)} \right))$$

Für E wurden die Redoxpotentiale der Messungen eingetragen.  $E^{0'}$  wurde verändert, bis die Simulation bestmöglich zu den Messpunkten mit der geringsten Abweichung der SQR passte (siehe Abb. 14).



**Abbildung 14: Normierte Absorption (Max = 1; Min = 0) bei 450 nm von AvDsrL-1A bei verschiedenen Redoxpotentialen (Punkte) im Verlauf der Redox Titration bei A) pH 7.0 und B) pH 6.0. Gestrichelt: Simulation der Nernst-Gleichung mit einem halben übertragenen Elektron bei A)  $E^{0'} = -367$  mV (SQR=0,11) und B)  $E^{0'} = -163$  mV (SQR=0,21). Schwarz: Simulation der Nernst-Gleichung mit einem übertragenen Elektron in A)  $E^{0'} = -368$  mV (SQR=0,15) und B)  $E^{0'} = -155$  mV (SQR= 0,70). Grau: Simulation Nernst-Gleichung mit zwei übertragenen Elektronen A)  $E^{0'} = -369$  mV (SQR=0,60); B)  $E^{0'} = -155$  mV (SQR= 1,08).**

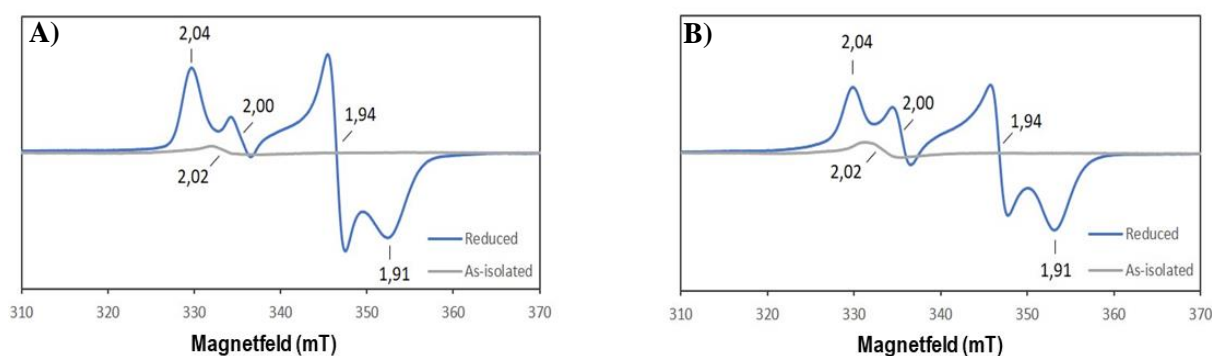
Die Simulation mit dem niedrigsten Fehler ergab sich bei der Annahme, dass nur ein halbes Elektron übertragen wird und nicht, wie für FAD üblich, zwei Elektronen. Dabei ergab sich ein Redoxpotential von  $E^{0'} = -367$  mV mit einem SQR-Wert von 0,11 bei pH 7.0. Ähnliche Werte ergibt auch die Simulation bei pH 7.0 für die Übertragung von einem Elektron mit -368 mV und  $R^2$ -Wert von 0,15. Für zwei Elektronen ergab sich ein deutlich höherer SQR-Wert mit 0,60 bei -369 mV für  $E^{0'}$ . Weitere für FAD charakteristische Wellenlängen wurden ebenfalls ausgewertet und Simulationen wurden durchgeführt und die entsprechenden Fehlerraten bestimmt. Alle Ergebnisse führten hierbei zu einem ähnlichen Redoxpotential (Abweichungen von 1 bis 4 mV, Daten nicht dargestellt). Bei pH 6.0 wurden die Redoxpotentiale in gleicher Weise durch Titration bestimmt. Auch hier war die Abweichung der Simulation bei der Annahme der Übertragung von einem halben Elektron wesentlich geringer im Vergleich zu der Übertragung von einem oder zwei Elektronen. Insgesamt war die Abweichung der ermittelten Daten bei pH 6.0 von den Simulationen, aber deutlich höher im Vergleich zu der Titration bei pH 7.0. Bei pH 6.0 ergibt sich ein wesentlich positiveres Redoxpotential von -163 mV bei der Übertragung von einem halben Elektron. Bei der Annahme einer Ein- oder Zwei-Elektronenübertragung ergibt sich ein Redoxpotential von -155 mV, wobei die Abweichung der Simulation zu den Messwerten hier sehr hoch ist (SQR= 0,70 und 1,08). Für das FAD in AvDsrL-1A lässt sich anhand dieser Methode und deren Ergebnisse das vorläufige Redoxpotential von etwa -370 mV bei pH 7.0 und -163 mV bei pH 6.0 feststellen, wobei die

theoretische Übertragung von nur einem halben Elektron die niedrigste Abweichung zu den Messwerten bei beiden gemessenen pH-Werten ergibt.

### 3.10 EPR-Spektroskopie und Redox Titration

Die Beschaffenheit der Eisen-Schwefel-Cluster in DsrL wurden mittels paramagnetischer Elektronenresonanzspektroskopie untersucht. Die EPR-Spektren und die potentiometrische Titration mit anschließender EPR-Spektroskopie wurden in Kooperation mit Dr. Sofia Venceslau am ITQB in Portugal durchgeführt. Es sollte Aufschluss über die Art der FeS-Cluster in DsrL gewonnen werden. Außerdem wurde für AvDsrL-1A auch eine potentiometrische Titration mit anschließender EPR-Spektroskopie durchgeführt um das Redoxpotential der FeS-Cluster zu bestimmen.

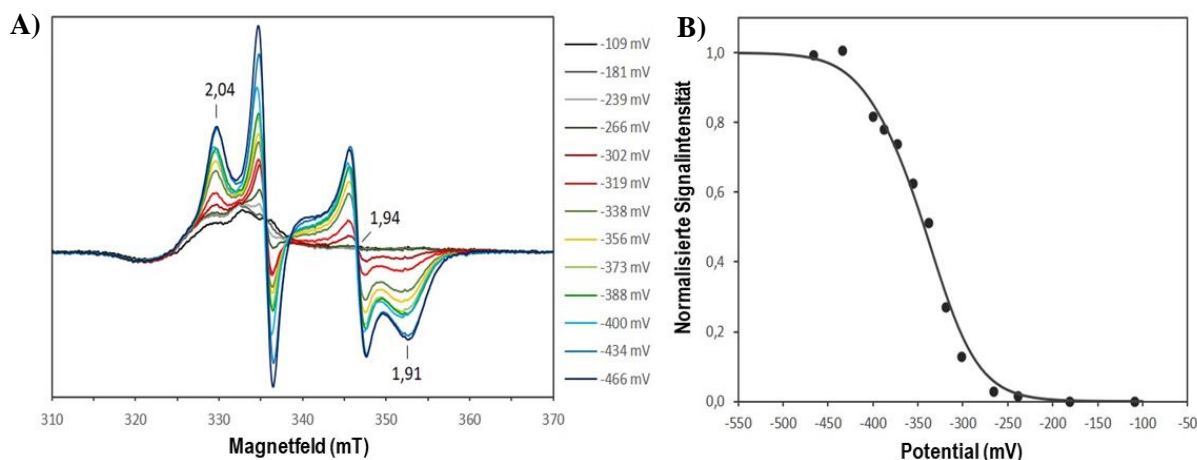
Die EPR-Spektren von AvDsrL-1A und DaDsrL-2 im isolierten Zustand zeigten ein sehr schwaches isotropes Signal, das bei  $g = 2,02$  zentriert ist und auf das Vorhandensein eines  $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Clusters hindeutet, das im oxidierten Zustand paramagnetisch ist. Sowohl reduziertes AvDsrL-1A als auch reduziertes DaDsrL-2 wiesen ähnliche rhombische Signale auf, die für das Vorhandensein von  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Clustern (Abb. 15) sprechen. Die Integration der relativen Intensität des  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Signals im Vergleich zu den  $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Signalen ergab einen 22-mal höheren Wert für AvDsrL-1A und 19-mal höheren Wert für DaDsrL-2 für das  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Signal. Dies deutet darauf hin, dass in beiden Fällen das Signal der  $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Cluster wahrscheinlich auf einen geringen Abbau der  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}$ -Cluster zurück zu führen ist.



**Abbildung 15: EPR-Spektren im as isolated und im reduzierten Zustand der rekombinanten Proteine aus A) Av-DsrL-1A und B) DaDsrL-2 (Abbildung modifiziert nach (Löffler et al. 2020b)).**

Um weitere Einblicke in die Eigenschaften der FeS-Cluster zu erhalten, wurde eine Redox-Titration des AvDsrL-1A-Proteins in Gegenwart von Redoxmediatoren im Anaerobenzelt durchgeführt, beginnend mit dem Protein im as isolated-Zustand (vollständig oxidiert) und anschließender schrittweisen Reduktion durch Zugabe von Na-Dithionit. Das Signal bei  $g = 2,02$  wird durch die Anwesenheit von Redoxmediatoren maskiert und war durch EPR-

Spektroskopie daher nicht titrierbar. Das EPR-Spektrum des vollständig reduzierten AvDsrL-1A am Ende der Titration zeigt das gleiche rhombische  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ -Signal, wie auch in der Probe ohne Mediatoren (Vgl. Abb. 15A und 16A).



**Abbildung 16: EPR-Spektroskopie begleitete Redox Titration A) Potentiometrische Titration AvDsrL-1A, zur Auswertung wurde die Signalintensität bei  $g=1,94$  verfolgt. B) Auswertung der potentiometrischen Titration von AvDsrL-1A.** Aufgetragen sind die normierten Signalintensitäten bei  $g=1,94$  und die anhand der Nernst-Gleichung berechneten Simulationskurve mit angenommenen Redoxpotentialen von  $-330\text{ mV}$  und  $-390\text{ mV}$  in einem 3:1 Verhältnis.

Die Intensität des Signals bei  $g = 1,94$  wurde während der potentiometrischen Titration verfolgt (Abb. 16A), um das Redoxpotential der FeS-Cluster zu bestimmen. Dafür wurde die Signalintensität bei  $g=1,94$  zwischen 1 und 0 normalisiert. Das Signal beginnt erst unterhalb von  $-270\text{ mV}$  zu erscheinen, was auf ein recht negatives Redoxpotential für die  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+/+}$ -Cluster hinweist. Zur Bestimmung der Redoxpotentiale wurden die normalisierten Signalintensitäten aufgetragen und mit Hilfe der umgestellten und angepassten Nernst-Gleichung Kurven bei verschiedenen Redoxpotentialen simuliert. Dabei wurden die Redoxpotentiale  $E^0$  in der Gleichung verändert, bis die Kurve der Simulation bestmöglich zu den tatsächlich gemessenen Daten passte.

Anpassung Nernst-Gleichung:

$$\Delta E = \frac{RT}{zeF} * \lg \frac{c_{ox}}{c_{red}}$$

Unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur gilt vereinfacht für die Titration folgende Annahme:

$$\Delta E = \frac{59\text{ mV}}{ze} * \lg \frac{\text{Anteil oxidiert}}{\text{Anteil reduziert}}$$

$ze$  = Zahl der übertragenen Elektronen gleich 1 für FeS-Cluster

$$\frac{\text{Anteil oxidiert}}{\text{Anteil reduziert}} = \frac{(1 - x)}{x}$$



Umgestellt und aufgelöst ergibt sich folgende Formel:

$$x = 1 / \left( 1 + \left( 10^{\left( \frac{E - E^0}{59 \text{ mV}} \right)} \right) \right)$$

Für E wurden die Redoxpotentiale der Messungen eingetragen.  $E^0$  wurde verändert, bis die Simulation bestmöglich zu den Messpunkten passte. Die beste Simulation konnte unter Berücksichtigung der Summe von vier Clustern mit mittleren Redoxpotentialen ( $E^0$ ) von -330 mV bzw. -390 mV in einem Verhältnis von 3:1 ermittelt werden, was mit dem erwarteten Vorhandensein von vier  $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+/+}$ -Zentren übereinstimmt (Abbildung 16B) und zudem im Einklang mit den Beobachtungen der UV/Vis-Redox titrationen ein deutlich negatives Redoxpotential aller Cofaktoren in AvDsrL-1A bestätigt.

### 3.11 NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität

Die Charakterisierung von AvDsrL-1A als NAD(P)H-Oxidoreduktase erfolgte bereits in einer früheren Arbeit (Lübbe, 2005). Hier sollten die enzymatischen Eigenschaften des anaerob gereinigten rekombinanten AvDsrL-1A mit den früheren Ergebnissen verglichen werden und weitere Erkenntnisse zu der Substratspezifität des Enzyms gewonnen werden. Außerdem sollten die Assays unter strikt anaeroben Bedingungen im Anaerobenzelt durchgeführt werden. Ziel war es insgesamt auch die gemeinsame Aktivität von DsrL im Zusammenhang mit DsrAB untersuchen zu können um Erkenntnisse über die *in vivo*-Funktion von DsrL zu gewinnen. Des Weiteren wurden auch die enzymatischen Eigenschaften von DsrL aus *D. amilsii* und aus *Cbl. tepidum* untersucht und mit den Eigenschaften von AvDsrL-1A verglichen.

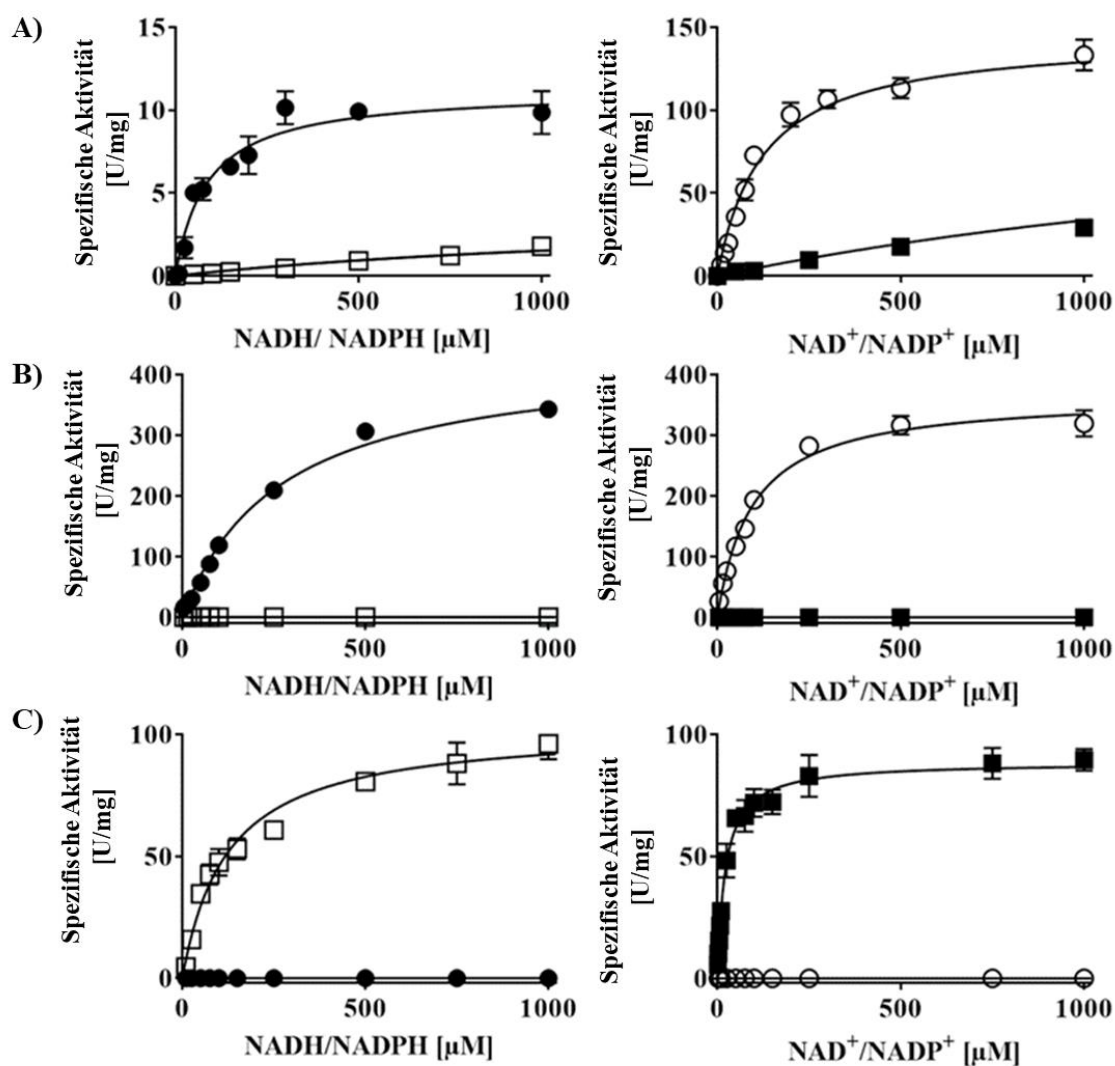
Die enzymatischen Assays wurden alle unter anoxischen Bedingungen durchgeführt und die kinetischen Parameter für die Substrate  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  und  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  wurden in dreifacher Bestimmung für jede eingesetzte Konzentration gemessen. Die bereits zuvor bestimmten Enzymoptima für Temperatur, pH-Wert und Puffer für AvDsrL-1A wurden zunächst übernommen. Allerdings wurde der Puffer von Tris-HCl-Puffer auf Kaliumphosphatpuffer gewechselt. Dies geschah nach Testung der Aktivität in diesem Puffer, um einen mit DsrAB kompatiblen Puffer verwenden zu können. Die Temperatur und pH-Optima der Enzyme aus *D. amilsii* (DaDsrL-2) und *Cbl. tepidum* (CtDsrL-1B) wurden jeweils durch die im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelorstudenten Vanessa Klingbeil und Kai Wallerang bestimmt (Kai Wallerang 2019; Vanessa Klingbeil 2018). Zusammengefasst ergeben sich für die drei DsrL-Proteine die in Tabelle 13 zusammengefassten Optima, die als Standardbedingung zur Bestimmung der NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität unter anaeroben

Bedingungen angewandt wurden. Die genaue Durchführung der Enzymassays ist unter 2.5.5 beschrieben.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der verwendeten optimalen Bedingungen zur Messung der NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität.**

	<b>AvDsrL-1A</b>	<b>CtDsrL-1B</b>	<b>DaDsrL-2</b>
<b>Temperaturoptimum in °C</b>	30	40	45
<b>pH-Optimum</b>	7.0	8.0	6.5
<b>Verwendeter Puffer</b>	50 mM Kaliumphosphat	50 mM Kaliumphosphat	50 mM Kaliumphosphat

Die Auswertung der Enzymassays erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism7. In diesem Programm wurden auch die Graphiken in Abbildung 17 erstellt.



**Abbildung 17: Zusammenfassende Darstellung der NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität der rekombinanten DsrL-Proteine aus A) *A. vinosum* AvDsrL-1A B) *Cbl. tepidum* CtDsrL-1B und C) *D. amilsi* DaDsrL-2. Dargestellt sind **schwarze Kreise** für NADH; **weiße Quadrate** für NADPH; **weiße Kreise** für NAD<sup>+</sup> und **schwarze Quadrate** für NADP<sup>+</sup>. Gemessen wurden die Kinetiken unter den optimalen Bedingungen für das jeweilige Enzym in 3-fach-Bestimmung (Löffler et al. 2020b).**

Die Berechnung der enzymatischen Parameter erfolgte ebenfalls mit GraphPad Prism7, wobei die aus den Messwerten berechneten spezifischen Aktivitäten in 3-fach-Bestimmung für jede Substratkonzentration in die Berechnungen eingingen. Die Standardabweichung ist ebenfalls in Abb. 17 mit angegeben. Die Ergebnisse für alle drei rekombinanten DsrL-Proteine sind in Tabelle 14 zusammengefasst, wobei die Enzymkinetiken zu AvDsrL-1A und DaDsrL-2 selbst durchgeführt worden sind und die Ergebnisse zu CtDsrL-1B durch Kai Wallerang erzielt wurden (Löffler et al. 2020b).

**Tabelle 14: Kinetische Eigenschaften der rekombinanten DsrL-Proteine aus *A. vinosum* (AvDsrL-1A), *Cbl. tepidum* (CtDsrL-1B) und *D. amilsii* (DaDsrL-2).**

	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [ $\mu$ M]	$k_{\text{cat}}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]
<b>AvDsrL-1A</b>				
<b>NADH</b>	11,2 $\pm$ 0,6	86,7 $\pm$ 17,0	13,5	155,5
<b>NADPH</b>	4,0 $\pm$ 0,3	1667 $\pm$ 230,2	4,9	2,9
<b>NAD<sup>+</sup></b>	144,9 $\pm$ 3,6	123,9 $\pm$ 10,3	176,3	1422,7
<b>NADP<sup>+</sup></b>	120,1 $\pm$ 5,3	2563 $\pm$ 272,1	146,1	57
<b>CtDsrL-1B</b>				
<b>NADH</b>	436 $\pm$ 10,0	267,5 $\pm$ 20,5	460,2	1723
<b>NAD<sup>+</sup></b>	366,5 $\pm$ 12,4	95,17 $\pm$ 9,9	386,8	4060
<b>DaDsrL-2</b>				
<b>NADPH</b>	103,2 $\pm$ 2,5	124,5 $\pm$ 10,5	109,5	870
<b>NADP<sup>+</sup></b>	88,8 $\pm$ 1,5	22,02 $\pm$ 1,9	94,26	4200

AvDsrL-1A zeigt NADP(H): Akzeptor-Oxidoreduktaseaktivität mit einer starken Präferenz für NADH gegenüber NADPH. Die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M$  zeigt die Präferenz für NADH mit  $155,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  im Vergleich zu NADPH mit  $2,9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  sehr deutlich.

In umgekehrter Richtung, bei der NAD(P)<sup>+</sup>-Reduktion mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator, ist die Affinität des Enzyms für die nicht-phosphorylierte Form des Nicotinamid-Cofaktors ebenfalls höher als für NADP<sup>+</sup> (Abbildung 17A) und Tabelle 14). Bei einem physiologischen pH-Wert von pH 7.0 betragen die  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Werte  $1423 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  und  $57 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  für die Reaktionen mit NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup> (Tabelle 14). Der viel höhere Wert für die NAD<sup>+</sup>-getriebene Reaktion deutet eindeutig auf eine starke Vorliebe des AvDsrL-1A für NAD<sup>+</sup> gegenüber NADP<sup>+</sup> als Substrat während der dissimilatorischen Schwefeloxidation hin. Außerdem zeigt die deutlich höhere katalytische Effizienz für die NAD<sup>+</sup> Reduktion im Vergleich zur NADH-Oxidation, dass die Reduktion sehr wahrscheinlich die physiologische Ausrichtung des Enzyms ist.

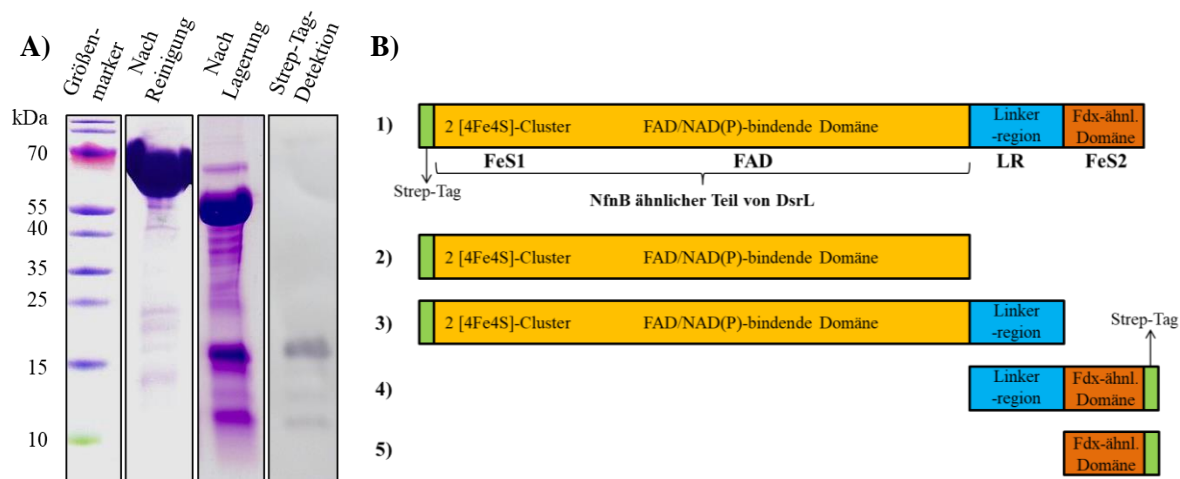
DsrL aus *Cbl. tepidum* (CtDsrL-1B) wies ein mit 40 °C deutlich höheres Temperaturoptimum auf im Vergleich zu AvDsrL-1A aus *A. vinosum*. Dies korreliert mit deutlich höheren optimalen Wachstumstemperaturen von *Cbl. tepidum* bei 47-48 °C (Wahlund et al. 1991). Interessanterweise zeigte das CtDsrL-1B keine messbare Aktivität mit NADPH oder NADP<sup>+</sup>. Mit NADH und NAD<sup>+</sup> hingegen zeigt CtDsrL-1B eine deutliche enzymatische Aktivität, wobei die Ausrichtung in oxidative oder reduktive Richtung hier weniger ausgeprägt scheint im Vergleich zu AvDsrL-1A.

Die katalytische Effizienz liegt mit  $4060 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion zwar mehr als doppelt so hoch im Vergleich zur  $\text{NADH}$ -Oxidation mit  $1723 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , der Unterschied in der Ausrichtung fällt aber deutlich geringer aus im Vergleich zu AvDsrL-1A (vergleiche Tab.14).

DsrL aus *D. amilii* (DaDsrL-2) hat ein Temperaturoptimum von  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  bei einem pH-Wert von 6,5, was ebenfalls zu den optimalen Wachstumsbedingungen von *D. amilii* passt (Florentino et al. 2016). Im Gegensatz zu den beiden Typ-1-DsrL Enzymen aus *Cbl. tepidum* und *A. vinosum* hat DaDsrL-2 keinerlei Aktivität mit  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$ , sondern erwies sich als strikt auf  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  als Substrate beschränkt (siehe Tabelle 14 und Abb. 17). Die katalytische Effizienz von DaDsrL-2 ist in Richtung der  $\text{NADP}^+$ -Reduktion höher, was nicht an einer wesentlich höheren Reaktionsgeschwindigkeit liegt, sondern an einer deutlich höheren Substratspezifität für  $\text{NADP}^+$  im Vergleich zu  $\text{NADPH}$ .

### 3.12. Charakterisierung funktioneller Untereinheiten von AvDsrL-1A

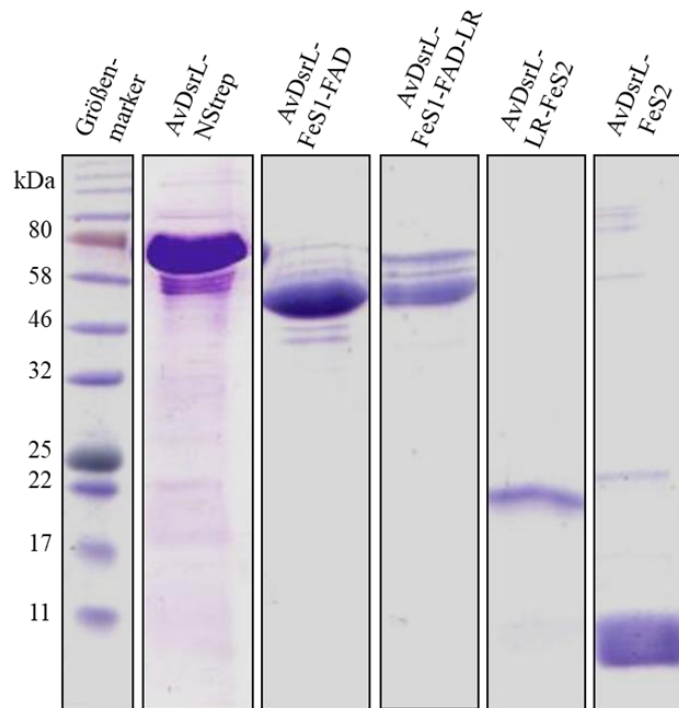
Bei der Untersuchung von DsrL aus *A. vinosum* wurden einige interessante Beobachtungen gemacht, die zu einer näheren Betrachtung der Umstände motivierten. Auffällig ist, dass AvDsrL-1A nach der Reinigung immer in klar definierte Bruchstücke zerfällt, die immer die gleichen Größen aufweisen. Dieser Zerfall konnte nicht durch Protease-Inhibitoren oder durch stabilisierende Zusätze wie DMSO und verschiedene kompatible Solute in den Lagerpuffern gestoppt werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Bestimmung der Schmelztemperatur und die zeitgleiche Beobachtung der Proteinstruktur mittels Circular-Dichroism-Spektren ergab keinen Anhaltspunkt für eine auffallend niedrige Schmelztemperatur des Proteins (Daten nicht gezeigt). Die Schmelztemperatur für AvDsrL-1A mit C-terminalem Strep-Tag liegt bei circa  $86^\circ\text{C}$ , weshalb ausgeschlossen werden kann, dass eine thermische Instabilität vorliegt. Der Zerfall wirkte spezifisch und es erschien lohnenswert, die Einheiten genauer zu betrachten. Insbesondere, wenn man die Vorhersagen der Proteinstruktur mit einbezieht, die in Abbildung 7 dargestellt sind, so scheint die C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne über die Linkerregion „lediglich locker“ und scheinbar beweglich mit dem zu NfnB-ähnlichen Proteinanteil aus DsrL verbunden zu sein. Um diesen Zusammenhang zu verifizieren und mehr über die Funktion der C-terminalen Ferredoxin-ähnlichen Domäne herauszufinden, wurden trunkierte Versionen des Proteins heterolog produziert. Die SDS-Page und der nach Western Blot durchgeführte immunologische Nachweis des Strep-Tags bestätigen, dass es der C-terminale Bereich des Proteins ist, der degradiert und vom Hauptteil des Proteins separiert wird. Der Zerfall von AvDsrL-1A und die Beschreibung der Einheiten, die heterolog produziert wurden, sind in Abbildung 18B) zusammengefasst.



**Abbildung 18: Beobachtung der Degradation und Einteilung AvDsrL-1A in trunkeierte Versionen.**

**A)** 12,5 %iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit 80 µg AvDsrL-1A mit C-terminalem Strep-Tag pro Tasche, um Degradation gut sichtbar zu machen, direkt nach der Reinigung und nach 2-wöchiger anoxischer Lagerung bei 4°C im Kühlschrank. Strep-Tag-Detektion nach Western Blot mittels Strep-Tactin-HRP-Konjugat. **B)** Darstellung der schematischen Proteinstruktur von AvDsrL-1A und trunkeierte Proteinversionen, die heterolog produziert wurden.

Durch die entstehenden Bruchstücke in Abbildung 18A) erscheint es naheliegend, dass die Linker-Region die den NfnB-ähnlichen Teil von AvDsrL-1A mit der C-terminalen Ferredoxin-ähnlichen Domäne verbindet, die Instabilität hervorruft. Um dies zu prüfen wurden verschiedenen trunkeierte Versionen von AvDsrL-1A in einer, im Rahmen dieser Arbeit betreuten, Bachelorarbeit von Ines Volker 2017 heterolog produziert und anschließend gemeinsam genauer analysiert. Die Produktion erfolgte, wie auch schon für das vollständige AvDsrL-1A, unter anoxischen Bedingungen, um die FeS-Cluster zu erhalten (Ines Volkert 2017). Dies ermöglichte auch eine Co-Faktorbestimmung in den einzelnen trunkeierten Teilen von DsrL und die Betrachtung der durch diese hervorgerufenen UV/Vis-spektroskopischen Eigenschaften.



**Abbildung 19: Verschiedene Versionen AvDsrL-1A, produziert in *E. coli*  $\Delta$ iscR in 12,5 %igem Coomassie-gefärbtem SDS-Gel.** Aufgetragen wurden Proben direkt aus der Elution nach der Reinigung 1 zu 4 verdünnt für das komplette AvDsrL-1A mit N-terminalem Strep-Tag und unverdünnt für die verkürzten Versionen. **AvDsrL-NSStrep:** Vollständiges AvDsrL-1A mit N-terminalem Strep-Tag. **AvDsrL-FeS1-FAD-**verkürzte AvDsrL-1A-Version ohne Linkerregion (LR) und ohne Ferredoxin-ähnliche Domäne (FeS2). **AvDsrL-FeS1-FAD-LR-**verkürzte AvDsrL-1A Version ohne Ferredoxin-ähnliche Domäne (FeS2). **AvDsrL-LR-FeS2:** verkürzte AvDsrL-1A Version nur Linkerregion (LR) und Ferredoxin-ähnliche Domäne (FeS2). **AvDsrL-FeS2:** Nur Ferredoxin-ähnliche Domäne von DsrL.

Die heterologe Produktion aller trunkierten AvDsrL-1A-Versionen war erfolgreich. Wie in Abbildung 19 erkennbar, konnte DsrL auch mit N-terminalem Strep-Tag erfolgreich gereinigt werden, erkennbar an der Bande etwas unter 80 kDa, was zu der erwarteten Größe des Proteins von 72,7 kDa passt. Schwach, aber dennoch sichtbar, sind leider auch bei dieser Version Degradationsprodukte erkennbar, sodass ausgeschlossen werden kann, dass der C-terminale Strap-Tag die Instabilität verursacht. Dies wurde geprüft durch ein SDS-Gel nach mehreren Tagen Lagerung im Kühlschrank, wobei ähnliche Degradationsprodukte wie bei AvDsrL-1A mit C-terminalem Strep-Tag erhalten worden sind (Daten nicht gezeigt, (Ines Volkert 2017)). Dennoch wies auch das AvDsrL-1A mit N-terminalem Strep-Tag vergleichbare spektroskopische und enzymatische Eigenschaften auf (Ines Volkert 2017). Die trunkierte Version ohne Linkerregion und ohne Ferredoxin-ähnliche Domäne AvDsrL-FeS1-FAD hat eine erwartete Größe von 54 kDa, was zu der im SDS-Gel beobachteten Bande passt. Interessant ist die Beobachtung, dass die Version AvDsrL-FeS1-FAD-LR mit 64,7 kDa eigentlich etwa 10 kDa größer ist, als die vorherige Version ohne Linker-Domäne. Eine Bande in entsprechender

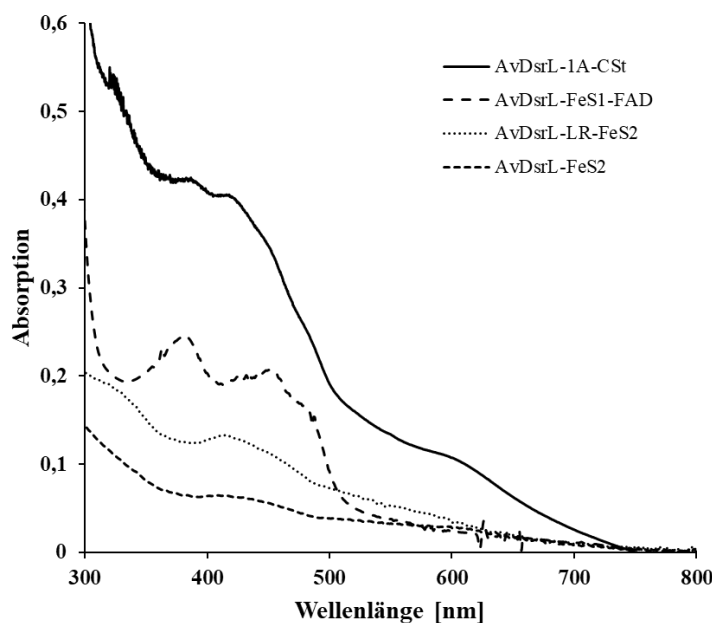
Größe ist im SDS-Gel bloss erkennbar, allerdings ist die Bande mit der höchsten Konzentration hier ebenfalls bei einer Größe von etwa 54 kDa zu sehen. Offenbar ist diese Version ebenfalls instabil und degradiert sofort nach der Reinigung. Die Ferredoxin-ähnliche Domäne mit Linkerregion (AvDsrL-LR-FeS2) konnte ebenfalls erfolgreich produziert werden, wenn auch nur in geringen Konzentrationen. Die erwartete Größe von AvDsrL-LR-FeS2 ist 19,8 kDa, was zu der im Gel beobachteten Größe der Bande bei etwas unter 22 kDa passt. Auch die Ferredoxin-ähnliche Domäne (FeS2) mit nur 9 kDa von AvDsrL-1A konnte alleine produziert und gereinigt werden, wie anhand der Bande bei unter 11 kDa im SDS-Gel erkennbar ist. Tabelle 15 fasst die Versionen und ihre Größe in kDa und die maximalen Ausbeuten, so wie der Fe- und S-Cofaktorgehalt der einzelnen Versionen zusammen.

**Tabelle 15: Zusammenfassende Informationen zu den trunkierten Versionen von AvDsrL-1A.**

Bezeichnung trunkierte Version von AvDsrL-1A	Größe in kDa	Maximal erzielte Ausbeuten aus 1 L Expressionskultur	Fe/S-Gehalt in mol pro mol Protein
AvDsrL-FeS1-FAD	54	3-10 mg/ml	7 mol Fe/9 mol S
AvDsrL-FeS1-FAD-LR	64,7	1-3 mg/ml	6 mol Fe/6 mol S
AvDsrL-LR-FeS2	19,8	1-3 mg/ml	5-6 mol Fe/ 5-6 mol S
AvDsrL-FeS2	9	1-4 mg/ml	4-7 mol Fe/ 5-7 mol S

Ausführliche Produktions- und Reinigungsversuche sowie Versuche zur Stabilität und Enzymaktivität sind in der Bachelorarbeit von Ines Volkert beschrieben (Ines Volkert 2017). In Abbildung 20 sind die UV/Vis-Spektren der verschiedenen Versionen im Vergleich zu dem vollständigen AvDsrL-1A gezeigt.





**Abbildung 20: UV/Vis-Spektren der verschiedenen AvDsrL-1A-Versionen.** Die Proteinkonzentration betrug je 20  $\mu\text{M}$ . **Durchgezogene Linie:** AvDsrL-1A in kompletter Länge mit C-terminalem Strep-Tag (AvDsrL-1A-CSt). **Gestrichelte Linie:** N-terminaler NfnB ähnlicher Teil von AvDsrL ohne Linker und ohne Ferredoxin-ähnliche Domäne (AvDsrL-FeS1-FAD). **Gepunktete Linie:** C-terminaler Linker und Ferredoxin-ähnliche Domäne von AvDsrL-1A, ohne N-terminale NfnB-ähnliche Domäne (AvDsrL-LR-FeS2). **Viereckig gepunktete Linie:** C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne AvDsrL allein (AvDsrL-FeS2).

Die AvDsrL-1A-Version mit dem NfnB ähnlichem N-terminalem Teil ohne die Linker-Region und ohne die hintere Ferredoxin-ähnliche Domäne (AvDsrL-FeS1-FAD) weist, wie erwartet, die typische Absorption für FAD auf. Im Vergleich zu der kompletten Version des Proteins treten die Absorptionsmaxima des FADs deutlicher hervor insbesondere die Peaks bei 382 und 453 nm, aber auch die Schultern 432 und 482 nm. In dieser Version liegen nur noch die zwei [4Fe4S]-Cluster im N-terminalem Bereich vor (FeS1). Die Absorptionsabnahme, die zur Auffüllung des FAD-Spektrums in der vollständigen AvDsrL-1A-Version führt, liegt vermutlich an den fehlenden FeS-Clustern im C-terminalen Teil des Proteins (FeS2). Wie anhand der Spektren der Proteine, bestehend aus der Ferredoxin-ähnlichen Domäne mit und ohne Linkerregion, zu erkennen (AvDsrL-LR-FeS2, AvDsrL-FeS2) (siehe Abbildung 20), absorbieren diese Versionen in eben diesem Bereich zwischen 300 und 500 nm mit einer Schulter bei 330 nm und einem Absorptionsmaximum bei 418 nm. Auch die erhöhte Absorption im Bereich zwischen 500 und 700 nm scheint auf die C-terminale Region von DsrL zurückführbar zu sein, da die gereinigte Ferredoxin-Domäne mit Linkerregion in diesem Bereich auch absorbiert. Interessant ist hier, dass diese Absorption bei AvDsrL-1A deutlich ausgeprägter ist im Vergleich zu CtDsrL-1B und DaDsrL-2 (Vgl. Abb. 10). Insgesamt ist allerdings zu beachten, dass die gereinigten verkürzten Versionen von DsrL vermutlich nicht

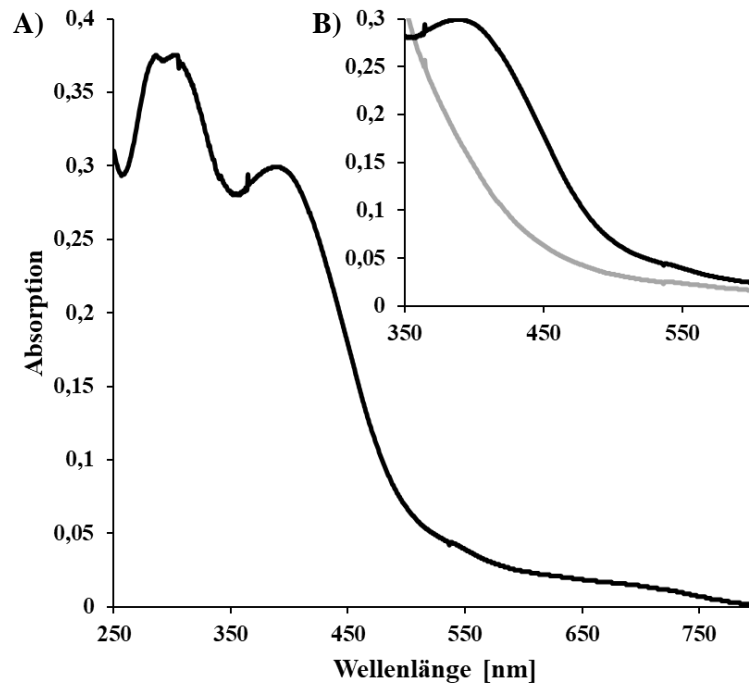
vollständig mit Cofaktoren beladen waren, da man durch Addition der Spektren der NfnB-ähnlichen Domäne mit der Linkerregion und Ferredoxin-ähnlichen Domäne nicht ganz das Absorptionsniveau des kompletten AvDsrL-1A erreicht. Dennoch konnte durch diese Spektren bestätigt werden, dass in der C-terminalen Ferredoxin-Domäne FeS-Cluster gebunden sind, die das charakteristische FAD-Spektrum von DsrL in der Absorption auffüllen und beeinflussen. Diese trunkierten Versionen von DsrL bestätigen den Eindruck, dass der Bereich der Linker-Domäne ursächlich ist für den beobachteten spezifischen Zerfall des AvDsrL-1A Proteins. Die trunkierten Versionen von AvDsrL-1A ohne Linker und Ferredoxin-ähnliche Domäne wiesen weiterhin eine NADH-Oxidoreduktaseaktivität in einem vergleichbaren Rahmen wie das vollständige AvDsrL-1A auf (Ines Volkert 2017). Dieser Umstand belegt, dass die C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne von DsrL nicht an der eigentlichen NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität beteiligt ist.

### 3.13. Ferredoxin als putativer Reaktionspartner für AvDsrL-1A

Das ursprünglich untersuchte AvDsrL-1A aus *Allochromatium vinosum* wurde bereits weiterführend analysiert und erweiterte Untersuchungen zu der Enzymaktivität wurden vorgenommen. Dabei konnte die genaue Funktion der Ferredoxin ähnlichen Domäne nicht näher betrachtet werden. Bei der Verwendung von artifiziellen Elektronendonatoren und -akzeptoren bleibt die NAD(P)H:Oxidoreduktaseaktivität bestehen, unabhängig vom Vorhandensein der FeS-Cluster (Lübbe 2005; Lydia Kammler 2009; Lofi 2020). Wie bereits beschrieben, hat DsrL Ähnlichkeit mit NfnB, der großen Untereinheit der NADH-abhängigen reduziertes Ferredoxin:NADP-Oxidoreduktase aus *Thermotoga maritima*. Der NfnAB-Proteinkomplex katalysiert eine reversible Elektronenbifurkation, wobei zwei Elektronen von NADPH genutzt werden, um Ferredoxin und  $\text{NAD}^+$  zu reduzieren. Die große Untereinheit NfnB bindet NADPH, beinhaltet das bifurkierende FAD und reduziert Ferredoxin, während die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  durch NfnA katalysiert wird. Der Reaktionsmechanismus und der Elektronendonator (oder -akzeptor) von DsrL sind unbekannt. Aufgrund der erlangten Erkenntnisse und der Struktur des Proteins ist es allerdings wahrscheinlich, dass ein Ferredoxin oder aber die C-terminale Ferredoxin-Domäne die Elektronen für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion durch AvDsrL-1A zur Verfügung stellen könnte.

Alle Aufreinigungs-Versuche von Ferredoxin aus *A. vinosum* und die heterologe Produktion von Ferredoxin aus *A. vinosum* waren leider nicht erfolgreich. Die Ausbeuten waren zu gering und bei der heterologen Expression war trotz anaerober Reinigungsbedingungen der Fe-Gehalt im Protein und damit der FeS-Clustergehalt der Proteine unvollständig (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde für die Enzymassays Ferredoxin aus *Clostridium tetanomorphum* gereinigt. Das gereinigte Ferredoxin wies eine charakteristische Absorption bei 390 nm auf. Mit einem Quotienten 390/280 des oxidierten Proteins von 0.77-0.80 konnte ein sauberes und gut mit FeS-Clustern beladenes Ferredoxin gewonnen werden (Mortenson 1964).

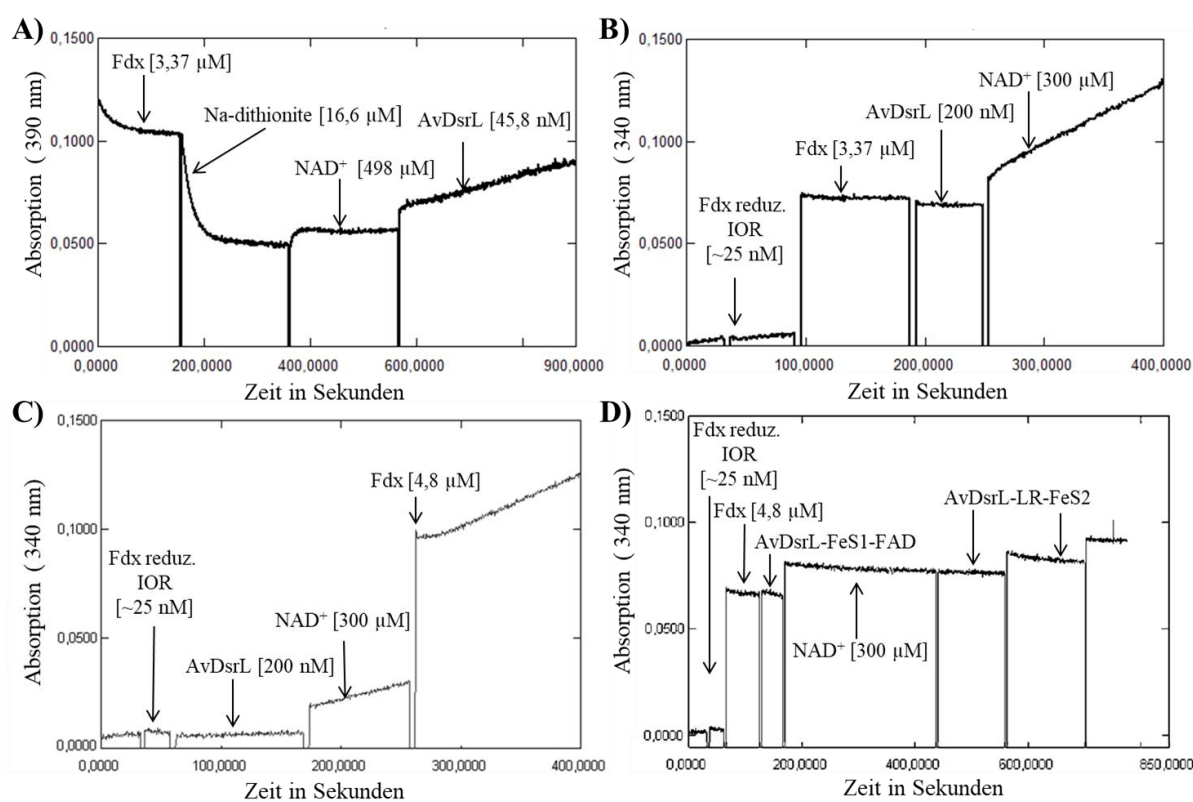


**Abbildung 21: UV-Vis-Spektrum von gereinigtem Ferredoxin (7 µM) aus *Clostridium tetanomorphum* A) im oxidierten Zustand nach Reinigung B) im oxidierten Zustand (schwarz) und mit Na-Dithionit reduziertem Zustand (grau).**

Um in den weiteren Enzymassays verfolgen zu können, ob Ferredoxin für AvDsrL-1A als Elektronendonator dienen kann, wurde die Absorption des Ferredoxins bei 390 nm während der Assays verfolgt, da bei dieser Wellenlänge der Unterschied in der Absorption zwischen oxidiertem und reduziertem Ferredoxin am höchsten ist (siehe Abb. 21 B).

In einem ersten Schritt wurde chemisch reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator für die NAD<sup>+</sup>-Reduktion eingesetzt. Ferredoxin (as isolated/oxidiert) wurde dem Assaypuffer zugegeben und mit Na-Dithionit reduziert. Dann wurde NAD<sup>+</sup> zugegeben um eine Hintergrundreaktion auszuschließen. Anschließend wurde DsrL hinzugefügt. Nach Zugabe von DsrL konnte eine eindeutige Zunahme der Absorption bei 390 nm beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass reduziertes Ferredoxin durch die Zugabe katalytischer Mengen ADsrL-1A oxidiert wird (siehe Abb. 22.A). Als Kontrolle wurde auch die Reduktion von NAD<sup>+</sup> bei 340 nm verfolgt (Daten nicht gezeigt). Neben dem Einsatz von chemisch reduziertem Ferredoxin wurde auch reduziertes Ferredoxin durch ein enzymatisches Regenerationssystem in der Reaktion zur Verfügung gestellt.

Genutzt wurde dafür die Indolpyruvat:Fdx-Oxidoreduktase (IOR) aus *Methanosarcina mazei* die heterolog produziert und anschließend gereinigt werden konnte (Kröniger et al. 2019). Der Produktionsstamm mit entsprechendem Plasmid für die Produktion der IOR wurde freundlicherweise von Lena Kröniger, AG Deppenmeier, zur Verfügung gestellt. Die Reinigung der IOR und ihr Einsatz im Enzymassay erfolgten wie von Kröniger et al. 2019 beschrieben. AvDsrL-1A konnte das kontinuierlich durch die IOR zur Verfügung gestellte reduzierte Ferredoxin als Elektronendonator für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion nutzen, wie in der Abbildung 22.B) zu erkennen ist. Diese Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt der charakteristischen Wellenlänge für die NADH-Produktion.



**Abbildung 22: AvDsrL-1A kann reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion nutzen.** A) mit chemisch durch Na-Dithionit reduziertem Fdx B) mit IOR als enzymatisches Regenerationssystem, das reduziertes Fdx zur Verfügung stellt C) Auch die FeS-Cluster in AvDsrL-1A selbst können in reduzierter Form direkt als Elektronendonator für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion dienen D) Ohne die C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne von AvDsrL-1A ist es nicht möglich, reduziertes Fdx als Elektronendonator zu nutzen, die Funktion kann *in vitro* nicht durch die Zugabe der Fdx-ähnlichen Domäne wiederhergestellt werden.

Außerdem wurde getestet, ob die IOR in der Lage ist, eventuell auch die Ferredoxin-ähnliche Domäne von DsrL zu reduzieren, sodass diese dann die Elektronen für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion zur Verfügung stellt.

Wie in Abbildung 22 C) zu erkennen, scheint auch dies zu funktionieren, wenn auch etwas langsamer. Fügt man zu dieser Reaktion nochmals Ferredoxin hinzu, so erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit.

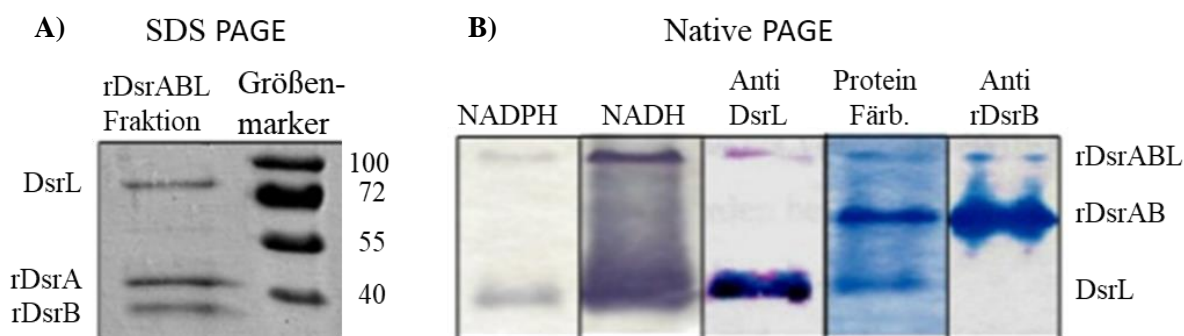
Um zu überprüfen ob es tatsächlich die C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne ist, die hier mit der IOR-interagiert und reduziert wird, wurde das Experiment mit der trunkierten Version von AvDsrL-1A ohne die Ferredoxin-ähnliche Domäne wiederholt (siehe Abbildung 22 D). Das trunkierte AvDsrL-1A Protein ohne die C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne (AvDsrL-FeS1-FAD) war nicht in der Lage, reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator zu nutzen. Diese Funktion konnte auch durch die Zugabe der C-terminalen Fdx-Domäne als trunkiertes Protein (AvDsrL-LR-FeS2) nicht wiederhergestellt werden. Als Kontrolle wurde der Reaktion das vollständige DsrL-1A zugegeben, wobei, wie erwartet, wieder eine NAD<sup>+</sup>-Reduktion beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). In diversen weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Reihenfolgen der Enzyme und verschiedenen Kontrollen wurden die hier zusammengefassten Ergebnisse bestätigt (Daten nicht dargestellt).

### **3.14 Interaktion von AvDsrL-1A mit Av-rDsrAB**

Die dissimilatorische Sulfitreduktase rDsrAB kann aus *A. vinosum* Zellen, angezogen unter photolithoautotrophen Bedingungen, mit Sulfid oder Thiosulfat gereinigt werden (Lofi 2020; Löffler et al. 2020a). Die rDsrAB kann dabei sowohl in der löslichen Fraktion, wie auch in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Schedel et al. 1979; Dahl et al. 2005; Weissgerber et al. 2014). Aus der Membranfraktion von *A. vinosum* wird rDsrAB gemeinsam mit Komponenten des Elektronentransfer-Komplexes DsrMKJOP aufgereinigt (Grein 2010; Grein et al. 2010; Dahl et al. 2005). Auch geringe Mengen DsrEFH und DsrC konnten in den Membranfraktionen nachgewiesen werden (Dahl et al. 2005), was auf eine enge Interaktion der Dsr-Komponenten hindeutet. Aus *A. vinosum* wurde rDsrAB aus der löslichen Fraktion mit Hilfe mehrerer chromatographischer Reinigungsschritte gewonnen, wie bereits beschrieben (Lübbe et al. 2006; Lofi 2020; Löffler et al. 2020a). Dabei konnte bei allen Reinigungen eine enge Interaktion von rDsrAB und AvDsrL-1A beobachtet werden (siehe Abb. 23). Alle angereicherten Reinigungsfraktionen enthielten neben den 40 und 45 kDa-Banden für rDsrB und rDsrA auch eine angereicherte dritte Bande von 72 kDa, die durch immunologischen Nachweis als AvDsrL-1A identifiziert werden konnte (Löffler et al. 2020a). Auch durch hochauflösende Anionenaustausch-Chromatographie konnte AvDsrL-1A nicht von rDsrAB getrennt werden. Mittels Gelfiltration wurden die enthaltenen Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

Dabei wurden Fraktionen erhalten, die Banden von circa 130 kDa enthielten, die einem Homodimer von DsrL entsprachen (Löffler et al. 2020a). Der Hauptteil allerdings eluierte mit einer Größe von circa 310 kDa von der Gelfiltrationsmatrix und hatte eine grünliche Färbung. Charakteristische Absorption für rDsrAB mit Maxima bei 392, 595 und 724 nm konnten ebenfalls für diese Fraktion nachgewiesen werden (Löffler et al. 2020a).

Die anschließende SDS-PAGE zeigte deutlich Banden bei 72 kDa, bei 45 und 40 kDa circa in einem 1:1:1 Verhältnis die den Proteinkomplex aus DsrABL repräsentieren (Löffler et al. 2020a; Lofi 2020), siehe Abbildung 23A).



**Abbildung 23: Interaktion AvDsrL-1A mit rDsrAB.** rDsrABL wurde aufgereinigt mittels mehrerer chromatographischer Reinigungsschritte (Löffler et al. 2020a) und anschließend mittels SDS **A)** und Native **B)** PAGE analysiert. **A)** Linke Tasche: 3 µg rDsrABL, rechte Tasche: Größenmarker in kDa. **B)** Native PAGE von links nach rechts: NADPH und NADH Oxidaseaktivitätsfärbung; AntiDsrL: Immunologischer Nachweis DsrL mit Antiserum; Proteinfärbung mittels Coomassie-Färbung; Anti rDsrB: Immunologischer Nachweis von DsrB mit Antiserum. Diese Abbildung wurde modifiziert nach (Löffler et al. 2020a; Lofi 2020).

Durch NADH und NADPH Oxidoreduktase-Aktivitätsfärbungen nach nativer PAGE zeigt sich in Zusammenstellung mit dem immunologischen Nachweis von AvDsrL-1A in den rDsrABL Reinigungsfraktionen deutlich, dass diese enzymatische Aktivität auf die AvDsrL-1A-enthaltenden Fraktionen begrenzt ist (siehe Abb. 23 B). Die enge Interaktion zwischen AvDsrL-1A und rDsrAB aus *A. vinosum* wurde durch weitere Methoden analysiert und nachgewiesen (Löffler et al. 2020a; Lofi 2020).

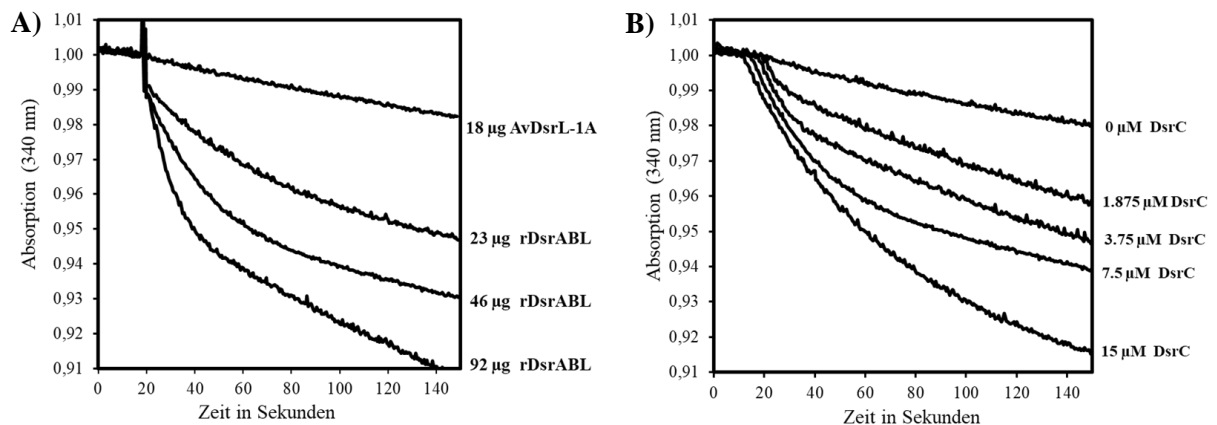
Auch die enzymatische Zusammenarbeit von rDsrAB und AvDsrL wurde in Zusammenarbeit mit Julia Lofi weiterführend charakterisiert. Die in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse zur NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität von AvDsrL-1A wurden genutzt, um Enzymassays mit dem Proteinkomplex aus rDsrABL durchzuführen (Lofi 2020). Die physiologische Aktivität von rDsrAB in *A. vinosum* ist vermutlich die Oxidation eines an DsrC gebundenen Trisulfids zu Sulfit, in Analogie zum Mechanismus in Sulfat-reduzierenden Prokaryonten (Pereira et al. 2011; Leavitt et al. 2015; Santos et al. 2015). Der genaue Reaktionsmechanismus in der Schwefeloxidation über das dsr-System konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Eine zentrale Schwierigkeit dabei ist, dass kein DsrC-Trisulfid gewonnen werden kann, um *in vitro* die angenommene physiologische Aktivität von rDsrAB zu prüfen (Löffler et al. 2020a; Lofi 2020). Daher konnte zunächst nur die umgekehrte Reaktionsrichtung getestet werden, die Sulfitreduktion, die ebenfalls durch rDsrAB katalysiert wird (Schedel et al. 1979).

Es konnte nachgewiesen werden, dass rDsrAB die Sulfitreduktion mit Methylviologen als Elektronendonator katalysieren kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von DsrC als Schwefel bindendes Protein die Sulfitreduktionsrate deutlich um das circa 15-fache erhöht (Löffler et al. 2020a; Santos et al. 2015; Lofi 2020), wie auch schon im sulfat-reduzierenden Organismus *Archeoglobus fulgidus* beobachtet (Santos et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der enzymatischen Aktivität von DsrL in Kooperation mit dem engen Interaktionspartner rDsrAB. Die nachgewiesene Aktivität von AvDsrL-1A als NAD(P)H-Oxidoreduktase lässt vermuten, dass rDsrABL zusammen als NADH:Sulfit-Oxidoreduktase fungieren kann. Zunächst wurde kontrolliert, dass DsrL alleine nicht dazu in der Lage ist, die NADH-abhängige Sulfitreduktion in Anwesenheit von DsrC zu katalysieren. Für diese Assays wurde das rekombinante AvDsrL-1A verwendet und außer einer leichten Hintergrundreaktion konnte keine Aktivität beobachtet werden. Wenn der aus *A. vinosum* gereinigte Proteinkomplex rDsrABL eingesetzt wurde, konnte deutlich gezeigt werden, dass jetzt NADH als Elektronendonator für die Reduktion von Sulfit fungieren kann. Auch lässt sich eine deutliche Steigerung der Reaktionsrate mit steigender Menge zugegebenen Proteinkomplexes rDsrABL beobachten (Löffler et al. 2020a). Auch diese Reaktion steht in starker Abhängigkeit zum Schwefelbindenden Protein DsrC. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Menge DsrC deutlich zu von 21,7 bis 229 mU/mg. Für alle Reaktionen ließ sich ein zweiphasiger Reaktionsverlauf beobachten. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der schnelleren Anfangsphase und der Menge des zugegebenen DsrC. Je mehr DsrC zugegeben wird, desto länger bleibt die schnellere Reaktionsrate zu Beginn erhalten. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass DsrC verbraucht wird während der Reaktion und dann nicht weiter zur Verfügung steht (Löffler et al. 2020a). Mit NADH als Elektronendonator konnte ein  $K_M$ -Wert für Sulfit von  $15,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$  bestimmt werden, der sehr nah an dem mit Methylviologen gemessenen Wert liegt ( $13,5 \pm 2,1 \mu\text{M}$ ) (Löffler et al. 2020a). Die Affinität von rDsrAB zu Sulfit scheint daher nicht beeinflusst zu werden, wenn die Elektronen über die NADH-Oxidoreduktaseaktivität von DsrL geliefert werden. Gleiches gilt auch für die NADH-Affinität von AvDsrL-1A im rDsrABL-Proteinkomplex.

Die gemessene Affinität liegt mit  $78,5 \pm 21,0 \mu\text{M}$  in einem ähnlichen Bereich wie der mit MTT ermittelte Wert von  $86,7 \pm 17,0 \mu\text{M}$  für das rekombinante AvDsrL-1A. Die spezifische Aktivität mit NADPH ( $300 \mu\text{M}$ ) war auch für rDsrABL, im Einklang mit den Ergebnissen für rekombinantes AvDsrL-1A, erheblich geringer mit nur circa 20 % der gemessenen Aktivität mit NADH. Auch hier konnte eine Erhöhung um das 3-fache erzielt werden, wenn die Reaktion bei pH 6.0 durchgeführt wurde, ein Phänomen, ebenfalls beobachtet für das rekombinante AvDsrL-1A.



**Abbildung 24: Funktion von AvDsrL-1A und DsrC für die NADH-abhängige Sulfitreduktion durch rDsrABL.** Alle Assays enthielten  $150 \mu\text{M}$  NADH und  $250 \mu\text{M}$  Sulfit. Die NADH-Oxidation wurde bei  $340 \text{ nm}$  ( $\epsilon_{340\text{nm}}=6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) gemessen. **A)** NADH-abhängige Sulfitreduktaseaktivität von rekombinantem AvDsrL-1A im Vergleich zu steigenden Mengen rDsrABL aus *A. vinosum* mit  $7,5 \mu\text{M}$  DsrC in allen Assays. **B)** NADH-abhängige Sulfitreduktaseaktivität von rDsrABL ( $46 \mu\text{g}$ ) mit unterschiedlichen DsrC-Konzentrationen. Abbildung modifiziert nach (Löffler et al. 2020a).

Interessanterweise scheinen die FeS-Cluster in AvDsrL-1A für diese Reaktion möglicherweise nicht essentiell zu sein, da auch mit unter aeroben Bedingungen gereinigtem rDsrABL-Proteinkomplex Aktivitäten im vergleichbaren Rahmen, wie mit unter anaeroben Bedingungen gereinigtem Protein erzielt werden konnten. Von den FeS-Clustern in DsrL ist allerdings bekannt, dass diese sauerstoffempfindlich sind und unter aeroben Reinigungsbedingungen nicht vollständig intakt in AvDsrL-1A eingebaut werden (Lydia Kammler 2009; Löffler et al. 2020a).

Mit Methylviologen als Elektronendonator ist rDsrABL ebenfalls in der Lage,  $\text{NAD}^+$  zu reduzieren. Auch hier zeigte sich, wie auch beim rekombinanten AvDsrL-1A, die deutliche Präferenz für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion mit  $49,3 \text{ U/mg}$  im Vergleich zur NADH-Oxidation mit  $5,9 \text{ U/mg}$  mit MTT als Elektronenakzeptor (Lofi 2020).

Auch der Elektronentransfer zwischen rDsrABL und Ferredoxin wurde getestet. Mit N-dithionit reduziertes Ferredoxin von *Clostridium tetanomorphum* war dabei in der Lage, als Elektronendonator für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion katalysiert durch rDsrABL zu fungieren (Lofi 2020).



Dabei konnte diese Aktivität auch mit unter aeroben Bedingungen gereinigtem rDsrABL gezeigt werden, in welchem die FeS-Cluster in AvDsrL-1A vermutlich nicht vollständig vorhanden waren. Dies ist ein Widerspruch zu den zuvor dargestellten Ergebnissen in dieser Arbeit (vgl. Abs. 3.13).

Wie beschrieben, hat DsrL deutliche Ähnlichkeit zu der zur Bifurkation fähigen Untereinheit NfnB. Daher wurden auch in diesem Hinblick erste enzymatische Assays mit rDsrABL vorgenommen. Getestet wurde dabei, ob die zwei Elektronen von NADH über rDsrABL in einer Bifurkation zum einen für die Reduktion von Sulfid genutzt werden kann - eine Aktivität, die wie oben beschrieben vorhanden ist - und das zweite Elektron zur Reduktion von Ferredoxin aufgewendet werden kann. In diesen Assays konnte allerdings kein Hinweis auf eine bifurkierende Aktivität von rDsrABL festgestellt werden (Lofi 2020).

## 4. DISKUSSION

Die Enzyme, welche essentiell sind für den dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel (Dsr), scheinen einen Komplex zu bilden, bestehend aus ganz unterschiedlichen Proteinen. Jedes Protein hat dabei eine spezifische Funktion (Dahl et al. 2005). Zu dieser Vielzahl am Dsr-Stoffwechsel beteiligter Proteine, kommt eine bisher unerwartete Diversität für einzelne Proteine, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit behandelte DsrL (Löffler et al. 2020b). Die komplexen zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen, die beeindruckende und noch nicht vollständig bekannte physiologische Diversität des Stoffwechselweges und die Vielzahl der ganz unterschiedlichen beteiligten Enzyme machen eine exakte biochemische Aufklärung des Reaktionsmechanismus des Dsr-Stoffwechsels zu einer großen Herausforderung. Viele Erkenntnisse konnten in den letzten Jahren bereits gewonnen werden, unbekannt aber ist weiterhin unter anderem der Elektronendonator- und/oder -Akzeptor für die durch das Schlüsselenzym DsrAB katalysierte Sulfitreduktion oder Schwefeloxidation. Wie in dieser Arbeit dargestellt, kann DsrL diese Funktion erfüllen. Details der unerwartet hohen Diversität, der biochemischen Eigenschaften und der katalytischen Aktivität von DsrL werden im Folgenden, bezugnehmend auf die gezeigten Ergebnisse, diskutiert.

### 4.1 Phylogenetische und enzymatische Diversität von DsrL

DsrL aus *Allochromatium vinosum* (AvDsrL-1A) ist Reaktionspartner der Sulfitreduktase DsrAB vom oxidativen Typ. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit und der Arbeit von Julia Lofi (Löffler et al. 2020a) deuten auf eine enge Interaktion von DsrAB und DsrL hin. Daher ist es auch nicht erstaunlich, dass sich auch phylogenetisch Zusammenhänge zwischen dem Stammbaum von DsrL und DsrAB ziehen lassen (Löffler et al. 2020b).

Zusammenfassend sind in allen Organismen mit DsrAB vom bakteriellen reduktiven Typ, wenn vorhanden, DsrL-Proteine aus der Gruppe DsrL-2 vertreten. Ein Organismus aus dieser Gruppe ist *D. amilsii*. Rekombinant produziertes DaDsrL-2 von *D. amilsii* zeigte eine enzymatische Aktivität, die auf NADP(H) beschränkt war, mit NAD(H) konnte keine Aktivität gemessen werden. Daher kann geschlussfolgert werden, dass DsrL-2 in Sulfat/Sulfit-reduzierenden Organismen Elektronen von NADPH, aber nicht von NADH für die Sulfitreduktion zur Verfügung stellen kann. Interessant ist, dass auch einige Organismen mit DsrAB vom oxidativem Typ DsrL-2 besitzen. Zwei davon sind als Schwefeloxidierer identifiziert (Bryantseva et al. 2019; Imhoff und Thiel, Vera 2010). In diesen Fällen wird vermutlich auch für die Schwefeloxidation NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor für die rDsrABL-2-katalysierte Reaktion verwendet. Eventuell besitzen alle Organismen mit der Kombination aus rDsrABL-2

die Fähigkeit zur Schwefeloxidation. Prinzipiell wäre auch die Sulfitreduktion mit NADPH als Elektronendonator in diese Organismen denkbar. Die nähere physiologische Untersuchung von Organismen mit dieser Kombination aus Dsr-Proteinen könnte Aufschluss darüber geben. Organismen mit der rDsrABL-2-Kombination wären nach den hier dargestellten Ergebnissen nicht in der Lage,  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor für die Schwefeloxidation zu nutzen. Das hätte zur Folge, dass diese Organismen Elektronen in den reduzierteren  $\text{NADP}^+$ -Pool abgeben müssten (Bennett et al. 2009), während Schwefeloxidierer mit DsrL-1  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor nutzen können.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass hier eine funktionelle Evolution von DsrL stattgefunden haben könnte in Anpassung an die physiologischen Bedürfnisse der Organismen. Die Kombinationen mit rDsrAB vom oxidativen Typ mit DsrL-1 und DsrL-2 als Reaktionspartner in Schwefeloxidierern würden  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  als Elektronenakzeptor nutzen, während die Kombination aus reduktivem DsrAB mit DsrL-2 von Sulfat/Sulfit-Reduzierern NADPH als Elektronendonator benötigt und nicht in der Lage wäre,  $\text{NADH}$  zu nutzen. Diese enzymatischen Kapazitäten von DsrL werden im nächsten Abschnitt den Unterschieden in der Aminosäuresequenz gegenübergestellt und diskutiert. Die zunehmende Menge an verfügbaren DNA-Sequenzdaten führen immer wieder zur Entdeckung neuer Schwefel-metabolisierender Organismen mit DsrAB und DsrL. Zum Beispiel wurden durch das neue für den Schwefelmetabolismus angepasste HMS-S-S (Hidden Markov Model Supported Sulphur Search System) (Tanabe und Dahl 2022) in verfügbaren Metagenomen bereits neue am Schwefelmetabolismus beteiligte Gene identifiziert. Dieses auf den Schwefelmetabolismus angepasste Tool wird zukünftig die Suche und Identifikation von am Schwefelmetabolismus beteiligten Genen deutlich erleichtern. Bereits jetzt kann es sehr differenziert zwischen Genen für Proteine, die am reduktiven oder oxidativen Schwefelstoffwechsel beteiligt sind, unterscheiden. Dieses identifizierte bereits zwei *Burkholderiales bacterium* Sbb1 und Sbb2-Spezies, die *dsrL* enthalten (Tanabe und Dahl 2022). Da aber nicht genügend Sequenzdaten für die unterschiedlichen Typen von DsrL, insbesondere für DsrL-2, vorliegen, ist es selbst diesem verbesserten System nicht möglich, zwischen den verschiedenen Typen von DsrL zu differenzieren (Tanabe und Dahl 2022). Hier ist also weiterhin eine Unterscheidung neuer *dsrL*-Gene in neuen Organismen/Metagenomen anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Merkmalsunterschiede sinnvoll und gegebenenfalls hilfreich für weiterführende physiologische Untersuchungen dieser neuen Organismen. Die noch zu erwartende Diversität Schwefel-metabolisierender Organismen, die bisher noch nicht sequenziert sind, sollte zudem

berücksichtigt werden, so dass die hier vorgestellten Unterscheidungsmerkmale keinesfalls vollständig sein müssen.

## 4.2 NAD(P)H- Oxidoreduktase-Aktivität von DsrL

In bakteriellen Zellen wird der  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Pool in einem reduzierten Zustand gehalten und der  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pool im oxidierten. Das Verhältnis ist aber stark abhängig von den Wachstumsbedingungen der Organismen. Die Verhältnisse von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  reichen dabei von 3,74 bis zu 31,3, während die Verhältnisse für  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  von 0,017 bis 0,95 reichen (Thauer et al. 1977; Bennett et al. 2009; Amador-Noguez et al. 2011; Spaans et al. 2015). Das tatsächliche Redoxpotential für beide Redoxpaare kann daher stark vom Standardredoxpotential abweichen, ist aber generell negativer als -320 mV für  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  und positiver als -320 mV für  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Bennett et al. 2009; Buckel und Thauer 2013; Spaans et al. 2015), was  $\text{NAD}^+$  zu einem besseren Elektronenakzeptor als  $\text{NADP}^+$  macht und umgekehrt  $\text{NADPH}$  zu einem stärkeren Elektronendonator *in vivo*. In diesem Hinblick ergibt die beobachtete Bevorzugung im Falle von AvDsrL-1A und Einschränkung von CtDsrL-1B auf  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  im physiologischem Kontext Sinn. Da  $\text{NADPH}$  auch der bessere Reduktant ist, ist es ebenfalls plausibel, das DsrL-2, welches hauptsächlich in Verbindung mit DsrAB vom reduktiven Typ auftritt, nur  $\text{NADPH}$  nutzen kann. Deutliche Hinweise darauf, wie diese funktionelle Differenzierung der DsrL-Typen zustande kommt, lassen sich anhand der Aminosäuresequenzen von DsrL im Vergleich zu NfnB feststellen. Die Kristallstruktur von NfnB von *Thermotoga maritima* zeigt das die Aminosäuren Y310, R311 und R312 in einem YRR-Motiv die Phosphatgruppe von  $\text{NADP(H)}$  in der Substratbindenden-Domäne koordinieren (Demmer et al. 2015). Dieses YRR-Motiv ist in entsprechender Position ebenfalls in DaDsrL-2 und mit einer Ausnahme in den anderen bisher bekannten DsrL-2 Sequenzen konserviert, und macht die entsprechende in dieser Arbeit dargestellte Bevorzugung von  $\text{NADPH}$  durch DaDsrL-2 plausibel. Durch Mutation des Motives im rekombinanten Protein könnte es möglich sein, dies zu belegen wobei aber die Beteiligung weitere Aminosäuren an der Substratspezifität nicht ausgeschlossen werden kann. Die Ausnahme in der Gruppe der analysierten DsrL-2-Aminosäuresequenzen stellen Spezies der *Candidatus*-Ordnung *Acidulodesulfobacterales* dar. In diesen ist das YRR-Motiv durch YNK ausgetauscht und damit sind die beiden Arginine durch Asparagin und Lysin ersetzt. Bei diesen Organismen müsste die Substratspezifität getestet werden, aber da Lysin ebenfalls beschrieben ist als eine Aminosäure die eine polare Bindung zur Phosphatgruppe von  $\text{NAD(P)H}$  vermitteln kann (Joyce et al. 2012), ist es durchaus denkbar, dass auch diese DsrL-2-Proteine  $\text{NADP(H)}$  als Substrat nutzen können.

In DsrL-1 (A und B)-Enzymen wurden diese Aminosäuren ersetzt, meist durch ungeladene Aminosäuren, sodass diese wahrscheinlich die Phosphatgruppe nicht binden können. Diese Erkenntnisse zusammengenommen mit den gemessenen Enzymaktivitäten für die drei Modellproteine (DaDsrL-2, AvDsrL-1A und CtDsrL-1B) ergeben ein klares Bild. DsrL-2 scheint an die Nutzung von NADPH angepasst, während DsrL-1 (A und B) NAD(H) bevorzugen. Während CtDsrL-1B eine ausgeprägte Substratspezifität für NADH aufweist und keine Aktivität mit NADP(H) nachweisbar war, erscheint AvDsrL-1A zwar deutlich NAD(H) zu bevorzugen, aber ist dennoch in der Lage NADP(H) zu nutzen. Hier könnte die Insertion im Bereich der Substrat-bindenden Domäne eine Rolle spielen. In der circa 30 Aminosäuren langen Insertion der DsrL-1A-Proteine kommen unter anderem auch geladene Aminosäuren wie Arginine und Lysine vor, die eine Koordinierung von NADP(H) in der Substrat-bindenden Domäne ermöglichen könnten, wenn auch nicht in der gleichen Effizienz wie die Dsr-2 Proteine mit ihrem konservierten YRR-Motiv. Innerhalb der DsrL-1A-Gruppe ist im Bereich der Insertion in der NAD(P)H-bindenden Domäne aber kein konserviertes Motiv zu finden, welches gezielt für die Koordinierung von NADPH beschrieben wurde, sodass es sich hier vermutlich nur um einen Nebeneffekt der Proteinstruktur handelt und unter physiologischen Bedingungen wie auch *in vitro* deutlich NAD<sup>+</sup>/NADH als Substrat bevorzugt wird.

### 4.3 Interaktion DsrL mit DsrAB

Eine Interaktion, wie sie zwischen dem Flavoprotein DsrL und der dissimilatorischen Sulfitreduktase DsrAB beobachtet werden kann, ist auch für andere, mit DsrAB verwandte, Sulfitreduktasen beschrieben. So ist das Flavoprotein AsrB zum Beispiel fester Bestandteil des AsrABC-Proteinkomplexes der dissimilatorischen Sulfitreduktase aus *Salmonella typhimurium*. Ebenfalls hat die assimilatorische Sulfitreduktase von *E. coli* ein Flavoprotein als Untereinheit, das den Elektronentransfer von NADPH zum katalytischen Hämprotein und zu Sulfit vermittelt (Ostrowski et al. 1989). Auch bei diesen Sulfitreduktasen bildet das Hämprotein, das die sechs Elektronen benötigende Sulfitreduktion zu Sulfid katalysiert, einen Proteinkomplex mit dem Flavoprotein. Hämprotein und Flavoprotein bilden in diesem Fall einen großen Proteinkomplex in einer  $\alpha_8\beta_4$ -Konformation. Das Octamer  $\alpha_8$  wird dabei durch das Flavoprotein gebildet, welches FMN und FAD enthält. Interessant ist, dass ein Octamer 4 FAD und 4 FMN enthält, sodass immer ein Dimer mit einem FAD und einem FMN als funktionelle Einheit fungieren müssen, da das FAD die Elektronen von NADPH aufnimmt und das FMN für den effizienten Elektronentransport zum Hämprotein benötigt wird (Ostrowski et al. 1989). Die dissimilatorische Sulfitreduktase aus *A. vinosum* rDsrAB bildet mit DsrL

ebenfalls einen Proteinkomplex in einer  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Konformation. Die Interaktion zwischen den Proteinen ist dabei so eng, dass rDsrABL gemeinsam aus *A. vinosum* aufgereinigt werden und selbst durch mehrere Reinigungsschritte nicht getrennt werden (Löffler et al. 2020a; Lofi 2020). Die nachgewiesene Enzymaktivität von rDsrABL aus *A. vinosum* zeigt, dass dieser Proteinkomplex eine NADH: Akzeptor-Oxidoreduktaseaktivität aufweist. Dabei waren die gemessenen  $K_M$ -Werte für NADH vergleichbar mit denen für rekombinant gereinigtes AvDsrL-1A. Das Auftreten von DsrL auch in Sulfat- und Sulfidreduzieren in Verbindung mit den gemessenen NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivitäten für die drei verschiedenen DsrL-Typen deuten drauf hin, dass DsrL und DsrAB in allen diesen Organismen interagieren können und die DsrL-Aktivität als Elektronendonator oder -Akzeptor für die Sulfat- oder Sulfitreduktion beziehungsweise Schwefeloxidation dient. Tatsächlich ist der physiologische Elektronendonator für dissimilatorische Sulfitreduktasen von Sulfatreduzieren noch nicht identifiziert (Rabus et al. 2015; Santos et al. 2015). Die enzymatische Aktivität von rDsrABL im Detail wurde bereits von Julia Lofi (Lofi 2020; Löffler et al. 2020a) diskutiert. Interessant für diese Arbeit und die nähere Charakterisierung von DsrL ist jedoch der Umstand, dass die spezifische Aktivität von rDsrABL aus *A. vinosum* mit Methylviologen höher war, als die gemessene Aktivität mit NADH. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für aSir aus *E. coli* beobachtet, wobei der Elektronentransfer zwischen dem FAD und dem Hämprotein der limitierende Faktor zu sein scheint (Siegel et al. 1982). Das FAD ist essentiell für die NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität von DsrL. Bei anfänglichen Reinigungen mit einer schlechten FAD-Beladung der rekombinanten DsrL-Proteine, waren die gemessenen Aktivitäten deutlich geringer (Daten nicht gezeigt) und auch in früheren Arbeiten zu DsrL fiel die Beladung mit FAD und auch die Aktivität von DsrL geringer aus (Lydia Kammler 2009).

Die in DsrL enthaltenen FeS-Cluster scheinen hingegen nicht für die gemeinsame Aktivität von rDsrABL als NADH: Akzeptor Sulfit:Oxidoreduktase relevant zu sein. Die FeS-Cluster aus DsrL sind Sauerstoff-empfindlich und bei aerober Reinigung sind diese nicht vollständig vorhanden (Lydia Kammler 2009). In dieser Arbeit wurden daher die beschriebenen anaeroben Produktionsbedingungen mit dem für die Produktion von FeS-clusterhaltigen Proteinen optimierten Produktionsstamm *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta iscR$  gewählt (Kuchenreuther et al. 2010; Akhtar und Jones 2008). Dadurch konnte DsrL mit FeS-Clustern und FAD-beladen produziert werden. Die Reinigung von nativem rDsrABL aus *A. vinosum* erfolgte meist unter aeroben aber auch unter anaeroben Bedingungen. Zudem wurden die FeS-Cluster chemisch rekonstituiert und es wurde rekombinant produziertes DsrL zusätzlich in die Enzymassays zur NADH-abhängigen Sulfitreduktaseaktivität von rDsrABL eingesetzt. Es zeigte sich kein Unterschied

zwischen dem unter aeroben Bedingungen gereinigten rDsrABL und dem unter anaeroben Bedingungen produzierten rDsrABL. Auch der zusätzliche Einsatz von rekombinantem AvDsrL-1A oder chemisch FeS-rekonstituiertem rDsrABL zeigte keine höhere NADH-abhängige Sulfitreduktaseaktivität. Daraus wurde geschlossen, dass die FeS-Cluster in AvDsrL-1A für die NADH-abhängige Sulfitreduktion durch rDsrABL nicht benötigt werden (Lofi 2020; Löffler et al. 2020a). Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann auch reduziertes Ferredoxin für rekombinantes AvDsrL-1A als Elektronendonator für die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu NADH fungieren. Selbiges wurde auch für die enzymatische Aktivität von DsrL im nativen rDsrABL-Komplex aus *A. vinosum* getestet mit Ferredoxin aus *C. tetanomorphum*. Auch hier konnte gezeigt werden, dass chemisch reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion dienen kann. Dabei war die beobachtete Aktivität abermals unabhängig von der Reinigung des rDsrABL-Komplexes unter aeroben vermutlich ohne FeS-Cluster oder anaeroben Bedingungen (Lofi 2020), was die Frage der Funktion der FeS-Cluster in DsrL unbeantwortet lässt. Auf diese interessante Frage wird im nächsten Abschnitt der Diskussion näher eingegangen.

#### 4.4 Funktion der C-terminalen Ferredoxin-ähnlichen Domäne von DsrL

Im Vergleich zu NfnB aus *Thermotoga maritima* enthält DsrL zusätzlich noch eine C-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne mit konservierten Bindemotiven für zwei weitere [4Fe4S]-Cluster. Diese Domäne scheint mit dem Hauptproteinteil, der das FAD und die Substrat-bindende Domäne enthält, über eine Linkerregion relativ flexibel mit dem NfnB-ähnlichen Teil verbunden zu sein. Die relativ flexible Bindung der Ferredoxin-ähnlichen Domäne kann aus den folgenden Beobachtungen dieser Arbeit geschlossen werden.

In allen durchgeführten Vorhersagen wird die dem Ferredoxin-ähnliche Domäne immer etwas separiert vom Hauptproteinteil, flexibel verbunden durch die Linkerregion, mit wechselnden Positionen dargestellt (vgl. Abb. 7). Dieses Ergebnis konnte sowohl mit Phyre2-Vorhersagen (Daten nicht gezeigt) wie auch mit I-Tasser erzielt werden (Löffler et al. 2020b). Versuche, DsrL zu kristallisieren blieben leider, selbst unter möglichst anoxischen Bedingungen, ohne Erfolg.

Zweitens zeigte sich eine Instabilität des rekombinant produzierten AvDsrL-1A, welche sich auf die Separation der Linker-Domäne und damit auch der Ferredoxin-ähnlichen Domäne vom Hauptproteinanteil von DsrL zurückführen lässt. Dieser Separation konnte weder durch verschiedene Proteaseinhibitor-Cocktails noch durch diverse getestete kompatible Solute und Stabilisatoren Einhalt geboten werden (Daten nicht gezeigt). Auch ein temperaturabhängiger

Zerfall des Proteins konnte ausgeschlossen werden. Jedes Mal wurden identische Zerfallsprodukte beobachtet, was für einen spezifischen Zerfall des Proteins spricht. Die Produktion trunkierter AvDsrL-1A-Versionen unter anderem ohne Linker und Ferredoxin-ähnliche Domäne zeigte, dass diese Version nicht weiter zerfallen und der Hauptteil von AvDsrL-1A, und damit der NfnB-ähnliche Teil, stabil ist. Zur Untersuchung der Funktion der Domänen wurden ebenfalls Enzymassays durchgeführt in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit (Ines Volkert 2017). Die NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität bleibt auch bei den trunkierten Versionen ohne Linker und Ferredoxin-ähnliche Domäne erhalten. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die C-terminale Region wie auch der NfnB-ähnliche Teil FeS-Cluster enthalten (vgl. Tabelle 15), wie auch an den UV/Vis-Spektren der C-terminalen Ferredoxin-ähnlichen Domäne mit und ohne Linker erkennbar ist (vgl. Abb. 20).

Da die C-terminale Domäne *in vitro* nicht für die NAD(P)H-Oxidoreduktaseaktivität von DsrL benötigt wird und Elektronen von artifiziellen Elektronendonatoren wie Methylviologen oder MTT offenbar auch ohne die FeS-Cluster die Elektronen an DsrL liefern können, wurde die Enzymaktivität von DsrL mit Ferredoxin als möglichem natürlichen Elektronendonator- oder -akzeptor getestet. Da die Aufreinigung von Ferredoxin aus *A. vinosum* recht aufwendig ist und keine ausreichenden Mengen vollständig mit FeS-Clustern beladenes Protein liefert, wurde versucht, Ferredoxin aus *A. vinosum* (Alvin\_2884) heterolog zu produzieren. Die Produktion gelang auch, allerdings nur in kleinen Mengen und mit schlechter FeS-Clusterbeladung (Daten nicht gezeigt). Daher wurde Ferredoxin aus *C. tetanomorphum* unter anaeroben Bedingungen gereinigt. Es konnten für Enzymassays ausreichende Mengen mit FeS-Clustern beladenes Ferredoxin gewonnen werden. Die Enzymassays mit AvDsrL-1A zeigten, wie auch die mit rDsrABL, dass reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion dienen kann. Dabei wurden Enzymassays mehrfach wiederholt und die beteiligten Enzyme wurden in unterschiedlichen Reihenfolgen eingesetzt. Dabei ist aufgefallen, dass durch das reduziertes Ferredoxin regenerierende Enzymsystem IOR auch AvDsrL-1A, bzw. die enthaltenen FeS-Cluster reduziert werden können und diese dann die Elektronen für die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bereitstellen können. Fehlt die C-terminale Ferredoxin-Domäne von DsrL, konnte keine  $\text{NAD}^+$ -Reduktion mit reduziertem Ferredoxin, egal ob mit chemisch reduziertem Ferredoxin (Daten nicht gezeigt) oder mit enzymatisch reduziertem Ferredoxin (vgl. Abb. 22), mehr nachgewiesen werden. Selbstverständlich wurde die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion für die eingesetzte trunkierte Version von DsrL ohne Linker und ohne Ferredoxin (AvDsrL-FeS1-FAD) mit Methylviologen noch am gleichen Messtag unter den gleichen Assay-Bedingungen nachgewiesen. Dies deutet im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen für rDsrABL (Lofi 2020) sehr wohl auf



eine Funktion der C-terminalen FeS-Cluster für den Elektronentransport zum FAD hin. Die Versuche hierzu waren reproduzierbar und wurden mit unterschiedlichen Kombinationen trunkierter Versionen wiederholt mit dem gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Eine Interaktion von Sulfite- und Nitritreduktasen mit Ferredoxinen ist relativ weit verbreitet und in Form von DsrL scheint DsrAB mit einem Ferredoxinprotein und einem Flavoprotein zeitgleich zu interagieren - ähnlich wie im AsrABC Holoenzym der dissimilatorischen Sulfitreduktase aus *Salmonella typhimurium* (Huang und Barrett 1991; Lofi 2020). Auch ausgehend von DsrL betrachtet ist eine Interaktion mit Ferredoxin oder eine Ferredoxin-ähnliche Funktion der C-terminalen Domäne von DsrL im Vergleich zu DsrL ähnlichen Proteinen wahrscheinlich. DsrL gehört zu der Familie der Pyridinnukleotid: Disulfid Oxidoreduktase, die FAD und FeS-Cluster enthalten. Bei den Sequenzalignments und den Strukturanalysen über i-Tasser und Phyre2 (Daten nicht gezeigt) wurde eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz und der vorhergesagten Struktur von DsrL zu sehr unterschiedlichen Proteinen gefunden, die alle selbst eine Ferredoxin-ähnliche Domäne besitzen oder aber mit Ferredoxin interagieren. Zum Beispiel die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase aus der Schweineleber, ein homodimeres Enzym mit zwei FAD, zwei FMN und insgesamt 8 [4Fe4S]-Clustern. Die Kristallstruktur dieses Enzyms zeigt, ähnlich zu DsrL, ebenfalls eine C-terminale FeS-Cluster-haltige Domäne, die vom Kernprotein mit den weiteren Cofaktoren etwas separiert ist, sodass kein direkter Elektronentransport im Monomer möglich ist. Erst durch die Formierung eines Dimers ist der Elektronentransport zwischen den Cofaktoren sichergestellt. Außerdem hat DsrL, wie eingangs beschrieben, Ähnlichkeit zu Glutamatsynthasen, zum Beispiel zur  $\beta$ -Untereinheit der Glutamatsynthase GltS aus *Azospirillum brasilense* (Cottevieille et al. 2008). Einige Glutamatsynthasen aus Cyanobakterien und Pflanzen sind ebenfalls Ferredoxin-abhängige Enzyme (van den Heuvel et al. 2003; Wu et al. 2018). Ebenfalls weist DsrL Ähnlichkeit mit der NfnI-Untereinheit aus *Pyrococcus furiosus* und NfnB aus *Thermotoga maritima*, jeweils Untereinheiten der NADH-abhängigen Ferredoxin:NADP Oxidoreduktase (Nfn) auf (Demmer et al. 2015; Lubner et al. 2017). Diese beiden Enzyme sind zur Elektronenbifurkation fähig in einem ebenfalls Ferredoxin abhängigen Reaktionsmechanismus, besitzen aber nicht wie DsrL die C-terminale Ferredoxin ähnliche Domäne. (Lubner et al. 2017; Demmer et al. 2018). Im Hinblick auf die Funktion der Ferredoxin-ähnlichen Domänen in zu DsrL verwandten Proteinen für den Elektronentransfer und auf die enge Interaktion einiger DsrL-ähnlicher Proteine mit Ferredoxin, ist es überaus unwahrscheinlich, dass die zwei konservierten [4Fe4S]-Cluster in DsrL relevant sind für den Reaktionsmechanismus *in vivo*.

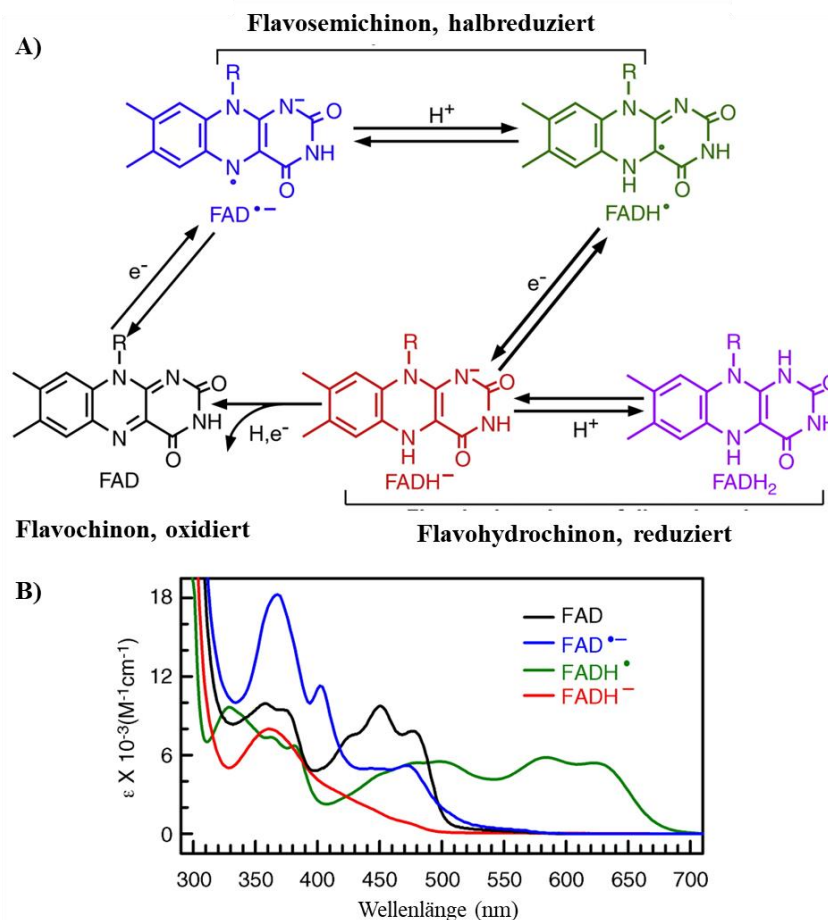
Da auch aerob gereinigtes rDsrABL reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator nutzen konnte, wurde geschlussfolgert, dass die FeS-Cluster in DsrL nicht notwendig sind für den Elektronentransport zum FAD. Dass unter oxischen Bedingungen gereinigtes DsrL nicht oder nur teilweise FeS-Cluster beladen ist, wurde aber bisher nur für das rekombinant in *E. coli* produzierte DsrL verifiziert. Leider erfolgte keine genaue Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehaltes in aerob und unter anoxischen Bedingungen gereinigtem rDsrAB aus *A. vinosum* (Lofi 2020). Im Originalorganismus produziert und zudem im möglicherweise stabilisierenden Komplex mit rDsrAB besteht durchaus die Möglichkeit, dass das AvDsrL-1A hier die nötigen FeS-Cluster noch enthielt. Zudem wurden auch die unter oxischen Bedingungen gereinigten rDsrABL-Komplexe nach der Reinigung größtenteils unter anoxischen Bedingungen gelagert, was einen nachträglichen Zerfall der FeS-Cluster im Vergleich zu früheren Lagerungen, vermieden haben könnte. Dadurch, dass die Absorption des FADs und der FeS-Cluster in DsrL vollständig vom Siro(häm)amid in rDsrAB überlagert wird, ist ein reiner Vergleich der UV/Vis-Spektren (aerob/anaerobe Reinigung) unzureichend (Lofi 2020), um die An- oder Abwesenheit von FeS-Clustern in DsrL zu verifizieren. Auch eine FeS-Cluster-Rekonstitution in rDsrABL (Löffler et al. 2020a), hatte keinen Effekt, aber auch keinen sichtbaren Effekt auf die UV/Vis-Spektren, wo, wenn tatsächlich keinerlei FeS-Cluster zuvor enthalten gewesen wären, zu mindestens eine leichte Änderung der Absorption beobachtet hätte werden müssen. Zudem ist der Quotient zwischen Absorption bei 280 nm und dem Soret-Peak bei rDsrAB mit 2,6 bis 2,7 höher als bei nah verwandten DsrABs aus Sulfatreduzierern (2,1 bis 2,2) (Löffler et al. 2020a), was ebenfalls auf die Anwesenheit von DsrL im Komplex mit DsrAB zurückgeführt wird. Da die Absorption in diesem Wellenlängenbereich bei DsrL mit FAD und FeS-Clustern deutlich höher ist, könnte auch dies ein Hinweis dafür sein, dass DsrL im rDsrABL-Komplex sehr wohl Cofaktor-beladen ist. In Summe ist festzuhalten, dass der FeS-Clustergehalt des rDsrABL-Komplexes aus *A. vinosum* quantifiziert werden sollte, um den in dieser Arbeit dargestellten Widerspruch aufzulösen oder aber zu bestätigen. Es bestehen auch weitere Möglichkeiten, warum die Übertragung von Elektronen von reduziertem Ferredoxin auf rDsrABL funktioniert, ohne FeS-Cluster aber in rekombinantem DsrL alleine nicht. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die direkte Übertragung an das FAD, die möglich ist aufgrund von Konformationsänderungen im rDsrABL-Komplex oder aber die *in vitro*-Übertragung von Elektronen über Cofaktoren von DsrAB, die *in vivo* so vermutlich nicht stattfinden würde. Dieser Widerspruch ist also eine offene Fragestellung, die durch eine Quantifizierung der FeS-Cluster in rDsrABL bereits leicht beantwortet werden könnte oder aber weitere Fragen zur Folge hätte.

## 4.5 Eigenschaften der Cofaktoren von DsrL

Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, ist es relevant, die Cofaktoren von DsrL näher zu betrachten, da auch hier noch viele offene Fragen zu ihrer Funktion existieren. Insgesamt enthält ein DsrL-Monomer vier [4Fe4S]-Cluster und ein FAD. Die Cofaktoren und ihre elektrochemischen Eigenschaften wurden näher untersucht.

### Eigenschaften des FAD in DsrL

DsrL enthält zwei Bindedomänen vom Rossmann-Faltungstyp, wobei eine das NAD(P) bindet und die andere das FAD (vgl. Abb. 4). FAD kann drei verschiedene Redoxzustände annehmen. Diese weisen jeweils charakteristische Absorptionen im UV/Vis-Spektrum auf und lassen sich so identifizieren, wenn sie in einem stabilen Zustand im Protein lang genug bestehen. In der Abbildung 25 sind diese Redoxzustände und die dazugehörigen Absorptionen dargestellt.



**Abbildung 25: Oxidationszustände und Absorptionscharakteristika von Flavinen:** A) Fünf mögliche Redoxzustände von Flavinen sind dargestellt. Die beiden unterschiedlichen Formen des Semichinon-Radikals, als Anion ( $FAD^{\bullet-}$ ) und neutrales Radikal ( $FADH^{\bullet}$ ), sowie die beiden Formen von reduziertem Flavin als protoniertes Hydrochinon ( $FADH_2$ ) und anionisches Hydrochinon ( $FADH^-$ ). B) Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von unterschiedlichen Redoxzuständen ausgewählter Beispielpoteine mit oxidiertem FAD (schwarz), anionischem Semichinon-Radikal (blau), neutralem Semichinonradikal (grün) und vollständig reduziertem Flavin (rot). Die Abbildung wurde entnommen aus (Chowdhury et al. 2014; Liu et al. 2010) und modifiziert.

Wie in Abschnitt 4.9 beschrieben konnten während verschiedener Titrations von DsrL mit Titancitrat, Ferricyanid oder auch mit  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  keine stabilen und über die spezifische Absorption detektierbaren unterschiedlichen Redoxzustände des FADs aus AvDsrL-1A beobachtet werden. Die gleiche Beobachtung wurde auch für die Proteine aus DaDsrL-2 aus *Desulfurella amilsii* und CtDsrL-1B aus *Chlorobaculum tepidum* gemacht (Daten nicht gezeigt). Insgesamt erwies sich die Titration des FADs aus AvDsrL-1A als schwierig. So konnte beispielsweise das reduzierte AvDsrL-1A mit Ferricyanid nicht vollständig reoxidiert werden (siehe Abbildung 11) bzw. das Ausgangsniveau der FAD-Absorption konnte nicht wiederhergestellt werden. Ein ähnliches Phänomen konnte bei der Oxidation des zuvor mit Titancitrat reduzierten DsrL mit  $\text{NAD}^+$  beobachtet werden. Bei einer nur geringen Menge von  $6,5 \mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  auf  $40 \mu\text{M}$  reduziertes DsrL wurde das FAD teilweise oxidiert und charakteristische Absorptionspeaks waren wieder erkennbar. Die weitere Zugabe von  $\text{NAD}^+$  führte aber zu keiner weiteren Erhöhung der Absorption und das Ausgangsabsorptionsniveau konnte, ähnlich wie bei der Oxidation mit Ferricyanid, nicht wieder erreicht werden. Eine Reduktion mit  $\text{NADH}$  war möglich, aber dafür mussten sehr große Mengen  $\text{NADH}$  eingesetzt werden. Die Gründe für dieses Verhalten ließen sich nicht verifizieren und das Phänomen blieb bei mehreren Versuchswiederholungen erhalten.

Auch die Redox titrationen von FAD erwiesen sich als Herausforderung. Es dauert sehr lange, bis ein stabiles Redoxpotential zu Beginn und nach jeder Zugabe von Oxidations- oder Reduktionsmitteln erreicht wurde. Insgesamt konnte nur eine vollständige Redox titration mit auswertbaren Spektren bei pH 7,0 und eine bei pH 6,0 aufgenommen werden. Bei anderen Versuchen blieben die Redoxpotentiale nicht stabil oder die Absorption des FADs zeigte trotz Änderung des angezeigten Redoxpotentials keine Änderung. Insgesamt muss hier vermutlich die Methodik angepasst werden und das ermittelte Redoxpotential sollte als vorläufiger Anhaltspunkt bewertet werden und erhebt keinen Anspruch auf Korrektheit.

Die Auswertung der Redox titration von AvDsrL-1A ergab, dass die Simulation der Nernst-Gleichung bei der Übertragung von nur einem halben Elektron die zu den Messwerten am besten passende ist. Eigentlich würde die Übertragung von zwei Elektronen für das FAD erwartet, auch diese Simulation ist dargestellt. Dabei waren die Abweichungen der ermittelten Redoxpotentiale anhand der verschiedenen Simulationen bei pH 7.0 nur sehr gering, mit  $-368 \text{ mV}$  bei einem oder einem halben angenommenen Elektron und  $-369 \text{ mV}$  bei zwei angenommenen Elektronen für die Simulation. Zusammengefasst ergibt sich also ein Redoxpotential von circa  $-370 \text{ mV}$ . Dieses Redoxpotential sollte allerdings dringend verifiziert

werden, aber es sollte eine geeignetere Methode bzw. Methodenbedingungen gesucht werden. Da die Simulationen auch darauf hindeuten, dass hier noch keine vollständige Reduktion des FADs durch die Übertragung von zwei Elektronen erfolgt ist, sollte insbesondere eine Methode gewählt werden, die eine Messung mit noch negativerem Redoxpotential ermöglicht. Im Vergleich zu DsrL-ähnlichen Proteinen liegt das bestimmte Redoxpotential allerdings in einem vergleichbaren Bereich. So wurde für das FAD der zu DsrL-ähnlichen  $\beta$ -Untereinheit der Glutamatsynthase aus *Azospirillum brasilense* ein Redoxpotential von circa -340 mV gemessen (Ravasio et al. 2001).

Auch während der Redoxtitration konnte keine zwischenzeitliche Ausbildung eines stabilen Semichinonzustandes (weder anionisch noch neutral) beobachtet werden, sondern lediglich eine stetige Abnahme der Absorption vom oxidierten zum reduzierten Zustand des FADs (siehe Abbildung 13). Möglicherweise ist ähnlich wie in NfnL der Semichinonzustand sehr instabil und kurzlebig, sodass er durch die angewandte Methode nicht beobachtet werden konnte. In NfnL und NfnB ist genau diese Eigenschaft des FADs entscheidend für die katalytische Aktivität als Elektronen-bifurkierendes Enzym. Die Halbwertszeit des anionischen Semichinonzustandes in NfnL beträgt lediglich 10 ps (Lubner et al. 2017). Falls dies bei DsrL auch zutreffend ist, konnte dieser Zustand nicht mittels normaler UV/Vis-Spektroskopie beobachtet werden. Hier müssten höherauflösende Methoden gewählt werden, wie die transiente UV/Vis-Absorptionsspektroskopie (TAS), die auch nur kurzzeitig auftretende Absorptionscharakteristika auflösen kann (Wise et al. 2022b). Außerdem wurden für die einzelnen Redoxübergänge des FADs in NfnL auch unterschiedliche Redoxpotentiale ermittelt, die ebenfalls für den Reaktionsmechanismus des Enzyms entscheidend sind. Dabei wurden für den Übergang vom oxidiertem FAD zum anionischen Semichinon ein Redoxpotential von -911 mV berechnet und für den Übergang vom anionischen Semichinon zum reduzierten Hydrochinon ein Redoxpotential von +359 mV. Für die Ausbildung des anionischen Semichinons ist dabei die Aminosäure Argenin (R201) in NfnL essentiell. Von dieser wird angenommen, dass sie das anionische Semichinon stabilisiert und die Bildung des neutralen Semichinons mit geringerer Reduktionskraft verhindert (Lubner et al. 2017). Durch die Kristallstruktur von NfnB sind die an der Bindung des FADs beteiligten Aminosäuren genau bekannt. Auch in NfnB ist dieses essentielle Argenin (Arg187) zur Stabilisierung des ASQ des FADs konserviert (Demmer et al. 2015). Weitere an der Bindung des FADs beteiligte Aminosäuren sind Val89, Val178, Ile183, und Val441 und Asp 293 (Demmer et al. 2015). Die meisten dieser Aminosäuren sind in den analysierten DsrL-Sequenzen konserviert. Ausnahmen sind Val89, welches in einigen Sequenzen durch Isoleucin ersetzt ist und Val178, das geordnet

nach der Häufigkeit durch Methionin, Tyrosin, Leucin, Threonin und Phenylalanin ersetzt ist. Die für die Stabilisierung des Semichinonzustandes essentielle Aminosäure Arg187 ist in allen analysierten DsrL-Sequenzen konserviert und unterstreicht die Möglichkeit, dass FAD in DsrL ähnliche elektrochemische Eigenschaften wie in NfnL/B aufweisen könnte. Auf den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus der Flavin-abhängigen Elektronenbifurkation wird daher im Verlauf der Diskussion noch näher eingegangen. Die genauere Untersuchung der elektrochemischen Eigenschaften des FADs in DsrL erscheint daher für zukünftige Forschungsarbeiten besonders interessant. Orientierung bieten hier aktuelle Publikationen, die als Anhaltspunkt für zukünftige Experimente dienen können (Wise et al. 2022b; Hoben et al. 2017; Lubner et al. 2017).

### **Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Cluster von DsrL**

Die Eisen-Schwefel-Cluster von DsrL sind besonders diskussionswürdig durch die offene Frage ihrer Funktion. Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst in Frage gestellt, ob überhaupt vier [4Fe4S]-Cluster in DsrL vorhanden sind. Anlass, dies in Frage zu stellen, sind die ungewöhnlichen Liganden der FeS-Cluster in der N-terminalen FeS-Cluster-bindenden Domäne in den Aminosäuresequenzen von DsrL im Vergleich zu NfnB (vgl. Abb. 6). Dabei sind wie in Abschnitt 3.6 beschrieben nicht alle Aminosäuren, die als Liganden für die FeS-Cluster in NfnB dienen, konserviert. Im distalen FeS-Cluster der N-terminalen FeS-Domäne ist das Cys39 in DsrL-Sequenzen durch Serin oder Threonin ersetzt. In einigen Dsr-2 Proteinen ist zusätzlich noch ein weiteres Cystein (Cys 42 in NfnB) durch Arginin ersetzt. Für alle genannten Aminosäuren gibt es Nachweise, dass sie als alternative Eisenliganden dienen können (Bak und Elliott 2014) und auch die Fe- und S-Bestimmungen der rekombinanten DsrL-Proteine legen das Vorhandensein von vier [4Fe4S]-Clustern nah. In *Lambdaproteobakterien* und *Desulfopila* sp. IMCC3006 ist das Cys42 aber durch Leucin oder Glycin ersetzt. Für diese Aminosäuren konnte keine Funktion als FeS-Cluster-Ligand in der bisherigen Literatur gefunden werden.

Über EPR-Spektroskopie konnten ebenfalls für [4Fe4S]-Cluster charakteristische Signale in AvDsrL-1A und DaDsrL-2 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15). Mit AvDsrL-1A konnte auch eine mittels EPR-Spektroskopie verfolgte Redoxtitration durchgeführt werden. Das beste Fitting der Simulation zu den gemessenen Daten ergab dabei, dass Redoxpotentiale von -330 mV und -390 mV angenommen werden können, in einem 3 zu 1 Verhältnis. Dies würde bedeuten, dass eines der vier FeS-Cluster ein deutlich negativeres Redoxpotential aufweist, und eventuell Hinweise auf die Richtung des Elektronenflusses liefern kann.

Um Aufschluss über die FeS-Cluster zu erhalten und über den Elektronentransport in DsrL wurde in der Literatur nach Hinweisen gesucht, wie die unterschiedlichen Aminosäureliganden die Eigenschaften der FeS-Cluster beeinflussen. In den letzten Jahren ist das Wissen um die Bedeutung der FeS-Cluster stark angestiegen und mittlerweile sind neben der klassischen Funktion der FeS-Cluster für den Elektronentransfer weitere Funktionen bekannt. Dabei reichen die Funktionen von strukturellen Aufgaben in der Proteinstruktur bis hin zur Funktion als Redoxsensor oder sogar als Substrat für die Synthese komplexer schwefelhaltiger Biomoleküle (Bak und Elliott 2014; Fugate und Jarrett 2012; McLaughlin et al. 2016) Die gefundenen und für DsrL möglicherweise relevanten Informationen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Insgesamt sind einige Funktionen tatsächlich noch nicht vollständig aufgeklärt - zum Beispiel im Fall von Threonin - , sodass in den nächsten Jahren sicher noch aufschlussreiche Erkenntnisse hinzukommen werden.

**Tabelle 16: Einfluss DsrL-relevanter alternativer Aminosäureliganden außer Cystein auf die Eigenschaften von FeS-Clustern in der N-terminalen FeS-Cluster-bindenden Domäne.** Angegebene Nummerierung der Aminosäuren basieren auf der Nummerierung von NfnB.

Aminosäure	Eigenschaften	Vorkommen in DsrL	Beispielproteine	Quelle
Glutaminsäure	Redoxpotential verringern, essentiell für Elektronentransport während Bi- und Confurkation (NfnL), aber auch Hinweise auf strukturelle Funktion	Konserviert im proximalen Cluster Glu 117	NADH-abhängige red.-Ferredoxin: NADP <sup>+</sup> Oxidoreduktase (große Untereinheit NfnB/NfnL)	(Demmer et al. 2015; Lubner et al. 2017); (Lubner et al. 2017; Wise et al. 2022b)
Serin	Schwefelinsertion/unbekannt	Cys39 ausgetauscht zu Serin im distalen Cluster	Lipoylsynthase	(McLaughlin et al. 2016)
Threonin	Elektronendonor gekoppelt an Sirohäm-Gruppe	Cys39 ausgetauscht zu Threonin im distalen Cluster	Dissimilatorische Sulfitreduktase	(Schiffer et al. 2008)
Arginin	Schwefeldonor, aber [2Fe-2S]- Cluster!	Cys42 ausgetauscht in einigen DsrL-2, in den meisten Cys konserviert	Biotinsynthase	(Fugate und Jarrett 2012)

In der Zusammenschau betrachtet ist es sehr interessant, dass viele der ungewöhnlichen FeS-Cluster-Ligationen in Enzymen auftreten, die an Stoffwechselmechanismen im Zusammenhang mit Schwefelverbindungen beteiligt sind (siehe Tabelle 16). Dabei dienen diese speziell ligierten FeS-Cluster auch als Substrate, wie zum Beispiel Arginin oder Serin, als Schwefeldonor bzw. sind für die Schwefelinsertion essentiell. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Ligation eine schwächere/instabilere Bindung des Schwefels die Insertion/Abgabe des Schwefels aus dem FeS-Cluster ermöglicht (Fugate und Jarrett 2012;

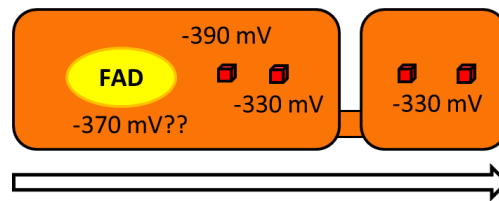
McLaughlin et al. 2016). Eine solche Funktion wurde für die FeS-Cluster in DsrL bisher nicht in Betracht gezogen, aber da der Reaktionsmechanismus zwischen DsrABL und DsrC noch immer nicht vollständig aufgeklärt ist, sollte diese besondere Eigenschaft der FeS-Cluster nicht vernachlässigt werden.

Für AvDsrL-1A ergibt sich für die N-terminale FeS-Domäne also ein proximales [4Fe4S]-Cluster mit drei Cysteinen, einmal Glutaminsäure und einem distalen Cluster mit Serin und drei Cysteinen als Liganden. Die C-terminalen FeS-Cluster der Ferredoxin-ähnlichen Domäne sind alle klassisch mit Cystein ligiert. Daher kann durch das festgestellte 3 zu 1 Verhältnis, das in der Redox titration festgestellt wurde, vermutet werden, dass eines der andersartig ligierten FeS-Cluster der N-terminalen Domäne das negativere Redoxpotential aufweist. Für Serin als Ligand lassen sich kaum Informationen finden, insbesondere nicht zu den Auswirkungen auf das Redoxpotential des FeS-Clusters. Hingegen finden sich aktuelle und spannende Erkenntnisse zu der Ligation des FeS-Clusters mit Glutaminsäure. Da diese Ligation auch in NfnB/L enthalten ist, gibt es aktuelle Hinweise darauf, dass diese spezielle Ligation für den Elektronenfluss in der Flavin-basierten Bifurkations- bzw. Confurkationsreaktion in Nfn wichtig ist (Wise et al. 2022a).

Auch das in dieser Arbeit ermittelte sehr negative Redoxpotential der FeS-Cluster passt zu den Erkenntnissen aus anderen Proteinen mit Ähnlichkeit zu DsrL. Ebenfalls in der Glutamatsynthase (GltS) und der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase wurden für die enthaltenen [4Fe4S]-Cluster sehr negative Redoxpotentiale ermittelt (unter -400 mV). Daher kann angenommen werden, dass das in DsrL konservierte, in NfnB/L ebenfalls vorhandene proximale FeS-Cluster das Cluster ist, welches das sehr negative Redoxpotential von -390 mV aufweist. Daher ist es wahrscheinlich, dass die FeS-Cluster der Ferredoxin-ähnlichen Domäne mit -330 mV eher ein geringeres Redoxpotential aufweisen und an diese die Elektronen abgegeben werden.

Abschließend befindet sich in Abbildung 16 eine schematische zusammenfassende Darstellung des möglichen Elektronenflusses innerhalb des DsrL-Proteins. Diese sollte allerdings als vorläufige Hypothese betrachtet werden, da insbesondere die Redox Eigenschaften des FAD in DsrL noch genauer untersucht werden müssen und die Interaktion mit DsrAB. Hilfreich wäre hier eine Kristallisation von DsrABL gemeinsam im Komplex, um die Anordnung der Cofaktoren analysieren zu können.





**Abbildung 26: Zusammenfassende Darstellung der Redoxpotentiale der Cofaktoren in DsrL und hypothetische Elektronenfluss innerhalb von DsrL**

#### 4.6 Flavin-abhängige Elektronenbifurkation oder Confurkation

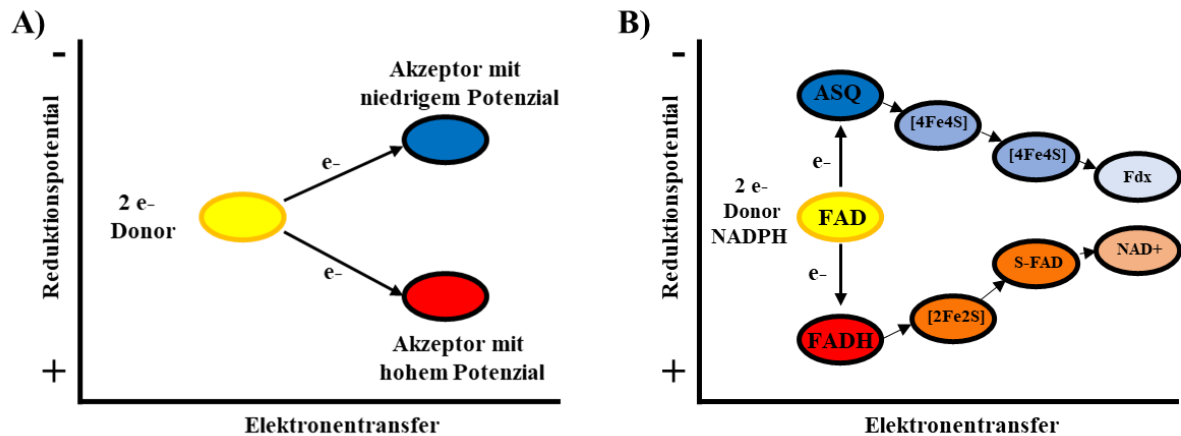
Die Ähnlichkeit von DsrL zu NfnB/L und die beschriebenen Eigenschaften der Cofaktoren in DsrL lassen weiterhin die Hypothese zu, dass DsrL, ähnlich wie NfnB/L, zur Elektronenbifurkation bzw. Confurkation befähigt ist. Leider konnte dies im Rahmen der gemessenen Enzymaktivitäten nicht nachgewiesen werden. Dies kann aber plausible Gründe haben. Daher wird dieser spannende Reaktionsmechanismus der Flavin-basierten Elektronenbifurkation im Folgenden kurz erklärt und im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert.

Der Begriff Elektronenbifurkation (Bifurka = zweizinkige Gabel) beschreibt sehr treffend den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus (siehe Abb. 27 A), die Aufteilung von einem Elektronenpaar an zwei verschiedene Elektronenakzeptoren, einer mit niedrigem und einer mit hohem Reduktionspotential. Dieser Mechanismus wurde bereits in den 1970er Jahren durch Paul Mitchell und weitere Wissenschaftler beschrieben und war schon damals eine erstaunliche und viel diskutierte Entdeckung (Wikström und Berden 1972; Mitchell 1975, 1976). Der ursprünglich auf mitochondriale und photosynthetische Membranen beschränkte Mechanismus der Chinon-abhängigen Elektronenbifurkation im Cytochrom bc1-Komplex der Atmungskette, auch Q-Zyklus genannt, war lange Zeit der einzige bekannte Elektronenbifurkations-Mechanismus. Dieses Bild hat sich schlagartig geändert nachdem 2008 die erste Publikation zur Flavin-basierten Elektronenbifurkation (FBEB) durch Wolfgang Buckel und Kollegen veröffentlicht wurde (Herrmann et al. 2008). Seitdem sind zahlreiche neue Enzymkomplexe, die zur Elektronenbifurkation fähig sind, entdeckt worden und viele weitere werden sicher noch folgen. Eine gute und umfassende Übersicht zu den bisher bekannten bifurkierenden Enzymkomplexen wurde durch die beiden bekannten und häufig zitierten Wissenschaftler Wolfgang Buckel und Rudolf K. Thauer 2018 veröffentlicht (Buckel und Thauer 2018). Der Mechanismus der Elektronenbifurkation und insbesondere der Flavin- basierten Bifurkation ist Gegenstand aktueller Forschung und viele Erkenntnisse kommen jedes Jahr hinzu (Buckel und Thauer 2018). Insbesondere ist der Mechanismus auf molekularer elektrochemischer Ebene Gegenstand aktueller Veröffentlichungen und Diskussionen (Wise et al. 2022b; Yuly et al.

2021) und bietet noch zahlreiche offene Fragen, die sicher in den nächsten Jahren noch genau untersucht werden.

Die Elektronenbifurkation basiert, vereinfacht dargestellt, auf dem Prinzip, dass ein Elektronenpaar ( $2e^-$  Donor) mit mittlerem Reduktionspotenzial aufgeteilt wird in zwei Elektronentransferschritten hin zu einem Elektronenakzeptor mit niedrigerem/negativem und einem anderen mit höherem/positivem Reduktionspotential (siehe Abb.27 A) (Yuly et al. 2019; Peters et al. 2016; Buckel und Thauer 2018). Damit wurde ein weiterer Mechanismus zur biologischen Energiekonservierung entdeckt, der zunehmend an Bedeutung gewinnt, je mehr Enzyme, die diesen Mechanismus nutzen, in den unterschiedlichsten Organismen gefunden werden. Dieser Mechanismus zur Energiekonservierung ermöglicht den Ablauf einer endergonen Reaktion durch Kopplung an eine exergone Reaktion, überwindet dadurch thermodynamische Barrieren und minimiert zeitgleich den Verlust freier Energie (Peters et al. 2016).

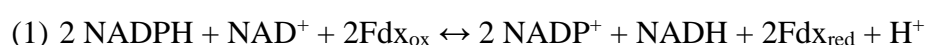
Für diese Arbeit relevant ist die Flavin-basierte Elektronenbifurkation (FBEB), die am Beispiel der NADH-abhängigen Ferredoxin:NADP-Reduktase (Nfn) in Abbildung 27B schematisch dargestellt ist und im Weiteren näher beschrieben wird. Es sind bereits einige weitere Proteine/Proteinkomplexe bekannt, die FBEB betreiben können (Buckel und Thauer 2018). Eine gemeinsame Eigenschaft weisen dabei alle bekannten Enzymkomplexe, die FBEB betreiben, auf. Die bifurkierenden Enzyme enthalten mehrere Cofaktoren für den Elektronentransfer (FeS-Cluster und Flavine) und gestalten so zwei separierte Elektronentransferwege aus mit unterschiedlichem Reduktionspotenzial (siehe Abb. 27 B). Zentrales Element ist ein Flavin (FAD), welches die eigentliche Bifurkation bewerkstelligt. Dabei sind die gekreuzten Reduktionspotenziale des bifurkierenden FADs von zentraler Bedeutung. Das Reduktionspotenzial des einfach oxidierten Flavins (Semichinon/anionisches Semichinon ASQ) ist dabei negativer, als das Reduktionspotenzial des vollständig reduzierten Flavins (HQ). Das zweite Elektron zu transferieren ist damit thermodynamisch einfacher, als das erste Elektron. Daher hat das anionische Semichinon (ASQ) im Beispiel Nfn eine zentrale Bedeutung (Zhang et al. 2017; Lubner et al. 2017; Wise et al. 2022b).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung A) Vereinfachter Mechanismus der Elektronenbifurkation und B) Schematische Darstellung der Flavon-basierten Elektronenbifurkation am Beispiel Nfn.** Die Abbildung wurde erstellt/modifiziert nach (Buckel und Thauer 2018; Yuly et al. 2019).

Die NADH-abhängige reduziertes Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Nfn) besteht aus den beiden Untereinheiten NfnA und NfnB. Mittlerweile wurde Nfn aus zahlreichen anaeroben Organismen untersucht mit einer sehr hohen Übereinstimmung der Eigenschaften zwischen den Nfn-Enzymkomplexen aus den verschiedenen Organismen (Wang et al. 2010; Huang et al. 2012; Demmer et al. 2015; Lubner et al. 2017; Nguyen et al. 2017). Aufgrund der vergleichsweise einfachen Struktur mit nur zwei Untereinheiten und der Möglichkeit, die Proteine zu reinigen, ist Nfn das derzeit beliebteste Modellprotein zur Untersuchung der FBEB.

Der FBEB-Mechanismus von Nfn lässt sich vereinfacht und zusammenfassend wie folgt beschreiben: Als Zwei-Elektronendonator dient für Nfn NADPH, welches die Elektronen an das bifurkierende FAD (gelb in Abb. 27B) liefert. Elektronenbifurkation wird von diesem FAD bewerkstelligt, indem dieses je ein Elektron an die beiden verschiedenen Elektronentransferwege gibt. Das erste Elektron wird dabei an das [2Fe2S]-Cluster in der kleinen Untereinheit von Nfn (NfnA oder S) im Elektronentransferweg mit hohem Reduktionspotenzial (orange in Abbildung 27B) abgegeben. Von dort wird das Elektron über ein weiteres FAD in der kleinen Untereinheit für die NAD<sup>+</sup>-Reduktion genutzt. Dieser Elektronentransfer in Kombination mit der stabilisierenden Proteinstruktur ermöglicht die Ausbildung eines kurzlebigen anionischen Semichinons (ASQ) und führt zum Elektronentransfer im Elektronentransferweg mit niedrigem Reduktionspotenzial in der großen Untereinheit von Nfn (NfnB oder L). Hier wird das Elektron über das proximale und distale [4Fe4S]-Cluster an oxidiertes Ferredoxin abgegeben. Diese Bifurkation wird wiederholt um 1 NADH und 2 reduzierte Ferredoxine zu erhalten (Gleichung 1).



Ein viel diskutiertes und entscheidendes Feature der FBEB von Nfn ist das „gekreuzte“ Reduktionspotenzial des bifurkierenden Flavins, wobei die Reduktion des oxidierten Flavins zum anionischen Semichinon (ASQ) bei einem deutlich negativerem Potenzial erfolgt, als die Reduktion des ASQ zum vollständig reduziertem Flavohydrochinon (HQ) (Lubner et al. 2017; Nitschke und Russell 2012; Wise et al. 2022b). Diese Redoxeigenschaften des Flavins können sich nur manifestieren durch das mit einem Elektron reduzierte Flavinsemichinon, die aufgrund ihrer Kurzlebigkeit (circa 10 ps) und Instabilität schwer zu untersuchen sind. Die Bestimmung des Redoxpotenziales des bifurkierenden FADs ist ebenso schwierig und bedurfte der Entwicklung einer angepassten Methodik (Wise et al. 2022b). Die für FAD bestimmten Reduktionspotenziale von *Pyrococcus furiosus* NfnL sind dabei deutlich negativer als zuvor erwartet. Für die Redoxspezies des FAD in NfnL wurden durch die Kombination mehrere Methoden wie durch Transiente Absorptionsspektroskopie, Redox titrationen unter UV/Vis-Spektroskopie und Square Wave- Voltammetrie genauere Werte erlangt. Dabei wurde durch UV/Vis-Redox titrationen ein Redoxpotenzial  $E_{m,Ox/HQ}$  von -436 mV ermittelt. Für die Übergänge von FAD zum ASQ wurde ein Redoxpotenzial von -911 mV und für ASQ zum vollständig reduzierten Hydrochinon +40 mV angegeben, teilweise berechnet anhand der erhaltenen Daten, da ein direkter experimenteller Nachweis nicht möglich war (Wise et al. 2022b). Diese erstaunlich große Spanne, die innerhalb eines einzigen Cofaktors aufgebaut werden kann, ist beeindruckend. Im Vergleich zu anderen FBEB-fähigen Enzymen scheinen bei Nfn zur Realisierung des Prozesses auch keine aufwendigen Konformationsänderungen im Protein/Proteinkomplex notwendig zu sein (Wise et al. 2022b).

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zu den biochemischen Eigenschaften von DsrL lassen nicht den Beweis zu, dass DsrL zur FBEB fähig ist. Dennoch sollte die FBEB aus den folgenden Gründen bei zukünftigen Arbeiten als Arbeitshypothese nicht außer Acht gelassen werden:

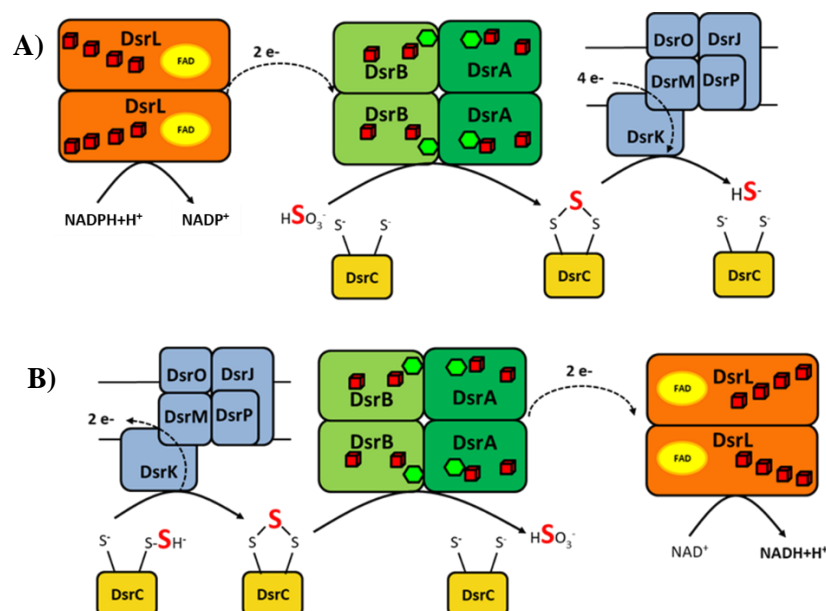
- 1) Strukturelle Ähnlichkeit zu FBEB-fähigen Enzymen wie NfnB/L, inklusive Konservierung von für die FBEB entscheidenden Aminosäuren
- 2) Kein stabiles Semichinon beobachtbar in diversen Experimenten
- 3) Gesamtprotein weist ein sehr negatives Redoxpotential auf
- 4) Der Reaktionsmechanismus von DsrABL mit DsrC ist trotz intensiver Bemühungen weiter unklar und eine FBEB könnte sich als physiologisch sinnvoll erweisen

Eine FBEB könnte sowohl im Kontext der Sulfatreduzierer mit DsrL wie auch für Schwefeloxidierer wertvolle physiologische Vorteile bieten. In Sulfatreduzieren könnten die

zwei Elektronen von NADPH genutzt werden, um Sulfid und zeitgleich Ferredoxin zu reduzieren. Reduziertes Ferredoxin als starkes Reduktionsmittel wird wiederum für diverse weitere Redoxreaktionen in den Zellen benötigt (Buckel und Thauer 2013). In Schwefeloxidierern wie *A. vinosum* könnte durch einen FBEB-ähnlichen Mechanismus mittels Oxidation von reduziertem Ferredoxin oder der reduzierten Ferredoxin-ähnlichen Domäne der direkte Elektronentransfer von DsrC-gebundenem Schwefel zu  $\text{NAD}^+$  ermöglicht werden. Solch ein direkter Transfer von Elektronen in den NAD-Pool wäre für autotrophe Schwefeloxidierer ein enormer Vorteil, da er die Notwendigkeit reduziert, die für die  $\text{CO}_2$ -Fixierung notwendigen Reduktionsäquivalente energieintensiv über reversen Elektronentransfer zu gewinnen.

#### 4.7 Funktion DsrL im dissimilatorischen Schwefelmetabolismus

Wie der vorangegangenen Diskussion zu entnehmen ist, bleiben viele Fragen zum Reaktionsmechanismus und zum Elektronenfluss während der Reaktionen von DsrABL mit DsrC ungeklärt. Daher ist dieser auch nicht näher in der folgenden zusammenfassenden Abbildung 28 dargestellt. Dass DsrL aber als Elektronendonator (Abb. 28A) oder als Elektronenakzeptor (Abb. 28B) für die durch DsrAB-katalysierte Reduktion oder Oxidation des DsrC-gebundenen Schwefels dienen kann, ist als Erkenntnis festhaltbar (Löffler et al. 2020a; Löffler et al. 2020b).



**Abbildung 28: Zusammenfassung der Funktion von DsrL im A) reduktiven und B) oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus.** Rote Würfel repräsentieren [4Fe4S]-Cluster, grüne Hexagone Siro(häm)amid, und gelbe Ovale FAD. Der Dargestellte Elektronenfluss (gestrichelte Pfeile) ist schematisch. **A)** DsrL-2 kann als Elektronendonator für die Sulfatreduktion dienen und nutzt dabei NADPH als Substrat. **B)** DsrL 1A und 1B dient als Elektronenakzeptor für die Schwefeloxidation und bevorzugt  $\text{NAD}^+$  als Substrat.

In Sulfat- oder Sulfit-reduzierenden Organismen dient sehr wahrscheinlich ausschließlich NADPH als Elektronendonator für die DsrAB-katalysierte Reaktion. Das entstehende Trisulfid wird anschließend vermutlich durch den DsrMKJOP-Komplex gespalten und Sulfid und regeneriertes DsrC wird entlassen (Santos et al. 2015). Die für diese Reaktion notwendigen Elektronen stammen dabei vorraussichtlich aus dem Chinonpool (Santos et al. 2015). Diese Reaktion läuft vermutlich in reverser Richtung während der Schwefeloxidation ab, wobei hier möglicherweise der an DsrC gebundene Schwefel am DsrMKJOP-Komplex in einem ersten Schritt oxidiert wird und Elektronen dabei an den Chinonpool abgegeben werden. Ein DsrC-Trisulfid als Produkt konnte bisher in Schwefeloxidierern nicht nachgewiesen werden und möglicherweise liegt hier auch ein anderer Reaktionsmechanismus vor (Lofi 2020). Der an DsrC gebundene Schwefel wird durch DsrAB weiter oxidiert zu Sulfit und die Elektronen werden an DsrL abgegeben, welches  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor nutzt (Löffler et al. 2020b). Die weiterführenden Untersuchungen zur Funktion von DsrL in Sulfatreduzieren sind sicher interessant. DaDsrL-2 ist kein geeigneter Elektronendonator für DsrABC aus *Archaeoglobus fulgidus*. Enzymatische Assays konnten hier keine oder nur eine sehr geringe Enzymaktivität zeigen bei der Nutzung von DaDsrL-2 als Elektronendonator mit NADPH als Substrat und DsrABC aus *A. fulgidus*. (Daten nicht gezeigt). Dies verwundert auch wenig, wenn man sich die vielen unerwarteten Eigenschaften des Dsr-Systems in *D. amilsii* ansieht, die vermuten lassen, dass hier ein anderer Reaktionsmechanismus für die Sulfitreduktion vorliegen muss. Interessant ist, dass in *D. amilsii* zum Beispiel nur *dsrMK* vorkommen und dass das zweite konservierte Cystein an DsrC fehlt (Florentino et al. 2019), welches essentiell in der Sulfatreduktion an der Ausbildung des DsrC-Trisulfids beteiligt ist (Santos et al. 2015). Zudem kommen in *D. amilsii* neben DsrL auch noch DsrE-ähnliche Proteine (DESAMIL20\_1427 und DESAMIL20\_1428) vor, die ebenfalls vormals nur in Schwefel-oxidierenden Organismen bekannt waren. Der in Abbildung 28 dargestellte Mechanismus ist also nur bedingt zutreffend und in den nächsten Jahren werden sicher neue Erkenntnisse dazu führen, dass neue Reaktionsmechanismen sowohl für den oxidativen, wie auch für den reduktiven Schwefelmetabolismus aufgestellt werden können. Die in den letzten Jahren aufkommende Diversität ist jedenfalls beeindruckend und lässt keine seriöse und allgemeingültige Aufstellung eines Reaktionsschemas zu.

Zudem lassen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weiterhin die Möglichkeit zu, dass ein weitaus komplexerer Reaktionsablauf denkbar ist. Die Interaktion zwischen AvDsrABL sollte genauer untersucht werden und der Aufbau des Proteinkomplexes sollte aufgeklärt werden, um über die Anordnung der Cofaktoren belastbarere Hinweise auf den

Reaktionsmechanismus zu bekommen. Zudem erscheint es sinnvoll und interessant, unabhängig davon, DsrAB und DsrL aus *D. amilsii* näher zu untersuchen, da hier ein anderer Reaktionsmechanismus zugrunde zu liegen scheint. Die unerwartete Diversität und Komplexität des Dsr-Systems ergibt die Notwendigkeit die Interaktion der Proteine ebenso genauer zu untersuchen wie auch die Funktionen im Reaktionsablauf einzelner Cofaktoren in den Proteinkomplexen. Deren Veränderung und Modifikation könnte in den verschiedenen Organismen auch zu unterschiedlichen angepassten Reaktionsmechanismen führen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das FeS-Cluster enthaltende Flavoprotein DsrL besitzt NAD(P)H-Oxidoreduktase-Aktivität und dient als Elektronendonator oder -akzeptor für die von DsrAB katalysierte Reaktion während der dissimilatorischen Sulfat/Sulfit-Reduktion oder der Schwefeloxidation. DsrL kommt nicht nur, wie ursprünglich angenommen, in schwefeloxidierenden Organismen vor, sondern auch in Organismen mit reduktivem dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel. DsrL interagiert eng mit DsrAB, wie die gemeinsame Aufreinigung der Proteine aus dem Schwefelpurpurbakterium *Allochromatium vinosum* zeigt, wobei die Proteine selbst durch mehrere chromatographische Reinigungsschritte nicht getrennt werden.

Phylogenetische und biochemische Untersuchungen erlauben die Unterscheidung von zwei Hauptgruppen von DsrL. DsrL-1 kommt vor allem in Organismen vor, welche die reverse dissimilatorische Sulfitreduktase (rDsrAB) besitzen und damit hauptsächlich in Schwefel oxidierenden Organismen. Das bevorzugte Substrat ist NAD<sup>+</sup>/NADH. Die DsrL-2 Gruppe kommt hauptsächlich in Organismen mit reduktiver DsrAB vor und nutzt NADP(H) als Substrat. Alle DsrL-Proteine bestehen aus einer N-terminalen FeS-Cluster-bindenden Domäne, und einer zentralen NAD(P)H-bindenden Domäne, die in eine FAD-bindende Domäne eingebettet ist. C-terminal, nach einer als Linker-Domäne bezeichneten Region, ist eine zweite Ferredoxin-ähnliche Domäne charakteristisch für DsrL. Die Unterschiede in der Substratspezifität zwischen den DsrL-Typen lassen sich auf Unterschiede in der Aminosäuresequenz zurückführen. So ist in DsrL-2 mit NADPH als Substrat ein Motiv mit zwei Argininen konserviert, welches im DsrL-verwandten NfnB an der Bindung der Phosphatgruppe von NADPH beteiligt ist.

DsrL aus *A. vinosum* enthält vier [4Fe4S]-Cluster mit sehr negativen Redoxpotentialen von -330 mV und -390 mV im Verhältnis 3:1. Das enthaltene FAD hat als vorläufiges Ergebnis ebenfalls ein negatives Redoxpotential von etwa -370 mV. Der genaue Reaktionsmechanismus von DsrABL konnte noch nicht aufgeklärt werden. Die Eigenschaften von DsrL legen jedoch nahe, dass bei zukünftigen Untersuchungen ein Reaktionsmechanismus ähnlich der Flavin-basierten Elektronenbifurkation nicht außer Acht gelassen werden sollte.



## 6. Literaturverzeichnis

Agarwal, Prachi; Sharma, D. K. (2010): Comparative Studies on the Bio-desulfurization of Crude Oil with Other Desulfurization Techniques and Deep Desulfurization through Integrated Processes. In: *Energy & Fuels* 24 (1), S. 518–524. DOI: 10.1021/ef900876j.

Akhtar, M. Kalim; Jones, Patrik R. (2008): Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H<sub>2</sub>-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (5), S. 853–862. DOI: 10.1007/s00253-008-1377-6.

Aliverti, A.; Curti, B.; Vanoni, M. A. (1999): Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins. In: *Methods in Molecular Biology* 131, S. 9–23. DOI: 10.1385/1-59259-266-X:9.

Altschul, Stephen F.; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene W.; Lipman, David J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* 215 (3), S. 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Amador-Noguez, Daniel; Brasg, Ian A.; Feng, Xiao-Jiang; Roquet, Nathaniel; Rabinowitz, Joshua D. (2011): Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (22), S. 7984–7997. DOI: 10.1128/AEM.05374-11.

Anantharaman, Karthik; Brown, Christopher T.; Hug, Laura A.; Sharon, Itai; Castelle, Cindy J.; Probst, Alexander J. et al. (2016): Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. In: *Nature Communications* 7 (1), S. 13219. DOI: 10.1038/ncomms13219.

Anantharaman, Karthik; Hausmann, Bela; Jungbluth, Sean P.; Kantor, Rose S.; Lavy, Adi; Warren, Lesley A. et al. (2018): Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. In: *The ISME Journal* 12 (7), S. 1715–1728. DOI: 10.1038/s41396-018-0078-0.

Bak, Daniel W.; Elliott, Sean J. (2014): Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 19, S. 50–58. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.12.015.

Bennett, Bryson D.; Kimball, Elizabeth H.; Gao, Melissa; Osterhout, Robin; van Dien, Stephen J.; Rabinowitz, Joshua D. (2009): Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. In: *Nature Chemical Biology* 5 (8), S. 593–599. DOI: 10.1038/nchembio.186.

Bryantseva, Irina A.; Tarasov, Alexey L.; Kostrikina, Nadezhda A.; Gaisin, Vasil A.; Grouzdev, Denis S.; Gorlenko, Vladimir M. (2019): *Prosthecochloris marina* sp. nov., a new green sulfur bacterium from the coastal zone of the South China Sea. In: *Archives of Microbiology* 201 (10), S. 1399–1404. DOI: 10.1007/s00203-019-01707-y.

Buckel, Wolfgang; Thauer, Rudolf K. (2013): Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1827 (2), S. 94–113. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.07.002.

Buckel, Wolfgang; Thauer, Rudolf K. (2018): Flavin-Based Electron Bifurcation, A New Mechanism of Biological Energy Coupling. In: *Chemical Reviews* 118 (7), S. 3862–3886. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00707.

Cheng, Xiaotao; Xia, Mengli; Yang, Yu (2023): Biodegradation of vulcanized rubber by a gut bacterium from plastic-eating mealworms. In: *Journal of Hazardous Materials* 448, S. 130940. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.130940.

- Chowdhury, Nilanjan Pal; Mowafy, Amr M.; Demmer, Julius K.; Upadhyay, Vikrant; Koelzer, Sebastian; Jayamani, Elamparithi et al. (2014): Studies on the mechanism of electron bifurcation catalyzed by electron transferring flavoprotein (Etf) and butyryl-CoA dehydrogenase (Bcd) of *Acidaminococcus fermentans*. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (8), S. 5145–5157. DOI: 10.1074/jbc.M113.521013.
- Cottevieille, Magali; Larquet, Eric; Jonic, Slavica; Petoukhov, Maxim V.; Caprini, Gianluca; Paravisi, Stefano et al. (2008): The Subnanometer Resolution Structure of the Glutamate Synthase 1.2-MDa Hexamer by Cryoelectron Microscopy and Its Oligomerization Behavior in Solution: FUNCTIONAL IMPLICATIONS\*. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (13), S. 8237–8249. DOI: 10.1074/jbc.M708529200.
- Dagert, M.; Ehrlich, S. D. (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. In: *Gene* 6 (1), S. 23–28. DOI: 10.1016/0378-1119(79)90082-9.
- Dahl, Christiane (2020): A biochemical view on the biological sulfur cycle. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineering*, Piet N. L. Lens (2), S. 55–96. DOI: 10.2166/9781789060966\_0055.
- Dahl, Christiane; Engels, Sabine; Pott-Sperling, Andrea S.; Schulte, Andrea; Sander, Johannes; Lübbe, Yvonne et al. (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*. In: *Journal of bacteriology* 187 (4), S. 1392–1404. DOI: 10.1128/JB.187.4.1392-1404.2005.
- Dahl, Christiane; Schulte, Andrea; Stockdreher, Yvonne; Hong, Connie; Grimm, Frauke; Sander, Johannes et al. (2008): Structural and molecular genetic insight into a widespread sulfur oxidation pathway. In: *Journal of Molecular Biology* 384 (5), S. 1287–1300. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.016.
- Demmer, Julius K.; Bertsch, Johannes; Öppinger, Christian; Wohlers, Hannah; Kayastha, Kanwal; Demmer, Ulrike et al. (2018): Molecular basis of the flavin-based electron-bifurcating caffeyl-CoA reductase reaction. In: *FEBS Letters* 592 (3), S. 332–342. DOI: 10.1002/1873-3468.12971.
- Demmer, Julius K.; Huang, Haiyan; Wang, Shuning; Demmer, Ulrike; Thauer, Rudolf K.; Ermler, Ulrich (2015): Insights into Flavin-based Electron Bifurcation via the NADH-dependent Reduced Ferredoxin:NADP Oxidoreductase Structure. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (36), S. 21985–21995. DOI: 10.1074/jbc.M115.656520.
- Denger, K.; Stackebrandt, E.; Cook, A. M. (1999): *Desulfonispora thiosulfatigenes* gen. nov., sp. nov., a taurine-fermenting, thiosulfate-producing anaerobic bacterium. In: *International journal of systematic bacteriology* 49 Pt 4 (4), S. 1599–1603. DOI: 10.1099/00207713-49-4-1599.
- Evans, Emrys W.; Dodson, Charlotte A.; Maeda, Kiminori; Biskup, Till; Wedge, C. J.; Timmel, Christiane R. (2013): Magnetic field effects in flavoproteins and related systems. In: *Interface Focus* 3 (5), S. 20130037. DOI: 10.1098/rsfs.2013.0037.
- Florentino, Anna P.; Brienza, Claudio; Stams, Alfons J. M.; Sánchez-Andrea, Irene (2016): *Desulfurella amilsii* sp. nov., a novel acidotolerant sulfur-respiring bacterium isolated from acidic river sediments. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (3), S. 1249–1253. DOI: 10.1099/ijsem.0.000866.
- Florentino, Anna P.; Pereira, Inês A. C.; Boeren, Sjeff; van den Born, Michael; Stams, Alfons J. M.; Sánchez-Andrea, Irene (2019): Insight into the sulfur metabolism of *Desulfurella amilsii* by differential proteomics. In: *Environmental microbiology* 21 (1), S. 209–225. DOI: 10.1111/1462-2920.14442.
- Florentino, Anna P.; Stams, Alfons J. M.; Sánchez-Andrea, Irene (2017): Genome Sequence of *Desulfurella amilsii* Strain TR1 and Comparative Genomics of *Desulfurellaceae* Family. In: *Frontiers in Microbiology* 8, S. 222. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00222.

- Fugate, Corey J.; Jarrett, Joseph T. (2012): Biotin synthase: insights into radical-mediated carbon-sulfur bond formation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1824 (11), S. 1213–1222. DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.01.010.
- Grein, Fabian (2010): Biochemical, biophysical and functional analysis of the DsrMKJOP transmembrane complex from *Allochromatium vinosum*. Dissertation. Universitäts- und Landesbibliothek Bonn. Online verfügbar unter <https://hdl.handle.net/20.500.11811/4698>.
- Grein, Fabian; Pereira, Inês A. C.; Dahl, Christiane (2010): Biochemical characterization of individual components of the *Allochromatium vinosum* DsrMKJOP transmembrane complex aids understanding of complex function in vivo. In: *Journal of bacteriology* 192 (24), S. 6369–6377. DOI: 10.1128/JB.00849-10.
- Hanahan, Douglas (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (4), S. 557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- Hausmann, Bela; Pelikan, Claus; Herbold, Craig W.; Köstlbacher, Stephan; Albertsen, Mads; Eichorst, Stephanie A. et al. (2018): Peatland *Acidobacteria* with a dissimilatory sulfur metabolism. In: *The ISME Journal* 12 (7), S. 1729–1742. DOI: 10.1038/s41396-018-0077-1.
- Herrmann, Gloria; Jayamani, Elamparithi; Mai, Galina; Buckel, Wolfgang (2008): Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. In: *Journal of bacteriology* 190 (3), S. 784–791. DOI: 10.1128/JB.01422-07.
- Hoben, John P.; Lubner, Carolyn E.; Ratzloff, Michael W.; Schut, Gerrit J.; Nguyen, Diep M. N.; Hempel, Karl W. et al. (2017): Equilibrium and ultrafast kinetic studies manipulating electron transfer: A short-lived flavin semiquinone is not sufficient for electron bifurcation. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (34), S. 14039–14049. DOI: 10.1074/jbc.M117.794214.
- Huang, C. J.; Barrett, E. L. (1991): Sequence analysis and expression of the *Salmonella typhimurium* asr operon encoding production of hydrogen sulfide from sulfite. In: *Journal of bacteriology* 173 (4), S. 1544–1553. DOI: 10.1128/jb.173.4.1544-1553.1991.
- Huang, Haiyan; Wang, Shuning; Moll, Johanna; Thauer, Rudolf K. (2012): Electron bifurcation involved in the energy metabolism of the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* growing on glucose or H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub>. In: *Journal of bacteriology* 194 (14), S. 3689–3699. DOI: 10.1128/JB.00385-12.
- Imhoff, Johannes F.; Thiel, Vera (2010): Phylogeny and taxonomy of *Chlorobiaceae*. In: *Photosynthesis research* 104 (2-3), S. 123–136. DOI: 10.1007/s11120-009-9510-7.
- Ines Volkert (2017): Die funktionellen Domänen des FeS-Cluster-haltigen Flavoproteins DsrL aus *Allochromatium vinosum*. Bachelorarbeit. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn. Institut für Biotechnologie und Mikrobiologie.
- Isaksen, M. F.; Teske, Andreas (1996): *Desulforhopalus vacuolatus* gen. nov., sp. nov., a new moderately psychrophilic sulfate-reducing bacterium with gas vacuoles isolated from a temperate estuary. In: *Archives of Microbiology* 166 (3), S. 160–168. DOI: 10.1007/s002030050371.
- Joyce, Michael G.; Ekanem, Idorenyin S.; Roitel, Olivier; Dunford, Adrian J.; Neeli, Rajasekhar; Girvan, Hazel M. et al. (2012): The crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of flavocytochrome P450 BM3. In: *The FEBS Journal* 279 (9), S. 1694–1706. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08544.x.
- Kai Wallerang (2019): Die Funktion des FeS-Flavoproteins DsrL im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von Chlorobien. Bachelorarbeit. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.
- Keen, N. T.; Tamaki, S.; Kobayashi, D.; Trollinger, D. (1988): Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. In: *Gene* 70 (1), S. 191–197. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90117-5.

- Kjeldsen, Kasper U.; Schreiber, Lars; Thorup, Casper A.; Boesen, Thomas; Bjerg, Jesper T.; Yang, Tingting et al. (2019): On the evolution and physiology of cable bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (38), S. 19116. DOI: 10.1073/pnas.1903514116.
- Koch, Tobias; Dahl, Christiane (2018): A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. In: *The ISME Journal* 12 (10), S. 2479–2491. DOI: 10.1038/s41396-018-0209-7.
- Kröniger, Lena; Steiniger, Fabian; Berger, Stefanie; Kraus, Sebastian; Welte, Cornelia U.; Deppenmeier, Uwe (2019): Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. In: *The FEBS Journal* 286 (19), S. 3831–3843. DOI: 10.1111/febs.14948.
- Kuchenreuther, Jon M.; Grady-Smith, Celestine S.; Bingham, Alyssa S.; George, Simon J.; Cramer, Stephen P.; Swartz, James R. (2010): High-yield expression of heterologous FeFe hydrogenases in *Escherichia coli*. In: *PloS one* 5 (11), e15491. DOI: 10.1371/journal.pone.0015491.
- Kumar, Sudhir; Stecher, Glen; Li, Michael; Knyaz, Christina; Tamura, Koichiro (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. In: *Molecular biology and evolution* 35 (6), S. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- Leavitt, William D.; Bradley, Alexander S.; Santos, André A.; Pereira, Inês A. C.; Johnston, David T. (2015): Sulfur Isotope Effects of Dissimilatory Sulfite Reductase. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 1392. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01392.
- Lenk, Sabine; Moraru, Cristina; Hahnke, Sarah; Arnds, Julia; Richter, Michael; Kube, Michael et al. (2012): Roseobacter clade bacteria are abundant in coastal sediments and encode a novel combination of sulfur oxidation genes. In: *The ISME Journal* 6 (12), S. 2178–2187. DOI: 10.1038/ismej.2012.66.
- Lens, P.N.L.; Kuenen, J. G. (2001): The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. In: *Water Science and Technology* 44 (8), S. 57–66. DOI: 10.2166/wst.2001.0464.
- Li, Yuanhu; Zhao, Suhe; Wang, Yaqin (2011): Microbial desulfurization of ground tire rubber by *Thiobacillus ferrooxidans*. In: *Polymer Degradation and Stability* 96 (9), S. 1662–1668. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.06.011.
- Liu, Bin; Liu, Hongtao; Zhong, Dongping; Lin, Chentao (2010): Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. In: *Current opinion in plant biology* 13 (5), S. 578–586. DOI: 10.1016/j.pbi.2010.09.005.
- Löffler, Maria; Feldhues, Julia; Venceslau, Sofia S.; Kammler, Lydia; Grein, Fabian; Pereira, Inês A. C.; Dahl, Christiane (2020a): DsrL mediates electron transfer between NADH and rDsrAB in *Allochromatium vinosum*. In: *Environmental microbiology* 22 (2), S. 783–795. DOI: 10.1111/1462-2920.14899.
- Löffler, Maria; Wallerang, Kai B.; Venceslau, Sofia S.; Pereira, Inês A. C.; Dahl, Christiane (2020b): The Iron-Sulfur Flavoprotein DsrL as NAD(P)H:Acceptor Oxidoreductase in Oxidative and Reductive Dissimilatory Sulfur Metabolism. In: *Frontiers in Microbiology* 11, S. 578209. DOI: 10.3389/fmicb.2020.578209.
- Lofi, Julia (2020): Characterization of the Sulfite-Generating rDsrABL Complex of *Allochromatium vinosum*. Universitäts- und Landesbibliothek Bonn, Bonn. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie. Online verfügbar unter <https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/8851>.
- Lübbe, Yvonne (2005): Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion von DsrN und DsrL im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *Allochromatium vinosum*. Dissertation. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie. Online verfügbar unter <https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/2312>.

- Lübbe, Yvonne J.; Youn, Hyung-Sun; Timkovich, Russell; Dahl, Christiane (2006): Siro(haem)amide in *Allochromatium vinosum* and relevance of DsrL and DsrN, a homolog of cobyrinic acid a,c-diamide synthase, for sulphur oxidation. In: *FEMS Microbiol Lett* 261 (2), S. 194–202. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00343.x.
- Lubner, Carolyn E.; Jennings, David P.; Mulder, David W.; Schut, Gerrit J.; Zadvornyy, Oleg A.; Hoben, John P. et al. (2017): Mechanistic insights into energy conservation by flavin-based electron bifurcation. In: *Nature Chemical Biology* 13 (6), S. 655–659. DOI: 10.1038/nchembio.2348.
- Lydia Kammler (2009): Heterologe Produktion und Charakterisierung des purpurbakteriellen Eisen-Schwefel-Flavoproteins DsrL aus *Allochromatium vinosum*. Diplomarbeit. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.
- Massey, Vincent (1957): Studies on succinic dehydrogenase. VII. Valency state of the iron in beef heart succinic dehydrogenase. In: *Journal of Biological Chemistry* 229 (2), S. 763–770. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)63681-1.
- McLaughlin, Martin I.; Lanz, Nicholas D.; Goldman, Peter J.; Lee, Kyung-Hoon; Booker, Squire J.; Drennan, Catherine L. (2016): Crystallographic snapshots of sulfur insertion by lipoyl synthase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (34), S. 9446. DOI: 10.1073/pnas.1602486113.
- Mitchell, Peter (1975): The protonmotive Q cycle: A general formulation. In: *FEBS Letters* 59 (2), S. 137–139. DOI: 10.1016/0014-5793(75)80359-0.
- Mitchell, Peter (1976): Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. In: *Journal of Theoretical Biology* 62 (2), S. 327–367. DOI: 10.1016/0022-5193(76)90124-7.
- Momper, Lily; Jungbluth, Sean P.; Lee, Michael D.; Amend, Jan P. (2017): Energy and carbon metabolisms in a deep terrestrial subsurface fluid microbial community. In: *The ISME Journal* 11 (10), S. 2319–2333. DOI: 10.1038/ismej.2017.94.
- Mortenson, L. E. (1964): Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* 81 (1), S. 71–77. DOI: 10.1016/0926-6569(64)90336-0.
- Müller, Hubert; Marozava, Sviatlana; Probst, Alexander J.; Meckenstock, Rainer U. (2020): Groundwater cable bacteria conserve energy by sulfur disproportionation. In: *The ISME Journal* 14 (2), S. 623–634. DOI: 10.1038/s41396-019-0554-1.
- Murros, Kari Erik (2022): Hydrogen Sulfide Produced by Gut Bacteria May Induce Parkinson's Disease. In: *Cells* 11 (6). DOI: 10.3390/cells11060978.
- Mussmann, Marc; Richter, Michael; Lombardot, Thierry; Meyerdierks, Anke; Kuever, Jan; Kube, Michael et al. (2005): Clustered genes related to sulfate respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer. In: *Journal of bacteriology* 187 (20), S. 7126–7137. DOI: 10.1128/JB.187.20.7126-7137.2005.
- Nguyen, Diep M. N.; Schut, Gerrit J.; Zadvornyy, Oleg A.; Tokmina-Lukaszewska, Monika; Poudel, Saroj; Lipscomb, Gina L. et al. (2017): Two functionally distinct NADP<sup>+</sup>-dependent ferredoxin oxidoreductases maintain the primary redox balance of *Pyrococcus furiosus*. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (35), S. 14603–14616. DOI: 10.1074/jbc.M117.794172.
- Nitschke, Wolfgang; Russell, Michael J. (2012): Redox bifurcations: mechanisms and importance to life now, and at its origin: a widespread means of energy conversion in biology unfolds... In: *BioEssays* 34 (2), S. 106–109. DOI: 10.1002/bies.201100134.
- Ostrowski, J.; Barber, M. J.; Rueger, D. C.; Miller, B. E.; Siegel, L. M.; Kredich, N. M. (1989): Characterization of the Flavoprotein Moieties of NADPH-Sulfite Reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (27), S. 15796–15808. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)71547-0.

- Pereira, Inês A. Cardoso; Ramos, Ana Raquel; Grein, Fabian; Marques, Marta Coimbra; Da Silva, Sofia Marques; Venceslau, Sofia Santos (2011): A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. In: *Frontiers in Microbiology* 2, S. 69. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00069.
- Peters, John W.; Miller, Anne-Frances; Jones, Anne K.; King, Paul W.; Adams, Michael Ww (2016): Electron bifurcation. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 31, S. 146–152. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.03.007.
- Pettersen, Eric F.; Goddard, Thomas D.; Huang, Conrad C.; Couch, Gregory S.; Greenblatt, Daniel M.; Meng, Elaine C.; Ferrin, Thomas E. (2004): UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. In: *Journal of Computational Chemistry* 25 (13), S. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- Pokorna, Dana; Zabranska, Jana (2015): Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. In: *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2), S. 1246–1259. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.007.
- Pourhossein, Fatemeh; Mousavi, Seyyed Mohammad (2023): Improvement of gold bioleaching extraction from waste telecommunication printed circuit boards using biogenic thiosulfate by *Acidithiobacillus thiooxidans*. In: *Journal of Hazardous Materials* 450, S. 131073. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131073.
- Py, Béatrice; Barras, Frédéric (2010): Building Fe-S proteins: bacterial strategies. In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (6), S. 436–446. DOI: 10.1038/nrmicro2356.
- Rabus, Ralf; Venceslau, Sofia S.; Wöhlbrand, Lars; Voordouw, Gerrit; Wall, Judy D.; Pereira, Inês A. C. (2015): A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. In: *Advances in Microbial Physiology* 66, S. 55–321. DOI: 10.1016/bs.ampbs.2015.05.002.
- Ramos, Ana Raquel; Keller, Kimberly L.; Wall, Judy D.; Pereira, Inês A. Cardoso (2012): The Membrane QmoABC Complex Interacts Directly with the Dissimilatory Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase in Sulfate Reducing Bacteria. In: *Frontiers in Microbiology* 3, S. 137. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00137.
- Ravasio, S.; Curti, B.; Vanoni, M. A. (2001): Determination of the midpoint potential of the FAD and FMN flavin cofactors and of the 3Fe-4S cluster of glutamate synthase. In: *Biochemistry* 40 (18), S. 5533–5541. DOI: 10.1021/bi0100889.
- Risgaard-Petersen, Nils; Kristiansen, Michael; Frederiksen, Rasmus B.; Dittmer, Anders Lindequist; Bjerg, Jesper Tataru; Trojan, Daniela et al. (2015): Cable Bacteria in Freshwater Sediments. In: *Applied and Environmental Microbiology* 81 (17), S. 6003–6011. DOI: 10.1128/AEM.01064-15.
- Roy, Ambrish; Kucukural, Alper; Zhang, Yang (2010): I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. In: *Nature protocols* 5 (4), S. 725–738. DOI: 10.1038/nprot.2010.5.
- Sander, Johannes; Engels-Schwarzlose, Sabine; Dahl, Christiane (2006): Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes. In: *Archives of Microbiology* 186 (5), S. 357–366. DOI: 10.1007/s00203-006-0156-y.
- Santos, André A.; Venceslau, Sofia S.; Grein, Fabian; Leavitt, William D.; Dahl, Christiane; Johnston, David T.; Pereira, Inês A. C. (2015): A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. In: *Science* 350 (6267), S. 1541–1545. DOI: 10.1126/science.aad3558.
- Schedel, Michael; Vanselow, Maria; Trper, Hans G. (1979): Siroheme sulfite reductase isolated from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. In: *Archives of Microbiology* 121 (1), S. 29–36. DOI: 10.1007/BF00409202.

- Schiffer, Alexander; Parey, Kristian; Warkentin, Eberhard; Diederichs, Kay; Huber, Harald; Stetter, Karl O. et al. (2008): Structure of the dissimilatory sulfite reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. In: *Journal of Molecular Biology* 379 (5), S. 1063–1074. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.04.027.
- Schwartz, C. J.; Giel, J. L.; Patschkowski, T.; Luther, C.; Ruzicka, F. J.; Beinert, H.; Kiley, P. J. (2001): IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26), S. 14895–14900. DOI: 10.1073/pnas.251550898.
- Siegel, L. M.; Rueger, D. C.; Barber, M. J.; Krueger, R. J.; Orme-Johnson, N. R.; Orme-Johnson, W. H. (1982): *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit. Prosthetic groups, catalytic parameters, and ligand complexes. In: *Journal of Biological Chemistry* 257 (11), S. 6343–6350. DOI: 10.1016/s0021-9258(20)65147-x.
- Sipma, Jan; Henstra, Anne M.; Parshina, Sofiya M.; Lens, Piet N.; Lettinga, Gatzke; Stams, Alfons J. M. (2006): Microbial CO conversions with applications in synthesis gas purification and bio-desulfurization. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 26 (1), S. 41–65. DOI: 10.1080/07388550500513974.
- Spaans, Sebastiaan K.; Weusthuis, Ruud A.; van der Oost, John; Kengen, Servé W. M. (2015): NADPH-generating systems in bacteria and archaea. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 742. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00742.
- Stockdreher, Yvonne; Sturm, Marga; Josten, Michael; Sahl, Hans-Georg; Dobler, Nadine; Zigann, Renate; Dahl, Christiane (2014): New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochrochromatium vinosum*. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (18), S. 12390–12403. DOI: 10.1074/jbc.M113.536425.
- Stockdreher, Yvonne; Venceslau, Sofia S.; Josten, Michael; Sahl, Hans-Georg; Pereira, Inês A. C.; Dahl, Christiane (2012): Cytoplasmic sulfurtransferases in the purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*: evidence for sulfur transfer from DsrEFH to DsrC. In: *PloS one* 7 (7), e40785. DOI: 10.1371/journal.pone.0040785.
- Suzuki, D.; Ueki, A.; Amaishi, A.; Ueki, K. (2007): *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007 (57), Artikel doi: 10.1099/ijs.0.64600-0, S. 520–526.
- Takahashi, Y.; Nakamura, M. (1999): Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biochemistry* 126 (5), S. 917–926. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022535.
- Tan, Sha; Liu, Jun; Fang, Yun; Hedlund, Brian P.; Lian, Zheng-Han; Huang, Li-Ying et al. (2019): Insights into ecological role of a new deltaproteobacterial order Candidatus *Acidulodesulfobacterales* by metagenomics and metatranscriptomics. In: *The ISME Journal* 13 (8), S. 2044–2057. DOI: 10.1038/s41396-019-0415-y.
- Tanabe, Tomohisa Sebastian; Dahl, Christiane (2022): HMS-S-S: A tool for the identification of Sulphur metabolism-related genes and analysis of operon structures in genome and metagenome assemblies. In: *Molecular Ecology Resources* 22 (7), S. 2758–2774. DOI: 10.1111/1755-0998.13642.
- Tanabe, Tomohisa Sebastian; Leimkühler, Silke; Dahl, Christiane (2019): The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA. In: *Advances in Microbial Physiology* 75, S. 233–277. DOI: 10.1016/bs.ampbs.2019.07.004.
- Thauer, R. K.; Jungermann, K.; Decker, K. (1977): Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. In: *Bacteriological Reviews* 41 (1), S. 100–180. DOI: 10.1128/BR.41.1.100-180.1977.

- Thorup Casper; Schramm Andreas; Findlay Alyssa J.; Finster Kai W.; Schreiber Lars; Newman Dianne K. (2017): Disguised as a Sulfate Reducer: Growth of the Deltaproteobacterium *Desulfurivibrio alkaliphilus* by Sulfide Oxidation with Nitrate. In: *mBio* 8 (4), e00671-17. DOI: 10.1128/mBio.00671-17.
- Trojan, Daniela; Schreiber, Lars; Bjerg, Jesper T.; Bøggild, Andreas; Yang, Tingting; Kjeldsen, Kasper U.; Schramm, Andreas (2016): A taxonomic framework for cable bacteria and proposal of the candidate genera *Electrothrix* and *Electronema*. In: *Systematic and Applied Microbiology* 39 (5), S. 297–306. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.05.006.
- van den Heuvel, Robert H.H; Svergun, Dmitri I.; Petoukhov, Maxim V.; Coda, Alessandro; Curti, Bruno; Ravasio, Sergio et al. (2003): The Active Conformation of Glutamate Synthase and its Binding to Ferredoxin. In: *Journal of Molecular Biology* 330 (1), S. 113–128. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00522-9.
- Vanessa Klingbeil (2018): Produktion und Charakterisierung des Flavoproteins DsrL aus dem Schwefel reduzierendem Organismus *Desulfurella amilsii*. Bachelorarbeit. Freie Universität Berlin, Berlin. Angfertigt am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologier, Universität Bonn.
- Venceslau, S. S.; Stockdreher, Y.; Dahl, C.; Pereira, I.A.C. (2014): The “bacterial heterodisulfide” DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837 (7), S. 1148–1164. DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.03.007.
- Wagner, Tristan; Koch, Jürgen; Ermler, Ulrich; Shima, Seigo (2017): Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction. In: *Science* 357 (6352), S. 699–703. DOI: 10.1126/science.aan0425.
- Wahlund, Thomas M.; Woese, Carl R.; Castenholz, Richard W.; Madigan, Michael T. (1991): A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. In: *Archives of Microbiology* 156 (2), S. 81–90. DOI: 10.1007/BF00290978.
- Wang, Shuning; Huang, Haiyan; Moll, Johanna; Thauer, Rudolf K. (2010): NADP<sup>+</sup> reduction with reduced ferredoxin and NADP<sup>+</sup> reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*. In: *Journal of bacteriology* 192 (19), S. 5115–5123. DOI: 10.1128/JB.00612-10.
- Weissgerber, Thomas; Sylvester, Marc; Kröninger, Lena; Dahl, Christiane (2014): A comparative quantitative proteomic study identifies new proteins relevant for sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 80 (7), S. 2279–2292. DOI: 10.1128/AEM.04182-13.
- Wikström, Mårten K.F.; Berden, Jan A. (1972): Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 283 (3), S. 403–420. DOI: 10.1016/0005-2728(72)90258-7.
- Wise, Courtney E.; Ledinina, Anastasia E.; Lubner, Carolyn E. (2022a): Site-Differentiated Iron-Sulfur Cluster Ligation Affects Flavin-Based Electron Bifurcation Activity. In: *Metabolites* 12 (9), S. 823. DOI: 10.3390/metabo12090823.
- Wise, Courtney E.; Ledinina, Anastasia E.; Mulder, David W.; Chou, Katherine J.; Peters, John W.; King, Paul W.; Lubner, Carolyn E. (2022b): An uncharacteristically low-potential flavin governs the energy landscape of electron bifurcation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (12), e2117882119. DOI: 10.1073/pnas.2117882119.
- Wolf, Patricia G.; Cowley, Elise S.; Breister, Adam; Matatov, Sarah; Lucio, Luke; Polak, Paige et al. (2022): Diversity and distribution of sulfur metabolic genes in the human gut microbiome and their association with colorectal cancer. In: *Microbiome* 10 (1), S. 64. DOI: 10.1186/s40168-022-01242-x.



- Wu, Fei; Yu, Ping; Yang, Xiaoti; Han, Zhongjie; Wang, Ming; Mao, Lanqun (2018): Exploring Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase as an Enzymatic Bioelectrocatalyst. In: *Journal of the American Chemical Society* 140 (40), S. 12700–12704. DOI: 10.1021/jacs.8b08020.
- Xu, Huangwei; Xuan, Guanhua; Liu, Huaiwei; Xia, Yongzhen; Xun, Luying (2021): Sulfane Sulfur Is a Strong Inducer of the Multiple Antibiotic Resistance Regulator MarR in *Escherichia coli*. In: *Antioxidants* 10 (11), S. 1778. DOI: 10.3390/antiox10111778.
- Xuan, Guanhua; Lü, Chuanjuan; Xu, Huangwei; Chen, Zhigang; Li, Kai; Liu, Honglei et al. (2020): Sulfane Sulfur is an intrinsic signal activating MexR-regulated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Microbiology* 114 (6), S. 1038–1048. DOI: 10.1111/mmi.14593.
- Yang, Jianyi; Zhang, Yang (2015): I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. In: *Nucleic Acids Research* 43 (W1), W174–81. DOI: 10.1093/nar/gkv342.
- Yao, Chu; Zhao, Suhe; Wang, Yaqin; Wang, Bingwu; Wei, Meiling; Hu, Minghan (2013): Microbial desulfurization of waste latex rubber with *Alicyclobacillus* sp. In: *Polymer Degradation and Stability* 98 (9), S. 1724–1730. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.002.
- Yuly, Jonathon L.; Lubner, Carolyn E.; Zhang, Peng; Beratan, David N.; Peters, John W. (2019): Electron bifurcation: progress and grand challenges. In: *Chemical Communications* 55 (79), S. 11823–11832. DOI: 10.1039/C9CC05611D.
- Yuly, Jonathon L.; Zhang, Peng; Beratan, David N. (2021): Energy transduction by reversible electron bifurcation. In: *Current Opinion in Electrochemistry* 29, S. 100767. DOI: 10.1016/j.coelec.2021.100767.
- Zhang, Peng; Yuly, Jonathon L.; Lubner, Carolyn E.; Mulder, David W.; King, Paul W.; Peters, John W.; Beratan, David N. (2017): Electron Bifurcation: Thermodynamics and Kinetics of Two-Electron Brokering in Biological Redox Chemistry. In: *Accounts of Chemical Research* 50 (9), S. 2410–2417. DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00327.

## 7. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl für das herausfordernde und spannende Thema, die umfassende Betreuung und die Übernahme des 1. Gutachtens bedanken. Dankbar bin ich zudem für die schöne und lehrreiche Zeit in Ihrer Arbeitsgruppe. Auch für das entgegengebrachte Vertrauen mehrere Bachelor und Projektarbeiten in der praktischen Arbeit begleiten zu dürfen und verschiedene Praktika anzuleiten möchte ich mich bedanken. Diese Arbeit hat mir immer viel Freude bereitet und ich profitiere noch heute in meinem Berufsleben von den vielfältigen Erfahrungen. Für die Gelegenheit an Konferenzen und einem internationalen Kurs teilzunehmen bin ich sehr dankbar, sowie für die Ermutigung und Unterstützung über meinen “Schatten zu springen” und zu diesen eigene Beiträge zu leisten.

Herrn Prof. Uwe Deppenmeier danke ich für die Übernahme des 2. Gutachtens und die Teilnahme an der Promotionskommission. Ihm und seiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich auch für den intensiven Austausch von Wissen, Stämmen, Plasmiden, Enzymen und Ersatzteilen für das Anaerobenzelt danken.

Danken möchte ich zudem Prof. Schreiber als Vorsitzender der Prüfungskommission und Prof. Höger als fachgruppenfremdes Mitglied der Promotionskommission für die Teilnahme an meinem Promotionsverfahren.

Der Arbeitsgruppe Dahl danke ich für die schöne Zeit im Labor, den kollegialen Austausch und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Kai Wallerrang. Er hat die Forschungen zu diesem Thema zum Ende der praktischen Phase wesentlich unterstützt. Es war ein Vergnügen ihm alle Methoden beizubringen und bereits erzieltes Wissen zu vermitteln. Innerhalb weniger Monate wurden sehr interessante Erkenntnisse gemeinsam erzielt. Die während dieser Phase mit ihm geführten Diskussionen über Aminosäuresequenzen und Stammbäume waren sehr wertvoll für die Ergebnisse dieser Arbeit. Ich danke weiterhin Vanessa Klingbeil und Ines Volkert für die Mitwirkung an diesem Forschungsthema im Rahmen von Projekt- und Bachelorarbeiten. Bei Julia Lofi bedanke ich mich für den Austausch zu “unserem Dsr-Rätsel” und für die schöne produktive Zeit in Oeiras am ITQB.

Dem gesamten Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das freundliche und offene Miteinander.

Prof. Dr. Inês A. C. Pereira und Dr. Sofia Venceslau danke ich für die Durchführung der EPR-Spektroskopie, die umfangreichen Diskussionen zu den Ergebnissen und die tolle Betreuung im Labor am ITQB in Oeiras, Portugal. Insbesondere Sofia Venceslau bin ich dankbar für die Vermittlung neuerer Methoden im Labor am ITQB und die stundenlangen online geführten Diskussionen über die erzielten Ergebnisse.

Meinem Vater danke ich für die Unterstützung bei der Betreuung meines Sohnes, die es mir ermöglicht hat die Arbeit trotz Kind, Beruf und sonstigen Alltagspflichten, abzuschließen. Zudem bin ich dankbar für seine Beharrlichkeit mich immer wieder an die noch nicht fertige Promotion zu erinnern. Danke Papa ohne dich gäbe es diese Arbeit nicht! Danke auch an meine liebe Schwiegermutter für die Korrektur dieser Arbeit und die sonstige Unterstützung.

Außerdem danke ich meinen Eltern für die langjährige Unterstützung während meines Studiums.

Ich danke meiner Oma Erika – du warst immer ein unglaublicher Halt für mich in schwierigen Zeiten. Es ist schade, dass du diesen Schritt nicht mehr erleben kannst.

Meiner Schwester Pauline danke ich für den Zusammenhalt. Egal was passiert ich weiß immer, dass ich nicht alleine bin.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann und meinem Sohn für ihre Geduld – schön, dass ihr in meinem Leben seid.