

**Biochemische, molekularbiologische und bioinformatische
Untersuchungen zum DsrMKJOP-Komplex von
*Allochromatium vinosum***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Johannes Sander
aus
Wuppertal

Bonn 2005

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

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

Tag der Promotion:

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5`-diphosphat
AMP	Adenosin-5`-monophosphat
APS	Adenosin-5`-phosphosulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BLOSUM	Block Substitution Matrix
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyyspiro {1,2-dioxethan-3,2`-(5`-chloro)tricyclo [3.3.1.1. ^{3,7}] decan}-4-yl)phenylphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N`-[2-ethan-sulfonsäure]
HPLC	High Performace Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -S-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Percent Accepted Mutation
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	10
2.1.1	<i>Antibiotika</i>	11
2.1.2	<i>Enzyme und Proteine</i>	11
2.1.3	<i>Antikörper</i>	11
2.1.4	<i>Nukleotide und Nukleinsäuren</i>	12
2.1.5	<i>Kits</i>	12
2.2	SOFTWARE UND INTERNETPROGRAMME	12
2.3	ORGANISMEN, VEKTOREN, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	13
2.3.1	<i>Organismen</i>	13
2.3.2	<i>Vektoren und Plasmide</i>	13
2.3.3	<i>Oligonukleotide</i>	14
2.4	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	15
2.4.1	<i>Kultivierung von A. vinosum</i>	15
2.4.1.1	RCV-Medium.....	16
2.4.1.2	RCV-Platten im Anaerobentopf	17
2.4.1.3	Thiosulfat-Medium.....	18
2.4.1.4	Pfennig-Medium.....	18
2.4.1.5	Kultivierung von A. vinosum in Fermentern.....	19
2.4.2	<i>Kultivierung von Escherichia coli</i>	21
2.4.2.1	Anzucht von Escherichia coli.....	21
2.4.2.2	Überexpression rekombinanten Proteins in Escherichia coli.....	22
2.4.3	<i>Konservierung von Bakterienstämmen</i>	22
2.5	BIOCHEMISCHE METHODEN	22
2.5.1	<i>Zellerte und Aufschluß</i>	22
2.5.1.1	Ultrazentrifugation	23
2.5.2	<i>Essigsäure-Fällung von Proteinen</i>	23
2.5.3	<i>Bestimmung des Proteingehaltes</i>	23
2.5.3.1	Proteinbestimmung mit dem BCA-Kit	23
2.5.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	23
2.5.4	<i>Elektrophorese von Proteinen und Western Blot</i>	24
2.5.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
2.5.4.2	Analyse ganzer Zellen auf einem Polyacrylamidgel	24
2.5.4.3	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung.....	25
2.5.4.4	Western Blot.....	25
2.5.5	<i>Säulenchromatographische Methoden</i>	26
2.5.5.1	Nickelchelat-Säule.....	26
2.6	NASSCHEMISCHE SCHWEFELBESTIMMUNG	26
2.7	NACHWEIS VON SCHWEFELVERBINDUNGEN MITTELS HPLC	27
2.7.1	<i>Bestimmung von Elementarschwefel</i>	27
2.7.2	<i>Bestimmung von Thiolen</i>	28
2.7.2.1	Derivatisierung	28
2.7.2.2	Nachweis der derivatisierten Thiole	28
2.7.3	<i>Bestimmung von Sulfat</i>	29
2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	29
2.8.1	<i>Präparation von DNA</i>	29
2.8.1.1	Plasmid-Minipräparationen	29
2.8.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Allochromatium vinosum	30
2.8.2	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	30
2.8.3	<i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA</i>	31
2.8.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.8.3.2	Färbung mit Ethidiumbromid	31
2.8.4	<i>Reinigung von DNA</i>	31
2.8.5	<i>PCR</i>	32
2.8.5.1	Amplifikation von Genen zur Klonierung.....	32
2.8.5.2	Kolonie-PCR	33
2.8.5.3	Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden	33

2.8.6	<i>Gene-SOEing und „in-frame“-Mutagenese</i>	33
2.8.7	<i>Enzymatische Modifikation von DNA</i>	34
2.8.7.1	Restriktion von DNA.....	34
2.8.7.2	Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	34
2.8.7.3	Ligation	35
2.8.8	<i>Klonierung</i>	35
2.8.8.1	Herstellung kompetenter E.coli-Zellen.....	35
2.8.8.2	Transformation kompetenter Zellen	35
2.8.8.3	Identifizierung gewünschter Klone.....	36
2.8.8.4	DNA-Sequenzierung	36
2.8.9	<i>Konjugation</i>	36
2.8.10	<i>DNA-DNA-Hybridisierung</i>	37
2.8.10.1	Southern Transfer	37
2.8.10.2	Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	38
2.8.10.3	Chemilumineszenzdetektion	38
2.9	BIOINFORMATISCHE METHODEN	40
2.9.1	<i>Erstellen von Alignments</i>	40
2.9.1.1	Paarweise Alignments	41
2.9.1.2	Multiple Alignments.....	41
2.9.2	<i>Datenbanken</i>	43
2.9.2.1	Durchsuchen der Datenbanken	43
2.9.2.2	BLAST-Varianten	44
2.9.2.3	Aufbereitung gefundener Sequenzen.....	45
2.9.3	<i>Erstellen phylogenetischer Bäume</i>	45
2.9.3.1	Maximum Parsimony (MP).....	45
2.9.3.2	Maximum Likelihood (ML)	48
2.9.3.3	Bootstrapping	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	ÜBEREXPRESSION DER PROTEINE	50
3.1.1	<i>Überexpression von DsrJ</i>	50
3.1.2	<i>Überexpression von DsrM</i>	52
3.1.3	<i>Überexpression von DsrO</i>	52
3.1.3.1	Anreicherung des rekombinanten DsrO	53
3.2	DIE LOKALISATION VON DSR O	55
3.3	NACHWEIS VON DSRJ UND DSR O IN EINER ANREICHERUNGSPROBE VON DSRK	55
3.4	DELETIONSMUTANTEN	57
3.4.1	<i>Erzeugung von in-frame-Mutanten in dsr-Genen</i>	57
3.4.1.1	Deletionsvektor für dsrM.....	59
3.4.1.2	Deletionsvektor für dsrK	59
3.4.1.3	Deletionsvektor für dsrJ.....	59
3.4.1.4	Deletionsvektor für dsrO	60
3.4.1.5	Deletionsvektor für dsrP.....	60
3.4.2	<i>Southern Blots zur Überprüfung des Genotyps der Mutanten</i>	61
3.4.3	<i>Phänotypische Charakterisierung der Mutanten</i>	63
3.4.3.1	Charakterisierung der Mutanten	63
3.4.3.2	Komplementation der Mutante 3J	68
3.4.3.3	Vergleich der Entschwefelungsraten	70
3.5	BIOINFORMATISCHE UNTERSUCHUNGEN	72
3.5.1	<i>Ergebnisse der BLAST-Suche und Alignments</i>	72
3.5.1.1	DsrAB.....	72
3.5.1.2	DsrEFH.....	73
3.5.1.3	DsrC	73
3.5.1.4	DsrL.....	74
3.5.1.5	DsrMKJOP	74
3.5.1.6	DsrN	80
3.5.1.7	DsrRS	80
3.5.2	<i>Dsr-Operons in den einzelnen Organismen</i>	81
3.5.2.1	„DsrT“	85
3.5.3	<i>Suche in der Sargassosee-Datenbank</i>	86
3.5.4	<i>Phylogenetische Analyse mutmaßlicher Dsr-Proteine</i>	87
3.5.5	<i>Phylogenetische Bäume mit anderen Dsr-Proteinen</i>	94
3.5.5.1	Phylogenetische Analyse der zu DsrEFH homologen Proteine	95
4	DISKUSSION	100

5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATUR.....	116

1 Einleitung

Schwefel tritt in der Natur in den verschiedensten Formen, z.B. als Sulfat im Meer und in Gesteinen, als Dimethylsulfid im Meer, als Elementarschwefel durch Oxidation des in vulkanischen Gasen enthaltenen Hydrogensulfids (Keppler 1999) oder als Schwermetallsulfide in Erzlagerstätten, auf. In dieser anorganischen Form liegen Schwefelverbindungen schon seit Urzeiten auf der Erde vor und es ist deshalb auch nicht verwunderlich, dass diese Verbindungen schon seit langem von Organismen für ihren Stoffwechsel genutzt werden. Das schwefelhaltige Mineral Pyrit hat sogar große Bedeutung in der Diskussion um den Ursprung des Lebens auf der Erde erlangt (Kaschke et al. 1994). In biologischen Systemen spielt Schwefel eine wichtige Rolle als Bestandteil der Aminosäuren Methionin und Cystein, aber auch in einer Reihe weiterer organischer Moleküle (z.B. Acetyl-CoA, Thiaminpyrophosphat oder die Coenzyme M und B bei Methanogenen), sowie in FeS-Clustern, die vielleicht sogar als Relikte aus der Frühphase des Lebens angesehen werden können (Rees und Howard, 2003).

Damit der Schwefel in organische Moleküle eingebaut werden kann, muß er zuerst einmal in eine für den Organismus verwertbare Form überführt werden. Dieser Prozess wird als assimilatorischer Schwefelstoffwechsel bezeichnet. Er kann von Pflanzen, Pilzen und vielen Prokaryonten, allerdings nicht von Tieren, durchgeführt werden (Dahl et al. 2002). Dem kann die Dissimilation von Schwefelverbindungen gegenüber gestellt werden. Hierzu sind fast ausschließlich Prokaryonten befähigt. Anders als bei assimilatorischen Prozessen sind die Organismen dabei nicht am Schwefel an sich, sondern nur am Schwefel als Elektronendonator oder Elektronenakzeptor interessiert (wenngleich es im Einzelfall vielleicht auch Überschneidungen geben kann). Prinzipiell lassen sich hier zwei Fälle unterscheiden:

- 1) Mehr oder weniger oxidierte Schwefelverbindungen dienen als Elektronenakzeptor. In diesem Fall kann von „anaerober Atmung“ gesprochen werden.
- 2) Reduzierte Schwefelverbindungen dienen als Elektronendonator. Beispielsweise können die Elektronen in eine Elektronentransportkette eingeschleust werden. Die Energie des Lichtes und/oder der Elektronen wird dann dazu verwendet ein Membranpotential aufzubauen, mit dessen Hilfe sich ATP generieren lässt. Alternativ und zusätzlich

kann der Organismus natürlich auch die Elektronen selbst benötigen, beispielsweise als Reduktionsäquivalente für eine CO₂-Fixierung.

Im weiteren Verlauf sollen die beiden Fälle an konkreten Beispielen eingehender erläutert werden.

Anaerobe Atmung

Anaerobe Atmung auf der Basis von Schwefelverbindungen findet sich bei einer Reihe von Prokaryonten, sowohl unter den Archaeen, als auch unter den Bakterien. Als Elektronenakzeptoren dienen z.B. Sulfat, Sulfit, Elementarschwefel oder Thiosulfat. Als Endprodukt entsteht Sulfid. Die dazu benötigten Elektronen stammen aus der Oxidation von molekularem Wasserstoff oder organischen Substraten. Zu den Sulfatreduzierern gehören neben Gram-negativen Bakterien aus der δ -Gruppe der Proteobakterien (z.B. Vertreter der Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfotalea*), auch Gram-positive Bakterien (*Desulfotomaculum*) und Archaeen (z.B. *Archaeoglobus fulgidus*). *Archaeoglobus veneficus* kann lediglich Sulfit und Thiosulfat umsetzen, obwohl er offensichtlich über alle Gene zur Sulfatreduktion verfügt (Sperling 2001). Vertreter der Gattung *Pyrobaculum* wachsen auf Sulfit, Thiosulfat und Elementarschwefel. Sehr viele Prokaryonten darunter überwiegend hyperthermophile Archaeen (z.B. *Thermoproteus*), aber auch mesophile Bakterien (z.B. *Desulfuromonas*, *Desulfovibrio*) sind zudem imstande eine Schwefelatmung zu betreiben (Hedderich et al. 1999).

Zahlreiche Organismen sind in der Lage je nach Umweltbedingungen sowohl einen reduktiv- als auch einen oxidativ-dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel durchzuführen. Ein Beispiel hierfür sind die Gattungen *Sulfolobus* und *Acidianus*, die unter anoxischen Bedingungen Elementarschwefel zu Sulfid reduzieren und unter oxischen Bedingungen eine Oxidation zum Sulfat vornehmen (Sperling 2001). *Wolinella succinogenes* betreibt eine Polysulfidatmung mit Formiat als Elektronendonator (Hedderich et al. 1999), kann aber auch unter Bildung von Polysulfiden Elektronen von Sulfid auf Fumarat übertragen (Friedrich et al. 2001).

Chemolithoautotrophe und Phototrophe

Auch die Oxidierer von Schwefelverbindungen stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, sowohl in systematischer, als auch in stoffwechselphysiologischer Hinsicht. Grundsätzlich lassen sie sich in chemotrophe Vertreter, die unter (meist) aeroben Bedingungen Schwefelverbindungen oxidieren können und phototrophe Vertreter, die dies unter anaeroben Bedingungen im Licht tun, unterscheiden.

Chemolithoautotrophe Prokaryonten, die über einen oxidativ-dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel verfügen, finden sich sowohl unter den Archaeen, als auch unter den Bakterien. Während bei den Archaeen Oxidierer von Schwefelverbindungen auf die Ordnung Sulfolobales (z.B. *Sulfolobus*, *Acidianus*) beschränkt ist, gehören sie innerhalb des Imperiums (Domäne) Bacteria verschiedenen Gruppen, etwa den α - (z.B. *Starkeya*, *Paracoccus*), den β - (z.B. *Thiobacillus*) oder den γ -Proteobakterien (z.B. *Beggiatoa*), an.

Zu den phototrophen Oxidierern von Schwefelverbindungen gehören ausschließlich Bakterien. Am bekanntesten sind die Purpurbakterien und die Grünen Schwefelbakterien (Chlorobiaceae). Diese Bakterien betreiben eine anoxygene Photosynthese, d.h. bei ihnen entsteht nicht wie bei den Grünen Pflanzen oder den Cyanobakterien durch Wasserspaltung Sauerstoff. Sofern diese Bakterien eine CO₂-Fixierung betreiben, müssen sie die dafür benötigten Elektronen aus einer anderen Quelle beziehen. In Frage kommen hier vor allem reduzierte Schwefelverbindungen.

Die Purpurbakterien sind eine Sammelbezeichnung für eine Reihe von Bakterien, unter die sowohl sogenannte Schwefel-freie Purpurbakterien aus der α - und β -Gruppe der Proteobakterien, als auch die Schwefelpurpurbakterien aus der γ -Gruppe der Proteobakterien gehören. Letztere zerfallen in die beiden Familie Chromatiaceae und Ectothiorhodospiraceae. Anders, als der Name suggeriert, sind allerdings nicht nur die Schwefelpurpurbakterien, sondern durchaus auch einige Vertreter der Schwefel-freien Purpurbakterien im Stande Schwefelverbindungen als Elektronenquelle zu nutzen (Brune 1989). Über die genannten Gruppen können auch noch einige grampositive phototrophe Heliobakterien (z.B. *Heliobacterium sulfidophilum*: Briantseva et al. 2000), Chloroflexaceae und sogar Cyanobakterien (z.B. *Oscillatoria limnetica*), die ja eigentlich eine oxygene Photosynthese betreiben, also ihre Elektronen aus der Spaltung von Wasser gewinnen, Schwefelverbindungen als Elektronenquelle zu nutzen (Brune 1989).

Der Organismus *Allochromatium vinosum*

Allochromatium vinosum gehört innerhalb der Schwefelpurpurbakterien in die Familie der Chromatiaceae. Es ist polar begeißelt, bildet keine Gasvesikel, besitzt stäbchenförmige Gestalt und ist etwa 2 μ m lang. Sein Temperaturoptimum liegt bei 30 - 35°C und sein pH-Optimum bei 6,5 - 7,6 (Imhoff et al. 1998). Sein natürlicher Standort sind stehende schwefelwasserstoffhaltige Salz- und Süßgewässer (Pfennig und Trüper 1989).

A. vinosum vermag photolithoautotroph und photoorganotroph zu wachsen. Chemolithoautotrophes Wachstum ist allerdings umstritten (Kämpf und Pfennig 1980).

Ein wesentlicher Vorteil von *Allochromatium vinosum* gegenüber den meisten Schwefelpurpurbakterien besteht in seiner genetischen Manipulierbarkeit (Pattaragulwanit und Dahl 1995). Dadurch bietet sich die Möglichkeit, gezielt für wichtig erachtete Gene auszuschalten oder zu verändern, um dann den Effekt auf die Physiologie des Organismus zu beobachten.

Schwefelstoffwechsel mit dem Schwerpunkt Schwefelpurpurbakterien

Aufgrund der großen Vielfalt im Schwefelmetabolismus ist es schwierig einfache allgemeingültige Stoffwechselwege zu formulieren, die jedem Organismus gerecht werden. Als Zwischenstufen bei der Umwandlung von Sulfid in Sulfat treten z.B. Elementarschwefel, Sulfit und APS auf. Im Folgenden soll die Oxidation von Sulfid und Thiosulfat zu Sulfat mit einem besonderen Schwerpunkt auf die Verhältnisse bei Schwefelpurpurbakterien (speziell *Allochromatium vinosum*) beschrieben werden.

Der erste Schritt des Schwefelstoffwechsels ist dort die Sulfidoxidation über Polysulfide zu Schwefel der Oxidationsstufe Null, der als Schwefelkugeln vorübergehend extrazellulär (bei den Ectothiorhodospiraceen und Chlorobiaceen) oder intrazellulär, d.h. genauer (wahrscheinlich) im Periplasma (z.B. bei *Beggiatoa*, *Thioploca* und den Chromatiaceen) abgelagert wird (Dahl et al. 2002). Der Schwefel kann dann über Sulfit weiter zu Sulfat oxidiert werden.

Verantwortlich für den ersten Schritt, die Oxidation von Sulfid zu Elementarschwefel ist bei *A. vinosum* wahrscheinlich eine membrangebundene Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase. Die angenommene Beteiligung zweier weiterer Enzyme, der Siroamid-Sulfit-Reduktase (kurz: Sulfitreduktase) und eines Flavocytochroms c an dem Prozess gilt nach Insertionsinaktivierung der zugrundeliegenden Gene zumindest als unwahrscheinlich (Pott und Dahl 1998, Reinartz et al. 1998). Das Flavocytochrom c (Sulfid:Cytochrom c Oxidoreduktase) kommt zudem nicht in allen Sulfid-oxidierenden Bakterien vor (Dahl et al. 2002). Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass dem Enzym unter besonderen Umständen (z.B. bei sehr niedrigen Sulfidkonzentrationen) doch eine Bedeutung zukommt (Reinartz et al. 1998). Auf eine mögliche Funktion der Sulfit-Reduktase wird weiter unten eingegangen.

Der im Thiosulfat enthaltene Schwefel erfährt bei *Allochromatium vinosum*, je nachdem, ob es sich um den Sulfan- oder den Sulfonschwefel handelt, ein unterschiedliches Schicksal: Während der Sulfonschwefel direkt zu Sulfat umgesetzt wird, entstehen aus dem

Sulfanschwefel ebenfalls Schwefelkugeln. Verantwortlich hierfür sind die in den beiden *Sox*-Genclustern kodierten Proteine (Hensen 2001; Daniela Hensen, persönliche Mitteilung).

Der Schwefel in den Schwefelkugeln liegt wahrscheinlich nicht als klassischer S_8 -Schwefel, sondern als (Bis-)Organylsulfane ($R-S_n-R$ mit $n \geq 4$) vor (Prange et al. 1999). Der Schwefel ist dabei von einer Hülle aus Proteinen umgeben. Die Tatsache, dass diese Proteine ein abspaltbares N-terminales Signalpeptid besitzen, zeigt, dass die Schwefelkugeln wahrscheinlich nicht wie ursprünglich angenommen im Cytoplasma der Zellen, sondern im Periplasma liegen (Pattaragulwanit et al. 1998). Gestützt wird dies von elektronenmikroskopischen Bildern, die ebenfalls auf eine periplasmatische Lokalisation hindeuten.

Ein erstes Enzym, das in *A. vinosum* mit dem Prozess Schwefeloxidation in Verbindung gebracht wurde, ist die dissimilatorische Sulfitreduktase (Schedel et al. 1979; Trüper 1984). Von dem Enzym war bekannt, dass es bei Sulfatreduzierern Sulfit zu Sulfid umsetzt. Es lag daher nahe, über eine mögliche umgekehrte Reaktion in Sulfid-Oxidierern zu spekulieren. Das Ausschalten des Enzyms durch Insertionsmutagenese führte allerdings lediglich zu einer Anhäufung von Schwefelkugeln, es war also nur die Oxidation von Schwefel zu Sulfit blockiert (Pott und Dahl 1998). Beidseitiges Sequenzieren der an das Gen für die Sulfitreduktase angrenzenden DNA-Regionen führte zur Entdeckung von 13 weiteren Genen, die zusammen mit den Genen für die beiden Untereinheiten der Sulfitreduktase kotranskribiert werden und die deshalb in ihrer Gesamtheit als *dsr*-Operon bezeichnet wurden (Dahl et al. 2005). Da diese Gene, bzw. die von ihnen abgeleiteten Proteine das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit sind, werden sie in einem eigenen Unterkapitel der Einleitung genauer betrachtet.

Für die Oxidation von Sulfit zu Sulfat kommen in *A. vinosum* prinzipiell zwei Wege in Frage. Bei dem ersten möglichen Weg katalysiert die (membrangebundene) APS-Reduktase (Adenosin-5'-Phosphosulfatreduktase) die Kondensation von Sulfit mit AMP. Dabei wird das Sulfit oxidiert und es entsteht als Zwischenprodukt APS. Dieses könnte dann unter Freisetzung von ATP und Spaltung von Pyrophosphat durch eine ATP-Sulfurylase (Dahl 1998) zu Sulfat umgesetzt werden. Wahrscheinlich spielt dieser Weg bei *A. vinosum* allerdings nicht die Hauptrolle, darauf deuten zumindest Untersuchungen an APS-Reduktase-defizienten Mutanten hin (Dahl 1996). Wahrscheinlich ist, dass das Sulfit zum überwiegenden Teil durch die lösliche Molybdopterin-haltige Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase direkt zu Sulfat umgesetzt wird (Sanchez et al. 2001).

Das *dsr*-Operon

Das *dsr*-Operon kodiert, wie oben bereits angerissen für 15 Polypeptide, die alle an der Oxidation des Schwefels beteiligt sind und umfasst 14974 bp inklusive der Promotorregion (s. Abb. 1.1).

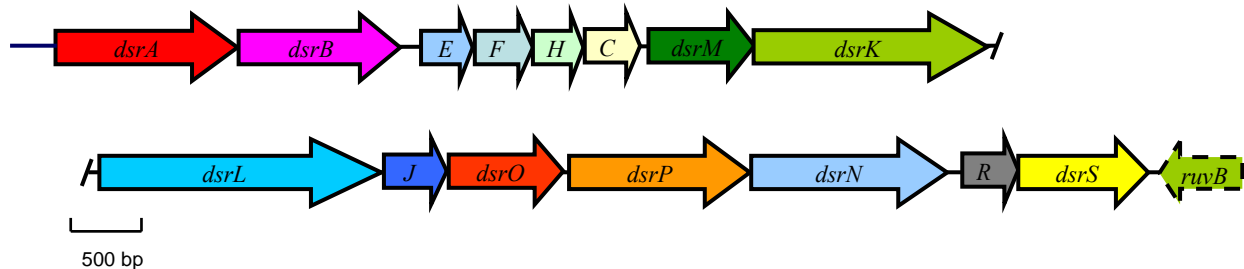


Abb. 1.1: Das *dsr*-Operon aus *Allochromatium vinosum*.

Ausgangspunkt für die Entdeckung des Operons waren die beiden ersten Gene des Operons *dsrA* und *dsrB* (s.o.), die für die beiden Untereinheiten der Sulfitreduktase kodieren. Das Protein ist im Cytoplasmaa lokalisiert und eng verwandt mit dissimilatorischen Sulfitreduktasen aus Sulfatreduzierern (Hipp et al. 1997). Stromaufwärts des *dsrA*-Gens liegt ein mutmaßliche Promotor, der durch Sulfid induzierbar ist (Pott und Dahl 1998; Dahl et al. 2005). Ein weiterer konstitutiver Promotor, von dem aus die Gene *dsrH* und *C* transkribiert werden, liegt wahrscheinlich innerhalb des *dsrF*-Gens (Pott und Dahl 1998).

Unmittelbar auf die Gene *dsrA* und *dsrB* folgen drei kleine Gene *dsrE*, *F* und *H*. Sie kodieren für cytoplasmatische, Cofaktor-freie Proteine und liegen, wie mittlerweile gezeigt werden konnte, als Heterohexamer in der Form $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ vor (Dahl et al. 2005). Für DsrF wurde Rhodaneseaktivität postuliert (Schwarz 2001). Unklar blieb dabei aber, weshalb DsrF keinen für die Rhodaneseaktivität benötigten konservierten Cysteinrest besitzt. Die Entdeckung das DsrF Teil eines Heterohexamers ist, schien die Lösung des Problems zu bringen, da sowohl DsrE, als auch DsrH über einen konservierten Cysteinrest verfügen. Allerdings ließ sich die Rhodaneseaktivität nicht reproduzieren, so dass äußerst fraglich ist, ob eine solche Aktivität überhaupt existiert (Andrea Schulte, persönliche Mitteilung).

Das *dsrC*-Gen kodiert ebenfalls für ein kleines, lösliches und Cofaktor-freies Protein. Es ist homolog zu den *dsv(r)C*-Gene aus *Desulfovibrio vulgaris*, *Pyrobaculum islandicum* und *Archaeoglobus fulgidus* (Pott und Dahl 1998), liegt möglicherweise als Dimer vor und interagiert wahrscheinlich mit dem DsrEFH-Protein (Andrea Schulte, persönliche Mitteilung). DsrN ist im Cytoplasma lokalisiert, besitzt keine Bindestellen für Cofaktoren und weist Homologie zu einer Cobyrynsäure-a,c-Diamidsynthase auf. Dieses Enzym katalysiert im

Rahmen der Vitamin-B12-Synthese die ATP-abhängige Amidierung von Cobyrynsäure zu Cobyrynsäure-Diamid (Debussche et al 1990). Da aus *Desulfovibrio*-Arten Sulfitreduktasen bekannt sind, die die amidierete Form des Sirohämns enthalten (Matthews et al. 1995) und eine Rolle von zu DsrN homologen Proteinen bei der Amidierung des Sirohämns in Sulfatreduzierern bereits postuliert wurde (Larsen et al. 2000), lag die Vermutung nahe, auch bei *A. vinosum* könnte es durch DsrN zu einer Amidierung des Sirohämns kommen. Eine entsprechende Funktion gilt mittlerweile als wahrscheinlich (Yvonne Lübke, persönliche Mitteilung).

DsrL ist ebenfalls ein cytoplasmatisches Protein. Es verfügt über zwei Bindestellen für FeS-Cluster und über zwei Adenylat-Bindestellen. Eine dieser Bindestellen dient wahrscheinlich der Interaktion mit einem FAD, die andere der Interaktion mit NADH + H⁺ (Dahl et al. 2005).

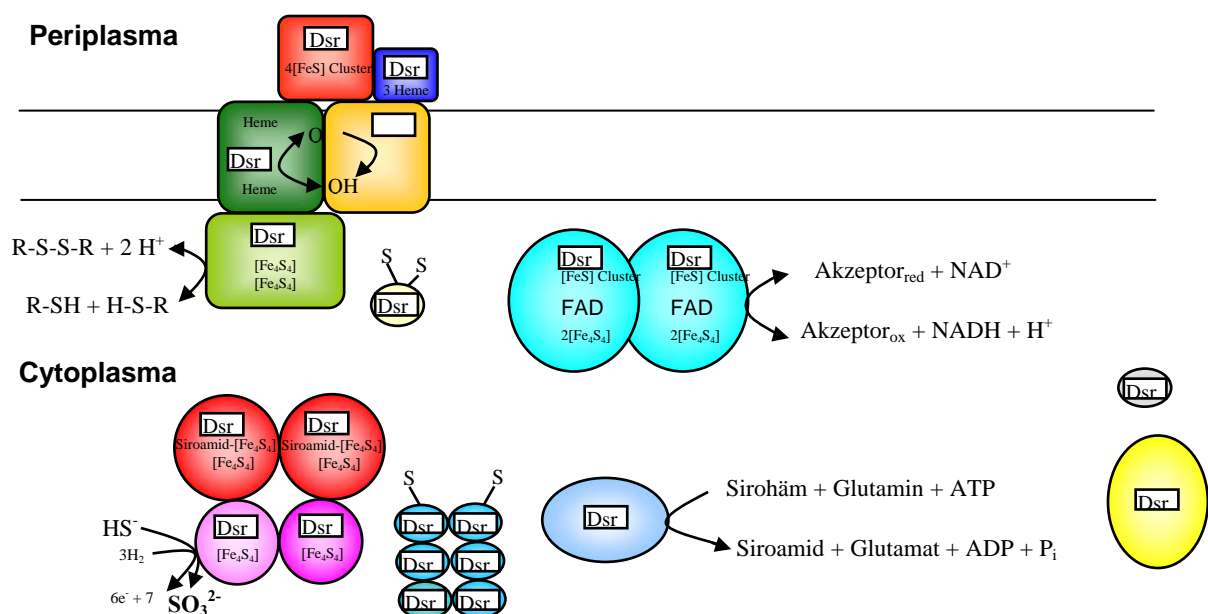


Abb. 1.2: Übersicht über die vom *dsr*-Operon kodierte Proteine, ihre (teils mutmaßliche) Lokalisation und Anordnung, sowie die ihnen zugeschriebenen Cofaktoren.

DsrL ähnelt der β -Untereinheit einer Formiat-Dehydrogenase aus *Moorella thermoacetica* und der FAD-haltigen β -Untereinheit (GltD) einer Glutamatsynthase (GltDE) aus *Azospirillum brasiliense*. Die üblicherweise vorhandene katalytisch aktive α -Untereinheit fehlt hier allerdings. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten bestand zumindest der Verdacht DsrL könnte über eine Glutamatsynthase-Funktion verfügen, zumal eine entsprechende Funktion für ein verwandtes Enzym aus *Thermococcus kodakaraensis* nachgewiesen worden war (Jongsreejit et al. 1997). Dieser Verdacht konnte bislang jedoch nicht bestätigt werden. Wahrscheinlicher ist daher, dass DsrL an einem Elektronentransfer zwischen NAD⁺/NADH

+ H⁺ und einem Akzeptor oder Donor über einen FAD-Cofaktor beteiligt ist. Als Donor/Akzeptor in Frage kämen z.B. die Sulfitreduktase oder DsrK (Dahl et al. 2005).

DsrL weist außerdem Homologien zu der großen Untereinheit (SudA) der Sulfid-Dehydrogenase (SudAB) aus *Pyrococcus furiosus*, die dort die Reduktion von Polysulfiden zu Sulfid katalysiert, auf (Hagen et al. 2000). Bei phylogenetischen Analysen fällt die *dsrL*-Sequenz allerdings nicht in dasselbe Cluster, wie die *sudA*-Sequenz (Andersson und Roger 2002, so dass eine Funktion als Polysulfidreduktase zumindest nicht sehr wahrscheinlich ist.

Über die Proteine DsrM, K, J, O und P lässt sich über Homologievergleiche und Hydrophobizitätsanalysen sagen, dass sie wahrscheinlich einen Membrankomplex bilden, der an Elektronentransportprozessen beteiligt ist. DsrM und DsrP sind demnach integrale Membranproteine. DsrM besitzt fünf mutmaßliche Transmembranhelices und mehrere konservierte Histidinreste über die wahrscheinlich zwei Häm-b-Gruppen (b_L und b_H) gebunden werden. Der N-Terminus von DsrM liegt wahrscheinlich im Periplasma (Pott und Dahl 1998).

DsrP verfügt wahrscheinlich über zehn Transmembranhelices. Geeignete Histidinreste, um Häm-Gruppen zu binden, fehlen dem Protein. Sowohl DsrM, als auch DsrP könnten aber möglicherweise den Kontakt zu dem Chinonpool herstellen (Dahl et al. 2005).

DsrJ und DsrO besitzen mutmaßliche Exportsignalpeptide, die für eine Lokalisation im Periplasma sprechen. DsrJ besitzt drei Bindestellen für Häm-c-Gruppen, was ebenfalls auf eine periplasmatische Lokalisation hindeutet. Bei dem mit DsrJ verwandten Protein AF503, das in *Archaeoglobus fulgidus* Bestandteil eines mit dem mutmaßlichen DsrMKJOP-Komplex verwandten Membrankomplexes (Hme-Komplex) ist, konnten Mander et al. (2002) zeigen, dass das Signalpeptid nicht abgeschnitten wird, sondern als Membrananker dient.

Anders als DsrJ, das über ein sec-Signalpeptid verfügt, besitzt DsrO ein mutmaßliches Tat-Signalpeptid. Dies dürfte in Zusammenhang stehen mit den beiden 4Fe4S-Cluster-Bindestellen von DsrO, denn Tat-Signalpeptide erlauben den Transport von gefalteten Proteinen über die Membran (Berks 1996; Berks et al. 2000). Somit ergibt sich für die Zelle die Möglichkeit die FeS-Cluster bereits im Cytoplasma in das betreffende Protein einzubauen. DsrK dürfte auf der cytoplasmatischen Seite mit dem Komplex assoziiert sein. Es besitzt zwei N-terminal gelegene 4Fe4S-Cluster-Bindestellen (Pott und Dahl 1998).

Die Proteine DsrM und DsrK sind homolog zu den beiden Untereinheiten HdrE (DsrM) und HdrD (DsrK) der membrangebundenen Heterodisulfidreduktase aus *Methanosarcina barkeri* (Küinkel et al. 1997; Pott und Dahl 1998). Für DsrK bestehen außerdem Homologien zu den Untereinheiten HdrB (C-Terminus) und HdrC (N-Terminus) der löslichen

Heterodisulfidreduktase (HdrABC) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Hedderich et al. 1994; Pott und Dahl 1996). Beide Enzyme dienen den Organismen dazu, das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB, das im Rahmen ihrer Methanogenese entsteht, wieder in CoM-SH und CoB-SH zu spalten („Disulfidatmung“). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass DsrK ebenfalls an der Spaltung von Schwefel-Schwefelbindungen (etwa im Rahmen von Thiol-Disulfid-Übergängen) beteiligt ist und die dazu benötigten Elektronen beispielsweise aus dem Chinonpool empfängt. Umgekehrt ergibt sich natürlich auch die Möglichkeit, dass DsrK Schwefel-Schwefelbindungen knüpft und die dabei freiwerdenden Elektronen dann in eine Elektronentransportkette einspeist.

DsrP und DsrO besitzen Homologien zu Untereinheiten von DMSO-, bzw. Polysulfid-Reduktasen (→ s.o.: *Wolinella succinogenes*). Es handelt sich dabei um eine recht große Proteinfamilie. Die Proteine bestehen aus drei Untereinheiten. Eine davon (PsrC, DmsC) ist ein integrales Membranprotein (homolog zu DsrP) und eine zweite (PsrB, DmsB) ein periplasmatisches FeS-Cluster Protein (homolog zu DsrO). Die dritte Untereinheit (PsrA, DmsA), zu der es kein homologes Protein im *dsr*-Operon gibt, trägt das katalytische Zentrum. Das *dsr*-Operon schließt ab mit zwei Genen, die für die Proteine DsrR und DsrS kodieren. Über beide Proteine ist bislang relativ wenig bekannt.

Bei Organismen mit reduktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel findet sich oft noch ein weiteres Dsr-Protein, nämlich DsrD. Bislang konnte in keinem Organismus mit oxidativ-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel ein Gen, das für ein entsprechendes Protein kodiert, gefunden werden (Dahl et al. 2005). Erwartungsgemäß fehlt ein solches Gen auch im *dsr*-Operon von *Allochromatium vinosum*.

Hinter dem *dsrS*-Gen liegt eine palindromische Sequenz, die als mutmaßlicher Terminator in Frage kommt. Diesem Terminator fehlt allerdings die für rho-abhängige Terminatoren (Reynolds et al. 1992) typische Poly-T-Sequenz. Ein weiteres Indiz für das Ende des *dsr*-Operons hinter *dsrS* ist das stromabwärts auf dem Gegenstrang kodierte *ruvB*-Gen (Dahl et al. 2005). Die Proteine RuvA, B und C bilden das sogenannte Resolvasom, dass an der Auflösung von Holidaystrukturen, die im Rahmen von genetischen Rekombinationsprozessen und DNA-Reparaturen entstehen, beteiligt ist (Dickmann et al. 2002).

Ziel der Arbeit

Der DsrMKJOP-Komplex nimmt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle im Rahmen der dissimilatorischen Oxidation von Schwefel bei *A. vinosum* ein. Zu Beginn der Arbeiten war bekannt, dass das *dsr*-Operon transkribiert wird. Interposon-Mutagenesen legten zudem nahe,

dass das Operon als Ganzes wichtig für die Schwefeloxidation ist (Pott und Dahl 1998). Welche Rolle den vom Operon kodierten Proteinen im Einzelnen zukommt, war allerdings noch weitgehend unerforscht. Ziel der Arbeit war es daher, die Proteine des mutmaßlichen DsrMKJOP-Komplexes im Detail näher zu untersuchen, um mehr über ihre spezifische Rolle im Rahmen des Schwefelstoffwechsels von *A. vinosum* herauszufinden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, zu den Dsr-Proteinen homologe Proteine zu finden und mittels bioinformatischer Methoden die Beziehungen dieser Proteine untereinander zu untersuchen, bzw. den Versuch zu unternehmen zu klären, in wieweit diese Proteine in den betreffenden Organismen an einem Schwefelstoffwechsel beteiligt sein könnten, also „echte“ Dsr-Proteine sind.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Acrylamid/Bisacrylamid	Life Technologies (Eggenstein)
Agar	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Agarose	Life Technologies (Eggenstein)
Anti-Digoxigenin-AP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
β -Mercaptoethanol	Biorad (München)
CDPStar	Roche Diagnostics (Mannheim)
Entwickler	Kodak (New Haven)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Fixierer	Kodak (New Haven)
IPTG	Roth (Karlsruhe)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen (Hilden)
Nitrat-Cellulose-Filter	Sartorius (Göttingen)
Röntgenfilm X-OMAT AR	Kodak (New Haven)
4* Rotiload	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Serva (Heidelberg)
Skim Milk	Töpfer (Dietmannsried)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tris	Life Technologies (Eggenstein)
X-Gal	Life Technologies (Eggenstein)

Weiteren Chemikalien und Materialien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.1 Antibiotika

Antibiotika wurden bei Bedarf in folgenden Konzentrationen zu den Medien gegeben (jeweils Endkonzentrationen):

Ampicillin:	100 µg/ml	UBS (Cleveland, USA)
Kanamycin:	50 µg/ml (bei <i>A. vinosum</i> 10 µg/ml)	Life Technologies (Eggenstein)
Streptomycin:	50 µg/ml	Sigma (Deisenhofen)
Rifampicin:	50 µg/ml (nur bei <i>A. vinosum</i>)	Fluka (Buchs, CH)

2.1.2 Enzyme und Proteine

CIAP	IBM Fermentas (Hanover, USA)
Lysozym	Sigma (Deisenhofen)
Proteingrößenmarker	IBM Fermentas (Hanover, USA)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Restriktionsenzyme	IBM Fermentas (Hanover, USA) Life Technologies (Eggenstein)
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rinderserumalbumin (RSA)	Roth (Karlsruhe)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	IBM Fermentas (Hanover, USA)
T4-DNA-Ligase	IBM Fermentas (Hanover, USA) Promega (Madison, USA)

2.1.3 Antikörper

Antikörper wurden durch die Firma Eurogentec S.A. (Seraing, B) über eine Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei – 20 und – 70 °C. Zur Immunisierung dienten folgende Peptide:

DsrJ: Gegen DsrJ wurde ein Antiserum hergestellt, dass gegen das Peptid H₂N - DAN RNP QPI DQP DQF C – CONH₂ gerichtet war. Das Peptid entspricht den Aminosäuren 91 bis 106.

DsrM: Gegen DsrM wurden im Laufe der Arbeit zwei Peptide hergestellt. Das erste war gegen das Peptid H₂N – SPT RNQ VDN PRE QRH I – CONH₂ an der Position 218 bis 233 gerichtet. Bei der zweiten Immunisierung wurde das

Peptid H₂N – CEQ RHI APW ARK LEQ S – CONH₂ eingesetzt. Es umfasst die Aminosäuren 229 bis 243 und ist zur besseren Immunisierung C-terminal um einen Cysteinrest erweitert.

DsrO: Zur Erzeugung von Antikörpern gegen DsrO diente das Peptid H₂N – SQR LRE IPS RQI RED L – CONH₂. Es umfasst die Aminosäuren 242 bis 257.

2.1.4 Nukleotide und Nukleinsäuren

Desoxyribonukleosidtriphosphate	IBM Fermentas (Hanover, USA)
Dig-dUTP	IBM Fermentas (Hanover, USA)
1 kb-DNA-Leiter	Life Technologies (Eggenstein)

2.1.5 Kits

GC-RICH PCR System	Roche Diagnostics (Mannheim)
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)

2.2 Software und Internetprogramme

Blast/NCBI	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Blast/EMBL-EBI	Sequenzdatenbank	http://www2.ebi.ac.uk/blast2
Sargasso-See-Datenbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/EnvirSample.Blast.html
DDBJ	Sequenzdatenbank	http://spiral.genes.nig.ac.jp/komology/nlast-e.shtml
Clone Manager	Verwaltung von Sequenzdaten	Offline Tool http://clustalw.genome.jp/
ClustalW	Globale Alignments von Aminosäuresequenzen	http://clustalw.genome.jp/ Thompson et al. 1994
ClustalX	Globale Alignments von Aminosäuresequenzen	Offline Tool Thompson et al. 1997
TCoffee	Globale Alignments von Aminosäuresequenzen	http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi
Block Maker	Lokale Alignments von Aminosäuresequenzen	http://blocks.fhrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html
DCA	Globales Alignment von Aminosäuren	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dca-simple.html
Expasy Bioedit	DNA- und Proteinanalyse Alignment Editor	http://www.expasy.ch Offline Tool Hall 1999
PAUP* 4.010b	Programm zur Berechnung phylogenetischer Bäume	Offline Tool, Swofford, 2003
Phylip	Programmpaket zur Berechnung	http://bioweb.pasteur.fr

ProtParam	phylogenetischer Bäume Vorhersage von isoelektrischen Punkten	Felsenstein 1989 http://au.expasy.org./tools/protpar.html
Treeview	Editor für phylogenetische Bäume	Gasteiger et al. 2005 Offline Tool Page 1996

2.3 Organismen, Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Organismen

Tab 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genetische Marker	Referenz
<i>Allochromatium vinosum</i> DSM180 ^T	Wildtyp	Pfennig und Trüper 1971
<i>Allochromatium vinosum</i> Rif50	Wildtyp: durch natürliche Mutagenese resistent gemacht gegen das Antibiotikum Rifampicin	Yvonne Lübbe
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA- argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) supE44 λ thi-1 gyrA relA1	Hanahan 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm met (DE3)	Novagen (Madison)
<i>Escherichia coli</i> HM125	F ⁻ Δ lacX74 galE galK thi rpsL(strA) Δ phoA degP:: Ω Kan eda51::Tn10(Tet ^r) rpoH15	Arslan et al. 1998
<i>Escherichia coli</i> S17.1	RP4-2 (TC::Mu) (Km::Tn7) chromosomal integriert, „mobilizing strain“	Simon et al. 1983

2.3.2 Vektoren und Plasmide

Tab 2.2: Verwendete Vektoren

Vektor	Genotyp oder Phänotyp	Referenz
pET11a	Ap ^r	Novagen (Madison)
pET22b	Ap ^r , His-tag (C-terminal)	Novagen (Madison)
pISC-2(iciA)	Ap ^r , araC, p _{ara} BAD	Arslan et al. 1998
pK18mobsacB	Km ^r , sacB, lacZ ⁻ , Mob ⁺ , RP4 oriT, RP4 oriV	Schäfer et al. 1994
pBBR1-MCS2	Km ^r , lacZ ⁻	Kovach et al. 1994

Tab. 2.3.: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp oder Phänotyp	Referenz
pET22b(J)	Ap ^r , pET22b + mit <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> kloniertes, an einen His-Tag fusioniertes <i>dsrJ</i> -Gen	Monika Kräling
pET11a(M)	Ap ^r , pET11a + mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> kloniertes <i>dsrM</i> -Gen	diese Arbeit
pET22b(O)	Ap ^r , pET22b + mit <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> kloniertes, an einen His-Tag fusioniertes <i>dsrO</i> -Gen	diese Arbeit
pISC-2(J)	Ap ^r , pISC-2-Vektor bei dem das <i>iciA</i> -Insert durch das <i>dsrJ</i> -Gen (<i>NdeI</i> , <i>XbaI</i>) ersetzt wurde	diese Arbeit
Plasmid	Genotyp oder Phänotyp	Referenz
pK18ΔK	Km ^r , <i>pK18mobsacB</i> + mit <i>HindIII</i> kloniertes PCR-Fragment, dass die <i>dsr</i> -Gene <i>C - L</i> ohne <i>dsrK</i> umfasst.	Engels 2001
pK18ΔO	Km ^r , <i>pK18mobsacB</i> + mit <i>HindIII</i> kloniertes PCR-Fragment, dass die <i>dsr</i> -Gene <i>J-P</i> ohne <i>dsrO</i> umfasst.	diese Arbeit
pK18ΔJ	Km ^r , <i>pK18mobsacB</i> + mit <i>HindIII</i> kloniertes PCR-Fragment, dass die <i>dsr</i> -Gene <i>L - O</i> ohne <i>dsrJ</i> umfasst.	diese Arbeit
pK18ΔP	Km ^r , <i>pK18mobsacB</i> + mit <i>HindIII</i> kloniertes PCR-Fragment, dass die <i>dsr</i> -Gene <i>O - P</i> ohne <i>dsrP</i> umfasst.	diese Arbeit
pK18ΔM	Km ^r , <i>pK18mobsacB</i> + mit <i>HindIII</i> kloniertes PCR-Fragment, dass die <i>dsr</i> -Gene <i>F-K</i> ohne <i>dsrM</i> umfasst.	diese Arbeit
pJKomp	pBBR1-MCS2 + <i>dsr</i> -Promotor + <i>dsrJ</i>	diese Arbeit

2.3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Bebbersberg) hergestellt. Fettgedruckte Nukleotide entsprechen eingefügten Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Enzym	Referenz
Ofor	CCGTGGATCTAGACTGCTTCGACTGTCAC	<i>XbaI</i>	diese Arbeit
Orev2	TCAGACGCCAAGCTTACGCACGCCCGT	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
DsrJfor1(mS)	CCTGGAGGCGCATATGGTCAACGGTGT	<i>NdeI</i>	Dahl
DsrJrev3	GTTGTGTTCTAGATCATGGTTC	<i>XbaI</i>	diese Arbeit
DsrM1f	GGTGC GGACATATGGCGTTTCTGAC	<i>NdeI</i>	diese Arbeit
DsrM1r	CGCTCGAATCAGGATCCTCATGACTGC	<i>BamHI</i>	diese Arbeit
DsrProF	GATGGCGATCTAGACTGACTTCATGG	<i>XbaI</i>	Lübbe
DsrProR	ATAGCCATATGGTCTCTCGTATCGAA	<i>NdeI</i>	Lübbe
cvseq16F	AACTGGTACGGAGAACGA	-	Pott-Sperling
Po-SK2	CGACTTTC AAACCGATGG	-	Pott-Sperling
Msoefor1a	GATGAACAAGCTTGATGCGGTCTTCAGCTTCTA	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
Msoerev1	TAAGCGGACGACTGGCGGTGGAGCTTGATG	-	diese Arbeit
Msoefor2	CATCAAGCTCCACCGCCAGTCGTCGGCTTA	-	diese Arbeit
Msoerev2c	TTGTCGTA AAGCTTGATGAACATGCCGAAGTTGG	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
Jsoefor1	GGCGCGGAAGCTTGACTCCGACAAGTTCTATC	<i>HindIII</i>	diese Arbeit

Jsoerev1	GTTTCAGTGCCCTCCCCGGCTCTGACTACA	-	diese Arbeit
Jsoeфор2	TGTAGTCAGAGCCGGGGGAGGGCACTGAAC	-	diese Arbeit
Jsoerev2	TGGCGCTAAGCTTATCCTTGAGATCGCCGAAGA	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
Osoeфор1a	TCGCCGCAAGCTTGATCGACGCCTATGTGATG	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
Osoerev1	CTGGCGTCGCCTCGGGGTTTCAGTGCCCTCC	-	diese Arbeit
Osoeфор2	GGAGGGCACTGAACCCCGAGGCGAGGCCAGCCCAG	-	diese Arbeit
Osoerev2	CGATCGGGAAAGCTTGGCTGCCG	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
Psoerev1	CTGGAGGCGAAGCTTGTCAACGCTGTAGTCAGAG	<i>HindIII</i>	diese Arbeit
Psoerev1	ATCTCAGGCCGGCTTGTACGCGAAGGCTGA	-	diese Arbeit
Psoeфор2	TCAGCCTTCGCGTACAAGCCGGCCTGAGAT	-	diese Arbeit
Psoerev2	ATGCCGGAAGCTTGACGCACGGTATAGCCATAG	<i>HindIII</i>	diese Arbeit

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von *A. vinosum*

A. vinosum wurde entweder photoorganoheterotroph (RCV-Medium) oder photolithoautotroph (Thiosulfat-Medium, Pfennig-Medium) kultiviert. Soweit angegeben wurden den Medien die Spurenelementlösungen SLA oder SL12 zugesetzt:

SL12 (Pfennig und Trüper 1992):

Na-EDTA	3 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1,1 g
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	50 mg
ZnCl ₂	42 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	2 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg
A. dest.	ad 1l

Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 3,5 - 4. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Nach einigen Wochen erhält sie dabei ihre charakteristische rote Färbung.

SLA (Imhoff und Trüper 1977):

FeCl ₂ * 6 H ₂ O	1,8 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	250 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	10 mg
Cu Cl ₂ * 6 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	70 mg
ZnCl ₂	100 mg
H ₃ BO ₃	500 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	30 mg
Na ₂ SeO ₂	10 mg
A. dest.	ad 1l

Der pH-Wert der Lösung beträgt 2. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

2.4.1.1 RCV-Medium

A. vinosum wurde photoorganoheterotroph auf RCV-Medium angezogen (Weaver et al. 1975). Grundmedium für das RCV-Medium ist das RÄH-Medium:

RÄH-Medium

60 g Malat
24 g NH ₄ Cl
4 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O
1,4 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O
+ 100 ml SLA-Lsg. oder 2 ml SL12 (100fach)

ad 1000 ml Aqua dest.; Lagerung: unsteril bei 4 °C

RCV-Medium

Das RCV-Medium setzt sich aus zwei Lösungen zusammen, die getrennt voneinander autoklaviert und nach dem Autoklavieren vereint werden:

Lösung A:

50 ml RÄH-Medium
ad ~ 800 ml aqua dest.
0,5 g Hefeextrakt
1,8 g NaOH

Falls erforderlich wurde das Medium mit HCl auf pH 7,0 gebracht und mit Aqua dest. auf 950 ml aufgefüllt.

Lösung B:

180 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

Es wurden jeweils 5 Teile Lösung B auf 85 Teile Lösung A eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte je nach Bedarf in 50, 100 oder 1000 ml Pfennig-Flaschen, die 10 %ig mit *A. vinosum* angeimpft wurden.

Bei der Anzucht aus Stockkulturen oder von der Platte werden dem RCV-Medium nach dem Autoklavieren je 100 ml Medium 100 µl Futterlösung (NaHS* H₂O: 3,1 g; NaHCO₃: 5g; Aqua dest. ad 100 ml) zugegeben.

2.4.1.2 RCV-Platten im Anaerobentopf

Zur Anzucht auf festen Nährmedien wurden RCV-Agar- und RCV-Phytigel-Platten verwendet. Bei RCV-Agarplatten handelt es sich um mit Agar verfestigtes RCV-Medium. RCV-Phytigel-Platten enthielten noch weitere Bestandteile. Das Phytigel ersetzt hierbei den sonst für das Gießen von Platten verwendeten Agar, da es schneller fest wird, so daß das zugegebene Sulfid weniger Zeit hat auszugasen. Die Zusammensetzung des Mediums für RCV-Phytigel-Platten war wie folgt:

236,2 ml RCV-Medium (+ 0,5 % NaCl + 1 % Phytigel)

13,8 ml Phosphatpuffer

650 µl Futterlösung (NaHS* H₂O: 3,1 g; NaHCO₃: 5g; Aqua dest. ad 100 ml)

500 µl Na-Acetat (1M)

500 µl Na₂S₂O₃ (0,4 M)

Die Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert, unmittelbar nach dem Gießen vereinigt und zum Plattengießen eingesetzt. Die Platten wurden sobald sie fest waren mit Bakterien beimpft und im Anaerobentopf (Merck, Darmstadt) im Licht inkubiert. Zur Erzeugung des anoxischen Milieus diente Anaerocult A (Merck, Darmstadt), zur Überprüfung angefeuchtete Indikatorstäbchen (Anaerotest: Merck, Darmstadt).

2.4.1.3 Thiosulfat-Medium

Das Thiosulfat-Medium (Sperling 2001) dient der photolithoautotrophen Anzucht von *A. vinosum* auf Thiosulfat. Da eine Anzucht auf Thiosulfat alleine nur schlecht gelingt (nicht ausreichendes reduzierendes Milieu) wird dem Medium auch Sulfid zugesetzt.

<u>Lösung A:</u>	100* Makroelementlösung	100 ml ad 9,5 l
<u>Lösung B:</u>	Na ₂ CO ₃	26.5 g
	NaHCO ₃	21,0 g
	Na ₂ S ₂ O ₃ * H ₂ O	31,0 g
	Sulfidlösung	25 ml
	A. dest.	ad 500 ml

<u>100* Makroelementlösung:</u>	KH ₂ PO ₄	100g
	NH ₄ Cl	70 g
	MgSO ₄ * H ₂ O	40 g
	CaCl ₂ * H ₂ O	10 g
	SL12	100 ml
	HCl konz.	193 ml
	A. dest.	ad 1 l

(Lagerung unsteril bei 4°C)

<u>Sulfidlösung (1 M):</u>	HNaS* H ₂ O	18,5 g
	A. dest.	250 ml

(Lagerung unsteril bei Raumtemperatur)

Die Lösungen A und B werden getrennt autoklaviert (Lösung A im 10 l-Carboy-Fermenter) und nach dem Abkühlen vereint. Der pH-Wert des Mediums sollte 7,5 betragen.

2.4.1.4 Pfennig-Medium

Das Pfennigmedium (modifiziert nach Pfennig und Trüper 1992) dient der photolithoautotrophen Anzucht von *A. vinosum* auf Sulfid. Anders als beim Thiosulfat-Medium ist diese Substanz hier der einzige Elektronendonator. Das Medium wird in vier

Lösungen getrennt autoklaviert, die anschließend in der Reihenfolge ihrer Nummerierung vereinigt werden. Da *A. vinosum* zum Wachstum kein Vitamin B₁₂ benötigt (Imhoff et al. 1998), wurde dieses aus dem Rezept gestrichen.

Lösung 1:

KCl	3,3 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	3,3 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	4,3 g
NH ₄ Cl	3,3 g
100* Spurenelementlsg. (SL12)	1 ml

Lösung 1 wurde im 10 l-Carboy-Fermenter auf 7810 ml + 500 ml (wegen Verdunstung) aufgefüllt, autoklaviert und unter einer Stickstoff-Atmosphäre abgekühlt.

Lösung 2:

KH ₂ PO ₄	3,3 g ad 1000 ml
---------------------------------	------------------

Lösung 3:

NaHCO ₃	15 g ad 1000 ml
--------------------	-----------------

Lösung 4:

NaHS	4 g (7 mM) oder 1,14 g (2mM) ad 250 ml
------	--

Nach Komplettierung von Lösung 1 mit den Lösungen 2 - 4 wurde das Medium solange mit Kohlendioxid durchblasen bis es klar wurde. Dadurch wurde der pH-Wert auf 6,8 - 7,0 eingestellt. Dieser Wert wurde mit einer pH-Elektrode überprüft. Das Medium wurde schließlich in sterilen Pfennig-Flaschen randvoll abgefüllt und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.1.5 Kultivierung von *A. vinosum* in Fermentern

A. vinosum wurde entweder in 10 l Carboy-Fermentern zur Gewinnung von Zellmaterial auf Thiosulfat-Medium oder zur Charakterisierung des Phänotyps in 1,5 bis 2 l Fermentern auf Pfennig-Medium angezogen.

Die 10 l Carboyfermenter wurden 10 %ig mit auf RCV-Medium gewachsenem *A. vinosum* beimpft und für etwa 5 Tage (bis nach dem zweiten Schwefeln) kultiviert.

Die kleineren Fermenter zur Charakterisierung des Phänotyps wurden im Gegenstrom von Stickstoff mit 1,5 (bei 2 l Fermentern) bzw. 1 l (bei 1,5 l Fermentern) Pfennig-Medium befüllt und anschließend mit abzentrifugierten und im Rücklauf resuspendierten auf 1 l RCV-Medium gewachsenem *A. vinosum* beimpft (ebenfalls im Gegenstrom von Stickstoff). Die Kultivierung erfolgte dann bei konstantem pH (6,8 - 7: pH-Elektrode, manuelle Regulierung), konstanter Beleuchtung (60 W Strahler verschiedener Hersteller), konstanter Temperatur (30°C: Wasserbad) und ständigem Rühren. Während der Kultivierung wurden wiederholt Proben zur späteren Bestimmung des Sulfid-, Elementarschwefel-, Sulfit, Sulfat-, Thiosulfat-, Thiole- und Proteingehaltes der Kultur gezogen.

Zur Reinheitskontrolle wurden 100 µl der Vorkulturen für die Fermenter auf LB-Platten ausplattiert und bei 37 °C und 30°C bebrütet.

2.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

2.4.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

E. coli wurde aerob bei 37 °C auf Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) oder 2YT-Medium (Sambrock et al. 1989) und anaerob in MS-Medium kultiviert:

LB-Medium:

Trypton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
pH	7,5

400 ml MS-Medium

40 ml M9-Medium
40 ml LB-Medium
40 mM Na ₂ Fumarat
0,8 g Glycerol
40 mM Nitrat

auf 400 ml mit Aqua dest. auffüllen und auf pH 7,0 einstellen.

10 x M9-Medium

10 g NH ₄ Cl
30 g KH ₂ PO ₄
60 g Na ₂ HPO ₄ X 7 H ₂ O

auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

2YT-Medium:

Trypton	1,6 %
Hefeextrakt	1,0 %
NaCl	0,5 %
pH	7,0

Zur Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium 1,5 % Agar hinzugefügt. Zur Blau-Weiß-Selektion wurde dem Medium 80 µg/ml X-Gal (in N,N-Dimethylformamid) als Indikatorfarbstoff und 0,5 mM IPTG als Induktor zugesetzt.

2.4.2.2 Überexpression rekombinanter Proteins in *Escherichia coli*

Zur Überexpression rekombinanter Proteine wurden ein das entsprechende Überexpressionsplasmid enthaltender *E. coli*-BL21 (DE3)- oder *E. coli* HM125-Stamm aerob bei 37°C in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ü.N. angezogen. Als Inokulum für die eigentliche Überexpression diente 1/10 Volumen in 500 µl LB-Medium resuspendierte Kultur. Bei einer OD von 0,8 wurde als Induktor, je nach Anforderungen des Plasmids IPTG (1 mM) oder L(+)-Arabinose (0,8%) hinzugegeben und die Kultur 2 - 48 h später durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert und bei – 20 °C gelagert.

Die eigentliche Überexpression erfolgte bei 30 oder 37 °C aerob in 100 oder 500 ml LB- oder anaerob in 100 ml MS-Medium.

2.4.3 Konservierung von Bakterienstämmen

Zum Anlegen von DMSO-Stockkulturen von *Allochromatium vinosum* wurden 50 ml Kultur in einem Falcon-Röhrchen 10 Minuten bei 2500 rpm steril abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 7-10 ml (zum Resuspendieren) verworfen. 900 µl der konzentrierten Zellsuspension wurden dann mit 900 µl 10 %igem DMSO (steril) versetzt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Anlegen von Glycerinkultur von *Escherichia coli* wurden 1 ml frische Bakterienkultur mit 1 ml Glycerinlösung (65% [v/v] Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 25 mM Tris/HCl pH 8) vermischt und bei -70°C gelagert (Ausubel et al. 1990-2001).

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Zellernte und Aufschluß

Aufschlusspuffer: *E. coli*: 20 mM Tris/HCl pH 7,5
 A. vinosum 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂

Kulturen von *Escherichia coli* und *Allochromatium vinosum* wurden durch Zentrifugation (5-15 Minuten, 25.000 x g, 4 °C) abgeerntet und in Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellen

wurden anschließend bei 4 °C mit Ultraschall (Cell Disruptor B15, Branson) bei 50 %iger Leistung und einer Beschallungsdauer von 1min/ml aufgeschlossen. Zur Entfernung von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen wurde das Lysat anschließend noch in einer Sorvallkühlzentrifuge bei 4 °C und 25.000 g 30 Minuten lang abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

2.5.1.1 Ultrazentrifugation

Rohextrakt aus *Allochromatium vinosum* wurde zur Trennung in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion in einer Ultrazentrifuge (Beckman LE80K, Rotor 60Ti) abzentrifugiert (4 °C, 145.000 x g, 3 h). Der Überstand enthält die Fraktion der löslichen Proteine, das Pellet die Membranproteine. Letztere wurden mit Hilfe eines Glashomogenisators (Braun, Melsungen) in Aufschlusspuffer resuspendiert. Beide Fraktionen wurden bei – 20°C gelagert.

2.5.2 Essigsäure-Fällung von Proteinen

Bei der Essigsäure-Fällung wurde eine 10 %ige (w/v) Trichloressigsäure- (TCA-)Lösung zu der Proteinprobe gegeben, so dass eine 3 - 4%ige TCA-Lösung entstand. Der Ansatz wurde dann für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert.

2.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes

2.5.3.1 Proteinbestimmung mit dem BCA-Kit

Proteinbestimmungen mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockeford, USA) wurden in Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die BCA-Methode (Smith et al. 1985) beruht vermutlich darauf, dass die im Reagenz enthaltenen Cu^{2+} -Ionen durch die Proteine zu Cu^+ reduziert werden, das dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen bei 562 nm stark absorbierenden Komplex bildet.

2.5.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie brilliant blue an Proteine bindet, wobei es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kommt (Rehm 2000). Gemäß den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden 1 Teil Proteinlösung mit 30 Teilen Bradfordreagenz gemischt, 5 Minuten inkubiert und dann bei 595 nm gegen den Reagenzienlehrwert vermessen. Eichkurven wurden im Bereich von 0 bis 1,4 mg BSA/ml erstellt.

2.5.4 Elektrophorese von Proteinen und Western Blot

2.5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diskontinuierliche Polyacrylamidgele wurden 12,5 %ig nach Laemmli (1970) folgendermaßen hergestellt:

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
Polyacrylamid-Lösung	5 ml	0,75 ml
Aqua dest.	4 ml	3 ml
Lösung A	3 ml	-
Lösung B	-	1,25 ml
10% APS	100 µl	100 µl
TEMED	5µl	5 µl

5*Elektrophoresepuffer

15 g Tris

72 g Glycin

5 g SDS

ad 1 l Reinstwasser

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

Als Polyacrylamidlösung wird 30 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5 : 1) (Life Technologies, Eggenstein) eingesetzt. Für eine diskontinuierliche Gelelektrophorese wird zuerst das Trenn-, dann das Sammelgel gegossen. Die Auspolymerisierungszeit beträgt jeweils 45 Minuten. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit A. dest. überschichtet, um beim Auspolymerisieren eine glatte Oberfläche zu erhalten. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das Wasser wieder entfernt.

Die Proteinproben wurden mit 4* Rotiload (Roth, Karlsruhe) versetzt und 5 min bei 100°C oder 1 h bei RT inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 - 100 V.

2.5.4.2 Analyse ganzer Zellen auf einem Polyacrylamidgel

Zur Analyse ganzer Zellen auf einem Polyacrylamidgel wurde 1 ml Kultur bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugieren. Das Pellet wurde in 100 µl 20 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendieren (10fache Konzentrierung), mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzen und 5 - 10 min bei 70 - 95°C erhitzt, Die Lagerung erfolgte bei - 20°C.

2.5.4.3 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

Coomassiefärbelösung: 0,25 % Coomassie-Brilliant-Blue R250, 50 % Methanol, 10 %

Essigsäure, 40 % Wasser

Coomassieentfärber: 20 % Methanol, 10 % Essigsäure 70 % Wasser.

Zur Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung wurden die Gele für mindestens 45 Minuten in Coomassiefärbelösung inkubiert. Anschließend folgt die Entfärbung mit Coomassieentfärber (ü.N. mit Schaumstoffstücken zur besseren Entfärbung).

2.5.4.4 Western Blot

(nach Matsudaira, 1987)

Towbin-Blotpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %; pH 8,3

Nachweisreagenz: 30 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 7 ml Ethanol, 20 µl H₂O₂, 43 ml Reinstwasser

Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transblot SD-Semi-Dry Transferzelle auf Cellulosenitratmembranen übertragen. Dazu wurden sowohl das Proteingel, als auch die Blottingmembran 15 Minuten lang in Towbin-Blotpuffer äquilibriert. Dann wurden nacheinander 3 in Towbin-Blotpuffer getränkte Whatman-3MM-Papiere, die Membran, das Gel und drei weitere in Towbin-Blotpuffer getränkte Whatman-3MM-Papiere auf die Anode gelegt. Nach Aufsetzen der Kathode wurde für 15 - 45 Minuten bei 15 V geblottet.

Die Membran wurde schließlich ü.N. in 100 ml 1 x PBS mit 5 % Skim Milk inkubiert. Am nächsten Morgen wurde fünfmal je fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen und die Membran dann für 3 h mit dem jeweiligen Antiserum (1:500 verdünnt) in 20 ml 1 x PBS mit 0,5 % BSA inkubiert. Dann wurde dreimal wieder je fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen und die Membran anschließend mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000) für eine Stunde erneut in 20 ml 1 x PBS mit 0,5 % Skim Milk inkubiert. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um ein Anti-Kaninchen-Antikörper, an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper bindet somit an den primären Antikörper und kann dann über die Peroxidase-Reaktion nachgewiesen werden. Dazu wurde die Membran nochmals in 1 x PBS gewaschen (zweimal für fünf Minuten) und anschließend für 10

Minuten in Nachweisreagenz im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit Aqua dest. gewaschen, um das Nachweisreagenz wieder zu entfernen.

2.5.5 Säulenchromatographische Methoden

2.5.5.1 Nickelchelate-Säule

Lysepuffer:

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol pH 8,0

Das Zellmaterial (aus 100 ml Überexpression) wurde zentrifugiert (4 °C, 10.000 rpm, 30 min) und in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Dann wurde Lysozym hinzugeben (Endkonzentration 1 mg/ml) und für 1 h auf Eis inkubiert. Es ergab sich eine schleimige Masse, die erneut abzentrifugiert wurde (4 °C, 14.000 rpm, 30 min). Währenddessen wurde 1 ml Säulenmaterial (Nickel-NTA-Agarose von Quiagen) in Säulchen mit Lysepuffer äquilibriert (2 - 3 Volumen des Lysepuffers). Die Probe wurde schließlich aufgetragen, der Durchfluß aufgefangen und das gebunden Protein mit je 1 ml Lysepuffer aufsteigender Imidazolkonzentration eluiert:

20 mM Imidazol
50 mM Imidazol
100 mM Imidazol
150 mM Imidazol
250 mM Imidazol
500 mM Imidazol

Nach dem Säulenlauf wurde die Säule mit Lysepuffer ohne Imidazol gespült, mit 20% Ethanol äquilibriert und im Kühlschrank gelagert.

2.6 Nasschemische Schwefelbestimmung

Reagenzien: Eisennitratreagenz: 30 g Fe(NO₃)₃
40 ml 55%iger HNO₃ (bzw. 34 ml von 65 %iger HNO₃)
ad 100 ml A. dest.

Natriumcyanid: 0,2 M

100 - 200 µl Kultur wurden 1 Minute bei 14.000 rpm abzentrifugiert und bei – 20 °C gelagert. Das Sediment wurde in 200 µl Aqua dest. aufgenommen und mit 100 µl 0,2 M

Natriumcyanidlösung versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 100 °C wurden 650 µl Aqua dest. und 50 µl Eisennitratreagenz hinzugegeben. Der Ansatz wurde schließlich 2 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert, um Zellreste, die das Messen der Extinktion behindern könnten, zu entfernen. Vermessen wurden die Proben schließlich bei 460 nm. Eine Eichkurve wurde mit Natriumrhodanid im Bereich von 0 - 300 nmol/Ansatz erstellt.

2.7 Nachweis von Schwefelverbindungen mittels HPLC

Die Bestimmung der Schwefelverbindungen erfolgte mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC). Verwendet wurde dazu eine HPLC-Anlage der Firma Thermo-Electron (Egelsbach). Die Anlage besteht aus folgenden Teilkomponenten: Pumpe P200 mit Vakuum-Entgaser SCM1000, UV-Detektor UV6000LP und UV150, Fluoreszenz-Detektor FL3000 und Säulenofen Column Thermostat Jetstream 2.

Vor dem Auftragen auf die Säule wurden die Proben 10 Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, um zu vermeiden, dass partikuläre Bestandteile auf die Säule gelangen. Verwendete Puffer wurden aus demselben Grund mittels Nitratcellulose-Filtern (Porengröße 0,2 µm; Sartorius, Göttingen) gefiltert.

2.7.1 Bestimmung von Elementarschwefel

Säule: LiChrospher100 RP 18 (125-4, 5 µm) (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: 95 % Methanol, 5 % Wasser

Elution: isokratisch

Detektion: UV-Detektion bei 263 nm (UV-Detektor UV 6000 LP)

Zur Schwefelbestimmung wurden 100 µl Zellen in Medium mit 100 µl Chloroform etwa 12 Sekunden lang gevortext. Nach Trennung der beiden Phasen wurden 50 µl der unteren Phase mit einer Hamilton-Spritze aufgezogen und über ein Rheodyne-Ventil mit einer Probenschleife von 20 µl in die HPLC-Anlage gespritzt. Die Elution erfolgte als Reversed Phase Chromatography im isokratischen Fluß. Bei der Reversed Phase Chromatography besitzt die stationäre Phase der Säule eine geringere Polarität als die mobile Phase. Detektiert wurde der Schwefel über UV-Absorption (Rethmeier et al. 1997, Beffa et al. 1988). Zur Erstellung einer Eichkurve wurden Lösungen von Elementarschwefel (25 - 5000 µM) in Chloroform eingesetzt.

2.7.2 Bestimmung von Thiolen

2.7.2.1 Derivatisierung

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES-Puffer, 5 mM EDTA, pH 8,0 (mit NaOH titriert)

Monobrombimanlösung: 96 mM in Acetonitril, Lagerung bei -20°C

Methansulfonsäure: 65 mM in Reinstwasser

Um Thiole wie z.B. Sulfid, Sulfit und Thiosulfat in der HPLC nachweisen zu können, müssen diese erst an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (derivatisiert) werden. Dazu wurden in einem Mikroreaktionsgefäß 50 μl HEPES-Puffer und 55 μl Acetonitril vorgelegt. Dann wurden 50 μl Probe und 5 μl Monobrombimanlösung hinzugegeben, der Ansatz gemischt und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl Methansulfonsäure abgestoppt und der Ansatz bei -20°C gelagert.

2.7.2.2 Nachweis der derivatisierten Thiole

Säule: LiChrospher 100 RP 18ec (250 - 4,5 μm) (Merck, Darmstadt); Flussrate 1ml/min; Säulentemperatur: 35°C

Laufmittel: Puffer A: 0,25 % Essigsäure, pH 4,0 (titriert mit NaOH)
Puffer B: Methanol

Elutionsprogramm: Binärer Gradient:

0-7 min:	85 % A, 15 % B
7-15 min:	12 - 30 % B
15-19 min :	30 % B
19-23 min:	30 - 50 % B
23-30 min:	50 - 100 % B
30-33 min:	100 % B
33-33,1 min:	100 - 15 % B
33,1-38 min:	15 % B

Detektion: Fluoreszenzdetektion: Anregung bei 380 nm, Emission bei 420 nm.

Auch der Nachweis der derivatisierten Thiole erfolgte wie der Nachweis von Elementarschwefel über eine Reversed Phase Chromatography. Eluiert wurde diesmal allerdings nicht über einen isokratischen Fluß, sondern über einen Gradienten (s. Elutionsprogramm). Die Detektion erfolgte zudem über Fluoreszenzabsorption (Rethmeier et al. 1997). Um eine Überlastung des Fluoreszenzdetektors zu vermeiden, wurden die Proben im Verhältnis mit Laufmittelgemisch (85 % Puffer A, 15 % Puffer B) 1:20 verdünnt und in

HPLC-Vials mit Septum pipettiert (200 µl insgesamt). Über den Autosampler wurden davon 50 µl in eine 100 µl Probenschleife injiziert.

Eichkurven für Sulfid, Sulfit und Thiosulfat wurden jeweils im Bereich von 50 – 750 µM aufgenommen. Die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen lagen jeweils etwa bei 4,8 (Sulfit), 9 (Thiosulfat) und 40 Minuten (Sulfid).

2.7.3 Bestimmung von Sulfat

<u>Säule:</u>	Polyspher IC AN1 (Merck, Darmstadt); Flussrate 1,3 ml/min; Säulentemperatur: 35 °C
<u>Laufmittel:</u>	1,5 mM Phthalsäure, 1,38 mM Tris, 300 mM Borsäure, pH 4,2 (nicht titriert)
<u>Elution:</u>	isokratisch
<u>Detektion:</u>	indirekte UV-Detektion bei 254 nm (UV-Detektor UV 150)

Die Sulfatbestimmung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie. Die UV-Detektion erfolgte indirekt, d.h. dass Laufmittel absorbiert stärker als die zu messenden Verbindungen, so dass negative Peaks erscheinen.

Die abzentrifugierten Fermenterproben wurden ohne weitere Vorbereitung in HPLC-Vials pipettiert. Aus diesen zog der Autosampler 60 µl der Probe, um sie in eine 100 µl Probenschleife zu injizieren. Eine Eichkurve wurde im Bereich von 50 – 2000 µM aufgenommen. Die Retentionszeit für Sulfat betrug etwa 12 Minuten.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Präparation von DNA

2.8.1.1 Plasmid-Minipräparationen

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mit dem Quiaprep-spin Plasmid-Kit nach Angaben des Herstellers (Quiagen, Hilden) isoliert. Das Kit beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) und der Absorption von DNA an Silica-Gel unter hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie 1979).

2.8.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *Allochromatium vinosum*

<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA pH 8
<u>TES-Puffer:</u>	50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 0,5 mM EDTA pH 8
<u>Saccharose-TES-Puffer :</u>	20 % Saccharose in TES-Puffer
<u>Lysozym-RNase-Lösung :</u>	20 mg/ml Lysozym, 1 mg/ml RNase
<u>Sarcosin-Lösung :</u>	10 % Laurylsarcosin, 250 mM EDTA
<u>Dialyseschläuche:</u>	Die Schläuche wurden in Stücke von 10 bis 20 cm Länge geschnitten und 10 Minuten in großem Volumen (1 l) 2 %iger NaHCO ₃ -Lösung und 1 mM EDTA (pH 8,0: 2 ml 0,5 M) gekocht. Nach kurzem Spülen in sterilem Aqua dest. wurden sie 10 Minuten in 1 mM EDTA (pH 8,0) autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Die Isolierung genomischer DNA aus *Allochromatium vinosum* erfolgte über eine Sarkosyl-Lyse (modifiziert nach Bazarl und Helsinki 1968). Die weitere Aufreinigung erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Dialyse.

80 - 100 mg Zellmaterial wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß in 1 ml eiskaltem TES-Puffer resuspendiert und mit 1 ml TES-Puffer versetzt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 250 µl Saccharose-TES-Puffer resuspendiert und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dann folgte nach Zugabe von 260 µl Lysozym-RNase-Lösung eine einstündige Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Nach der Inkubation wurde die DNA durch einmaliges Aufsaugen durch ein sterile Kanüle (18 x 1,5-1,2 x 45 mm) geschert und mit 300 µl sterilem Wasser versetzt. Die DNA-Lösung wurde schließlich durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte über eine dreistündige Dialyse gegen TE-Puffer, gefolgt von einer 12 - 15-stündige Dialyse gegen TE-Puffer und abschließend einer zwei-stündigen Dialyse gegen steriles Aqua dest. Die DNA wurde schließlich in sterilen Mikroreaktionsgefäßen bei 4°C gelagert.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Ein Extinktionswert von 1,0 entspricht bei dieser Wellenlänge einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al. 1989).

2.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

2.8.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

(nach Sambrook et al. 1989)

10 x TAE: 400 mM Tris-Acetat pH 7,8, 50 mM Natriumacetat, 10 mM Na₂EDTA, pH 7,8

10 x Probenpuffer: 0,1 % Bromphenolblau, 60 % Glycerin in 1 x TAE-Puffer

Die Agarose wurde 0,8 bis 1,5 %ig in 1 x TAE durch Aufkochen gelöst und in eine vorbereitete horizontale Gelkammer (Life Technologies, Eggenstein) gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard dienten jeweils 5 µl einer 1 kb-Leiter von Life Technologies (Eggenstein). Die Laufzeit betrug 1 - 2 h bei 60 - 100 V.

2.8.3.2 Färbung mit Ethidiumbromid

Die Agarosegele wurden im Dunkeln unter leichtem Schütteln für 5-10 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gefärbt und anschließend auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 360 nm betrachtet und mit einem Videosystem der Firma INTAS dokumentiert.

2.8.4 Reinigung von DNA

Zur Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen, nach Restriktionsverdauen oder zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden Protokolle des QIAquick Gel Extraction Kits (Quiagen, Hilden) eingesetzt. Die DNA wurde schließlich mit 30 µl Reinstwasser eluiert.

2.8.5 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde entwickelt, um *in vitro* Abschnitte von Nukleinsäuren selektiv anreichern zu können (Mullis & Faloona 1987; Saiki et al. 1985).

PCR`s wurden generell in 50 µl Ansätzen in sterilen Mikroreaktionsgefäßen mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml durchgeführt. Je nach Bedarf wurden die *Taq*- oder die *Pfu*-DNA-Polymerase benutzt. Typische Reaktionsansätze enthielten etwa folgende Komponenten:

- 10 x Reaktionspuffer (vom Hersteller der entsprechenden Polymerase)
- MgCl₂ (1,5 - 5 mM)
- Primer 1 und 2 (je 100 pmol/µl)
- dNTP-Mischung (jeweils 5 mM)
- DNA-Matrize (0,1 –0,5 µg/µl)
- DNA-Polymerase (1-2,5 U/µl)

Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurde der fertige Ansatz mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die verwendeten PCR-Programme bewegten sich meist innerhalb folgender Parameter:

Initialdenaturierung	95 °C	3 min
30-40 Schleifen:		
Denaturierung	95°C	45 sec – 1 min
Primeranlagerung	45-65°C	1 min
Synthesephase	72°C	1-5 min
Abschließende Synthese	72°C	10 min

Die Dauer der Synthesephase richtet sich nach der Länge des erwünschten Amplifikats und der verwendeten Polymerase. Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Bebbersberg) synthetisiert. Geeignete Primeranlagerungstemperaturen wurden sowohl von der Herstellungsfirma bei Zusendung der Primer mitgeteilt, als auch über die Formel $T_A(^{\circ}\text{C}) = [2 \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \times (\text{G} + \text{C})] - 5$ berechnet (Thein & Wallace, 1986).

2.8.5.1 Amplifikation von Genen zur Klonierung

Zur Amplifikation von *dsr*-Genen zwecks späterer Klonierung in Überexpressionsvektoren oder zur Herstellung von Deletionsmutanten (s. 2.8.6) wurden Primer von 20 - 30 nt Länge

verwendet, in die Schnittstellen für geeignete Restriktionsenzyme eingebaut waren. Mit den Primern wurde die DNA-Sequenz also nicht nur amplifiziert, sondern an ihren Enden auch mutiert, um den Einbau in die gewünschten Vektoren zu erleichtern.

Als DNA-Polymerase wurde meist die *Pfu*-Polymerase verwendet, da diese, anders als die *Taq*-Polymerase, über eine Kontrolllesefunktion verfügt und somit weniger Fehler in die Amplifikate einbaut. Gelingt es nicht die gewünschten Amplifikate zu erhalten, so wurde auch das GC-RICH PCR-System von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet, das sich gut dafür eignet, PCRs mit GC-reichen DNA-Matrizen durchzuführen. Dieses Kit verwendet allerdings eine *Taq*-Polymerase und erfordert beim PCR-Programm eine Synthesetemperatur von 68 °C statt 72 °C.

2.8.5.2 Kolonie-PCR

Kolonie-PCRs dienen als Schnelldiagnostik dafür, ob bestimmte Gene in Mutanten von *A. vinosum* (noch) vorhanden waren oder nicht. Verwendet wurde hierzu die *Taq*-Polymerase.

Bei Kolonie-PCRs werden statt aufgereinigter DNA ganze Zellen (100 µl Kultur) eingesetzt. Da diese Zellen erst aufgeschlossen werden müssen, um die in ihnen enthaltene DNA als Matrize für die PCR zugänglich zu machen, wird daher vor der Initialdenaturierung ein weiterer 10-minütiger Inkubationsschritt bei 95 °C eingeschaltet. Um Aktivitätsverluste der *Taq*-Polymerase zu vermeiden, wurde das Enzym erst nach diesem Inkubationsschritt zugegeben.

2.8.5.3 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Die Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden (Seibl et al. 1990) verlief über eine normale PCR, allerdings mit dem Unterschied, dass der dNTP-Mix das Nukleotid dTTP in verminderter Konzentration (4 mM) enthielt und zusätzlich das alternative Nukleotid DIG-dUTP (20 µM) hinzugegeben wurde. Dieses Nukleotid wird dann an einigen Positionen statt dTTP in das PCR-Produkt eingebaut und kann mittels des über einen Spacerarm gebundenen Digoxigenin nachgewiesen werden.

2.8.6 Gene-SOEing und „in-frame“-Mutagenese

Die Gene-SOEing-Methode wurde eingesetzt, um einzelne Gene des *dsr*-Operons deletieren zu können, ohne dass die Transkription oder Translation (zumindest soweit dies das DNA-Template betrifft) beeinträchtigt werden. Der Name Gene-SOEing steht für „gene splicing by overlap extension“. Die Methode wurde 1995 von Horton entwickelt und eignet sich sowohl

für das Einfügen von Mutationen, als auch von Deletionen. Letzteres soll hier kurz beschrieben werden:

In einem ersten Schritt werden mittels PCR diejenigen Sequenzbereiche amplifiziert, die den zu deletierenden Bereich der DNA-Sequenz stromabwärts und stromaufwärts flankieren. Dabei werden die beiden äußeren Primer (also der forward-Primer der stromabwärts und der reverse-Primer der stromaufwärts gelegenen Sequenz) so gewählt, dass sie je eine Restriktionsschnittstelle in die Sequenz einbauen. Die beiden inneren Primer bestehen aus je einer 15 nt langen Sequenz die komplementär zu dem DNA-Bereich ist, der amplifiziert werden soll und einem 15 nt langen Schwanz, der komplementär ist zu dem jeweils anderen inneren Primer. Dadurch besitzen die beiden PCR-Produkte eine 30 bp lange Überlappungsregion. Dies ermöglicht es nun, in einer zweiten PCR mit den beiden äußeren Primern aus den beiden einzelnen Amplifikaten ein fusioniertes PCR-Produkt herzustellen. In der ersten Amplifikationsrunde dienen sich dabei die beiden ersten Amplifikate gegenseitig als Primer und erzeugen so die gewünschte Matrize, die dann nur noch durch die beiden äußeren Primer vermehrt werden muß.

Da der Bereich der Deletion durch geeignete Wahl der Primer beliebig gewählt werden kann, ermöglicht es diese Methode Teile von Genen oder vollständige Gene so zu entfernen, dass weder das Leseraster etwaiger verbleibender Reste eines Gens, noch die Leseraster benachbarter Gene, noch andere wichtige Bereiche der DNA-Sequenz (z.B. Ribosomenbindestellen) in Mitleidenschaft gezogen werden.

2.8.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.7.1 Restriktion von DNA

Restriktionsverdau von DNA erfolgten in Mikroreaktionsgefäßen für 1 - 3 h bei 30°C oder 37°C gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller der Restriktionsenzyme (Life Technologies [Eggenstein] und IBM Fermentas [Hanover, USA]). Sollte die verdaute DNA später für eine Klonierung eingesetzt werden, so wurden die Restriktionsansätze nach dem Verdau für 15 Minuten bei 65°C inkubiert, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren.

2.8.7.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Um eine Rezirkularisierung von nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektoren bei der späteren Ligation zu vermeiden, wurden solche Vektoren nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt. Dazu wurden die Restriktionsansätze nach dem Verdau mit entsprechenden Mengen 10 x CIAP-Puffer und 1 Unit CIAP versetzt und für

1 - 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 Minuten bei 85°C inaktiviert.

2.8.7.3 Ligation

Zur Ligation wurden Insert und Vektor-DNA in Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 10 – 20 µl zusammen mit T4-DNA-Ligase (Promega [Madison, USA] oder IBM-Fermentas [Hanover, USA]) und dem entsprechenden Ligasepuffer gemischt. Die Ligationen erfolgten entweder bei Raumtemperatur für 2 h oder bei 16°C über Nacht.

2.8.8 Klonierung

2.8.8.1 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen

CaCl₂/MgSO₄-Lösung: 70 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄ (zum Herstellen der Lösung werden 1 M Stammlösungen der beiden Salze getrennt autoklaviert und anschließend unter Verdünnung vereinigt)

Zur Herstellung von Transformations-kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode (Dagert & Ehrlich 1974 verwendet). Dazu wurden 5 ml 2YT-Medium mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm beimpft und ü.N. unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 70 ml 2YT-Medium in einem OD-Meßkolben im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur beimpft und solange bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 erreicht war. Die Kultur wurde dann auf zwei Sorvall-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (6 min; 4.000 rpm; 4°C). Beide Pellets wurden in je 10,5 ml CaCl₂/MgSO₄-Lösung resuspendiert und für 30 - 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Pellets diesmal in je 3,5 ml CaCl₂/MgSO₄-Lösung resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 30 - 45 Minuten auf Eis wurden die Zellsuspensionen mit 875 µl sterilem Glycerin versetzt, durch vortexen gemischt, in 200 µl Portionen abgefüllt und bei -70°C gelagert.

2.8.8.2 Transformation kompetenter Zellen

Die bei -70°C gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden jeweils 100 µl Zellen mit 1 µl Vektor-/Plasmid-DNA, bzw. die vollständigen Ligationsansätze miteinander gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein 1,5 minütiger Hitzeschock bei 37 - 42°C, gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Die Zellen wurden schließlich mit 500 µl 2YT-Medium versetzt und für 1-

2 h bei 37°C inkubiert, um ihnen Zeit zu geben, ihre Resistenzgene zu exprimieren. Anschließend wurden 50 - 200 µl der Kultur auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Platten ausplattiert. Waren die verwendeten Vektoren für eine Blau-Weiss-Selektion geeignet, so enthielten die Platten zusätzlich 0,008 % X-Gal (in Dimethylformamid) und 2,8 % IPTG.

2.8.8.3 Identifizierung gewünschter Klone

Gewünschte Klone wurden letztlich über DNA-Minipräparationen der Plasmid-DNA aus den entsprechenden Klonen (dazu wurden die Zellen über Nacht in 5 ml LB-Flüssigmedium vermehrt) und anschließende geeignete Kontrollverdaue identifiziert. Die Wahrscheinlichkeit nur richtige Klone zu identifizieren, lässt sich durch Einsatz geeigneter Antibiotika und (wo dies möglich ist) durch Blau-Weiss-Selektion erhöhen. Letzteres Verfahren ist bei Vektoren möglich, deren Polyklonierungsstelle in das α -Fragment des *lacZ*-Gens aus *E. coli* (*lacZ'*-Gen) eingebettet ist (z.B. pK18*mobsacB*). In diesem Fall durchbricht das Einsetzen eines Inserts in die Polyklonierungsstelle das Leseraster des *lacZ*-Gens und verhindert so, dass eine funktionelle Kopie des Gens abgelesen wird. Dadurch verliert die Zelle die Fähigkeit X-Gal, ein Substratanalogon der Lactose zu spalten. Als Folge davon wird kein Indigo freigesetzt und die Zellen bleiben weiss. Voraussetzung für das Gelingen dieser Selektion ist natürlich, dass der zur Klonierung verwendete *E. coli*-Stamm über ein *lacZ*-Gen verfügt, dem das α -Fragment fehlt.

2.8.8.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden kommerziell durch die Firma Sequiserve (Vaterstätten) durchgeführt.

2.8.9 Konjugation

Plasmide wurden in *Allochromatium vinosum* über Konjugation (Pattaragulwanit & Dahl 1995) eingebracht. Dazu wurde das Plasmid zuerst in den zur Konjugation befähigten *E. coli*-Stamm S17.1 transformiert. Etwa 1 ml einer Kultur von *A. vinosum*, die sich bereits in der stationären Phase befand, wurde 5 Minuten lang bei 10.000 rpm abzentrifugiert und 2 mal in 0,5 ml RCV-Medium gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde schließlich in 0,5 ml RCV-Medium resuspendiert. Parallel dazu wurde am Vortag ausplattierter und über Nacht bei 37°C gewachsener *E. coli* S17.1, der das Plasmid enthielt, in 3 ml RCV-Medium resuspendiert bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Beide Suspensionen wurden schließlich im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet im Rücklauf

resuspendiert. Die so erhaltene Mischung wurde schließlich auf sterilen Nitrat-Cellulose-Filtern verteilt und auf eine RCV-Agarplatte aufgelegt. Die Platten wurden dann für zwei Tage anaerob bei 30°C im Licht bebrütet.

Nach Ablauf der zwei Tage wurden die Filter zusammen mit 1 ml RCV-Medium in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt und die Bakterien in das Medium gespült. Die Suspension wurde schließlich auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten RCV-Phytigel-Platten ausplattiert.

2.8.10 DNA-DNA-Hybridisierung

Zur Überprüfung des Genotyps von erzeugten Mutanten wurde die Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzt (Southern 1975, 1979). Dabei wird die DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran übertragen und immobilisiert. Mittels einer markierten DNA-Sonde können dann die bei Deletionen zu erwartenden Größenänderungen von Restriktionsfragmenten nachgewiesen werden.

2.8.10.1 Southern Transfer

Materialien:

<u>20*SSC:</u>	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7,0
<u>Depurinierungslsg.:</u>	0,2 N HCl
<u>Denaturierungslsg.:</u>	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
<u>Neutralisierungslsg.:</u>	3 M NaCl + 0,5 M Tris/Hcl, pH7,4

Restringierte, elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mittels eines neutralen Kapillarblots von dem Gel auf eine Nylon-Membran (Sartalon, Sartorius) übertragen. Dazu wurde das Gel zuerst 15 Minuten depuriniert, um die DNA in kleinere Stücke zu zerbrechen, die sich besser kovalent mit der Membran verknüpfen lassen, dann - nach mehrmaligem Waschen mit A. dest. (Reinstwasser) - zweimal für jeweils 15 Minuten denaturiert und schließlich vor dem eigentlichen Blot für 10 Minuten neutralisiert.

Der Kapillarblot erfolgte ü.N.. Das Gel wurde dazu auf eine Lage Whatman-3-MM-Papier gelegt, dessen Enden in eine Wanne mit 20*SSC tauchten. Auf das Gel kam die zuvor in Wasser und dann in 20*SSC getränkte (5 - 10 Minuten) Nylon-Membran, gefolgt von 6 Lagen Whatman-3-MM-Papier. Zuerst lag ein Stapel saugfähiges Filterpapier, sowie Gewichte zur Beschwerung. Die beschriebene Anordnung erlaubt es, das 20*SSC durch das Gel und die Membran durch Kapillarkräfte hindurchzusaugen, wobei die DNA aus dem Gel mitgerissen und auf der Membran abgelagert wird.

Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran auf Whatman-3-MM-Papier und durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200 mJ) in einem Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla) mit der Membran kreuzvernetzt. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung eingesetzt.

2.8.10.2 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Materialien:

<u>Puffer 1:</u>	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5
<u>Vorhybridisierungslösung:</u>	20 % Puffer 1, 25 % 20* SSC, 0,1 % Lauroysarcosin 10 % SDS, 2 % Blocking-Reagenz
<u>Hybridisierungslösung:</u>	
<u>2*SSC, 0,1 % SDS:</u>	10 % 20*SSC, 0,1 % SDS
<u>0,1* SSC, 0,1 % SDS:</u>	0,5 % 20*SSC, 0,1 % SDS

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und für 3 - 4 h in einem MWG Biotech- (Ebersberg) oder einem Biometra- (Göttingen) Hybridisierungssofen bei 60 - 68°C mit 20 ml Vorhybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde vor Gebrauch zur Auftrennung der DNA-Stränge der Sonde 10 min (bei erstmaligem Gebrauch 20 min) gekocht. Die Haupthybridisierung erfolgte für 12 - 18 h ebenfalls bei 60 - 68°C. Nach Gebrauch wurde die DNA-Sonde in einem sterilen Gefäß bei -20°C gelagert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT in 2*SSC, 0,1 % SDS und zweimal für 15 min bei der Hybridisierungstemperatur in vorgewärmtem 0,1*SSC, 0,1 % SDS gewaschen.

2.8.10.3 Chemilumineszenzdetektion

Waschpuffer (0,3 % Tween 20 in Puffer 1)	150 ml
Puffer 2 (1% Blockingreagenz in Puffer 1)	65 ml
Puffer 3 (0,1 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; pH 9,5)	30 ml

Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran zunächst 5 Minuten mit Waschpuffer und dann 30 Minuten mit Puffer 2 behandelt. Dann folgte eine 30minütige Inkubation mit 1:7500 in Puffer 2 verdünntem Anti-Dig-AP-Antikörperkonjugat, das als Antikörper spezifisch an die mit Digoxigenen markierten dUTP-Reste der Sonde bindet und gleichzeitig kovalent mit einer alkalischen Phosphatase verknüpft ist. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran 2 x 15 Minuten mit Waschpuffer behandelt und dann 5 Minuten mit

Puffer 2 äquilibriert. Abschließend erfolgte eine 20minütige Inkubation mit 25 μM CSPD oder CDPstar in Puffer 3. Wenn CDPstar verwendet wurde enthielt der Puffer 3 kein MgCl_2 . Die Membran wurde schließlich in Haushaltsfolie eingeschweißt. Der Röntgenfilm wurde entweder direkt (CDPstar) oder nach einer 2stündigen Inkubation bei 37°C (CSPD) aufgelegt und je nach Bedarf nach 45 Minuten bis 24 h nach Angaben des Herstellers entwickelt.

2.9 Bioinformatische Methoden

2.9.1 Erstellen von Alignments

Die einfachste Art von Alignments sind sogenannte DOT-BLOTS. Dabei werden zwei Proteinsequenzen, die miteinander verglichen werden sollen, auf die X- und die Y-Achse eines Diagramms geschrieben. Dann werden übereinstimmende Aminosäuren mit einem Punkt in dem Diagramm gekennzeichnet. Vergleicht man auf diese Weise identische Polypeptide, so entsteht eine Diagonale. Sind die Polypeptide nur in Teilbereichen identisch, so entstehen lediglich kurze Linien, die sich nicht über das ganze Diagramm hinziehen. Völlig verschiedene Polypeptide führen lediglich zu einzelnen Zufallstreffern, die als Hintergrundrauschen in dem Diagramm erscheinen. Ein so durchgeführter Dot-Blot ist allerdings in zweierlei Hinsicht problematisch:

1. Nicht nur identische Aminosäuren sind für den Vergleich zweier Aminosäuren wichtig. Manchmal kommt es nur darauf an, ob an einer bestimmten Position beispielsweise eine hydrophobe Aminosäure liegt.
2. Das Hintergrundrauschen der Zufallstreffer kann dazu führen, dass der Dot Blot sehr unübersichtlich wird.

Dem ersten Problem kann durch Substitutionsmatrizen abgeholfen werden. Die einfachste Form einer Substitutionsmatrix ist die oben erwähnte Identitätsmatrix. Die für das Alignment von Sequenzen wichtigsten Substitutionsmatrizen, die auch einander ähnliche Aminosäuren mit einbeziehen, sind die Matrizen der PAM- (Dayhoff et al. 1978) und der BLOSUM-Reihe (Henikoff und Henikoff 1992). PAM steht für „percent accepted mutation“ und BLOSUM für „block substitution matrix“. Beide Matrizen wurden empirisch ermittelt, d.h. ihnen liegen Alignments aus einander ähnlichen Aminosäuresequenzen zugrunde, an denen ausgezählt wurde, wie häufig eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht wird.

Die Wahl der jeweiligen PAM- oder BLOSUM-Matrix richtet sich nach dem Verwandtschaftsgrad der Proteine, die untersucht werden sollen. Eine PAM40-Matrix geht z.B. von 40 Aminosäureaustauschen pro 100 Aminosäuren aus, eine PAM70-Matrix von entsprechend mehr. Je enger zwei Proteine miteinander verwandt sind, desto niedriger sollte also die Nummer der verwendeten PAM-Matrix sein. Bei der BLOSUM-Reihe ist es genau umgekehrt, dort gibt der Zahlwert die Prozent an Identität zwischen den Sequenzen an. Bei unbekanntem Proteinen werden üblicherweise die PAM250- oder die BLOSUM62-Matrix

verwendet. Der Wert 250 bei der PAM250-Matrix kommt durch Mehrfachmutationen zustande (Hansen 2004). Bei den in dieser Arbeit gezeigten Alignments wurde die BLOSUM-Reihe verwendet.

2.9.1.1 Paarweise Alignments

Paarweise Alignments sind die Grundlage für multiple Alignments von mehr als zwei Sequenzen. Sie können zwischen zwei Protein- oder Nukleinsäuresequenzen als globales oder als lokales Alignment erstellt werden. Bei einem globalen Alignment wird versucht, die Proteine/Nukleinsäuren ihrer ganzen Länge nach miteinander zu vergleichen. Lokale Alignments hingegen suchen nur nach bestimmten konservierten und damit besonders gut in Übereinstimmung zu bringenden Sequenzabschnitten.

Für globale Alignments wurde meist der Algorithmus von Needleman und Wunsch (1970) verwendet. Ausgangspunkt dieser Methode ist ein Dot Blot wie oben beschrieben. Je nach verwendeter Substitutionsmatrix erfährt dabei jedes Feld des Dot Blots eine Bewertung mit einer bestimmten Punktzahl. Der Needleman-Wunsch-Algorithmus versucht nun denjenigen Weg durch die Matrix zu finden, der die höchste Punktzahl besitzt. Ein Rückwärtsgehen in der Matrix ist nicht erlaubt. Abweichungen von der Diagonalen in horizontaler Richtung führen zu Lücken im Alignment (gaps), die mit Strafpunkten belegt werden. Dabei werden meist höhere Strafpunktzahlen für das Eröffnen („gap open penalty“), als für das Fortführen einer Lücke („gap extension penalty“) zugeteilt.

Für lokale Alignments wurde der Algorithmus von Smith und Waterman (1981a; 1981b) verwendet. Auch der Smith-Waterman-Algorithmus geht von einem Dot Blot aus, allerdings werden hier nur kurze Bereiche mit einer möglichst hohen Gesamtpunktzahl betrachtet. Das Einfügen von Gaps ist nicht erlaubt, denn dadurch würde die Gesamtpunktzahl wieder absinken.

2.9.1.2 Multiple Alignments

Multiple Alignments gehen in der Regel von paarweisen Alignments aus. Auch hier muß wieder zwischen lokalen und globalen multiplen Alignments (s.o.) unterschieden werden. Für lokale multiple Alignments wurde das Programm Block Maker verwendet, das als Online-Tool zur Verfügung steht. Der Erstellung globaler multipler Alignments dienen vor allem ClustalX (Thompson et al. 1997) als Offline Tool, sowie ClustalW (Thompson et al. 1994) und DCA als Online Tools. Die Programme ClustalX und ClustalW arbeiten beide nach dem gleichen Prinzip, das Programm DCA arbeitet allerdings mit einem anderen Algorithmus.

Dieses Programm wurde deshalb eingesetzt, um die Ergebnisse der anderen Programme zu überprüfen und abzusichern. Im folgenden sollen die zugrundeliegenden Algorithmen kurz erläutert werden:

2.9.1.2.1 ClustalW

(Thompson et al. 1994)

Ein multiples Alignment setzt voraus, dass die Distanzen zwischen den einzelnen Protein-/Nukleotidsequenzen bekannt sind. Zur Berechnung dieser Distanzen gibt es zwei Wege „slow“ und „fast“. Da die Verwendung des „fast“-Algorithmus meist nur einen unbedeutenden Zeitgewinn im Vergleich zum „slow“-Algorithmus bringt, wurde ausschließlich mit letzterem gearbeitet. Bei diesem Algorithmus wird zuerst mit jedem möglichen Proteinpaar ein paarweises Alignment nach Needleman und Wunsch (1970) errechnet. Daraus ergibt sich eine Distanzmatrix für alle Proteine. Diese Distanzmatrix dient dazu einen Neighbor-Joining-Baum (NJ) zu errechnen (Saitou und Nei, 1987). Die Neighbor-Joining-Methode beginnt mit einer Sterntopologie. Dazu werden alle Sequenzen zunächst (symbolisch) auf der Oberfläche eines Kreises angeordnet. Dann wird ein innerer Knoten zwischen zwei Sequenzen eingefügt und die Distanz des Knotens zu den übrigen Sequenzen neu berechnet. Ziel ist es dabei, die Gesamtdistanz des Baumes möglichst gering zu halten. Dieses Verfahren wird solange fortgeführt, bis ein vollständiger ungewurzelter NJ-Baum mit allen Sequenzen entstanden ist.

Der NJ-Baum wird nun benutzt um ein sogenanntes „progressives multiples Alignment“ zu erstellen. Ausgangspunkt ist ein paarweises Alignment der am engsten miteinander verwandten Sequenzen. Dann werden, ausgehend von den Distanzwerten der Knoten untereinander und zu den Sequenzen, diese Alignments miteinander und mit (mangels ausreichend nahe verwandter Partnersequenz) noch isolierten Sequenzen verknüpft.

Ein Vorteil von ClustalW und ClustalX gegenüber dem älteren progressiven Alignment nach Feng und Doolittle (1987) besteht darin, dass nicht alle Sequenzen beim multiplen Alignment gleich behandelt werden, sondern sich die Strafpunkte für die Eröffnung oder Fortführung einer Lücke, bzw. die verwendete Substitutionsmatrix bei den paarweisen Alignments nach der Verwandtschaft und der Länge der Sequenzen richten (Thompson et al. 1994, Thompson et al. 1997).

Für online erstellte Alignments wurde in der Regel ClustalW verwendet. Für offline durchgeführte Alignments kam hingegen meist die weiterentwickelte Variante ClustalX zum

Einsatz, da ClustalW offline betrieben nur im MS-Dos-Modus läuft. Außerdem bot ClustalX die Möglichkeit, Nexus- (PAUP*) oder Interleaved-Dateien (Phylip) zu erstellen.

2.9.1.2.2 DCA

Das Programm DCA erstellt anders als ClustalW kein progressives, sondern ein simultanes multiples Alignment. Zugrunde liegt der Divide-and-Conquer-Algorithmus (Stoye 1998: Namensgebung frei nach „divide et impera“). Kurz gesagt, versucht dieser Algorithmus das beste Alignment zu finden, indem er den Weg mit höchster Gesamtpunktzahl in einer n-dimensionalen Matrix (analog zu der 2-dimensionalen Matrix beim paarweisen Alignment) sucht. Dies ist normalerweise sehr zeitaufwendig, wird aber dadurch erleichtert, dass das Programm die Sequenzen vor dem Alignment in kurze Abschnitte zerlegt, die sich dann leichter bearbeiten lassen (Hansen 2004).

2.9.2 Datenbanken

Sequenzen von Proteinen und Nukleinsäuren werden in (primären) Datenbanken der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Erste Adresse sind hier vor allem drei Datenbanken, die alle 24 Stunden gegeneinander abgeglichen werden, so dass immer nur eine dieser Datenbanken durchsucht werden muß (Hansen 2004). Es bestehen allerdings Unterschiede in der Darstellung der Suchergebnisse und in den zur Verfügung gestellten Suchalgorithmen. Es kann daher durchaus lohnend sein, alle drei Datenbanken zu verwenden.

Die Datenbanken werden zur Verfügung gestellt vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) in den USA (Benson et al. 2004), vom EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute) in Europa (Baker et al. 2000) und von der DDBJ (DNA Databank of Japan) mit Sitz in Japan (Tateno et al. 2000).

2.9.2.1 *Durchsuchen der Datenbanken*

Zum Durchsuchen der Datenbanken stehen im Prinzip zwei Wege zur Verfügung: Bei dem Suchalgorithmus SSEARCH wird die eingegebene Suchsequenz mit allen in der Datenbank vorhandenen Sequenzen unter Verwendung des Smith-Waterman Algorithmus (s.o.) verglichen. Diese Form der Suche ist zwar sehr gründlich, aber auch sehr langwierig. Daher wurden schnellere, auf das rasche Auffinden von Sequenzen ausgelegte, (sogenannte heuristische [von griechisch εὑρίσκειν: „finden“]) Suchalgorithmen entwickelt. Die bekanntesten dieser Suchalgorithmen sind FASTA und BLAST. Da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich mit BLAST gearbeitet wurde, soll hier nur dieser Algorithmus kurz erklärt werden:

BLAST (Altschul et al. 1990) durchsucht die Datenbanken mit Hilfe der sogenannten „Two-Hit“-Methode (Hansen 2004). Dazu zerlegt es die eingegebene Suchsequenz zuerst einmal in einzelne Teilabschnitte, sogenannte „Wörter“ der Länge w . Für Proteine ist die Grundeinstellung $w = 3$, für Nukleinsäuren $w = 11$. Die Wortlänge kann bei Bedarf verstellt werden. Mit diesen „Wörtern“ durchsucht BLAST nun die Datenbank nach Treffern (Hits). Finden sich in einer Sequenz der Datenbank mindestens zwei Treffer, so erstellt BLAST ein lokales Alignment (s. 2.9.1).

Jedes Alignment wird von BLAST einer Bewertung (Scoring) unterzogen. Aus dem sogenannten „Bit Score“ ergibt sich nach folgender Formel der Erwartungswert E :

$$E = m*n*2^{-S}$$

Dabei ist m die Länge der Suchsequenz, n die Summe der Längen der Vergleichssequenzen und S der Bit Score. Umso niedriger der Erwartungswert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Treffer signifikant, also nicht durch Zufall zustande gekommen ist. Dementsprechend listet BLAST die gefundenen Treffer auch nach der Reihenfolge ihrer aufsteigenden E -Werte auf.

2.9.2.2 *BLAST-Varianten*

Der BLAST-Algorithmus wird in verschiedenen Abarten angeboten. Diejenigen Varianten, die für diese Arbeit wichtig waren, sollen hier kurz erläutert werden:

Üblicherweise werden von BLAST wie oben beschrieben mit Proteinsequenzen Proteindatenbanken und mit DNA-Sequenzen DNA-Datenbanken durchsucht, es gibt aber auch die Möglichkeit mit Proteinsequenzen DNA-Datenbanken (TBLASTN), bzw. mit DNA-Sequenzen Protein-Datenbanken (BLASTX) zu durchsuchen. Dies ist z.B. sinnvoll, um auf Nukleinsäuresequenzen codierte, aber aufgrund von Leserasterverschiebungen nicht annotierte Gene zu finden. Bei diesen Programmen übersetzt BLAST die DNA-Sequenzen in allen Leserahmen.

Das Programm PSI-BLAST (Altschul et al. 1997; Altschul und Koonin 1998) führt zu einer quantitativen Überbewertung hoch konservierter Positionen. Um dies zu erreichen, wird zunächst eine normale BLAST-Suche durchgeführt. Dann wird aus allen Treffern eine sogenannte „Positionsspezifische Substitutionsmatrix“ (PSSM) errechnet, die dann die bisherige Substitutionsmatrix (üblicherweise BLOSUM62) ersetzt. Mit dieser PSSM werden dann weitere Suchzyklen durchgeführt.

Das Programm PHI-BLAST (Zhang et al. 1998) führt im Gegensatz dazu zu einer qualitativen Überbewertung eines zusätzlich zu der Suchsequenz eingegebenen Sequenzmotivs (Hansen 2004).

2.9.2.3 Aufbereitung gefundener Sequenzen

Die BLAST-Suchen gefundene Sequenzen wurden im FASTA-Format abgespeichert. Das erfolgte entweder in MSWord oder mittels des Alignment Editors „Bioedit“ (Hall 1999).

2.9.3 Erstellen phylogenetischer Bäume

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten phylogenetische Bäume zu erstellen. Reine (phänetische) Distanzverfahren, wie das oben bereits erwähnte Neighbor-Joining-Verfahren und das UPGMA-Verfahren (UPGMA steht für „unweighted pair group method using arithmetic average“) stehen dabei neben kladistischen Verfahren, denen Annahmen zum Ablauf von Evolutionsprozessen zugrunde liegen. Da das Neighbor-Joining-Verfahren bereits im Rahmen des Kapitels über multiple Alignments erläutert wurde, sollen hier nur zwei kladistische Verfahren (Maximum Parsimony und Maximum Likelihood) kurz dargestellt werden. Das UPGMA-Verfahren findet meist nur noch bei der Analyse von Populationen Verwendung und gilt ansonsten als überholt, vor allem, weil es voraussetzt, dass die Evolution in allen Ästen des Baumes mit gleicher Geschwindigkeit abläuft (Hansen 2004).

2.9.3.1 Maximum Parsimony (MP)

Das MP-Verfahren (Eck und Dayhoff, 1966; Fitch, 1977) geht von der Annahme aus, dass das Parsimonitätsprinzip („Sparsamkeitsprinzip“) gilt. Kurz gesagt heißt das: Derjenige Baum, zu dessen Erklärung die wenigsten Mutationen angenommen werden müssen ist auch der wahrscheinlichste.

Zu Beginn einer Parsimony-Analyse werden die einzelnen Positionen des Alignments in beständige und variable Positionen unterteilt. Bei den variablen Positionen wird dann weiter zwischen informativen und nicht informativen Positionen unterschieden. Als informativ gelten nur solche Positionen, bei denen ein Austausch zu einem neuen Baum führen würde (Hansen 2004).

MP-Bäume wurden mit den Programmen PAUP* und Phylip (hauptsächlich PAUP*) erstellt. Generell muß unterschieden werden zwischen dem Kriterium, dass der Suche nach einem Baum zugrunde liegt (hier: größtmögliche Sparsamkeit) und dem Algorithmus, der dazu dient, den oder die Bäume zu finden, die dieses Kriterium erfüllen. PAUP bietet hier mehrere Möglichkeiten an. Ist die Zahl der Taxa klein (maximal 12), so besteht die Möglichkeit alle

theoretisch denkbaren Bäume zu erzeugen und auf ihre jeweilige Gesamtlänge hin zu überprüfen. Die Zahl der möglichen ungewurzelten Bäume beträgt bei n Taxa:

$$N(n) = (2n-5)!/[2^{n-3}(n-3)!]; (n \geq 3)$$

Damit ergeben sich bei 12 Taxa bereits 654.729.075 verschiedene mögliche Bäume. Deshalb wurden, um auch größere Datensätze in angemessener Zeit bewältigen zu können, andere Algorithmen entwickelt, die nicht mehr jeden Baum einzeln betrachten.

Bei Datensätzen, die bis zu 20 Taxa enthalten, kann ein Verfahren angewendet werden, das als „Branch-and-Bound“ bezeichnet wird. Bei diesem Verfahren wird zunächst ein zufälliger Baum erzeugt und dessen Länge bestimmt. Da insgesamt nach dem sparsamsten Baum gesucht werden soll, kann dieser Baum auf keinen Fall länger sein, als der zufällige Baum. Der „Branch-and-Bound“-Algorithmus probiert nun aus, ob sich durch kleine Änderungen an der Verzweigung ein noch kürzerer Baum finden lässt (Kierstein 2001).

Für noch größere Datensätze bietet PAUP* drei Suchalgorithmen an, die als „Heuristische Suche“, „Puzzle“ und „Star Decomposition“ bezeichnet werden. Bei diesen Suchalgorithmen gibt es, anders als bei den oben genannten Verfahren, keine Garantie dafür, dass der kürzeste Baum auch tatsächlich gefunden wird (Kierstein 2001). Das Risiko nicht den kürzesten Baum zu finden, lässt sich aber zumindest teilweise durch häufiges Wiederholen der Suche minimieren. In der Arbeit gezeigte Bäume wurden über den „Branch and Bound“-Algorithmus oder über eine „Heuristische Suche“ gefunden.

Die „Heuristische Suche“ lässt sich in zwei Schritte unterteilen: Im ersten Schritt werden einem Ausgangsbaum, der aus drei Taxa besteht, weitere Taxa hinzugefügt. Da bei einem solchen Vorgehen ein großes Risiko besteht, dass der entgültige Baum durch Zufallsaspekte mitbestimmt ist (etwa durch die Reihenfolge der Taxa), wird in einem zweiten Schritt versucht den fertigen Baum durch ein Umlagern seiner Äste („branch swapping“) zu verbessern (Kierstein 2001). Dazu bietet PAUP* mehrere Algorithmen an (TBR, SPR und NNI). Verwendet wurde in dieser Arbeit der TBR-Algorithmus.

2.9.3.1.1 Homoplasie-Indices

Sind in einem Alignment zwei oder mehrere Positionen zwischen zwei Sequenzen identisch, so gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten dies zu erklären: Die Identität kann auf einer Homologie beruhen, also von einer gemeinsamen Vorläufersequenz herleitbar sein. Alternativ kann die Identität aber auch durch Analogie oder Parallelismus zustande gekommen sein. In letzterem Fall spricht man auch von Homoplasien. Sequenzdatensätze, die viele Homoplasien aufweisen, bereiten dem Maximum-Parsimony-Verfahren im allgemeinen Schwierigkeiten, da sie zu Mehrdeutigkeiten führen können. Es lässt sich schließlich nicht so ohne weiteres sagen, welche identischen Positionen auf Homologie und welche auf Homoplasie beruhen. Um das Ausmaß von Homoplasien, die bei einem gegebenen MP-Baum angenommen werden müssen und damit auch die Verlässlichkeit des Baumes einschätzen zu können, werden häufig Homoplasie-Indices angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Indices angegeben, der Konsistenz-Index (CI) und der Retentions-Index (RI). Der Konsistenz-Index (Kluge und Farris 1969) berechnet sich nach der Formel:

$$CI = M/S$$

Dabei ist M gleich der minimalen Anzahl der Substitutionen in allen möglichen Bäumen und S gleich der beobachteten Anzahl von Substitutionen in dem erhaltenen Baum. Falls es keine Homoplasien bei einem Baum gibt, so nimmt CI den Wert 1 an.

Um zu vermeiden, dass Autapomorphien durch den Konsistenz-Index überbewertet werden, führte Farris 1988 den Retentions-Index ein. Dieser Index berechnet sich nach folgender Formel:

$$RI = (G-S)/(G-M)$$

Dabei sind M und S die gleichen Variablen wie beim Konsistenz-Index und G entspricht der minimalen Anzahl von Substitutionen in allen möglichen Bäumen. Ebenso wie der Konsistenz-Index sollte der Retentions-Index möglichst nahe an den Wert 1 herankommen (Storch et al. 2001).

2.9.3.2 *Maximum Likelihood (ML)*

Mit der ML-Methode wurde in dieser Arbeit nur ergänzend gearbeitet. Das Programm PAUP* bietet lediglich die Möglichkeit ML-Bäume mit Nukleotidsequenzen zu erstellen. ML-Bäume wurden daher entweder auf der Ebene von Nukleotidsequenzen oder – auf Proteinebene - mit Hilfe des Programms ProML (Adachi und Hasegawa 1992), das als Zusatzanwendung im Programm Bioedit (Hall 1999) enthalten, aber auch online verfügbar ist, erstellt.

ML-Methoden machen zusätzliche Annahmen zur Evolution, z.B. gehen sie von verschiedenen Astlängen bei Bäumen oder von bestimmten Übergangswahrscheinlichkeiten bei Nukleotidsubstitutionen aus. Anders als reine Distanzmethoden, bei denen z.B. solche Substitutionswahrscheinlichkeiten auch mit in die Berechnung der Distanzwerte eingehen können, wird bei ML nicht nur die reine Distanz zwischen den Sequenzen betrachtet, sondern es fließt (wie bei der Parsimony-Methode) auch die Position der einzelnen Nukleotide/Aminosäuren mit in die Berechnung ein (Kierstein 2001).

Es gibt verschiedene gängige Substitutionsmodelle, die der Maximum Likelihood Methode zugrunde gelegt werden. Auf DNA-Ebene sind dies z.B. das Jukes-Cantor-Modell, das Kimura-2-Parameter-Modell, das F81-Modell oder das HKY85-Modell. Das einfachste Modell ist das Jukes-Cantor-Modell (Jukes und Cantor 1969). Es geht davon aus, dass die Substitutionsrate zwischen allen Nukleotiden gleich ist. Das Kimura-2-Parameter-Modell (Kimura 1980) gewichtet bereits Transitionen und Transversionen verschieden. Das HKY85-Modell (Hasegawa 1985) schließlich bezieht zusätzlich mit in die Betrachtung ein, dass die Substitutionsrate der einzelnen Nukleotide abhängig ist von ihrer jeweiligen Häufigkeit. Die Grundeinstellung des PAUP*-Programmes ist das HKY85-Modell. Mit diesem Modell wurde auch meistens gearbeitet, wenn DNA-Sequenzen untersucht wurden.

Auch für ML-Bäume mit Aminosäuresequenzen gibt es Substitutionsmodelle. Verwendet wird hier, neben den oben bereits erwähnten Matrizen PAM und BLOSUM, vor allem die Jones-Taylor-Thornton- (JTT-) Matrix (Jones et al. 1992), die auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam.

Der Likelihood-Wert, mit dem die ML-Bäume beschrieben werden, ist die „Wahrscheinlichkeit“ des Datensatzes (sic!) unter der Bedingung, dass ein bestimmter Baum und ein bestimmtes Substitutionsmodell vorgegeben sind.

2.9.3.3 Bootstrapping

Das Bootstrapping–Verfahren dient dazu erhaltene Bäume statistisch abzusichern (Felsenstein 1985). Dazu werden neue Datensätze erzeugt, indem einzelne Nukleotid-/Aminosäurepositionen mehrfach, andere hingegen gar nicht berücksichtigt werden. Anschließend wird mit dem neuen Datensatz wieder ein phylogenetischer Baum erzeugt. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt (in dieser Arbeit 10.000mal). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von „Pseudoreplikationen“, denn im Gegensatz zu echten Wiederholungen einer Messung (die nicht durchführbar sind, weil sich die Evolution nicht wiederholen lässt), wird hier quasi eine virtuelle Wiederholung durchgeführt.

Aus allen phylogenetischen Bäumen, die sich bei jeder Pseudoreplikation ergeben haben, kann schließlich ein Konsensus-Baum („50 % majority rule consensus tree“) errechnet werden. Der Prozentsatz, mit dem eine bestimmte Verzweigung des Konsensus-Baumes in allen zugrundeliegenden Bäumen auftritt, ist der Bootstrap-Wert. Uneinigkeit besteht darüber, wie hoch der Bootstrap-Wert sein muß, damit eine Verzweigung als statistisch gesichert gelten kann. Nach Felsenstein (1985) muß der Bootstrap-Wert mindestens 95 % betragen. Hillis und Bull (1993) halten aber bereits einen Wert von 70 % für ausreichend.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass das *dsr*-Operon von *A. vinosum* auch fünf Gene, *dsrMKJOP*, umfaßt, von denen zwei (*dsrM* und *P*) für mutmaßliche integrale Membranproteine und zwei (*dsrJ* und *O*) für Proteine mit mutmaßlichen Exportsignalen kodieren. Abgesehen von *dsrK* war für keines der Gene erwiesen, ob es exprimiert wird, wo das mögliche Produkt lokalisiert ist und ob weitere Vorhersagen, bezüglich mutmaßlicher Signalpeptide, Cofaktoren etc. korrekt sind. Es war zwar klar, dass das *dsr*-Operon in seiner Gesamtheit essentiell für die Schwefeloxidation in *A. vinosum* ist, Aussagen über die Funktion einzelner *dsr*-Gene waren aber nicht möglich.

3.1 Überexpression der Proteine

Es galt zunächst nachzuweisen, dass die gegen einzelne Dsr-Proteine in Kaninchen erzeugten Antikörper geeignet sind, die jeweiligen Proteine spezifisch nachzuweisen. Dazu wurden Überexpressionen in *Escherichia coli* durchgeführt.

3.1.1 Überexpression von DsrJ

Da aus Sequenzanalysen (Pott-Sperling 2000) bekannt war, dass DsrJ wahrscheinlich drei kovalent gebundene Häm c-Gruppen besitzt, wurde zur Überexpression dieses Proteins ein besonderer *E. coli*-Stamm, HM125 verwendet (Arslan et al. 1998). Dieser Stamm weist zwei Vorzüge auf: Zum einen ist die periplasmatische Protease DegP inaktiviert. Dies ist an sich nichts Ungewöhnliches bei Bakterienstämmen, die der Überexpression von Proteinen dienen, soll doch verhindert werden, dass die frisch gebildeten Proteine gleich wieder abgebaut werden. Die Tatsache, dass bei HM125 eine periplasmatische Protease inaktiviert ist, befähigt diesen Stamm aber in besonderem Maße zur Überexpression periplasmatischer Proteine. Die zweite Besonderheit von HM125 besteht darin, dass der Stamm über das Plasmid pEC86 verfügt. Dieses Plasmid trägt das *ccm*-Operon (c y t c m a t u r a t i o n), also die Gene, die bei *E. coli* für den Einbau von Häm-c-Gruppen in C-Typ-Cytochrome verantwortlich sind. In dem vorliegenden *E. coli*-Stamm werden diese Gene auch unter aeroben Bedingungen exprimiert. Der Stamm HM125 ist daher in besonderem Maße zur Überexpression von Proteinen mit Häm-c-Gruppen befähigt.

Zur Amplifikation des *dsrJ*-Gens aus *A. vinosum*-DSM180-Wildtyp-DNA dienten die Primer DsrJfor1(mS) und DsrJrev3. Über diese Primer wurden in das Amplifikat Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NdeI (DsrJfor1(mS)), bzw. XbaI (DsrJrev3) eingeführt. Der forward-Primer (DsrJfor1(mS)) ist so gewählt, dass das PCR-Produkt das mutmaßliche Signalpeptid

von DsrJ mit einschließt. Die Klonierung erfolgte dann in den Vektor pISC-2(*iciA*), der geeignet ist über seinen Arabinose-Promotor Gene in *E. coli* HM125 zu exprimieren.

Nach Überprüfung der erfolgreichen Klonierung über Sequenzierung und Transformation von *E. coli* HM125, konnten Überexpressionsexperimente durchgeführt werden. Dazu wurden in parallelen Ansätzen Überexpressionen mit Zellen die das Plasmid pISC-2(J) und – als Kontrolle - mit Zellen, die den Ursprungsvektor pISC-2(*iciA*) enthielten, durchgeführt. Die Überexpression erfolgte wie unter 2.4.2.2 beschrieben. Vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen geerntet und entweder direkt auf Polyacrylamidgelen aufgetragen (s. 2.5.4.2) oder mit Ultraschall aufgeschlossen (s. 2.5.1).

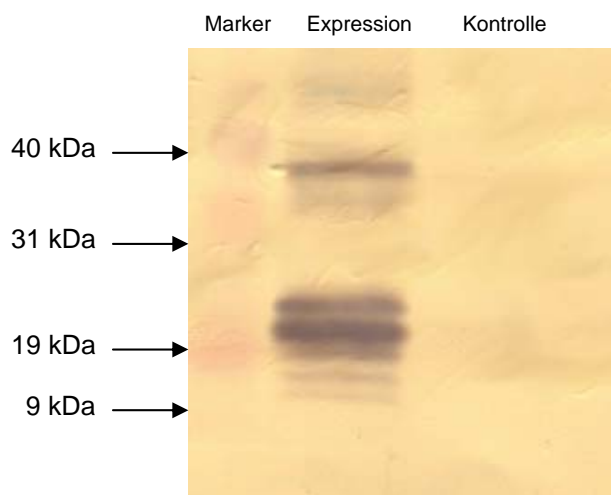


Abb. 3.1: Western Blot zur heterologen Überexpression von *dsrJ* in *E. coli* HM125. Die Proteine wurden auf einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Ganz links ist der Marker aufgetragen. Die mittlere Spur enthält *E. coli* HM125 mit dem Plasmid pISC-2(J). Die rechte Spur enthält *E. coli* HM125 mit dem Vektor pISC-2(*iciA*), der statt des *dsrJ*-Inserts ein anderes Insert (*iciA*) enthält.

In mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbten Gelen war keine prominente Bande des heterolog produzierten DsrJ-Proteins zu sehen. Versuche, die Überexpression unter anaeroben Bedingungen in MS-Medium durchzuführen, brachten keine Verbesserung des Ergebnisses. Im Western Blot trat aber ein klares Signal auf, dass in dem Kontrolllexperiment fehlt (s. Abb. 3.1), es wurde also offensichtlich DsrJ-Protein gebildet und das verwendete Antiserum ist geeignet DsrJ zu detektieren. Auffällig sind die zahlreichen Banden mit denen das Antiserum reagiert. Hauptbande mit Massen von circa 23 und 39 kD sind von mehreren schwächeren Satellitenbanden umgeben. Die meisten Banden liegen deutlich über der für DsrJ erwarteten

Größe (13,6 kDa + eventuell 2,7 kDa für das Signalpeptid). Möglicherweise handelt es sich um Aggregate aus mehreren DsrJ-Proteinen, denn die Größe der Banden entspricht in etwa den für Mono-, Di- und Trimeren zu erwartenden Größen.

3.1.2 Überexpression von DsrM

Zur Erzeugung eines Überexpressionvektors für DsrM wurde das *dsrM*-Gen aus *A. vinosum* DSM 180-Wildtyp-DNA mit den Primern DsrM1f und DsrM1r amplifiziert und in den Vektor pET11a klonieren. Als Überexpressionsstamm wurde diesmal *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Versuche das DsrM-Protein in diesem Stamm überzuexprimieren führten allerdings in keinem Fall zu einer erkennbaren Expression:

Weder eine Veränderung der Überexpressionszeit (2-48 h), noch der Temperatur (30-37°C), noch Kombinationen aus beiden Parametern brachten eine Verbesserung des Ergebnisses. Dabei wurden zwei verschiedene gegen Abschnitte von DsrM gerichtete Antiseren getestet (s. Kapitel 2.1.3). Da Mander et al. (2002) beobachtet hatten, dass das dem DsrM entsprechende Protein des Hme-Komplexes aus *Archaeoglobus fulgidus* (AF501) sich nur dann in Zellextrakten nachweisen ließ, wenn die Probe vor dem Gelauftrag nicht gekocht worden war, wurde auch dies überprüft. Der Versuch verlief allerdings ebenfalls erfolglos.

3.1.3 Überexpression von DsrO

Zur Amplifikation des *dsrO*-Gens aus *A. vinosum* DSM180 WT-DNA dienten die Primer Ofor und Orev2. Der forward-Primer Ofor war so gewählt, dass die für das mutmaßliche Signalpeptid kodierende Sequenz des *dsrO*-Gens im PCR-Produkt enthalten blieb. Die Klonierung erfolgte in den Vektor pET22b, der es erlaubt Proteine so zu klonieren, dass ein Fusionsprotein entsteht, bei dem an das eigentlich zu exprimierende Protein zusätzlich eine kurze Sequenz aus mehreren Histidinresten (sogenanter His-Tag) angehängt wird. Dieser ermöglicht es das überexprimierte Protein später über eine Nickel-Chelat-Säule affinitätschromatographisch aufzureinigen. Ein solcher His-Tag kann C- oder N-terminal an das Protein angefügt werden. Bei DsrO gab es aufgrund des mutmaßlichen N-terminalen Signalpeptids nur die Möglichkeit den His-Tag C-terminal an das Protein anzuhängen.

Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung des Überexpressionvektors pET22b(O) wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Vektor transformiert. Als Kontrolle diente ein mit pET22b ohne Insert transformierter *E. coli* BL21(DE3)-Stamm. Bei der Überexpression war zwar im Coomassie-gefärbten Gel keine Proteinbande für DsrO zu erkennen, allerdings zeigte der ebenfalls durchgeführte Western Blot, dass durchaus DsrO-Protein gebildet wurde (s.

Abb. 3.2). Somit ist klar, dass auch das gegen DsrO gerichtete Antiserum geeignet ist dieses Protein spezifisch nachzuweisen.

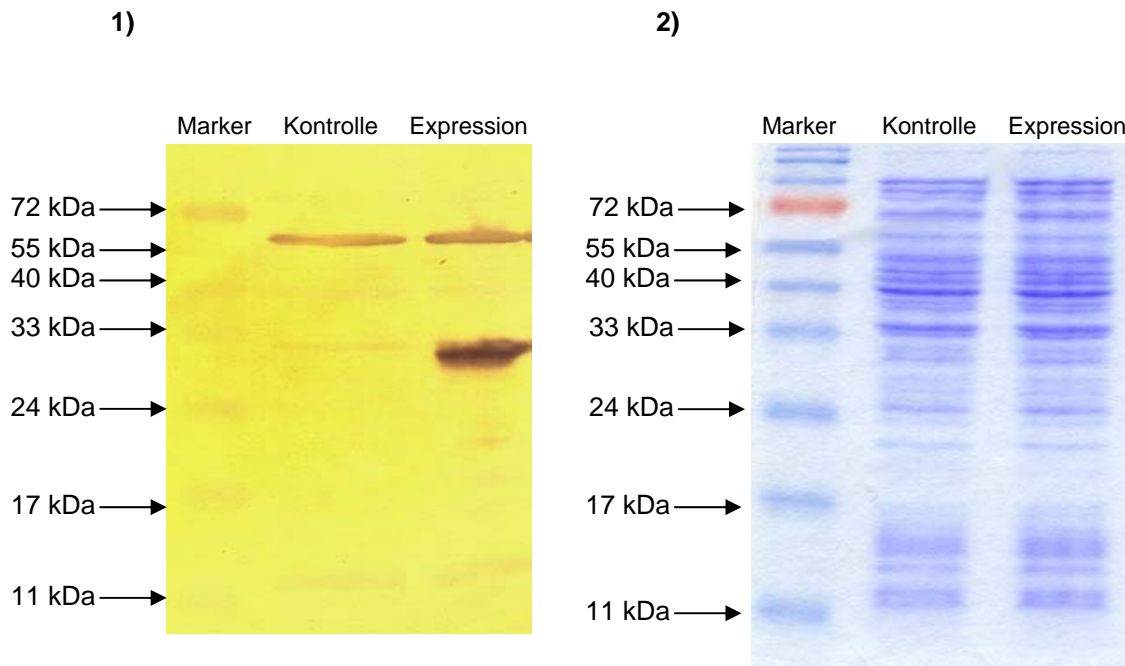


Abb. 3.2: Western Blot (1) und mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbtes Gel (2) des mit His-Tag in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierten DsrO-Proteins. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend einem Western Blot (1) oder einer Färbung mit Coomassie-Brillant Blue (2) unterzogen.

3.1.3.1 Anreicherung des rekombinanten DsrO

Das überexprimierte Protein ist größer, als bei einer korrekten Abspaltung des mutmaßlichen Signalpeptides zu erwarten wäre (circa 30 kDa). Ohne Signalpeptid sollte das rekombinante Protein etwa eine Größe von 25 kDa haben. Das Signalpeptid selber umfasst etwa 4,7 kDa. Da das Protein über einen His-Tag verfügte, wurde eine Anreicherung über eine Ni-Chelat-Säule versucht, um zu überprüfen, ob prozessiertes Protein gebildet wird. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben. Mit den erhaltenen Proben wurde schließlich ein Western Blot durchgeführt (3.4). Wie im Vergleich mit dem mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten Gel (s. Abb. 3.3) zusehen ist, kommt es tatsächlich zu einer Anreicherung des etwa 30 kDa großen, wahrscheinlich unprozessierten DsrO-Proteins. In den Spuren, in denen diese Bande am stärksten ist (150 mM Imidazol und 500 mM (mit Essigsäure gefällt)) ist zusätzlich eine sehr schwache zweite Bande zu sehen, deren Größe (etwa 25 kDa) in etwa dem prozessierten DsrO-Protein entspricht.

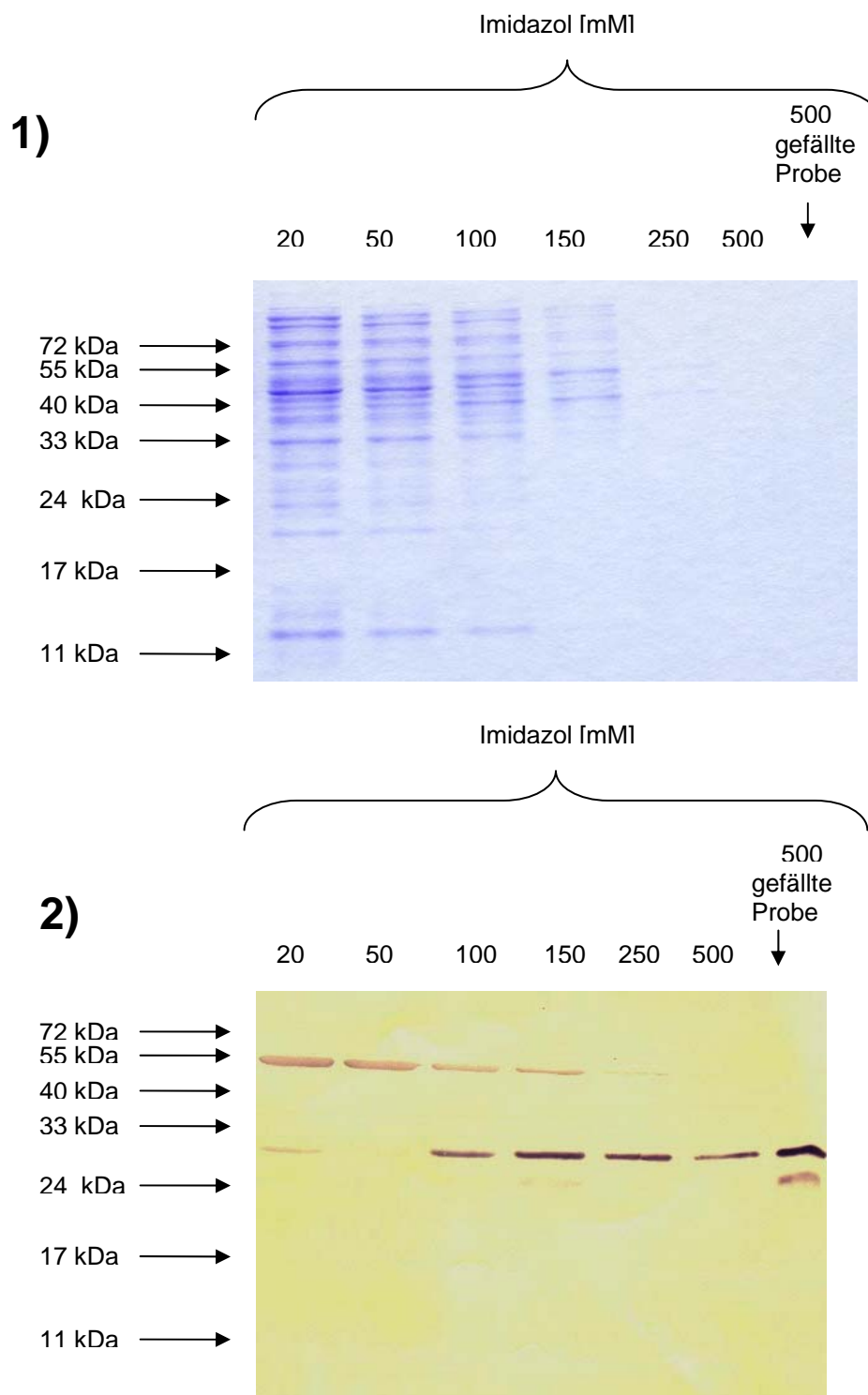


Abb. 3.3: Mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbtes 12,5 %iges Polyacrylamidgel (1) und Western Blot (2) zur Aufreinigung des rekombinanten DsrO Proteins aus *E. coli* BL21(DE3) über eine Nickel-Chelat-Säule. Die Elution erfolgte über einen Stufengradienten mit den über den Spuren angegebenen Imidazolkonzentrationen. Die letzte Spur zeigt wie die vorletzte Spur die Elutionsprobe bei 500 mM Imidazol, die über eine Essigsäurefällung sechsfach konzentriert wurde.

3.2 Die Lokalisation von DsrO

Als bekannt war, dass für DsrO und DsrJ funktionierende Antiseren zur Verfügung standen, wurde versucht die einzelnen Proteine auch in Rohextrakten, der Membranfraktion, sowie der löslichen Fraktion von *Allochrocatium vinosum* mittels Westen Blots nachzuweisen. Lediglich bei DsrO war eine sehr schwache Bande in der Rohextraktfraktion zu sehen, womit die Bildung des Proteins erwiesen ist. Nach einer Auftrennung des Rohextraktes in die Membranfraktion und die lösliche Fraktion wurde ausschließlich in der Membranfraktion ein Signal erhalten (s. Abb. 3.4).



Abb. 3.4: Nachweis der Expression von DsrO in *A. vinosum* (s. Pfeil) und der Lokalisation in der Membranfraktion des Organismus. Es wurden der Rohextrakt, die lösliche Fraktion und die Membranfraktion aufgetragen. Jede Spur enthielt 10 µg Protein.

3.3 Nachweis von DsrJ und DsrO in einer Anreicherungsprobe von DsrK

Um die vorhergesagte Lokalisation weiter zu verifizieren, wurden Western Blot Experimente mit einer Proteinprobe aus einer DsrK-Anreicherungsversuch aus *A. vinosum* (Engels 2001), durchgeführt. Die Probe stammte aus einer solubilisierten Membranfraktion, die über Anionenaustausch- (Q-Sepharose), Hydroxyapatit- und Gelfiltrationschromatographie (Superose 6) auf DsrK hin gereinigt wurde. Der Nachweis von DsrK war seinerzeit über ein Antiserum erfolgt. Über N-terminale Sequenzierungen konnte nachgewiesen werden, dass die Probe außer DsrK auch die Proteine DsrA, DsrB, sowie ein Protein, dass Ähnlichkeiten zu einer Ribulose-Phosphat-3-Epimerase besitzt, enthielt (Engels 2001, Dahl et al. 2005). Mit Antiseren gegen DsrJ und DsrO wurde nun überprüft, ob sich auch diese beiden Proteine in

der DsrK-haltigen Probe befanden. Beide Proteine konnten nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5). DsrM konnte mit entsprechenden Antiseren nicht nachgewiesen werden.

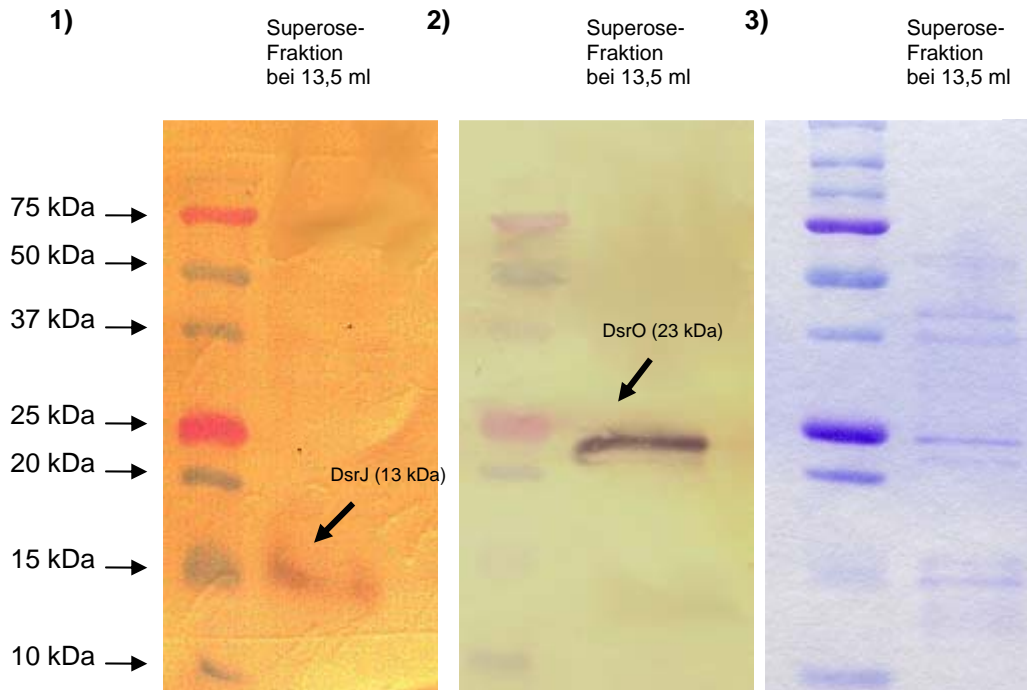


Abb. 3.5: Nachweis von DsrJ und DsrO in auf DsrK hin aufgereinigten Membranproben aus *A. vinosum*. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Gele wurden anschließend einem Western Blot unterzogen (1 und 2) oder mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt (3). Es wurden je 5 µg Protein aufgetragen.

Damit ist gezeigt, dass auch das DsrJ-Protein in *A. vinosum* exprimiert wird und in der Membran von *A. vinosum* zu finden ist. Für DsrO konnte das unter 3.2 erhaltene Ergebnis bestätigt werden. Besser als in Abb. 3.5 ist zudem zu erkennen, dass das DsrO-Protein in *A. vinosum* kleiner als als 25 kDa ist. Das entspricht der errechneten molekularen Masse ohne Signalpeptid (23,86 kDa). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Protein prozessiert ist.

3.4 Deletionsmutanten

Bisher wurden über Interposon-Mutagenese schon zahlreiche Mutanten in den *dsr*-Genen erzeugt (Pott und Dahl 1998, Dahl et al. 2005). Dieses Verfahren hat allerdings den Nachteil, dass polare Effekte auftreten können: Vor allem Gene, die stromabwärts der Interposonkassette liegen, können in ihrer Expression stark eingeschränkt werden, da das verwendete Interposon an seinen Enden Transkriptionsterminatoren besitzt. Beobachtete Phänotypen bei Interposonmutanten lassen sich daher kaum auf den Effekt nur eines einzigen Gens zurückführen.

3.4.1 Erzeugung von *in-frame*-Mutanten in *dsr*-Genen

Um *in-frame*-Mutanten erzeugen zu können, wurden zuerst kurze Abschnitte des *dsr*-Operons erzeugt, die die gewünschte Deletion enthielten. Dies geschah über Gene-SOEing, wie unter 2.8.6 beschrieben. Über die beiden äußeren Primer der GeneSOEing-PCR wurden dabei Restriktionsschnittstellen in das Amplikat eingebaut, die eine Klonierung in einen Vektor erlauben. Als Vektor diente pK18*mobsacB* (Schäfer et al. 1994, s. Abb. 3.6).

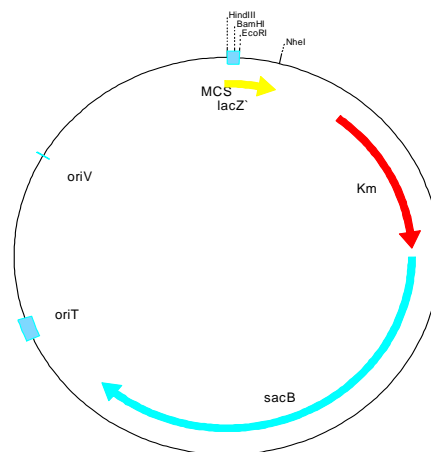


Abb. 3.6: Vektorkarte von pK18*mobsacB*. Das Plasmid besitzt neben seinem Replikationsursprung (*oriV*) und einer Polyklonierungsstelle (MCS) auch noch die Mobilisierungsregion des Plasmids RP4 (*oriT*), ein Kanamycin-Resistenzgen (*Km*), das eine positive Selektion auf den Besitz des Plasmids ermöglicht und ein Laevansaccharasegen (*sacB*), das eine negative Selektion erlaubt.

Dieser Vektor weist eine Reihe von Eigenschaften auf, die ihn für die Erzeugung von Deletionsmutanten in *A. vinosum* besonders geeignet machen:

1. Er enthält die Mobilisierungsregion des Plasmids RP4 (*oriT*) ist also durch Konjugation übertragbar und kann somit leicht von einem Konjugations-kompetenten *E. coli*-Stamm (hier S17.1, s. 2.8.9) aus in *A. vinosum* eingeführt werden.
2. Der Vektor ist nur in Enterobacteriaceen replizierbar. In *A. vinosum* eingeführte DNA-Sequenzen bleiben also nur dann dauerhaft erhalten, wenn sie in das Genom integriert werden.
3. Der Vektor enthält ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin. *A. vinosum* ist resistent gegen Kanamycin (Pattaragulwanit et al. 1995), so dass auf die Integration des Vektors in das Genom hin selektioniert werden kann („single crossover Mutanten“).
4. Der Vektor besitzt ferner das *sacB*-Gen aus dem Vektor pSM20 (Selbitschka et al. 1993), über das auf den Verlust des in das Genom integrierten Vektors hin selektioniert werden kann. Das *sacB*-Gen kodiert für eine Laevansaccharase, die aus Saccharose die Bildung von Fructanen (Laevanen) katalysiert. Dies ist aus bislang unbekannten Gründen für Gram-negative Bakterien letal (Jäger et al. 1992).
5. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) liegt im α -Fragment des lacZ-Gens, der Vektor ist daher für Blau-Weiß-Selektion geeignet (s. 2.8.8.3).

Nach erfolgter Klonierung des gewünschten, die Deletion enthaltenden Abschnitts des *dsr*-Operons, in den Vektor, wurde mit dem erhaltenen Plasmid zunächst der *E. coli*-Stamm S17.1 transformiert. Aus diesem erfolgte dann der Transfer über Konjugation in den Rifampicin-resistenten *A. vinosum*-Stamm Rif50. Durch Selektion über die Antibiotika Rifampicin und Kanamycin auf RCV-Phytigel-Platten wurden dann zum einen der (Rifampicin-sensitive) *E. coli* aus der Kultur eliminiert und zum anderen *A. vinosum*-Stämme angereichert, die das Plasmid über homologe Rekombination in ihr Genom integriert hatten. Die erfolgreiche Integration wurde jeweils über geeignete Kontroll-PCRs überprüft, die als Kolonie-PCRs (s. 2.8.5.2) durchgeführt wurde. Diese Methode erlaubt eine schnellere Kontrolle des Genotyps, da nicht erst aufwendig DNA isoliert werden muß, sondern stattdessen ganze Zellen eingesetzt werden. Durch zehnmütiges Kochen der Zellen vor Beginn der PCR werden diese aufgeschlossen und die in ihnen enthaltene DNA somit als Template zugänglich gemacht.

Anschließend wurden die Kulturen auf Rifampicin-haltige, aber Kanamycin-freie Flüssigkulturen gebracht (RCV-Medium) und zwei- bis dreimal überimpft, um den Bakterien Gelegenheit zu geben, das Plasmid wieder aus ihrem Genom auszuschneiden. Dies geschieht entweder unter Wiederherstellung der Wildtypsituation (Revertanten) oder unter Bildung der

gewünschten Deletionsmutante. In beiden Fällen sollten die Zellen im Stande sein auf Saccharose-haltigem Medium zu wachsen. Sie wurden daher auf RCV-Phytigelplatten, denen 10% Saccharose zugesetzt worden war, ausplattiert. Kolonien, die sich auf den Saccharoseplatten gebildet hatten, wurden zur weiteren Kontrolle sowohl auf Kanamycin- und Rifampicin-haltigen, als auch auf lediglich Rifampicin-haltigen RCV-Phytigelplatten ausplattiert. Wenn die Zellen den Vektor wirklich nicht mehr besitzen, so sollten sie die Fähigkeit auf Kanamycin-haltigem Medium zu wachsen verloren haben. Stämme, auf die dies zutraf, wurden darüber hinaus zunächst mit einer Kolonie-PCR und, wenn diese das gewünschte Ergebnis geliefert hatte, mit einem Southern Blot überprüft.

3.4.1.1 Deletionsvektor für *dsrM*

Die stromaufwärts und stromabwärts von *dsrM* gelegenen Genregionen wurden mit den Primern Msoefor1a und Msoerev1 (stromabwärts), bzw. Msoefor2 und Msoerev2c (stromaufwärts) amplifiziert. Die Lage der inneren Primer wurde so gewählt, dass das *dsrM*-Gen vollständig deletiert werden konnte. Dabei erstanden erwartungsgemäß PCR-Fragmente mit einer Länge von 819 bp (Primer for1a und rev1), bzw. 898 bp (Primer for2 und rev2c). Mit diesen PCR-Produkten und den beiden äußeren Primern (Msoefor1 und Msoerev2) wurde dann eine weitere PCR durchgeführt, die ein Gesamtamplifikat von 1687 bp lieferte.

Da über die beiden äußeren Primer Schnittstellen für das Restriktionsenzym *HindIII* in das PCR-Produkt eingebaut worden waren, konnte dieses jetzt in den vorher ebenfalls verdauten Vektor pK18*mobsacB* kloniert werden. Die Orientierung des Inserts war dabei bedeutungslos. Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft. Das Plasmid erhielt den Namen pK18ΔM.

3.4.1.2 Deletionsvektor für *dsrK*

Für *dsrK* lag zu Beginn der Arbeiten bereits ein fertiges von Sabine Engels (2001) erzeugtes Plasmid vor. In dem Plasmid war das *dsrK*-Gen nicht vollständig deletiert, sondern Anfang und Ende des Gens sind noch erhalten und im selben Leseraster aneinandergesetzt, so dass keine Effekte auf die übrigen *dsr*-Gene zu erwarten sind.

3.4.1.3 Deletionsvektor für *dsrJ*

Amplifikate von den an *dsrJ* stromab- und stromaufwärts angrenzenden DNA-Abschnitten wurden mit den Primern Jsoefor1, Jsoerev1, Jsoefor2 und Jsoerev2 erzeugt. Dabei blieben Teile des *dsrJ*-Gens erhalten, die allerdings *in-frame* aneinandergefügt wurden. Dies ließ sich nicht vermeiden, da andernfalls die Ribosomenbindestelle des nachfolgenden *dsrO*-Gens mit

beseitigt worden wäre. Dadurch wäre der beobachtete Phänotyp der Mutanten nicht mehr allein auf den Verlust des *dsrJ*-Gens zurückführbar gewesen.

Die Amplifikate der ersten beiden PCRs hatten eine Größe von 734 bp und 721 bp. Mit den erhaltenen Amplifikaten der an *dsrJ* angrenzenden Regionen und den beiden äußeren Primern (Jsoefor1 und Jsoerev2) wurde nun die dritte PCR durchgeführt und das dabei erhaltene Produkt in den Vektor pK18*mobsacB* kloniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde wieder über Restriktionsanalyse überprüft. Das Plasmid erhielt den Namen pK18ΔJ.

3.4.1.4 Deletionsvektor für *dsrO*

Zur Amplifikation der stromab und stromaufwärts von *dsrO* gelegenen DNA-Bereiche dienten die Primer Osoefor1a, Osoerev1, Osoefor2 und Osoerev2. Sie lieferten in der ersten und zweiten PCR Fragmente mit einer Länge von 1054 (for1a und rev1) und 1050 bp (for2 und rev2). Das *dsrO*-Gen konnte, anders als bei *dsrJ* (s.o.), vollständig deletiert werden.

Das PCR-Produkt der dritten PCR wurde schließlich wieder über die beiden von den äußeren Primern eingeführten HindIII-Schnittstellen in den Vektor pK18*mobsacB* kloniert. Eine Restriktionsanalyse bestätigte die erfolgreiche Klonierung. Das fertige Plasmid erhielt den Namen pK18ΔO.

3.4.1.5 Deletionsvektor für *dsrP*

Bei *dsrP* wurde in analoger Weise vorgegangen: Mit den Primern Psoefor1 und Psoerev1 wurden die stromabwärts des *dsrP*-Gens gelegenen DNA-Regionen und mit Psoefor2 und Psoerev2 die stromaufwärts gelegenen Bereiche amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte hatten eine Größe von 1319 bp (for1 und rev1) und 1283 bp (for2 und rev2). Ähnlich wie bei *dsrJ* ergab sich bei *dsrP* das Problem, dass die Ribosomenbindestelle des auf *dsrP* folgenden *dsrN*-Gens noch im *dsrP*-Gen liegt. Das Gen konnte somit ebenfalls nicht vollständig deletiert werden.

Das Amplifikat der dritten PCR wurde wie auch bei den übrigen Konstrukten über die HindIII-Schnittstellen der äußeren Primer in den Vektor pK18*mobsacB* kloniert. Das erhaltene Plasmid erhielt nach Kontrolle der erfolgreichen Klonierung über Restriktionsanalyse die Bezeichnung pK18ΔP.

3.4.2 Southern Blots zur Überprüfung des Genotyps der Mutanten

Abschließend wurden von jeder Mutante Southern Blots durchgeführt, um den Genotyp zu überprüfen. Die dazu benötigte Sonde wurde mit den Primern *cvseq16F* und *Po-SK2* (Pott-Sperling 2000) erzeugt. Abb. 3.7 zeigt den Southern Blot für die Mutanten 28O und 5M.

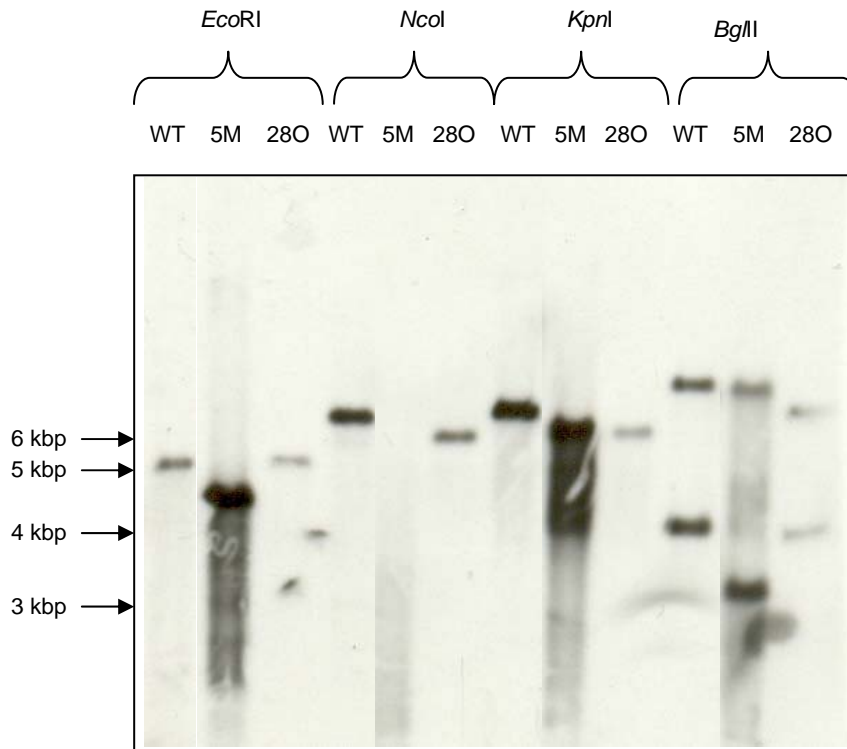


Abb. 3.7: Southern Blot zur Überprüfung der Mutanten 5M und 28O. Erwartet wurden folgende Banden: Wildtyp: 5356 bp (*EcoRI*), 6792 bp (*NcoI*), 6944 bp (*KpnI*) und 4060 bp (*BglII*: untere Bande). $\Delta dsrM$ -Mutante: 4561 bp (*EcoRI*), 6792 bp (*NcoI*), 6200 bp (*KpnI*) und 3296 bp (*BglII*: untere Bande). $\Delta dsrO$ -Mutante: 5356 bp (*EcoRI*), 5962 bp (*NcoI*), 6114 bp (*KpnI*), 4060 bp (*BglII*: untere Bande). Erwartet wurde zudem, dass die obere Bande beim *BglII*-Verdau in allen Fällen gleich ist, mit Ausnahme bei der $\Delta dsrO$ -Mutante, dort wurde eine um 830 bp (entspricht dem deletierten Bereich) kleinere Bande erwartet.

Der Southern Blot für die Mutante 3K wurde analog durchgeführt und ist in Abb. 3.8 zu sehen.

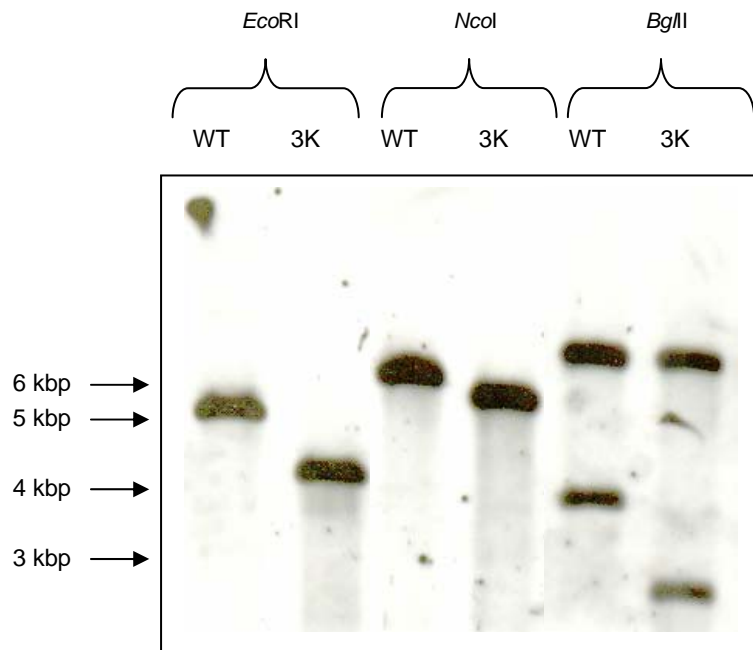


Abb. 3.8: Southern Blot zur Überprüfung der Mutante 3K. Erwartet wurden für den Wildtyp Banden bei 5356 bp (*EcoRI*), 6792 bp (*NcoI*), und 4060 bp (*BglII*: untere Bande). Für die $\Delta dsrK$ -Deletionsmutante wurden Banden bei 4261 bp (*EcoRI*), 6120 bp (*NcoI*) und 2965 bp (*BglII*: untere Bande) erwartet. Zusätzlich war zu erwarten, dass bei dem Verdau mit *BglII* eine weitere (obere) Bande unbekannter Größe auftritt, in der sich Wildtyp und Mutanten allerdings nicht unterscheiden sollten.

Die Southern Blots für die Mutanten 11P und 3J sind in den Abb. 3.9 und 3.10 gezeigt.

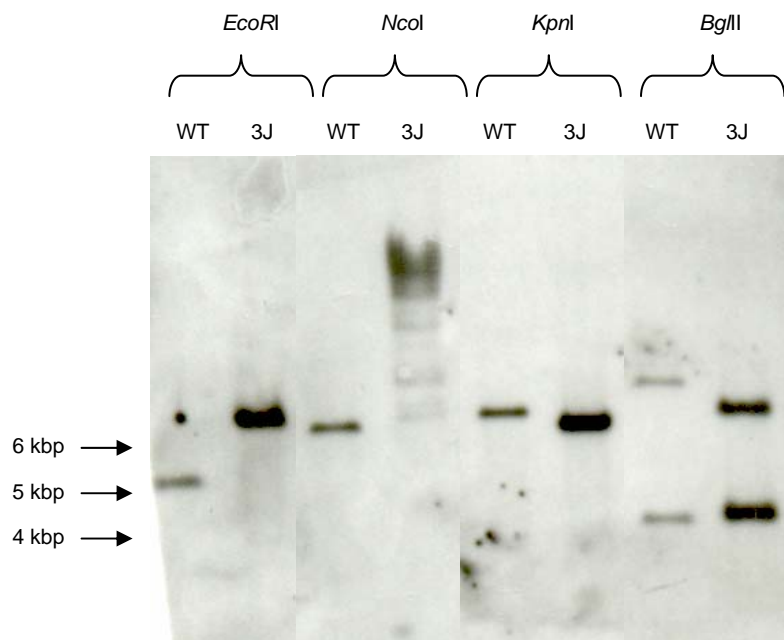


Abb. 3.9: Southern Blot für die Mutante 3J. Erwartet wurde für den Wildtyp die Banden 5356 bp (*EcoRI*), 6792 bp (*NcoI*), 6944 bp (*KpnI*) und 4060 bp (*BglII* untere Bande). Für die $\Delta dsrJ$ -Deletionsmutante wurden Banden bei 7400 bp (*EcoRI*), 6300 bp (*NcoI*), 6524 bp (*KpnI*) und 4060 bp (*BglII*: untere Bande) erwartet. Zudem wurde erwartet, dass die obere Bande beim *BglII*-Verdau bei der Mutante kleiner ist, als beim Wildtyp. Der Verdau mit *NcoI* hat bei der 3J-Mutante nicht funktioniert.

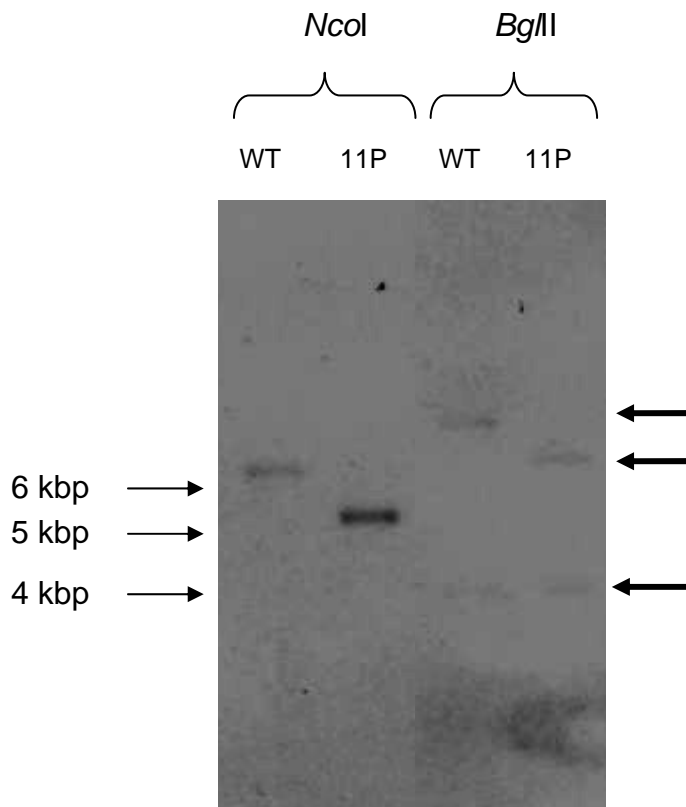


Abb. 3.10: Southern Blot für die Mutante 11P. Erwartet wurden für den Wildtyp Banden bei 6792 bp (*NcoI*) und 4060 bp (*BglII*; s. Pfeile) und für die $\Delta dsrP$ -Deletionsmutante Banden bei 5577 bp (*NcoI*) und 4060 bp (*BglII*). Erwartet wurde zudem eine kleinere obere Bande beim *BglII*-Verdau (s. Pfeile).

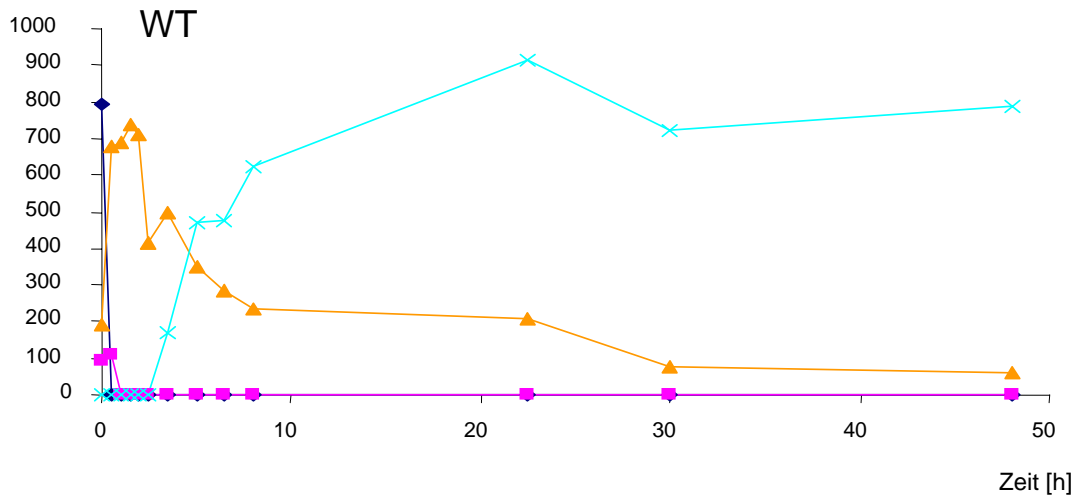
3.4.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

3.4.3.1 Charakterisierung der Mutanten

Der Phänotyp der erzeugten Deletionsmutanten wurde in Batch-Kultur in Fermentern unter kontrollierten Bedingungen (30°C; pH 6,8-7,0; Medium) untersucht. Dazu wurden die Zellen auf 1 l RCV-Medium angezogen, nach vier Tage abzentrifugiert und im Rücklauf resuspendiert. Mit dieser konzentrierten Zellsuspension wurden 1 l Pfennigmedium in Fermentern beimpft. Im Verlauf des etwa 2-3 Tage dauernden Fermenterversuchs wurden das Wachstum und der Umsatz von Schwefelverbindungen durch die Kultur anhand der Sulfid-, Thiosulfat-, Schwefel-, Sulfit-, Sulfat- und Proteinbestimmung verfolgt. Dabei wurde außerdem zur besseren Kontrolle des Wachstums und der Schwefeleinlagerung die OD der Kultur bei 690 nm bestimmt. Der Verlauf dieser Werte ist in Abb. 3.11 am Beispiel der 3J-Mutante dargestellt.

Schwefel-
Verbindungen
[μM]

1)



Schwefel-
Verbindungen
[μM]

2)

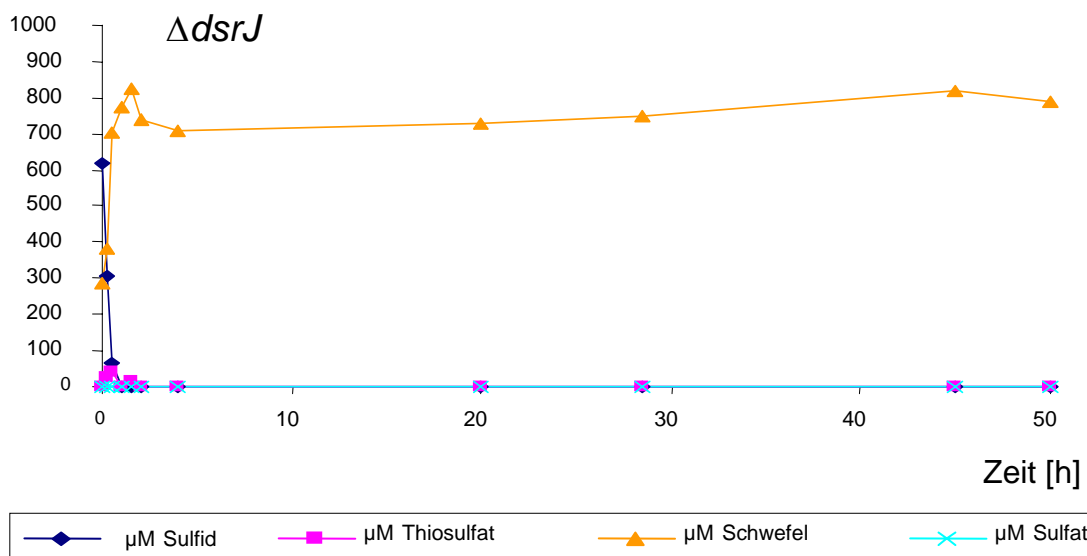


Abb. 3.11: Vergleich der auf Mutante 3J (1) mit dem Wildtyp (2): Der Proteingehalt der Kulturen betrug für den Wildtyp: 190,6 $\mu\text{g/ml}$ und für die $\Delta dsrJ$ -Mutante: 130,5 $\mu\text{g/ml}$.

Die Menge an cyanolytisch gemessenem Schwefel stieg zunächst sowohl bei der 3J-Mutante, als auch beim Wildtyp stark an. Der Wildtyp und die 3J-Mutante erreichen den maximalen Schwefelwert etwa nach 1,5 (3J), bzw. 2 Stunden (WT). Während beim Wildtyp dann aber die Schwefelkonzentration wieder fiel, bleibt sie bei der Mutante auf konstant hohem Niveau.

Beim Wildtyp entsteht auch nach bereits 3,5 h das Endprodukt des Oxidationsprozesses Sulfat, während bei der Mutante selbst nach 50 Stunden noch kein Sulfat zu detektieren war. Der Phänotyp der übrigen Deletionsmutanten entsprach dem Phänotyp der $\Delta dsrJ$ -Mutante. In Abb. 3.12 ist daher nur ein Vergleich der Schwefelkonzentrationen gezeigt:

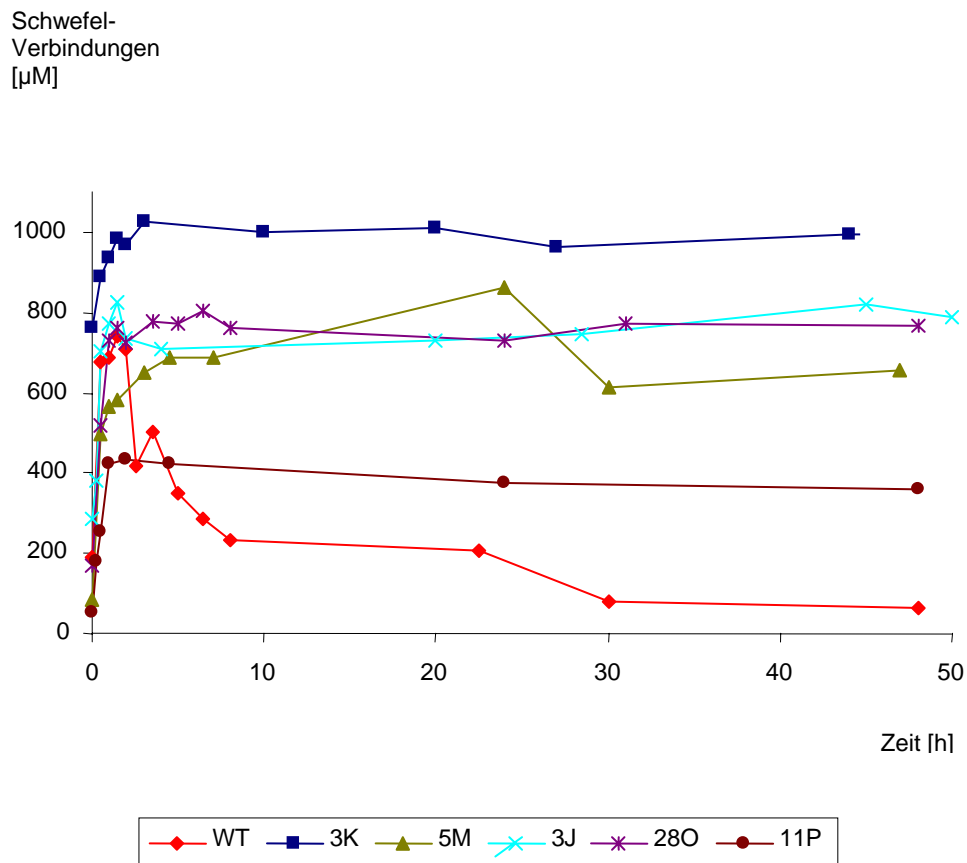


Abb. 3.12: Vergleich der Schwefelabbau beim Wildtyp und den verschiedenen Mutanten der Gene des DsrMKJOP-Komplexes. Der Proteingehalt betrug für den Wildtyp: 190,6 µg/ml, für die 3K-Mutante: 227,7 µg/ml, für die 5M-Mutante: 176,3 µg/ml, für die 3J-Mutante: 130,5 µg/ml, für die 28O-Mutante: 238,1 µg/ml und für die 11P-Mutante: 156,1 µg/ml. Die maximale Schwefelkonzentration variiert mit der Menge an eingesetztem Sulfid, dass seinerseits sehr flüchtig ist. Die Sulfidkonzentration selbst unterliegt somit Schwankungen je nach Lagerungsdauer des Mediums.

Während der Oxidation des Sulfids zum Schwefel werden von *A. vinosum* vorübergehend zwei Polysulfide angehäuft, die bei einer HPLC-Messung nach einer Retentionszeit von jeweils 39 bzw, 44 Minuten detektiert werden. Die genaue Kettenlänge dieser Polysulfide ist unbekannt. Um zu überprüfen, ob ihr Umsatz in irgendeiner Weise in den Mutanten beeinträchtigt ist, wurden auch der Konzentrationsverlauf dieser Substanzen bei den Mutanten mit dem Wildtyp verglichen. Wie in Abb. 3.13 am Beispiel der 5M-Mutante gezeigt ist, ergibt sich allerdings kein Unterschied. Die anderen Mutanten verhalten sich in gleicher Weise. Beide Polysulfide gebildet und wieder abgebaut, wobei meist die Substanz RT44 ihr

Maximum etwas früher erreicht, als die Substanz RT39. Die absolute Peak-Höhe ist auch bei verschiedenen Wildtyp-Fermentern sehr variabel.

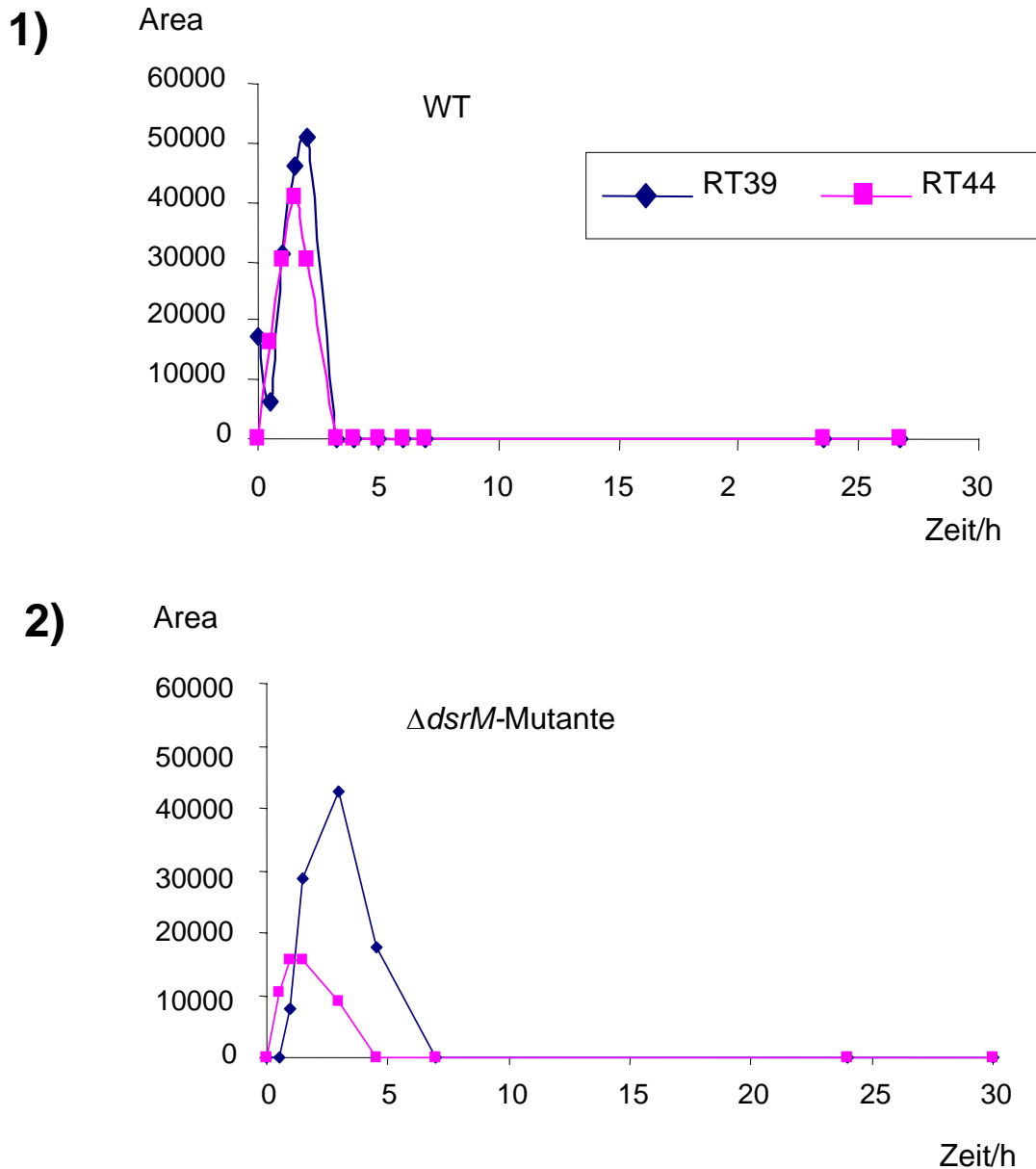


Abb. 3.13: Vergleich der Polysulfide RT39 und RT44 beim Wildtyp (1) und bei der $\Delta dsrM$ -Mutante. Die Einheit der Y-Achse ist als Fläche des Peaks ("Area") angegeben, da mangels eines Standards keine absolute Konzentration bestimmt werden konnte. Gezeigt sind zwei auf 7,5 mM Sulfid angezogene Kulturen. Der Proteingehalt betrug für den Wildtyp: 105,6 $\mu\text{g/ml}$, für die $\Delta dsrM$ -Mutante: 176,2 $\mu\text{g/ml}$.

Um zu testen, ob bei den Mutanten auch die Thiosulfatoxidation beeinträchtigt ist und um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Mutanten in der langen Hungerphase absterben und

allein deshalb keine Reaktion mehr zeigen, wurden die Kultur in einer zweiten Serie nach 48 h mit Thiosulfat gefüttert (s. Abb. 3.14).

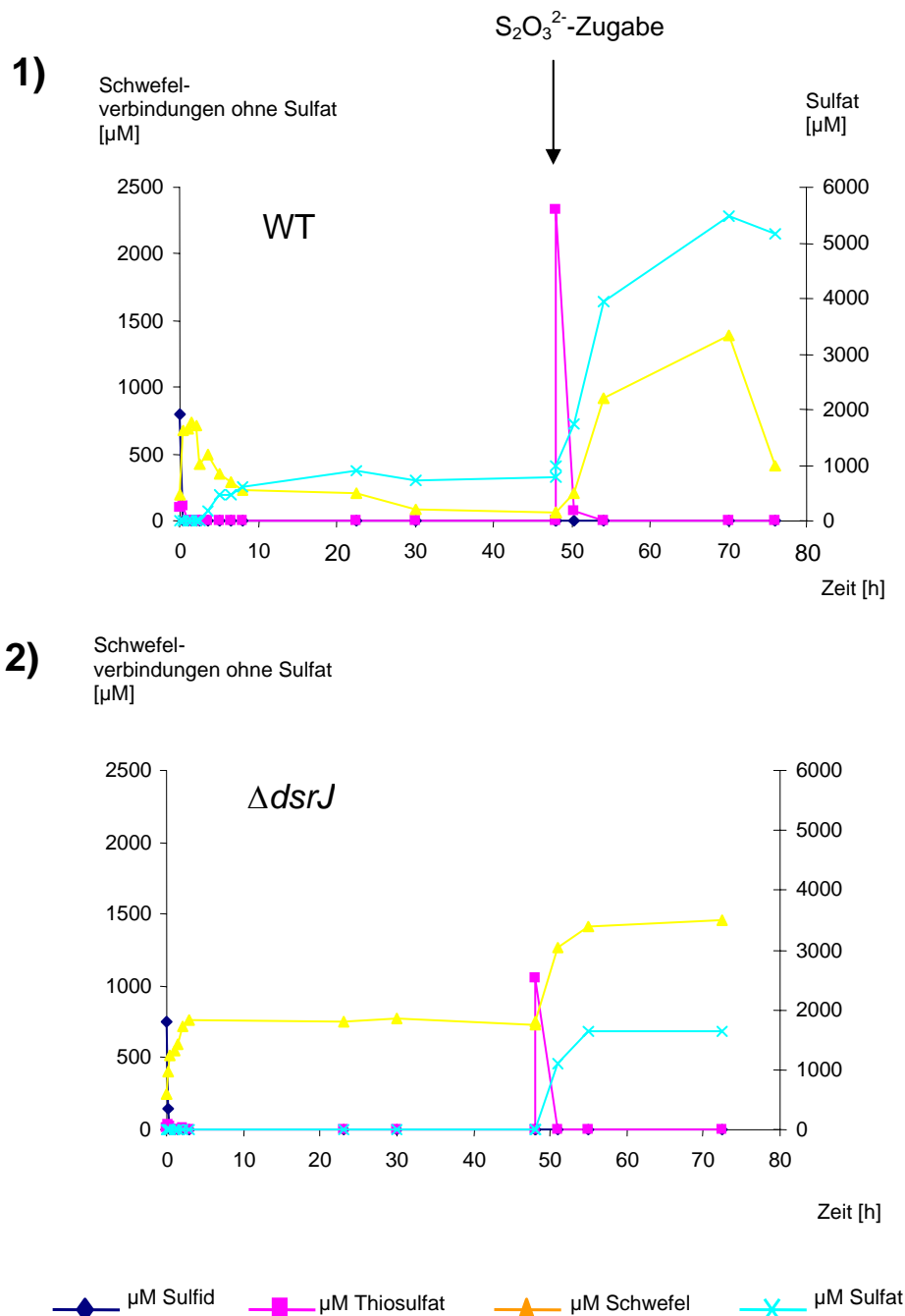


Abb. 3.14: Vergleich der nach 48 h mit Thiosulfat gefütterten Fermenter der Mutanten 3J (1) mit dem Wildtyp (2). Der Proteingehalt betrug für den Wildtyp: 190,6 $\mu\text{g/ml}$ und für die 3J-Mutante: 126,7 $\mu\text{g/ml}$. Die Sulfatkonzentration ist auf Gründen der Übersichtlichkeit auf einer zweiten Achse dargestellt.

Nach der Fütterung reagierten alle Mutanten sofort mit erneuter Schwefeleinlagerung. Erwartungsgemäß entstand dabei aus dem Sulfonschwefel des Thiosulfat direkt Sulfat. Die Menge war aber entsprechend niedriger als beim Wildtyp. Alle anderen Kulturen verhielten

sich in gleicher Weise und werden daher hier nicht gezeigt. Der erste Schritt der Thiosulfatoxidation ist bei den Mutanten somit nicht beeinträchtigt.

3.4.3.2 Komplementation der Mutante 3J

3.4.3.2.1 Erzeugung des Komplementationsvektors

Zu Beginn der Arbeiten stand kein geeignetes System zur Verfügung, um Gene über einen in *A. vinosum* replizierbaren Vektor in diesem Organismus zu exprimieren. Es wurde daher auf verschiedene Weise versucht Vektoren herzustellen, mit denen sich die erzeugten Deletionsmutanten wieder komplementieren lassen. Ein erster Ansatz war *dsr*-Gene in den Vektor pMHE3crtKm (Fodor et al. 2004) Versuche schlugen allerdings alle fehl. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die pMHE-Vektoren low-copy-Vektoren sind und somit in der Zelle nur in geringer Stückzahl vorkommen.

Dann wurde versucht mehrere *dsr*-Gene gemeinsam (*dsrMK* und *dsrJOP*) in einen pBluescript-Vektor zu klonieren, in den zuvor der Promotor des *rubisco*-Gens aus *A. vinosum* eingebracht worden war (Yvonne Lübbe). Es war anzunehmen, dass dieser Promotor in *A. vinosum* unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen gut funktionieren würde. Die gemeinsame Klonierung mehrerer *dsr*-Gene sollte zum einen die Klonierung erleichtern und zum zweiten bestand die Vermutung, daß die gemeinsame Transkription den Zusammenbau des Komplexes erleichtern könnte. Allerdings hatten frühere im Labor durchgeführte Komplementationsexperimente mit *dsr*-Genen unter der Kontrolle des *rubisco*-Promotors zu einer geringeren Expression als erwartet geführt (Yvonne Lübbe, persönliche Mitteilung). Da der Promotor selbst sehr stark ist und nicht aus einem Fremdorganismus stammt, wurde vermutet, dass dies weniger etwas mit der Promotor-Stärke, als mit einem zu raschen Abbau des kurzen nur ein *dsr*-Gen enthaltenden Transkriptes zurückzuführen sei (möglicherweise aufgrund fehlender Sekundärstrukturen, die den Abbau der mRNA verhindern). Es bestand daher die Möglichkeit, dass die gemeinsame Klonierung mehrerer *dsr*-Gene dieses Problem reduzieren könnte. Allerdings war auch diese Klonierung nicht erfolgreich, so dass nach einer weiteren Alternative gesucht werden mußte. Die Wahl fiel auf das Plasmid pET22b(J) (Monika Kräling), das das *dsrJ*-Gen *in-frame* an einen His-Tag fusioniert enthält. Die Strategie zur Erzeugung eines Überexpressionsplasmides mit Hilfe von pET22b(J) war wie folgt:

1. Amplifikation des *dsr*-Promotors mit Hilfe der Primer DsrProF und DsrProR (Yvonne Lübbe). Die Primer bringen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und NdeI in das Amplifikat ein und erlaubten so eine Klonierung des *dsr*-Promotors vor das *dsrJ*-Gen in pET22b(J).

2. Ausschneiden des *dsr*-Promotors zusammen mit dem *dsrJ*-Gen aus dem Plasmid pET22b(J) durch die Enzyme *Xba*I und *Hind*III. Da das *dsrJ*-Gen unter anderem mit *Hind*III in den pET22b-Vektor kloniert worden war, führte dies dazu, dass der His-Tag wieder abgeschnitten wurde.
3. Das *Xba*I, *Hind*III-Fragment wurde nun in den Vektor pBBR1-MCS2, der konjugierbar und in *A. vinosum* replizierbar ist, kloniert. Es entstand das Plasmid pJKomp

Wahrscheinlich besitzt das von dem pJKomp-Plasmid aus exprimierte DsrJ-Protein einen veränderten C-Terminus, da beim Abschneiden des His-Tags auch das Stoppcodon beseitigt wurde. Dies wurde billiger in Kauf genommen, da jede andere Klonierungsstrategie erheblich aufwendiger gewesen wäre. Da außerdem das *dsrJ*-Gen in der 3J-Mutante nicht vollständig deletiert werden konnte, bestand zudem die Möglichkeit, daß es, wie bei anderen Genen bereits beobachtet, zu einer Rekombination mit dem *dsr*-Operon kommt (Yvonne Lübke, persönlich Mitteilung).

3.4.3.2.2 Komplementation der 3J-Mutante

Das Plasmid pJKomp wurde schließlich in *E. coli* S17.1 transformiert und von diesem Stamm aus über Konjugation in *A. vinosum* überführt. Die Selektion auf erfolgreich konjugierte *A. vinosum*-Stämme erfolgte über das Antibiotikum Kanamycin. Einzelkolonien wurden außerdem noch über eine Kolonie-PCR daraufhin überprüft, ob sie das Plasmid enthielten. Eine positiv getestete Kolonie wurde schließlich in größerem Maßstab angezogen und für einen Fermenterversuch eingesetzt. Dazu wurde das Zellmaterial einer 1 l RCV-Kultur im Rücklauf resuspendiert und dazu verwendet, 1 l Null Medium anzupflanzen. Der Versuch wurde dann durch Zugabe von Sulfid gestartet. Wie in Abb. 3.15 zu sehen ist stieg der Schwefel zunächst an und viel dann langsam aber stetig ab. Der Prozess verlief allerdings sehr viel langsamer als beim Wildtyp und auch Sulfat wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt gebildet. Für den verzögerten Verlauf des Prozesses kann es mehrere Gründe geben: Zum einen kann es sein, dass es dem Organismus schwerer fällt den DsrMKJOP-Komplex zusammenzubauen, wenn nicht alle Gene in einem Operon kodiert werden. Zum anderen kann natürlich auch die Veränderung der Aminosäuresequenz am C-Terminus eine Rolle spielen. Zwar werden dadurch die für die Funktion des DsrJ-Proteins wahrscheinlich wesentlichen Häm-c-Gruppen nicht beeinträchtigt, die Veränderung kann aber durchaus Einfluß auf die Struktur des Proteins und damit vielleicht auch auf die Interaktion mit möglichen Partnern haben.

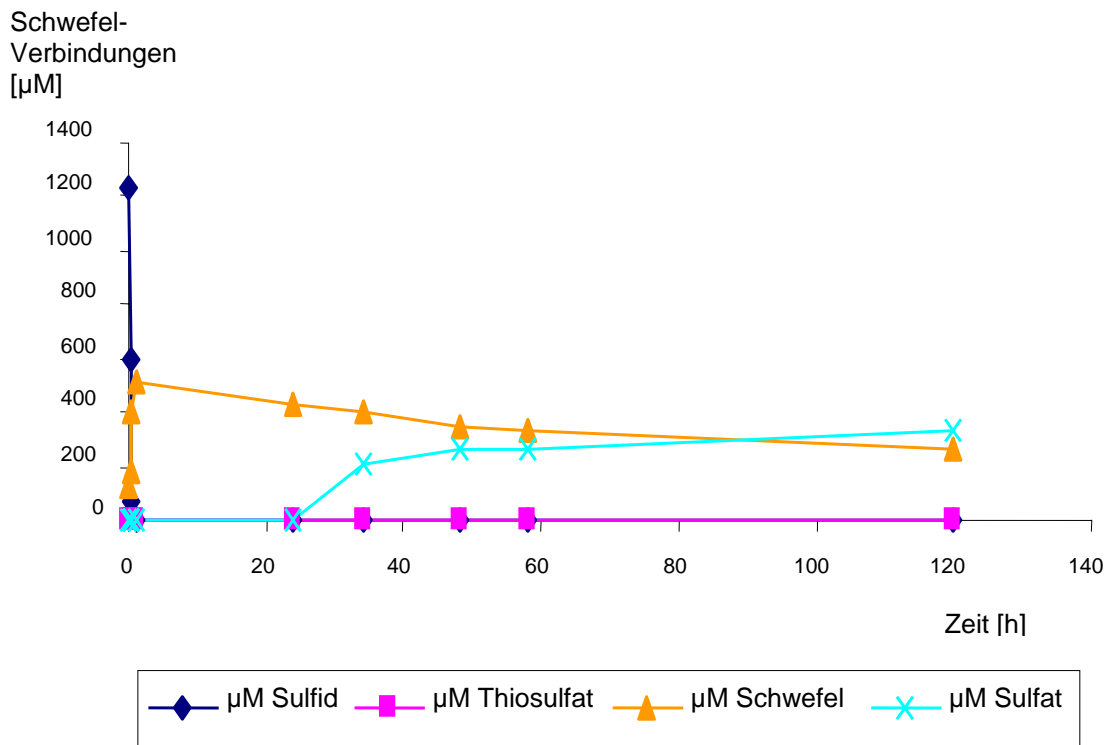


Abb. 3.15: Fermenter mit der Komplementationsmutante von 3 JKomp. Der Proteingehalt der Kultur betrug 187,4 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.3.3 Vergleich der Entschwefelungsraten

Abschließend wurden die Entschwefelungsraten der Deletionsmutanten und der Komplementationsmutante mit dem Wildtyp verglichen. Bei den auf 7,5 mM Sulfid angezogenen Kulturen lag der Wildtyp mit durchschnittlich 40,5 nMol Schwefel/(min*mg [Protein]), deutlich über den bei den Mutanten beobachteten Raten, die sich um die 0 nMol Schwefel/(min*mg [Protein]) bewegten. Ein Vergleich dieser Raten ist in Abb. 3.16 zu sehen.

nMol [Schwefel]/(min*mg [Protein])

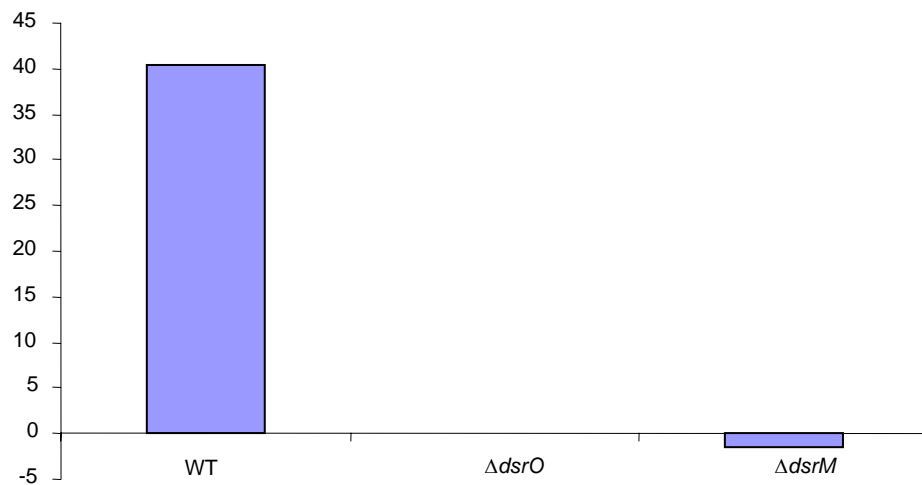


Abb. 3.16: Vergleich der durchschnittlichen Entschwefelungsraten beim WT und bei auf 7,5 mM Sulfid angezogenen Mutanten.

Bei auf 2 mM Sulfid angezogenen Mutanten sah die Situation ähnlich aus, allerdings war hier die Entschwefelungsrate des Wildtyps niedriger. Ein Vergleich der durchschnittlichen Entschwefelungsraten ist in Abb. 3.17 zu sehen. Dem dort gezeigten Diagramm ist außerdem die durchschnittliche Entschwefelungsrate der Komplementationsmutante für die $\Delta dsrJ$ -Mutante (3J) hinzugefügt. Die Entschwefelungsrate der Komplementationsmutante ist zwar nicht besonders hoch, allerdings signifikant höher als die Entschwefelungsrate jeder einzelnen Deletionsmutante. Zusammen mit der nachgewiesenen Bildung des Endproduktes Sulfat, spricht dies eindeutiger Beweis für einen Schwefelabbau.

nMol [Schwefel]/(min*mg [Protein])

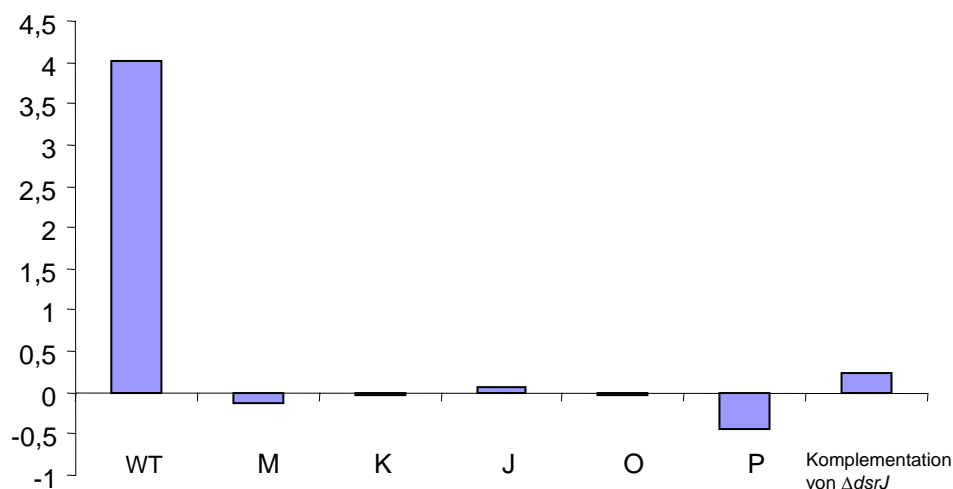


Abb. 3.17: Vergleich der durchschnittlichen Entschwefelungsraten der auf 2 mM Sulfid angezogenen Kulturen. Gezeigt sind der Wildtyp, die einzelnen Mutanten, sowie die Komplementation der $\Delta dsrJ$ -Mutante

3.5 Bioinformatische Untersuchungen

Zu Beginn der Arbeiten wurden mit allen Sequenzen der Proteinen des *dsr*-Operons BLAST und PSI-BLAST-Suchen durchgeführt. Mit den Suchergebnissen wurde nach zweierlei Art verfahren: Zum einen wurde untersucht, ob die den gefundenen Proteinsequenzen zugrunde liegenden Gensequenzen in der Nachbarschaft des betreffenden Gens weitere Gene für *dsr*-Gene (oder andere interessante, möglicherweise den Schwefelstoffwechsel betreffende Gene) aufweisen. Zum anderen wurden die Suchergebnisse im Fasta-Format exportiert und einem multiplen Alignment unterzogen, das dann für die Erzeugung von phylogenetischen Bäumen verwendet werden konnte. Auf diese Weise sollte geklärt werden, welche Proteinsequenzen ein gemeinsames Cluster bilden und somit möglicherweise auch funktional nahe miteinander verwandt sind.

3.5.1 Ergebnisse der BLAST-Suche und Alignments

Aufgrund der großen Zahl der bei der BLAST-Suche erzielten Treffer scheint es nicht sinnvoll hier für jedes Protein eine vollständige Liste der Suchergebnisse zu präsentieren. Ich werde daher so vorgehen, dass ich zunächst eine kurze Beschreibung der Suchergebnisse gebe und aufzeige, welche Proteine sich durch eine phylogenetische Analyse mit Hilfe von Stammbäumen von den übrigen Proteinen als „echte“ Dsr-Proteine absetzen lassen.

3.5.1.1 *DsrAB*

Eine BLAST-Suche mit DsrA, bzw. DsrB liefert erwartungsgemäß eine Vielzahl von Suchergebnissen von (in vielen Fällen mutmaßlichen) Sulfitreduktasen. Ein Grossteil davon stammt aus Organismen mit reduktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel. Eine Analyse mit Hilfe von phylogenetischen Bäumen (NJ, Parsimony) zeigt, dass die Sequenzen aus *Allochromatium vinosum* DSM180 zusammen mit Sequenzen aus *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 und *Chlorobaculum tepidum* TLS in ein Cluster fällt. *T. denitrificans* besitzt offensichtlich drei eng miteinander verwandte DsrA-Sequenzen, aber nur eine DsrB Sequenz. In dem Cluster finden sich außerdem auch Sequenzen aus *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 und *Magnetococcus* species MC-1, die wie fast alle anderen magnetotaktischen Bakterien befähigt sind auf reduzierten Schwefelverbindungen chemolithoautotroph zu wachsen (Simmons et al. 2004) und dabei intermediär Schwefelkugeln bilden (Bazylini et al. 2004). Das *Allochromatium*-Cluster lässt sich klar von den übrigen Sequenzen absetzen.

3.5.1.2 *DsrEFH*

Die Polypeptide DsrEF und H werden hier gemeinsam abgehandelt, da sie zusammen ein Protein bilden (Dahl et al 2005). Bei allen drei Proteinen stehen an der Spitze der Suchergebnisse wieder Sequenzen aus *T. denitrificans* ATCC 25259, *C. tepidum* TLS, *M. magnetotacticum* MS-1 und *Magnetococcus* sp. MC-1. Dann folgen weitere Sequenzen aus verschiedenen Organismen. Ein Blick auf die Umgebung der zugrunde liegenden Gene zeigt, daß in den meisten Fällen alle drei Polypeptide direkt nebeneinander kodiert werden. Die Reihenfolge in der die Polypeptide in der BLAST-Suche erscheinen, variiert allerdings stark. Eines der wenigen Proteine, dessen Gen alleine auftritt ist das zu DsrE homologe YchN aus *Escherichia coli*.

3.5.1.3 *DsrC*

Bei DsrC lieferte eine erste Suche mit der Sequenz aus *A. vinosum* neben vielen anderen Suchergebnissen wieder Sequenzen aus den bereits bekannten Organismen *T. denitrificans*, *C. tepidum*, *M. magnetotacticum* und *Magnetococcus* sp.. Interessanterweise findet sich die Sequenz aus *C. tepidum* nicht wie die Sequenzen aus den übrigen Organismen an der Spitze der Suchergebnisse, sondern erst an 16. Position. Sequenzen aus Organismen mit reduktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel werden vorerst nicht gefunden. Stattdessen erscheinen Proteine aus Arten, die aller Wahrscheinlichkeit nach nicht über einen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel verfügen (z.B. *Yersinia pestis* KIM, *Haemophilus somnus* 2336 oder *Mannheimia succiniproducens* MBEL55E).

Da allerdings seit längerem bekannt ist, dass auch Organismen mit reduktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel DsrC-homologe Proteine besitzen, wurde mit der Sequenz des DsrC-Proteins des Sulfit-Reduzierers *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 (Lie et al. 1999) eine weitere BLAST-Suche durchgeführt. Bei dieser Suche fanden sich neben den oben bereits genannten Proteinen u.a. Sequenzen aus den Sulfat-Reduzierern *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* (Hildenborough), *Desulfovibrio desulfuricans* G20, *Desulfotalea psychrophila* LSv54, *Thermodesulforhabdus norvegica*, *Archaeoglobus fulgidus* (DSM 4304), den Sulfitreduzieren *Pyrobaculum aerophilum* und *P. islandicum*, sowie *Moorella thermoacetica* ATCC 39073, bei dem die Fähigkeit Thiosulfat und Dimethylsulfoxid als Elektronenakzeptoren zu nutzen zwar nachgewiesen ist (Beatty und Ljungdahl 1991), aber bislang nicht näher untersucht wurde (Drake und Daniel 2004). Obwohl diese Proteine bei einer BLAST-Suche mit der Sequenz aus *A. vinosum* nicht direkt auffindbar waren, clustern sie bei einer phylogenetischen Analyse alle zusammen mit der Sequenz aus *A. vinosum*.

Beim Betrachten von Alignments der mit DsrC verwandten Proteine fällt auf, dass in dem hochkonservierten C-Terminus der Proteine der erste konservierte Cysteinrest (Pott und Dahl 1998) auf Organismen mit dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel beschränkt ist, während der zweite Cysteinrest auch weit über diese Gruppe hinaus noch auftritt (Abbildung nicht gezeigt).

3.5.1.4 DsrL

Eine PSI-BLAST-Suche mit DsrL liefert zwar zahlreiche Suchergebnisse, die häufig als Glutamat-Synthase oder Formiat-Dehydrogenase annotiert sind, ohne dass die entsprechende Funktion tatsächlich nachgewiesen wäre, unter den Organismen mit Schwefelstoffwechsel sind aber nur solche des oxidativen Stoffwechseltyps vertreten.

3.5.1.5 DsrMKJOP

Da die Proteine DsrMKJOP einen Membran-durchspannenden Komplex bilden, erscheint es zunächst sinnvoll sie hier ebenfalls gemeinsam abzuhandeln. Andererseits gibt es aber auch bedeutende Unterschiede hinsichtlich der zu ihnen homologen Proteine. Unter diesem Aspekt ist es sinnvoller die Proteine DsrM und K und die Proteine DsrO und P, sowie das Protein DsrJ unabhängig zu besprechen. Um beiden Aspekten gerecht zu werden, werde ich zuerst einmal diejenigen Punkte besprechen, die für alle fünf Proteine gemeinsam gelten, um dann auf die jeweiligen Besonderheiten einzugehen.

Bei PSI-BLAST-Suchen mit den jeweiligen Proteinsequenzen aus *A. vinosum* DSM180 werden immer Proteine aus den bereits im Kapitel für DsrC aufgeführten Organismen *T. denitrificans*, *C. tepidum*, *M. magnetotacticum* und *Magnetococcus* sp. und *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* (Hildenborough), *Desulfovibrio desulfuricans* G20, *Moorella thermoacetica* ATCC 39073, *Desulfotalea psychrophila* LSv54 und *Archaeoglobus fulgidus* (Proteine des Hme-Komplexes) gefunden. In einigen Fällen treten zusätzlich auch die Namen anderer Organismen auf, für die ein Schwefelstoffwechsel bekannt ist (z.B. *Thermodesulforhabdus norvegica*, *Pyrobaculum aerophilum* oder *P. islandicum*). Die mutmaßlichen Dsr-Proteine lassen sich aber in phylogenetischen Analysen gut von den übrigen Treffern abgrenzen. Gezeigt ist dies am Beispiel von DsrM in Abb. 3.18.

3.5.1.5.1 DsrMK

Von DsrMK ist schon seit langem bekannt und in der Einleitung beschrieben, dass diese Proteine Homologien zu einer membranständigen Heterodisulfidreduktase aufweisen. Dementsprechend besitzen auch viele der zu DsrMK homologen Proteine eine entsprechende Genstruktur: Neben einem Gen, das für ein zu *dsrM* homologes Gen kodiert, liegt ein Gen

das zu *dsrK* homolog ist und umgekehrt. Insbesondere über eine BLAST-Suche mit DsrK lassen sich außerdem die Proteine des Hmc-Komplexes aus *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfovibrio desulfuricans* (Rossi et al. 1993) leicht finden.

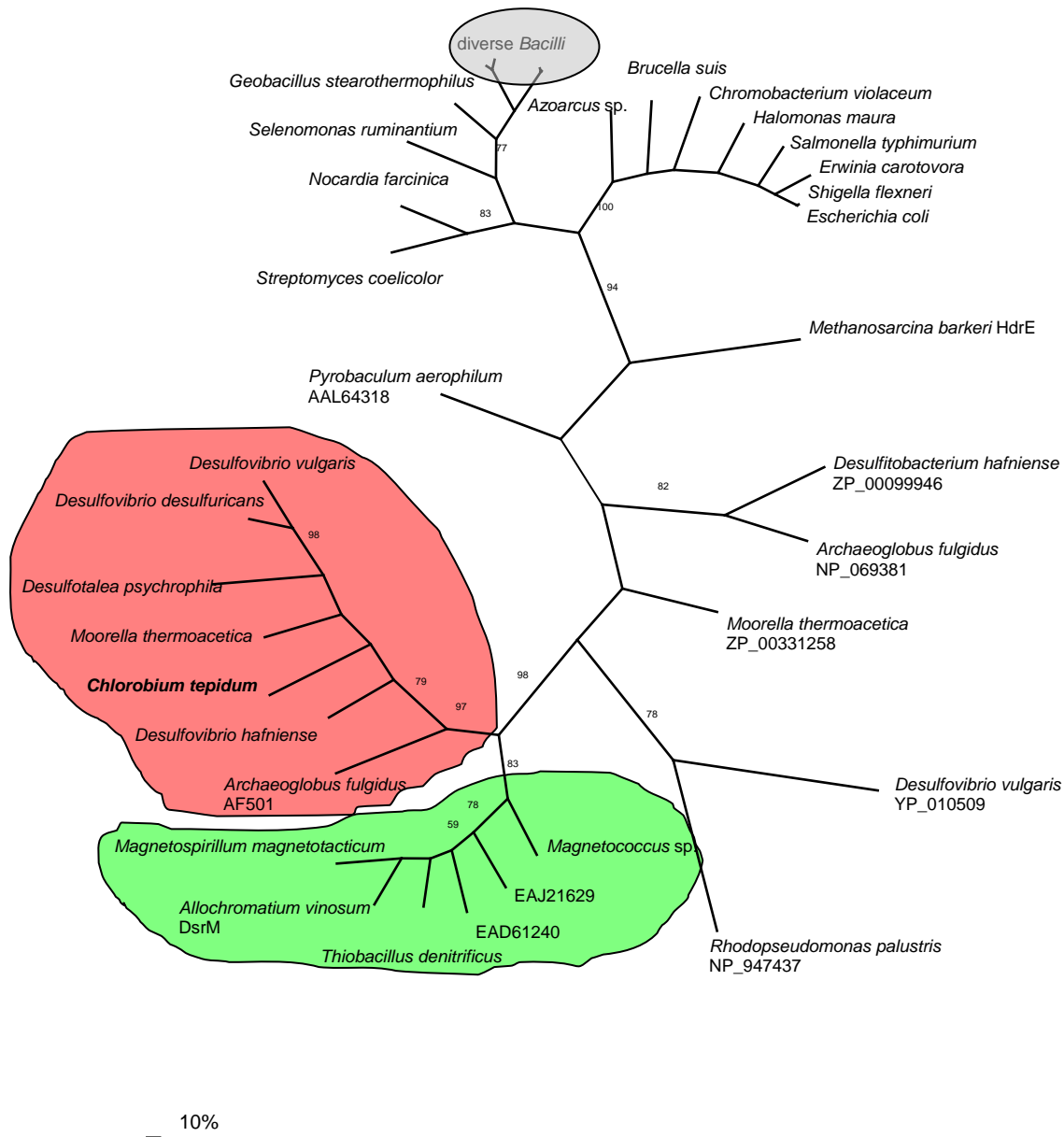


Abb. 3.18: Maximum Parsimony-Baum der zu DsrM homologen Proteine. Baumlänge: 3596, CI = 0,6368, RI = 0,5937. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Der Baum zeigt die ersten 35 Suchergebnisse einer PSI-BLAST-Suche exklusive der Sequenzen bei denen kein Organismenname angegeben ist. Mutmaßliche „echte“ Dsr-Proteine sind rot (Organismen mit reduktivem-Schwefelstoffwechsel inklusive *C. tepidum*), bzw. grün (Organismen mit oxidativem Schwefelstoffwechsel exklusive *C. tepidum*) unterlegt. Bei den Proteinen EAJ21629 und EAD61240 handelt es sich um Sequenzproben aus der Sargassosee (Venter et al. 2004). Die Sequenzen dieser Proteine stammen aus einer separaten Suche in der Sargassosee-Datenbank.

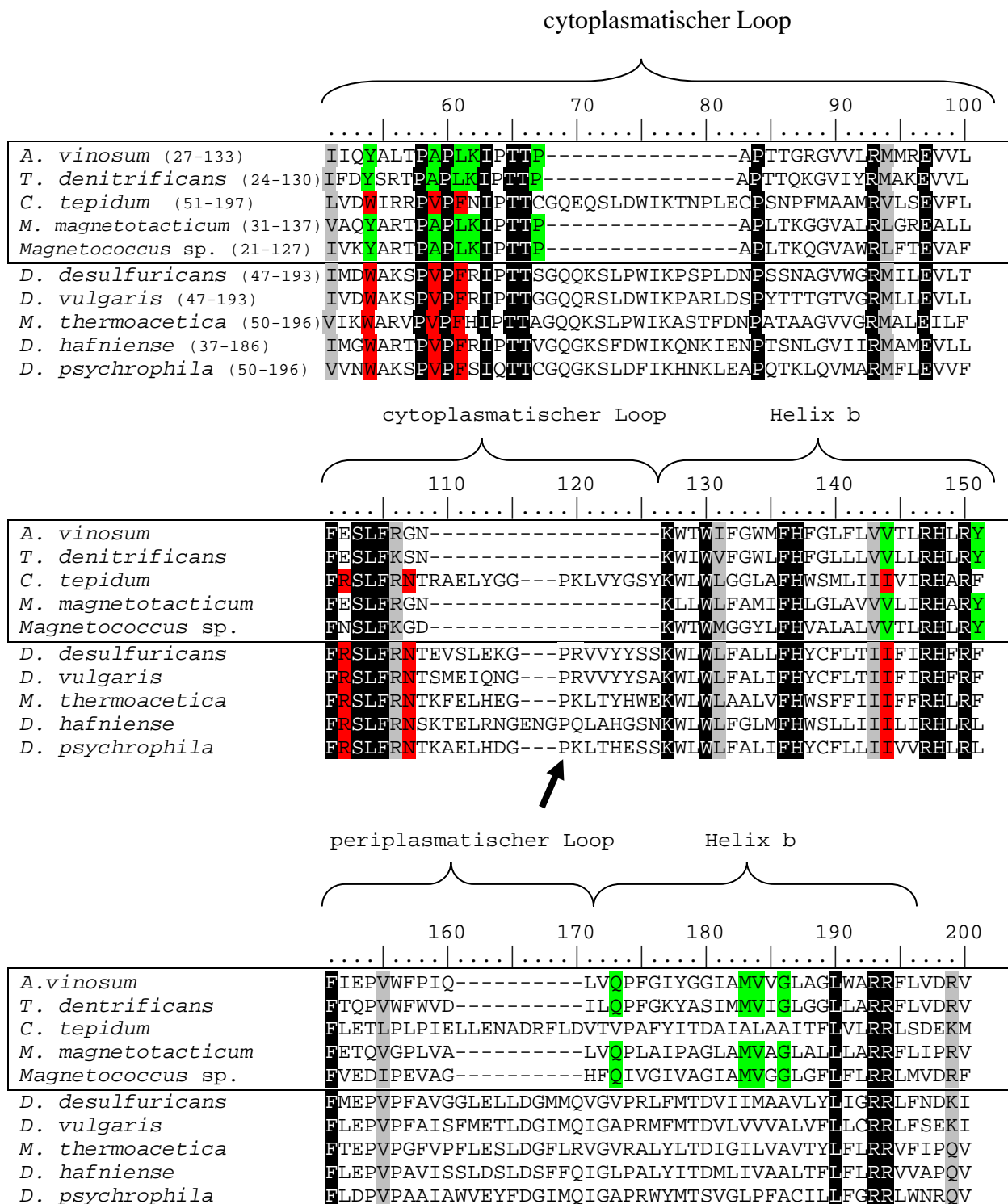


Abb. 3.19: Alignment-Ausschnitt der DsrM-Proteine. Zu erkennen sind drei charakteristische Lücken, die für Sulfidoxidierer typisch sind. Lediglich *C. tepidum* verfügt über diese Lücken nicht. In der zweiten Lücke befindet sich ein konservierter Prolinrest (s. Pfeil). Da Prolinreste die Polypeptidkette knicken, könnte dies durchaus Einfluß auf die Struktur der Proteine haben. Aminosäurereste, die in allen Sulfat-/Sulfit-Reduzierern und in *C. tepidum* vorkommen sind rot markiert. Aminosäurereste, die auf Sulfidoxidierer ohne *C. tepidum* beschränkt sind, sind grün markiert. Die Zahlen hinter den Organismennamen im ersten Block des Alignments geben die Aminosäurepositionen bei dem jeweiligen Organismus an. Alle Sulfidoxidierer sind umrandet.

Alignments von DsrM-Proteinen zeigen drei charakteristische Lücken in den Loop-Regionen zwischen den mutmaßlichen Membranhelices, die für Sulfidoxidierer typisch sind und bei Sulfat-/Sulfitreduzieren fehlen (s. Abb. 3.19). Interessanterweise fehlen auch der Sequenz aus *C. tepidum* diese Lücken. Ähnlich ist die Situation bei DsrK-Proteinen. Hier finden sich zwei auf Sulfidoxidierer und eine auf Sulfatreduzierer (inklusive *C. tepidum*) beschränkte Lücken (nicht gezeigt).

3.5.1.5.2 DsrOP

Zu DsrO homologe Proteine werden zwar in den Datenbanken häufig als „Hydrogenase Komponenten 1“ angegeben, es konnte aber, zumindest bei den mit DsrO näher verwandten Proteinen, in keinem Fall andere Komponenten einer Hydrogenase gefunden werden. Stattdessen liegt unmittelbar neben einem zu *dsrO* homologen Gen (meist annotiert als *psrB/dmsB*) oft ein zu *dsrP* homologes Gen (*psrC/dmsC*). Außerdem findet sich häufig noch ein ORF, das wahrscheinlich, laut Annotierung, für die aktive Untereinheit einer Polysulfid- bzw. DMSO-Reduktase (PsrA/DmsA) kodiert.

Eine Besonderheit bildet eine Genstruktur in *Rubrivivax gelatinous*. Dort liegt neben einem zu *dsrO* und einem zu *dsrP* homologen Gen nicht ein *psrA/dmsA*-Gen, sondern ein Gen für ein mutmaßliches C-Typ Cytochrom, das allerdings keine Homologie zu DsrJ besitzt. Interessanterweise besitzen die zu DsrO homologen Komponenten von Polysulfid-/DMSO-Reduktasen (anders als DsrO) kein mutmaßliches Doppelarginin- (Tat-) Signalpeptid. Bei der PsrA/DmsA-Untereinheit wurde aber in fast allen Fällen ein solches Signalpeptid gefunden. In einigen Fällen musste dazu allerdings der in der Datenbank angegebene Startpunkt N-terminal verschoben werden.

Hinsichtlich der vier in DsrO konservierten mutmaßlichen FeS-Cluster-Bindestellen fällt auf, dass nur die Cluster II und III in allen zu DsrO homologen Dsr-Proteinen gut konserviert sind. Von dem Cluster I ist in *D. vulgaris*, *D. desulfuricans*, *D. hafniense* und *D. psychrophila* nur noch der letzte Cysteinrest (Cys84 in *A. vinosum*) konserviert. Das Cluster IV ist besser erhalten, allerdings fehlt in den genannten Arten der letzte konservierte Cysteinrest. Bei *M. thermoacetica* und *A. fulgidus* sind im ersten Cluster zwar alle Cysteinreste enthalten, allerdings sind die Abstände durch Einschübe zwischen einzelnen Cysteinresten vergrößert (s. Abb.3.20).

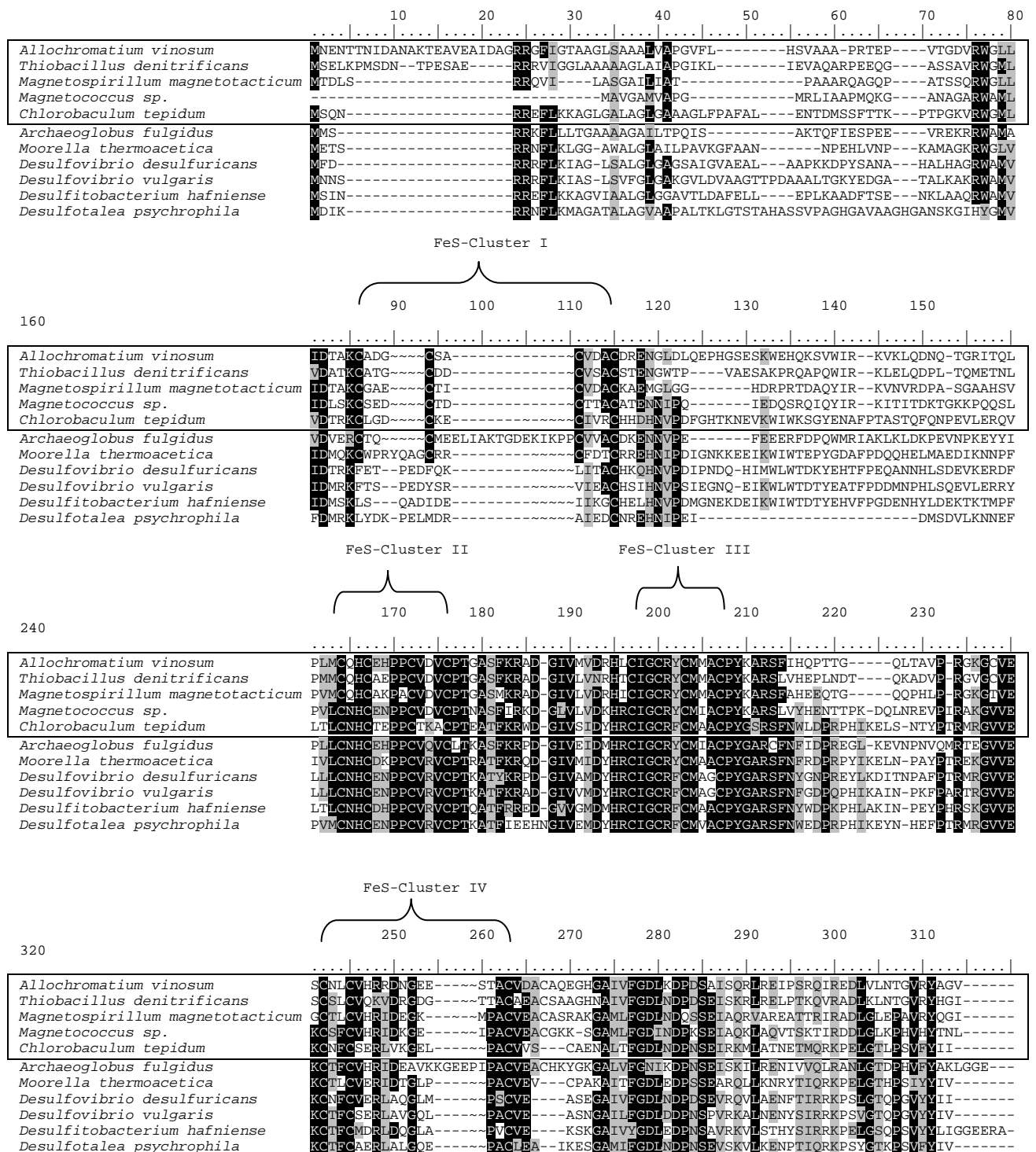


Abb. 3.20: Nachbearbeitetes Alignment der DsrO-Proteine. Das Alignment wurde an verschiedenen Stelle mit dem Programm Bioedit nachbearbeitet, um die (möglicherweise) konservierten Cysteinreste besser herauszuarbeiten. Nachträglich eingefügte Lücken sind mit einem ~ gekennzeichnet. Klammern über den Alignments geben die Position der FeS-Cluster an. Alle Sulfidoxidierer sind umrandet.

Zu den mutmaßlichen DsrP-Proteinen ist zu sagen, dass diese auf Sequenzebene wenig konserviert sind. Lücken im Alignment die auf eine bestimmte physiologische Gruppe beschränkt sind, sind selten und meist nur kurz.

3.5.1.5.3 DsrJ

Bei einer Suche mit der DsrJ-Sequenz aus *A. vinosum* finden sich, abgesehen von den Sequenzen aus Organismen mit dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel, nur sehr wenige weitere Suchergebnisse. Bei einigen der dabei gefundenen Proteine handelt es sich ebenfalls um C-Typ-Cytochrome (Proteine aus *Geobacter metallireducens* GS-15, *Geobacter sulfurreducens* PCA und *Photobacterium profundum* SS9), allerdings sind diese Proteine bedeutend größer als die DsrJ-Proteine. Ein Alignment aller DsrJ-Proteine (s. Abb. 3.21) zeigt, dass alle diese Proteine über drei mutmaßliche Häm-c-Bindestellen (CXXCH-Motiv) verfügen (auch wenn die Sequenz aus *T. denitrificans* als ein Tetra-Häm-Protein annotiert ist). Auffallend ist, dass alle Sulfidoxidierer (mit Ausnahme von *C. tepidum*) nach dem ersten Cysteinrest des dritten Häm-Bindemotivs einen Phenylalaninrest besitzen, während bei Proteinen aus Sulfat-/Sulfit-Reduzierern dort ein Tryptophanrest zu finden ist. Außerdem tritt wieder eine für Sulfidoxidierer (mit Ausnahme von *C. tepidum*) charakteristische Lücke im Alignment auf (s. Abb. 3.21).

Häm c-Gruppen erfordern nicht nur CXXCH-Motive, an die sie kovalent gebunden werden, sondern auch Histidin-, Methionin- oder Cysteinreste, über die das Eisen der Hämgruppe komplexiert wird. In der Tat finden sich N-terminal mehrere konservierte Aminosäurereste, die hierfür in Frage kommen (Cys46, Met53, His57 und Met58, Nummerierung gemessen an der Sequenz aus *A. vinosum*).

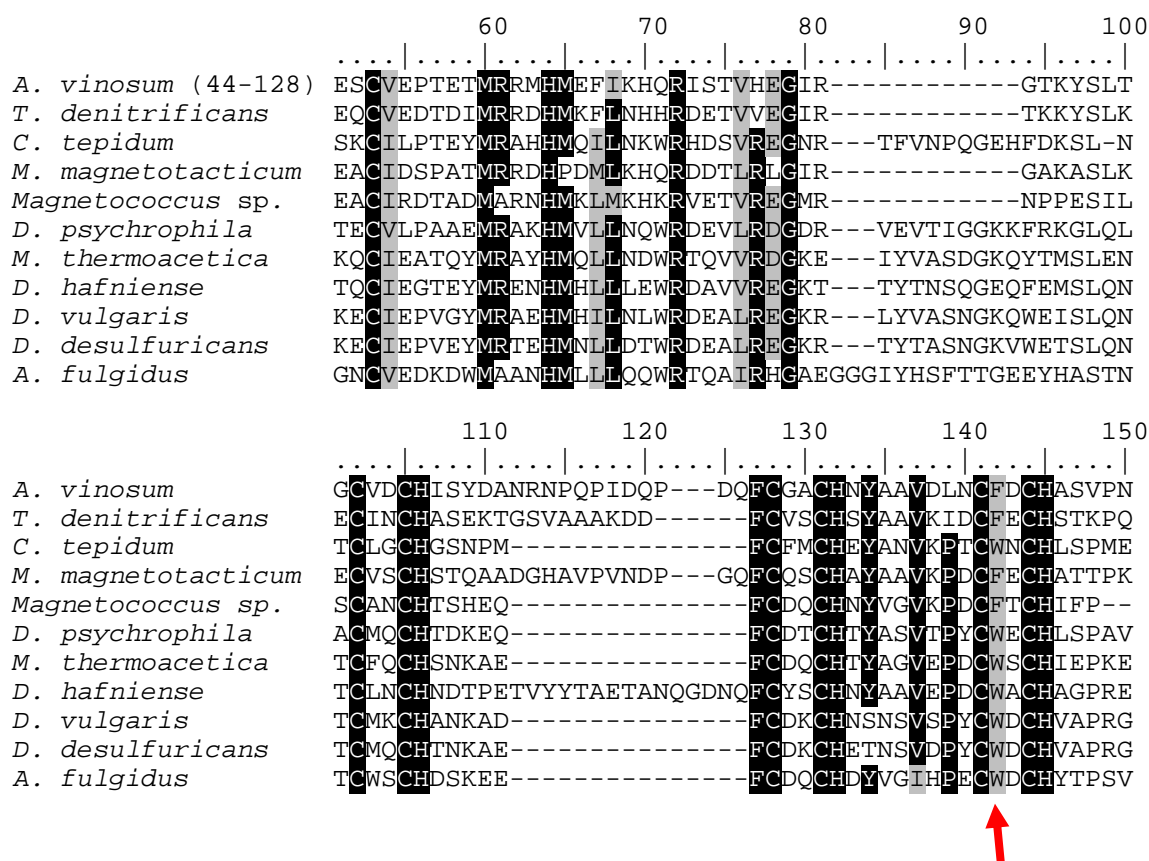


Abb. 3.21: Ausschnitt aus dem Alignment der zu DsrJ homologen mutmaßlichen Dsr-Proteine. Gezeigt ist die Region mit den Häm-Bindemotiven. Der rote Pfeil deutet auf den Phenylalaninrest der bei Sulfidoxidierern, bzw. den Tryptophanrest der bei Sulfat-/Sulfit-Reduzierern konserviert ist.

3.5.1.6 *DsrN*

Auch bei *DsrN* treten bei einer PSI-BLAST-Suche wieder die bereits bekannten Organismennamen auf und zwar sowohl solche mit oxidativem, als auch solche mit reduktivem Stoffwechsel. Hinzu kommen diesmal noch einige weitere Arten mit reduktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel: *Thermodesulforhabdus norvegica*, *Desulfobacula toluolica* und *Desulfobacter vibriiformis*.

3.5.1.7 *DsrRS*

Zu *DsrR* und *DsrS* konnten nicht sehr viele Homologien in Organismen mit dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel gefunden werden. Mutmaßliche homologe Proteine zu *DsrR* und *DsrS* gibt es nach derzeitigem Kenntnisstand außer in *A. vinosum* nur noch in *T. denitrificans* und (eventuell bei *DsrR*) in *Magnetospirillum magnetotacticum*. Ein *DsrR*-Stammbaum wird weiter unten in Abb. 3.26 gezeigt.

3.5.2 Dsr-Operons in den einzelnen Organismen

Ausgehend von den Ergebnissen der BLAST-Suche wurden die zu den jeweiligen mutmaßlichen *dsr*-Genen benachbarten Gene betrachtet, um die Struktur der Operons in den Organismen bestimmen zu können. Abb. 3.22 und Abb. 3.23 zeigen Übersichtsgraphiken.

Bei den Sulfid-Oxidierern (s. Abb. 3.22) konnten fünf phototrophe (*A. vinosum*, *C. tepidum*, *C. limicola*, *C. phaeobacteroides* BS1 und DMS266) und drei chemotrophe Organismen identifiziert werden, die über *dsr*-Operons mit Genen für die Proteine des DsrMKJOP-Komplexes verfügen. Das *dsr*-Operon von *A. vinosum* wurde bereits in der Einleitung hinreichend erörtert und soll daher hier nicht weiter besprochen werden. *C. tepidum* verfügt über zwei *dsr*-Operons. Beiden gemein sind Gene für die Proteine DsrABC und N. Die aus den Gensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz dieser Proteine ist weitgehend identisch, so dass anzunehmen ist, dass vor kurzem eine Verdopplung dieser Gene stattgefunden hat. Die DsrB-Sequenz im ersten oben abgebildeten *dsr*-Operon aus *C. tepidum* weist eine Leserasterverschiebung auf, möglicherweise wird dieses Gen also nicht abgelesen. *DsrMKJOP*-Genen treten nur im ersten Operon auf. Ihnen voran gehen zwei kleine Gene. Das zweite dieser Gene (mutmaßliches Genprodukt: NP_663119) findet sich sonst nur bei Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel, die über *dsrMKJOP*-Gene verfügen. Es kommt dort fast immer benachbart zu diesen Genen vor und wird im Folgenden daher als „*dsrT*“-Gen bezeichnet.

Thiobacillus denitrificans verfügt, abgesehen von *A. vinosum* als einziger Organismus mit Schwefelmetabolismus über die Gene *dsrR* und *dsrS*, allerdings ist nur das *dsrR*-Gen auch mit anderen *dsr*-Genen assoziiert. *dsrS* liegt an einer anderen Stelle im Genom. Das Haupt-*dsr*-Operon des Organismus ist abgesehen von *dsrA* und *B*, die vorne fehlen und *dsrS*, das hinten fehlt, in der Abfolge der Gene identisch mit dem *dsr*-Operon aus *A. vinosum*. Auffallend ist, dass *dsrA* und *dsrC* dreimal im Genom vorkommen. Nur eines der *dsrA*-Gene (ZP_00334394) ist allerdings mit einem *dsrB*-Gen assoziiert. In der Nähe dieser beiden Gene liegt in umgekehrter Leserichtung ein zu *dsrC* homologes Gen und unmittelbar daneben eine mutmaßliche Thiosulfat-Schwefeltransferase (Rhodanese). Das zweite und das dritte *dsrA*-Gen (ZP_00335544 und ZP_00335499) liegen isoliert. In der Nähe des dritten *dsrA*-Gens (ZP_00335499) findet sich allerdings, getrennt durch drei weitere mutmaßliche Gene ohne offensichtlichen Bezug zum Schwefelstoffwechsel, stromaufwärts ein zu *dsrC*-homologes Gen (ZP_00335503). Stromabwärts liegen zudem ein *hupS* und ein *hupL*-Gen, die hier wie auch bei *Thiocapsa roseopersicina* und *A. vinosum* zwei Gene einschließen, die zu *dsrM* und *dsrK* homolog sind (Rakhely et al. 1998; Dahl et al. 1999).

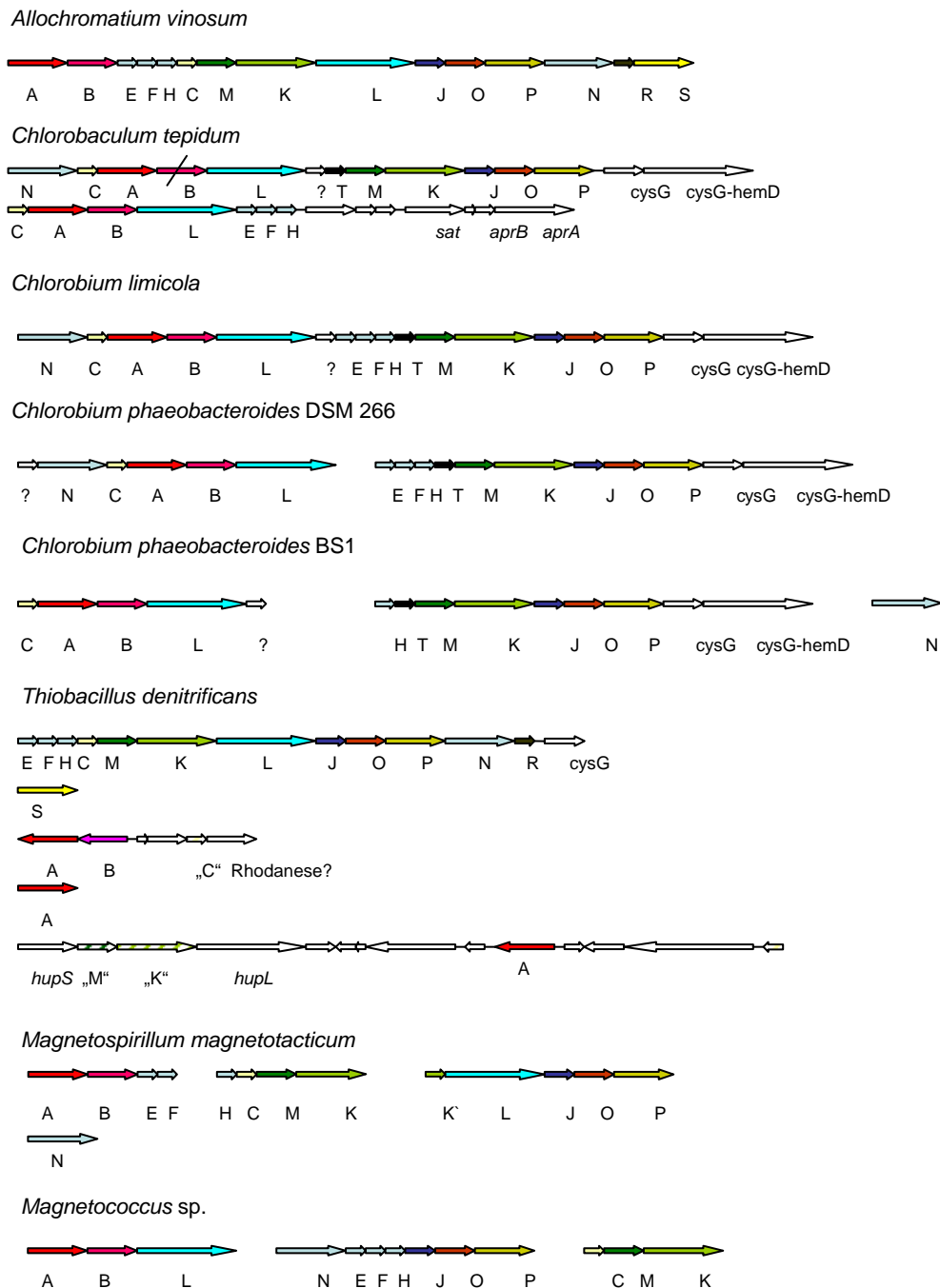


Abb. 3.22: Übersicht über die *dsr*-Gene bei Organismen mit oxidativ-dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel. Die Farbcodierung der einzelnen *dsr*-Gene ist in allen Operons gleich. Weiß eingezeichnete Gene gehören nicht zu den aus *A. vinosum* bekannten *dsr*-Genen. Schrägstriche durch die Gene weisen auf Leserasterverschiebungen hin. In Anführungszeichen gesetzte Gene weisen zwar Homologien zu *dsr*-Genen auf, sind aber wahrscheinlich keine „echte“ *dsr*-Gene. Abkürzungen: *cysG*: Sirohäm synthasegen, *cysG-hemD*: Fusionsprotein aus *cysG* einer Uroporphyrinogen-III-Synthase, *aprA,B*: Gene für die Untereinheiten der Aps-Reduktase, *sat*: ATP-Sulfurylase-Gen; *hupS*, *L*: Hydrogenasegene.

Auch bei *Magnetospirillum magnetotacticum* und *Magnetococcus* sp. liegen bislang nur Rohsequenzen des Genoms vor. Dies bedingt, dass hier die *dsr*-Gene auf mehrere bislang noch nicht zusammengefügte DNA-Abschnitte verteilt sind. Es ist also gut möglich, dass die hier zusammenhanglos dargestellten *dsr*-Gengruppen Bestandteil jeweils eines einzigen Operons sind, dies konnte jedoch auf Grundlage der aktuell verfügbaren Daten nicht ermittelt werden. Dargestellt ist die vermutete Reihenfolge. Insbesondere das *dsrK*- und das *dsrK'*-Gen von *M. magnetotacticum* könnten verschiedene Abschnitte eines einzigen Gens sein, da sie jeweils entweder zum N-Terminus, bzw. zum C-Terminus des *dsrK*-Gens von *A. vinosum* homolog sind.

Die beiden in Abb. 3.22 dargestellten Operons aus *Chlorobium limicola* und *C. phaeobacteroides* wurden erst kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit in der Datenbank veröffentlicht. Von beiden Organismen liegen bislang ebenfalls nur Rohsequenzen vor. Offensichtlich besitzen diese Chlorobien aber die gleiche Ausstattung an *dsr*-Genen wie *C. tepidum*. Die in den Genomen der vier Chlorobiaceen in Abb. 3.26 mit einem „?“ bezeichneten Gene sind zueinander homolog. Ein entsprechendes Gen findet sich auch im Genom von *Magnetococcus* sp. (mutmaßliches Genprodukt: ZP_00290157).

Ein Vergleich der mutmaßlichen *dsr*-Operons aus Organismen mit reduktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel (s. Abb. 3.23) zeigt bereits auf den ersten Blick einige Unterschiede. Seit längerem ist bekannt, dass das *dsr(v)D*-Gen auf den reduktiven Stoffwechseltyp beschränkt ist. Bei den oben dargestellten Organismen tritt es auch meist auf, bei *D. hafniense* fehlt es aber offensichtlich. Auch durch eine gezielte Suche im Genom konnte kein entsprechendes Gen gefunden werden. Ein Vergleich der Operons zeigt aber auch, dass das oben als „*dsrT*“ bezeichnete Gen offensichtlich bei allen dargestellten Organismen zu finden ist. Indes fehlen bei Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel die Gene *dsrEFH*, *dsrL*, *dsrR* und *dsrS*. *dsrC*-Gene sind in allen Fällen vorhanden, liegen aber meist isoliert im Genom. *Moorella thermoacetica* besitzt zwei mutmaßliche *dsrC*-Gene hintereinander, wobei aber nur die Sequenz des von dem ersten Gen codierten Proteins (ZP_00331283) bei phylogenetischen Analysen mit anderen *dsrC*-Genen in ein Cluster fällt. Nur dieses (mutmaßliche) Protein weist außerdem auch den ersten der beiden konservierten konservierten Cysteinreste auf, der für „echte“ Dsr-Proteine typisch ist.

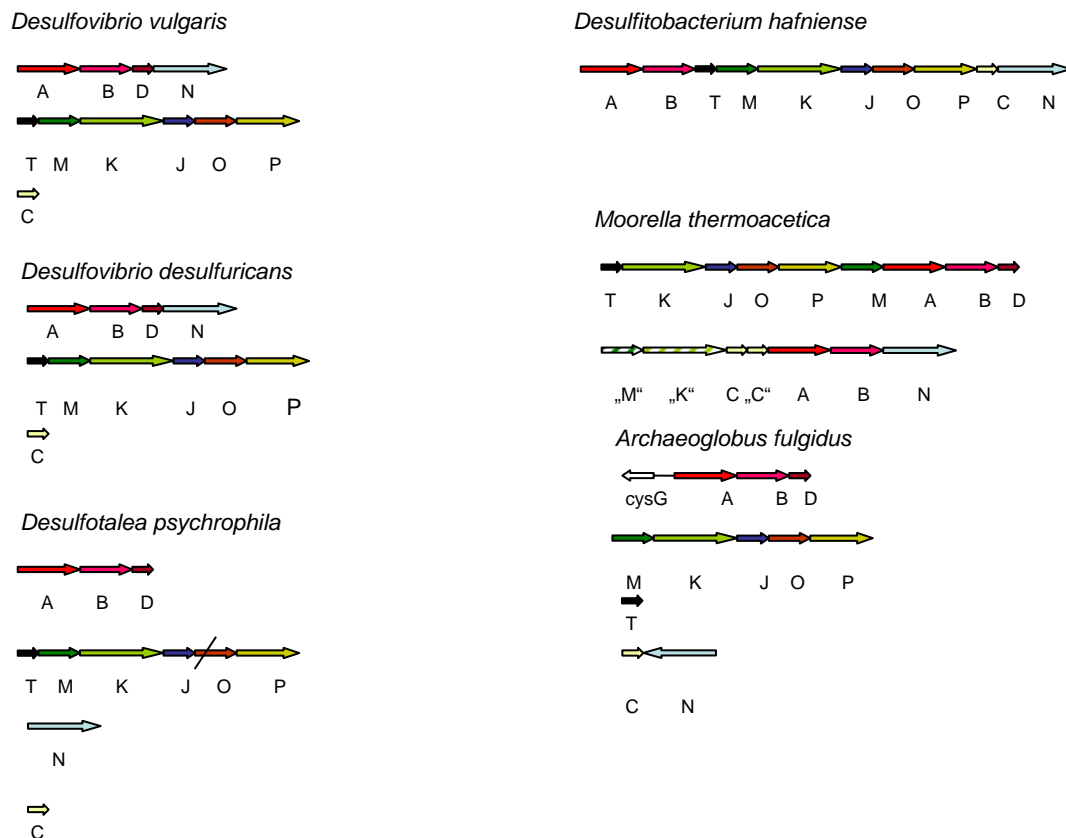


Abb. 3.23: Übersicht über die *dsr*-Gene bei Organismen mit reaktiv-dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel. Die Farbcodierung der einzelnen *dsr*-Gene ist in allen Operons gleich und entspricht der Codierung in Abb. 3.26. Schrägstriche durch die Gene weisen auf Leserasterverschiebungen hin. In Anführungszeichen gesetzte Gene weisen zwar Homologien zu *dsr*-Genen auf, sind aber wahrscheinlich keine „echte“ *dsr*-Gene.

Bei dem *dsrTMKJOP*-Operon aus *Desulfotalea psychrophila* wird in der Datenbank vor dem *dsrO*-Gen ein weiteres kleines Gen angegeben. Eine BLAST-Suche mit diesem Gen liefert auf den ersten Blick nur wenige Ergebnisse. Ein genauerer Blick auf die Suchergebnisse zeigt allerdings, dass unter diesen Ergebnissen vor allem zu DsrO-homologe Proteine aus den oben angeführten Operons von Sulfat-/Sulfit-Reduzierern sind. Um die Beziehung dieser beiden zu *dsrO* direkt oder indirekt homologen Proteine zu untersuchen wurden *in silico* Dot-Blots durchgeführt. Dabei werden zwei Proteine, die verglichen werden sollen auf die x- und die y-Achse eines Diagramms geschrieben und identische, bzw. ähnliche Aminosäuren in den Feldern des Diagramms markiert. Auf diese Weise ist ein einfacher Vergleich möglich, welche Bereiche der Proteine homologisierbar sind. Das Ergebnis der Dot Blots ist in Abb. 3.24 zu sehen: Offensichtlich entsprechen der N-Terminus des ersten Proteins und der C-Terminus des zweiten Proteins dem zu DsrO-homologen Protein aus *Moorella thermoacetica*.



Abb. 3.24: *In silico* Dot-Blot-Vergleich des zu DsrO homologen Proteins ZP_00329190 aus *Moorella thermoacetica* mit dem mutmaßlichen Protein YP_066808 aus *Desulfotalea psychrophila* (1) und mit dem mutmaßlichen Protein YP_066807 aus *Desulfotalea psychrophila* (2).

Das Ergebnis war, dass offensichtlich der N-Terminus des ersten Proteins (YP_066808) und der C-Terminus des zweiten Proteins (YP_066807) zu *dsrO* homolog ist. Da zudem nur das erste Protein über ein mutmaßliches Doppelarginin-Signalpeptid verfügt und die FeS-Cluster-Bindestellen nur in dem zweiten Protein vorhanden waren, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um zwei Teile eines Proteins handelt.

3.5.2.1 „DsrT“

Bei einer genauen Betrachtung der vorliegenden Operons fällt auf, dass bei allen Organismen mit reduktivem Stoffwechsel ein kleines Gen, meist in Verbindung mit den *dsrMKJOP*-Genen, vorliegt das ich hier vorläufig als „*dsrT*“ bezeichnen möchte. Die einzigen Sulfidoxidierer, die über *dsrT* verfügen, sind die Chlorobiaceae. Bei *Archaeoglobus fulgidus* schien das *dsrT*-Gen zunächst zu fehlen. Eine genauere Suche im Genom ergab dann aber, dass ein solches Protein (NP_069748) an anderer Stelle kodiert wird. Um mehr über das mutmaßliche aus der DNA-Sequenz abgeleitete „DsrT“-Protein zu erfahren, wurden eine Reihe von Analysen vorgenommen. Dabei ergab sich folgendes Bild:

„DsrT“ ist wahrscheinlich ein kleines cytoplasmatisches Protein ohne Cofaktoren. Die einzelnen Proteine umfassen 131 (*D. vulgaris*) bis 196 Aminosäuren (*D. hafniense*) und haben damit eine molekulare Masse von 14 bis 21 kDa. Der isoelektrische Punkt (ermittelt mit dem Programm ProtParam) bewegt sich zwischen 4,92 (*A. fulgidus*) und 6,85 (*M. thermoacetica*). Lokale und globale multiple Alignments ergaben einen C-terminal gelegenen konservierten Bereich (s. Abb. 3.25).

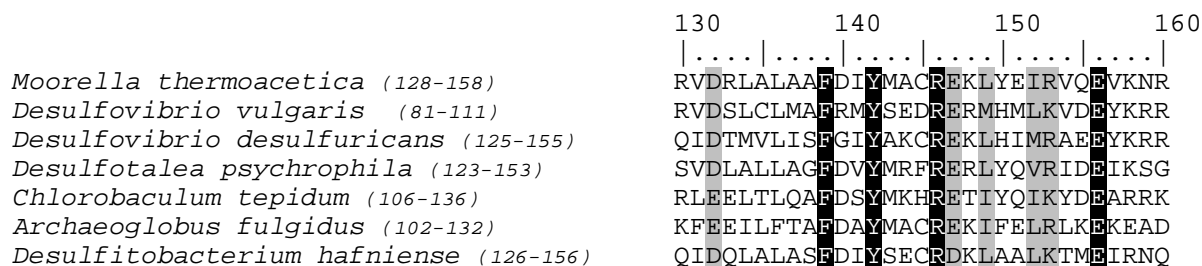


Abb. 3.25: Ausschnitt aus dem Alignment der bekannten „DsrT“-Proteine. Zu sehen ist der konservierteste Bereich des Alignments

Andere Regionen ließen sich schlechter homologisieren und führten zu widersprüchlichen Ergebnissen bei globalen und lokalen multiplen Alignments. Wendet man das Vorhersage-Programme für die Sekundärstruktur von Proteinen Gor IV (Garnier et al. 1996) auf die einzelnen mutmaßlichen DsrT-Proteine an, so zeigt sich, daß in allen Fällen für den konservierten Bereich eine α -Helix wahrscheinlich ist.

In der Hoffnung mehr über die Bedeutung des konservierten Bereichs zu erfahren, wurden mit der Sequenzmuster Fx_2Yx_3RE und den „DsrT“-Sequenzen PHI-BLAST-Suchen durchgeführt. Anders als bei PSI-BLAST, bei dem es zu einer quantitativen Überbewertung konservierter Bereiche kommt, wird bei PHI-BLAST eine qualitative Überbewertung des eingegebenen Sequenzmusters vorgenommen. Dabei ergaben sich drei weitere Suchergebnisse, ein Protein mit Signalpeptid (NP_253689) aus *Pseudomonas aeruginosa*, ein mutmaßlicher Transkriptionsregulator (AAP58580) aus einem *Acidobacterium* und eine Ornithin-Carbamoyltransferase (NC_252227) aus *Pseudomonas aeruginosa*.

3.5.3 Suche in der Sargassosee-Datenbank

Nach den einzelnen Dsr-Proteinen wurde auch in der getrennt von der allgemeinen Sequenzdatenbank am NCBI-Server vorliegenden Sargassosee-Datenbank gesucht. Bei Stammbaumanalysen clustern meist drei bis sechs der dabei gefundenen Sequenzen zusammen mit den Sulfidoxidierern. Zu sehen ist dies bereits am Beispiel von zu DsrM-homologen Sequenzen in Abb. 3.26 Für DsrR wurden insgesamt sieben homologe Sequenzen in der Datenbank gefunden. Zwei der sieben Sequenzen fallen bei Stammbaumanalysen mit den DsrR-Proteinen aus *A. vinosum* und *T. denitrificans* in ein Cluster. Bei einer dieser beiden Sequenzen konnten auf dem zugrundeliegenden DNA-Abschnitt auch noch weitere *dsr*-Genen gefunden werden.

Unklar ist die Funktion des zu DsrR homologen Proteins aus *M. magnetotacticum*. Das Protein clustert nicht zusammen mit den Proteinen aus *A. vinosum* und *T. denitrificans*.

Für DsrS gab es nur zwei Treffer. Deren codierende Sequenz war allerdings zu kurz, als das andere *dsr*-Gene in der Nachbarschaft gefunden werden konnten.

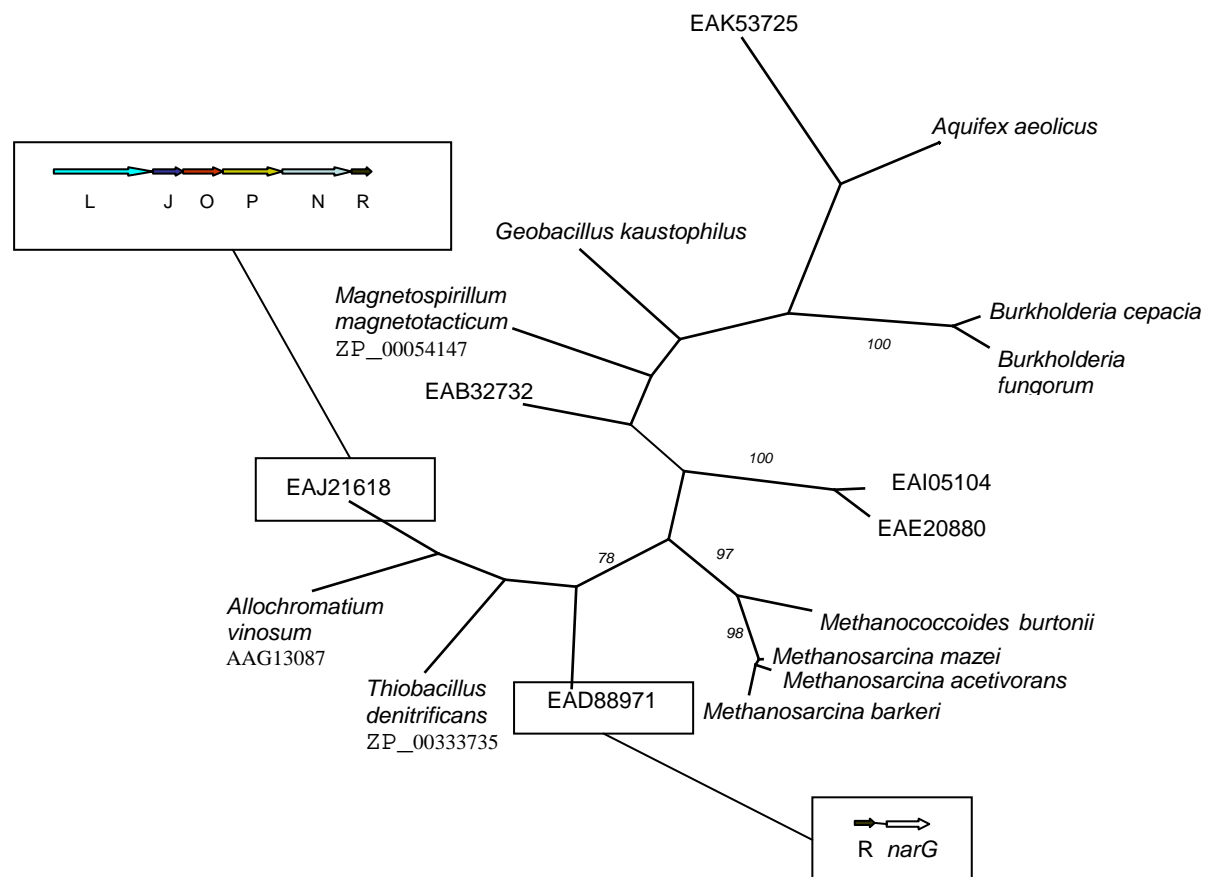


Abb. 3.26: Maximum Parsimony Baum für die 12 ersten zu DsrR homologen mutmaßlichen Proteine, inklusive der ersten 6 Proteinsequenzen aus der Sargassosee-Datenbank (mit der Datenbanknummer bezeichnet). Baumlänge: 712; CI = 0,7823; RI = 0,6737. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Bei den mutmaßlichen Proteinen aus der Sargassosee, die mit der DsrR-Sequenz aus *A. vinosum* und *T. denitrificans* in ein Cluster fallen ist die Genstruktur der DNA-Sequenz mitangegeben (siehe Kasten). *dsr*-Gene konnten nur in der Nähe des Gens für das Protein EAJ21618 gefunden werden. Die DNA-Sequenz auf dem das Protein EAD88971 kodiert wird beinhaltet außer dem *dsrR*-Gen nur noch ein Gen für ein mutmaßliches Nitrat-/Nitritreduktase Sensorprotein (*narG*).

3.5.4 Phylogenetische Analyse mutmaßlicher Dsr-Proteine

Im Rahmen der oben beschriebenen BLAST-Suchen waren bereits phylogenetische Bäume erstellt worden, um die mutmaßlichen Dsr-Proteine leichter aus der Masse der gefundenen Proteine herausfiltern zu können. Hier sollen nun weitere Analysen mit einem Schwerpunkt auf den mutmaßlichen DsrMKJOP-Proteinen vorgestellt werden. Die mutmaßlichen Dsr-Proteine aus *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266, *C. phaeobacteroides* BS1 und *C. limicola* DSM 245 werden dabei zunächst nicht berücksichtigt und später in einem eigenen Unterkapitel behandelt, da die hier gezeigten Analysen bereits abgeschlossen waren, als die Sequenzen aus diesen Organismen in die Datenbank gestellt wurden.

In Abb. 3.27 sind als Vergleich ein Maximum Parsimony und ein NJ-Baum für die zu DsrM homologen Proteine gezeigt. Ein mit dem Programm ProML erzeugter Maximum Likelihood-Baum (nicht gezeigt; Matrix: JTT; -ln Likelihood: 5738,03299) besitzt das gleiche Verzweigungsmuster wie der NJ-Baum. Phylogenetische Bäume auf der Basis der zugrunde liegenden DNA-Sequenzen (ebenfalls nicht gezeigt) unterschieden sich vor allem im Verzweigungsmuster der Sulfat-/Sulfitreduzierergruppe, das ohnehin bei den dargestellten Bäumen nicht durch hohe Bootstrap-Werte abgesichert ist. Es fällt auf, dass sich die Gruppe der Sulfidoxidierer deutlich von den Sulfat-/Sulfit-Reduzierern absetzt. Eine Ausnahme bildet lediglich die Sequenz des Proteins aus *Chlorobaculum tepidum*, die zusammen mit Sequenzen aus Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel clustert. Das Protein aus *Archaeoglobus fulgidus* nimmt eine Position in der Mitte der beiden Cluster ein.

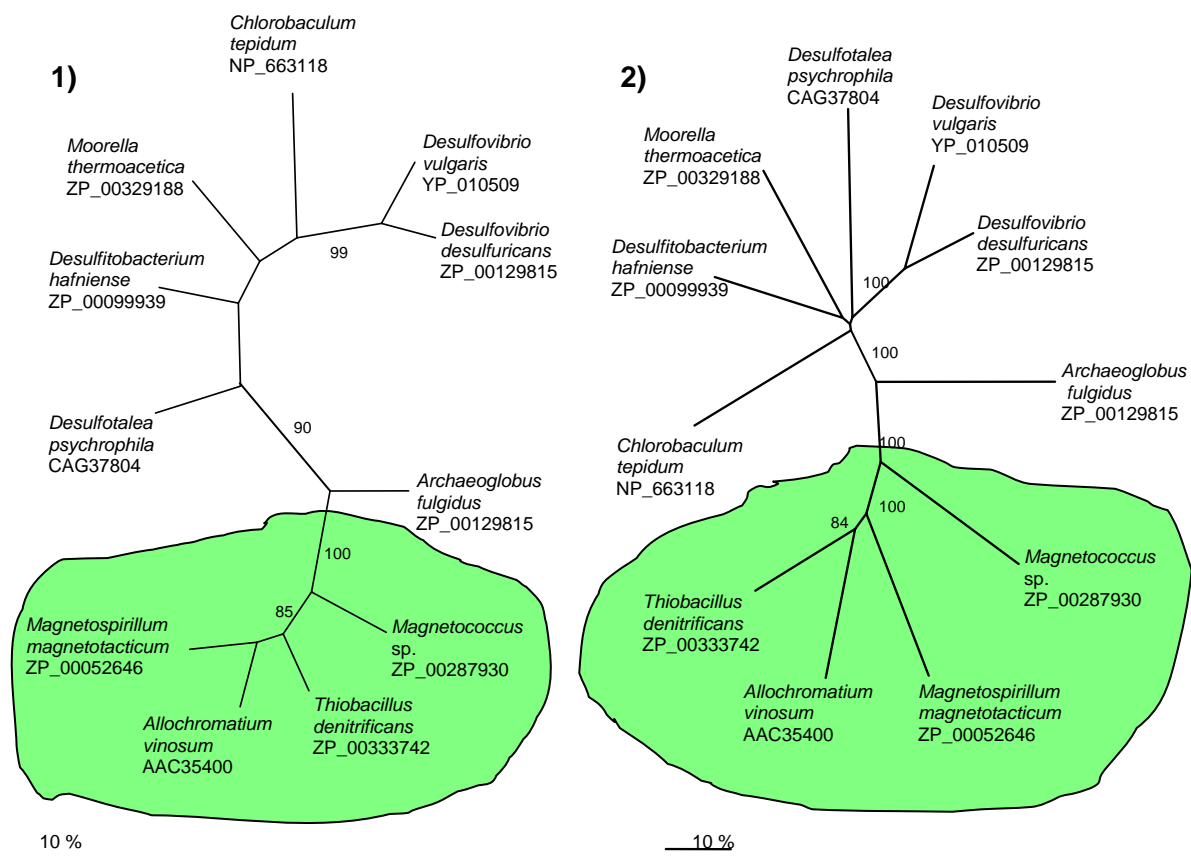


Abb. 3.27: Maximum-Parsimony-Baum (1) und Neighbor-Joining-Baum (2) für die zu DsrM homologen mutmaßlichen Dsr-Proteine. Baumlänge des Parsimony-Baumes: 1019; CI = 0,8175; RI = 0,5867. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Die Gruppe der Sulfidoxidierer ist grün umrandet.

Sehr ähnlich ist die Situation bei phylogenetischen Bäumen mit zu DsrK und zu DsrO homologen Proteinen (s. Abb. 3.28). Da sich auch hier die mit verschiedenen Methoden

erzeugten Bäume weitgehend ähneln sind in den folgenden Abbildungen nur noch die Maximum-Parsimony-Bäume gezeigt.

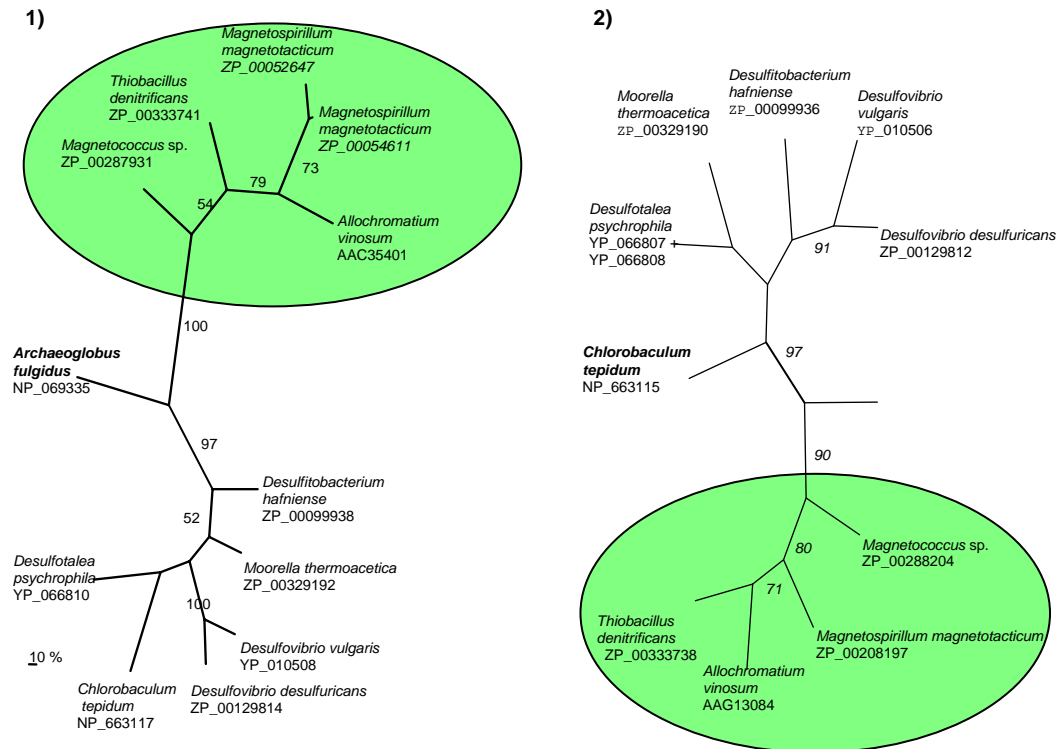


Abb. 3.28: Maximum-Parsimony-Baum für die zu DsrK (1) und zu DsrO (2) homologen mutmaßlichen Dsr-Proteine. Baumlänge DsrK-Baumes: 1416; CI = 0,8227; RI = 0,6723. Baumlänge des DsrO-Baumes: 995; CI = 0,8377; RI = 0,5742. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Das mutmaßliche DsrO-Protein aus *Desulfotalea psychrophila*, in dem laut Datenbank eine Leserasterverschiebung vorkommt, wurde aus beiden Teilsequenzen zusammenkopiert. Die Gruppe der Sulfidoxidierer (ohne *C. tepidum*) ist grün unterlegt.

Für DsrJ konnte kein eindeutiger Parsimony-Baum gefunden werden, sondern nur zwei gleichermaßen sparsame Bäume. Beide sind in Abb. 3.29 gezeigt. In beiden Bäumen gruppiert das Protein aus *C. tepidum* wieder zusammen mit den Sulfat-/Sulfit-Reduzierern. Die Sequenz aus *A. fulgidus* liegt ebenfalls wieder an der Grenze zwischen beiden Gruppen.

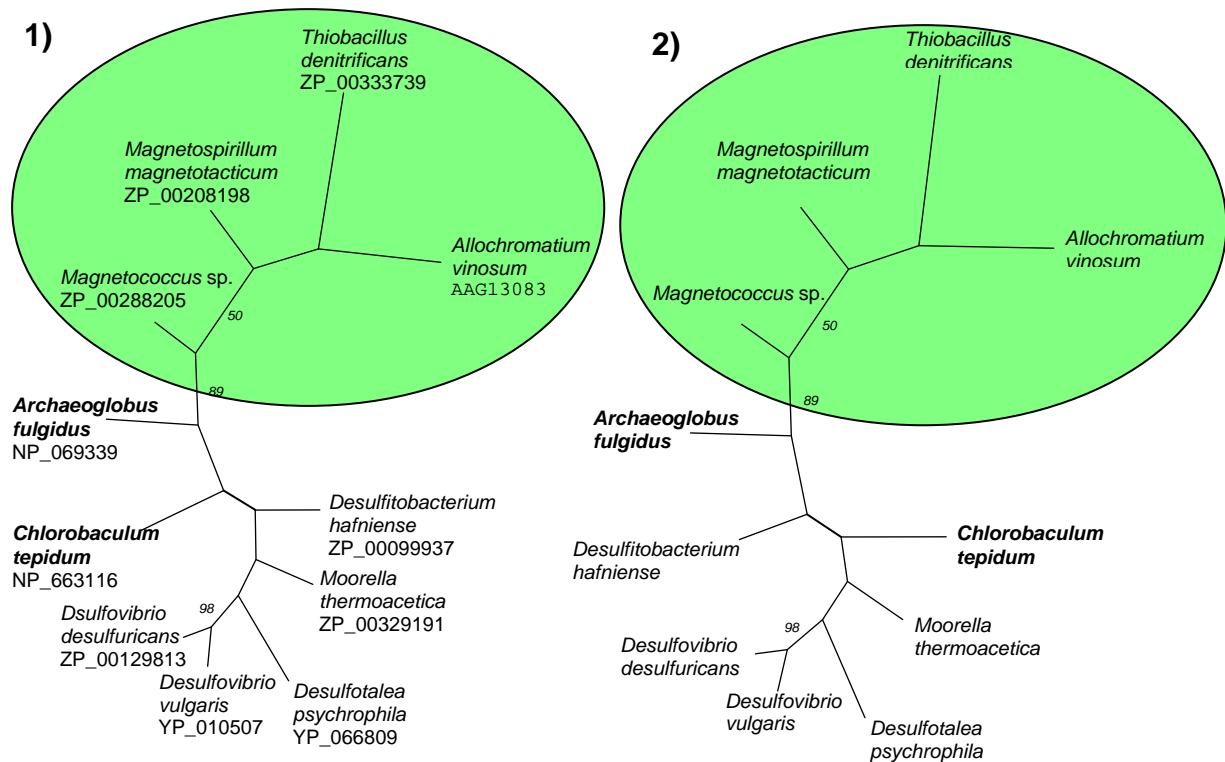


Abb. 3.29: Vergleich zweier gleichermaßen sparsamer Parsimony-Bäume für DsrJ. Baumlänge: 602; CI = 0,8837; RI = 0,6023. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Die Gruppe der Sulfidoxidierer ist grün unterlegt.

Auch bei dem Parsimony-Baum mit zu DsrP homologen Proteinen (s. Abb. 3.30) fällt die Sequenz aus *Chlorobaculum tepidum* in die Gruppe der Sulfat-/Sulfit-Reduzierer. Allerdings erscheint hier zusätzlich die Sequenz des Proteins aus *Archaeoglobus fulgidus* auf einem Ast mit den Sulfidoxidierern. Bei den vorher gezeigten Bäumen liegt die entsprechende Sequenz auf der Grenze, so dass *A. fulgidus* hier beiden Gruppen zugeordnet werden könnte.

Die „Fehlgruppierung“ der Sequenzen aus *C. tepidum* und *A. fulgidus* ist auch bei DsrP nicht auf den Parsimony-Baum beschränkt, sondern tritt ebenfalls bei Neighbor-Joining- und Maximum-Likelihood-Bäumen auf.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, dass bei allen phylogenetischen Bäumen, die mit Proteinen der DsrMKJOP-Komplexes erstellt wurden, zwar eine klare Trennung in Sulfidoxidierer und Sulfat-/Sulfitreduzierer erfolgt, die Sequenz aus *C. tepidum* aber immer im „falschen“ Cluster erscheint, während die Sequenz von *A. fulgidus* meist eine mittlere Position zwischen den beiden Clustern einnimmt und zumindest in einem Fall ebenfalls „falsch“ eingeordnet wird.

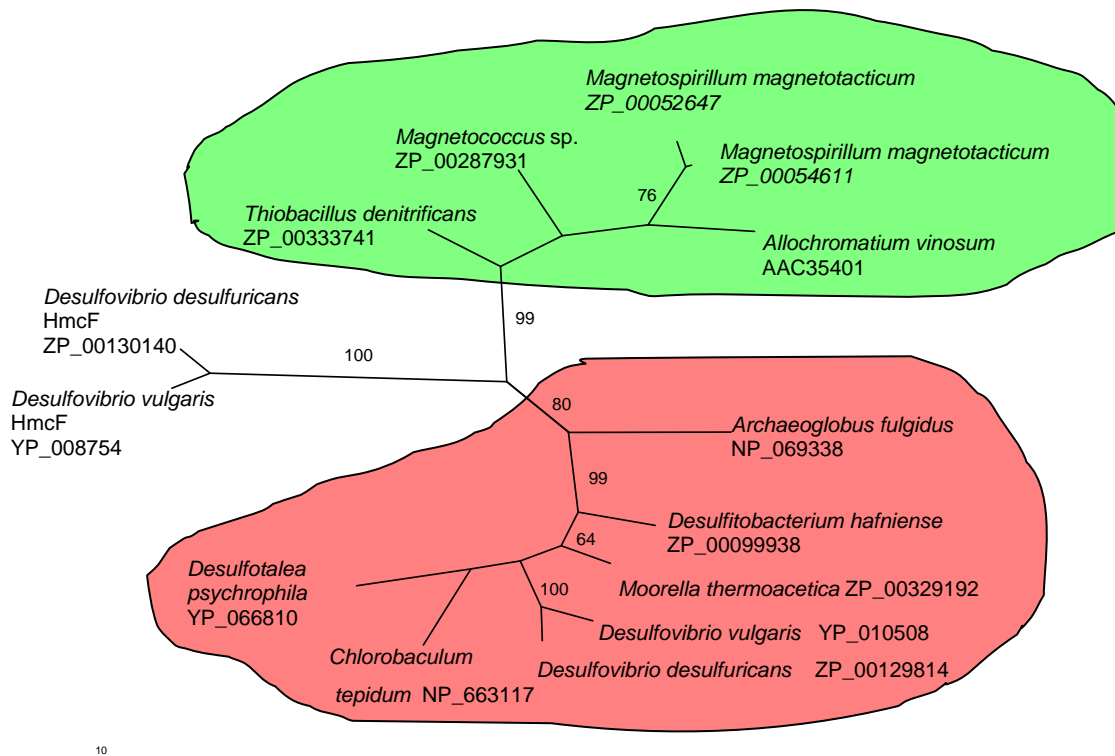


Abb. 3.32: Maximum Parsimony-Baum für DsrK-Proteine, inklusive der homologen Proteine des Hmc-Komplexes aus *D. vulgaris* und *D. desulfuricans*. Baumlänge: 1793, CI = 0,8238, RI = 0,7228. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an.

Bei DsrO war es nach Hinzunahme der Hmc-Proteine nicht mehr möglich einen eindeutigen Parsimony-Baum zu erhalten. Stattdessen wurden drei gleichermaßen „sparsame“ Bäume gefunden. Gezeigt wird in Abb. 3.33 einer dieser Bäume, der als eine Art Zwischenzustand zwischen den anderen beiden Bäumen betrachtet werden kann. Bei dem gezeigten Baum befindet sich die Sequenz des Proteins AF499 aus *A. fulgidus* auf einem gemeinsamen Ast mit den Hmc-Proteinen. Bei den anderen beiden gleichermaßen sparsamen Bäumen tendiert diese Sequenz entweder mehr zu den Sulfid-Oxidierern oder mehr zu den Sulfat-/Sulfitreduzierern. Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass auch schon bei dem DsrP-Baum das entsprechende Protein aus *A. fulgidus* mit den Sulfid-Oxidierern assoziiert war.

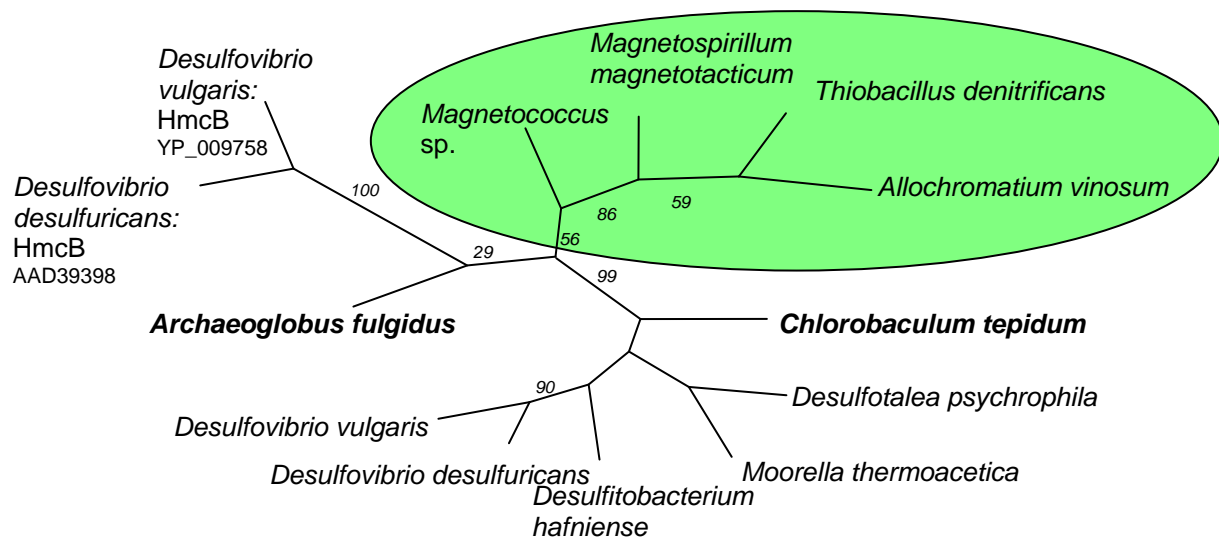


Abb. 3.33: Einer von drei gleichermaßen sparsamen Parsimony-Bäumen für DsrO-Proteine inklusive der entsprechenden Hmc-Proteine. Baumlänge: 1213; CI = 0,8335; RI = 0,6373. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Die Proteinsequenz aus *A. fulgidus* clustert entweder wie hier gezeigt zusammen mit den Hmc-Proteinen oder tendiert mehr zu den Sulfidoxidierern (grün umrandet) oder mehr zu den Sulfat-/Sulfitreduzierern hin. Die Bootstrap-Werte für die entsprechenden Verzweigungen (Nummern an den Kanten des Baumes) sind in allen drei Fällen nicht besonders hoch. Zu den Datenbanknummern s. Abb. 3.33.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Proteine des Hmc-Komplexes offensichtlich nicht zu den Dsr-Proteinen gehören, sondern eine parallele Entwicklung darstellen.

3.5.5 Phylogenetische Bäume mit anderen Dsr-Proteinen

Offensichtlich ist es so, dass bei den Proteinen des DsrMKJOP-Komplexes das jeweilige Protein aus *C. tepidum* (bzw. aus den übrigen Chlorobiaceae) entgegen der Erwartung in Stammbäumen zusammen mit Organismen, die über einen reduktiven Schwefelstoffwechsel verfügen, clustert. Um zu überprüfen, ob dies auf die Proteine des Komplexes beschränkt ist, wurden auch mit allen anderen Dsr-Proteinen, die in beiden physiologischen Gruppen vorkommen (also DsrABC und N) Stammbäume erstellt. Das Ergebnis war in allen Fällen, dass die Sequenz aus *C. tepidum* in der „richtigen“ Gruppe nämlich bei den Sulfidoxidierern zu finden war. Als Beispiel sei hier ein phylogenetischer Baum für DsrN gezeigt (s. Abb. 3.34).

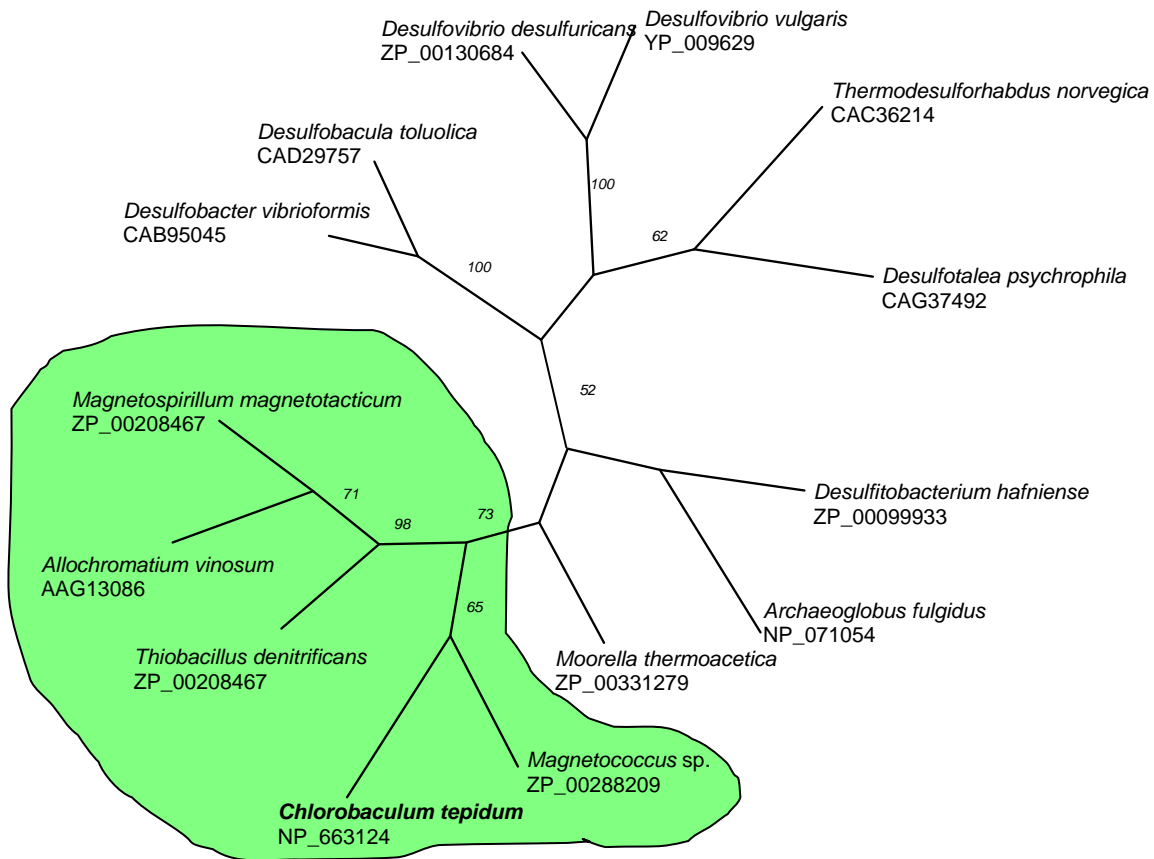


Abb. 3.34: Maximum Parsimony-Baum für DsrN. Baumlänge: 2347; CI = 0,7298, RI = 0,4246. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Wie nach dem Stoffwechselltyp zu erwarten wäre fällt die Sequenz aus *C. tepidum* in das Cluster der Sulfidoxidierer. Die Sequenz aus *A. fulgidus* nimmt ebenfalls eine eindeutige Position ein.

Auch die mutmaßlichen DsrN-Proteine aus *C. phaeobacteroides* DSM 266 und BS1, sowie aus *C. limicola* clustern zusammen mit den Sulfidoxidierern (nicht gezeigt).

3.5.5.1 Phylogenetische Analyse der zu DsrEFH homologen Proteine

Die phylogenetische Analyse wurde nicht nur auf die Proteine beschränkt, die sowohl bei Sulfidoxidierern und Sulfat-/Sulfit-Reduzierern vorkommen, sondern auch auf alle anderen Dsr-Proteine ausgedehnt. Dies führte bei den Proteinen DsrEFH zu interessanten Ergebnissen, die hier abschließend vorgestellt werden sollen.

Es erwies sich zunächst als schwierig phylogenetische Bäume von DsrE zu erzeugen. Während sich bei Bäumen für DsrF und DsrH die bereits bei DsrA und DsrB beobachtete Gruppe der (mutmaßlichen) Sulfidoxidierer klar von den übrigen Sequenzen abhob, entstand bei den Bäumen für DsrE ein zusätzlicher „Trieb“ innerhalb der Sulfidoxidierer-Gruppe. Dieser Trieb umfaßte die Sequenzen YchN aus *E. coli*, das Protein TM0981 aus *Thermotoga maritima* MSB8 und ein Protein aus *Moorella thermoacetica* ATCC39073. Das Protein YchN

ist interessant, da es bereits kristallisiert wurde (Shin et al. 2002). Das Gen für das Protein TM0981 liegt neben Genen, die für DsrF- (TM0980) und DsrH-homologe Proteine (TM0979) kodieren und wurde ebenfalls bereits kristallisiert (Gaspar et al. 2005).

Der aus YchN, TM0981 und dem *Moorella*-Protein bestehende Trieb trat sowohl bei Neighbor Joining-, als auch bei Maximum Parsimony-Bäumen auf. Bei Maximum Likelihood-Bäumen fällt das Protein YchN aus dieser Gruppe heraus, die beiden anderen Proteine verbleiben allerdings innerhalb der Sulfidoxidierer. Ein Blick auf das den Bäumen zugrunde liegenden Alignment macht allerdings schnell klar, dass die Sequenzen der drei problematischen Proteine sich relativ stark von den übrigen Sequenzen unterscheiden (s. Abb. 3.35). Am augenfälligsten ist hierbei der zweite konservierte Cysteinrest (Cys81 zusätzlich zu dem auch bei allen anderen Proteinen konservierten Cys78). Die große Verschiedenheit zwischen den Sequenzen wird auch durch UPGMA-Bäume nahegelegt. Bei diesen Bäumen sondert sich der Zweig der drei genannten Proteine völlig von den übrigen Proteinen ab. UPGMA-Bäume gelten allerdings für phylogenetische Analysen mittlerweile als überholt.

Die Tatsache, dass offensichtlich sehr verschiedene Sequenzen in phylogenetischen Bäumen unerwartet nahe beieinander clustern, lässt vermuten, dass hier ein Phänomen auftritt, das in der Literatur als „Long Branch Attraction“ bekannt ist (Felsenstein 1978, Stefanovic et al. 2004). Es wurde daher beschlossen Bäume mit *in-silico*-Fusionsproteinen zu erzeugen, bei denen dann natürlich das YchN-Protein, da es ohne Partner auftritt, nicht miteinbezogen werden konnte. Außerdem bieten solche Bäume den Vorteil, dass nur Fälle, in denen alle drei Proteine gemeinsam kodiert werden, betrachtet werden und die Information aus allen drei Sequenzen gleichermaßen in die Bäume einfließen. Der über die *in-silico*-Fusionsproteine gewonnen Parsimony-Baum ist in Abb. 3.36 gezeigt. Wie die Abbildung zeigt ragen die Sequenzen aus *M. thermoautotrophicus*, *M. thermoacetica* und *T. maritima* immer noch aus dem Dsr-Cluster heraus. Bei dem Neighbor-Joining-Baum aber bilden diese Sequenzen zumindest nur eine Schwestergruppe zu dem Dsr-Cluster (hier nicht gezeigt).

Ein Vergleich der Alignments der Proteine DsrE, F und H mit dem vorliegenden Stammbaum offenbart interessante Verteilungsmuster bestimmter konservierte Aminosäuren. Wie bereits erwähnt zeigt ein Blick auf die konservierte Cysteinreste, dass die zu DsrE homologen Proteine MTH1357, TM0981 und das zu DsrE homologe *Moorella*-Protein als einzige über zwei konservierte Cytseine verfügen (Cys78 und Cys81 gemessen an der Sequenz aus *A. vinosum*). Andere Organismen besitzen stattdessen einen oder mehrere konservierte

Cysteinreste in ihren zu DsrF- und/oder DsrH-homologen Proteinen. Eine Übersicht über die konservierten Cysteine ist in Tab. 3.1 gegeben:

Konservierte AS-Reste	Organismen	Position
1 Cystein in DsrE	<i>Idiomarina loihiensis</i>	Cys78
2 Cysteine in DsrE	<i>Moorella thermoacetica</i> <i>Thermotoga maritima</i> <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	Cys78 Cys81
1 Cystein in DsrE + 1 Cystein in DsrH	<i>Allochroamium vinosum</i> <i>Chlorobaculum tepidum</i> <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> <i>Magnetococcus</i> sp. <i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Methylococcus capsulatus</i>	DsrE: Cys78 DsrH: Cys20
Je 1 Cystein in DsrE, DsrF und DsrH	<i>Photobacterium profundum</i> <i>Shewanella oneidensis</i> , alle <i>Pseudomonas</i> -Arten	DsrE: Cys78 DsrF: Cys83 DsrH: Cys20
1 Cystein in DsrE + 1 Cystein in DsrF	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Photorhabdus luminescens</i> Alle <i>Vibrio</i> -Arten	DsrE: Cys78 DsrF: Cys83
1 Cystein in DsrE 2 Cysteine in DsrF	<i>Escherichia coli</i> CFT073 und EDL933 <i>Salmonella enterica</i> <i>Shigella flexneri</i>	“DsrE”: Cys78 “DsrF”: Cys80 und Cys83

Tab. 3.1: Übersicht über Zahl und Lage der konservierten Cysteinreste in den einzelnen Organismen.

Nicht nur Lage und Zahl der Cysteinreste korrelieren mit den einzelnen Ästen des Baumes, sondern auch andere Aminosäuren lassen sich, teilweise in größeren Blöcken einzelnen Clustern zuordnen. Ein gutes Beispiel hierfür findet sich am N-Terminus des DsrE-Proteins (s. Abb. 3.35).

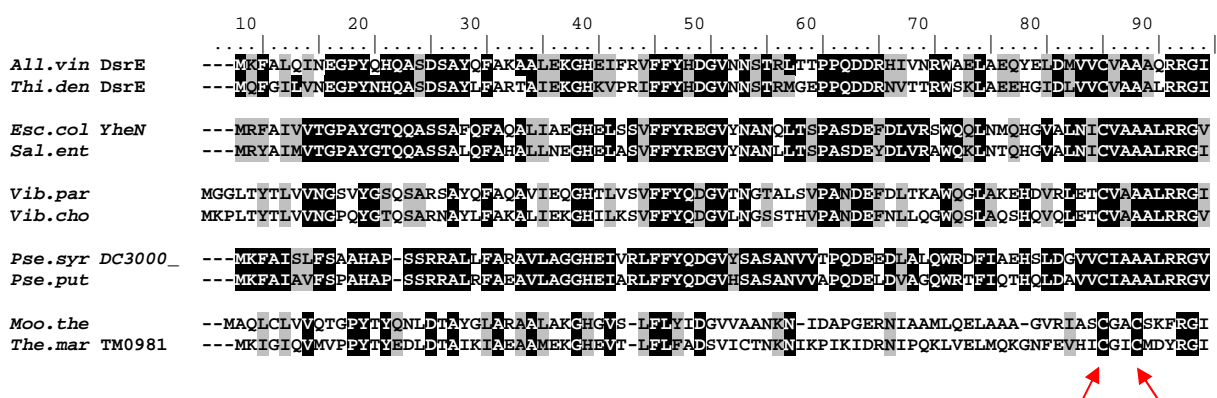


Abb. 3.35: Exemplarischer Vergleich der verschiedenen Gruppen der zu DsrE homologen Proteine. Von jeder Gruppe wurde jeweils ein Alignment erzeugt, bei dem alle in der Gruppe gemeinsam vorkommenden Aminosäuren Schwarz (identische Aminosäuren) oder Grau (ähnliche Aminosäuren) markiert wurden. Anschließend wurden je zwei Vertreter der Gruppe in diesem Alignment zusammenkopiert. Die Proteine aus *Moorella thermoacetica* und *Thermotoga maritima* setzen sich recht deutlich von den übrigen Proteinen ab. Die roten Pfeile deuten auf die Cysteinreste Cys78 und Cys81.

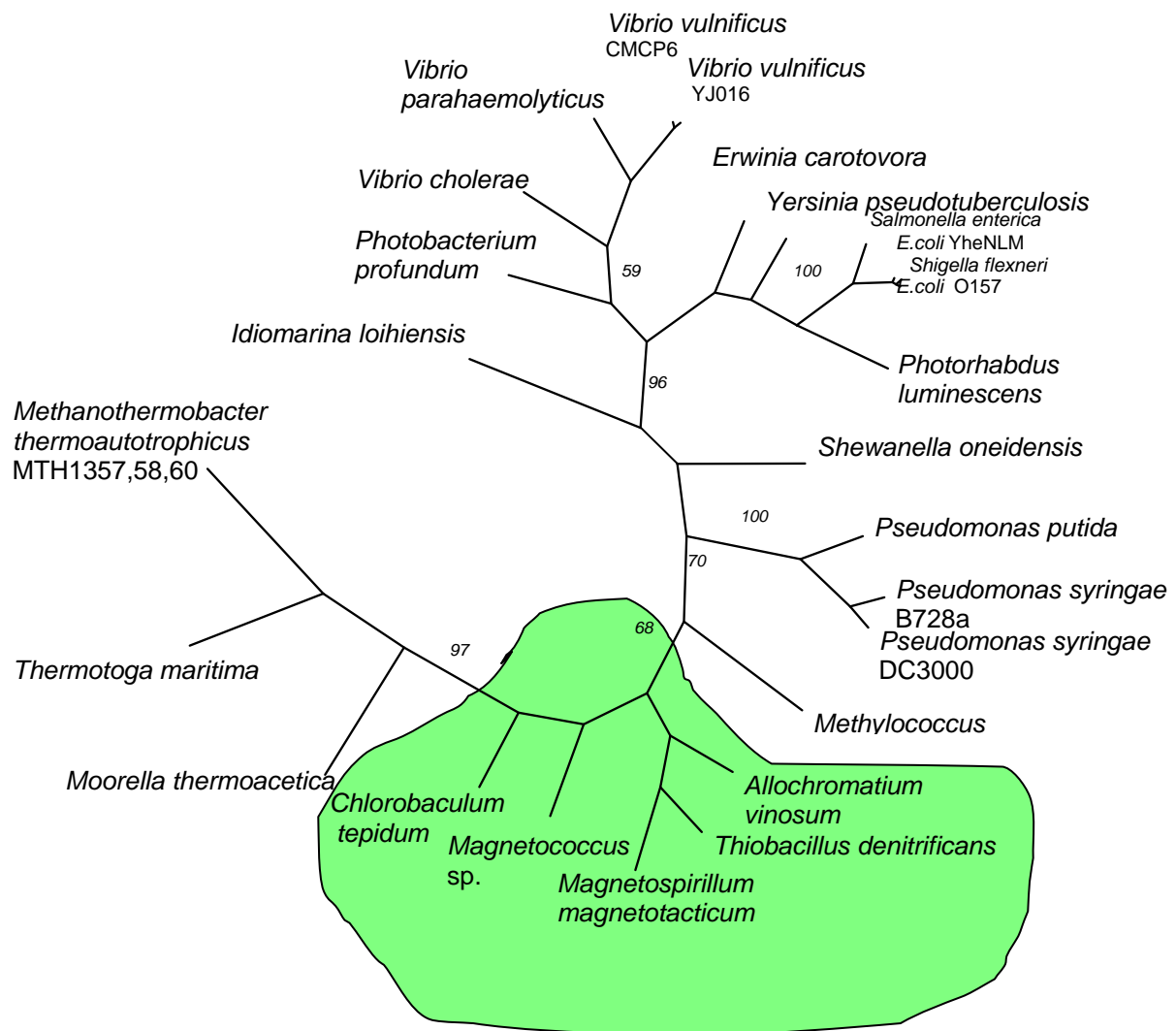


Abb. 3.36: Maximum Parsimony-Baum ohne Astlängen der *in-silico*-Fusionsproteine aus zu DsrEF und H homologen Proteinen. Baumlänge: 1873 CI = 0,6567, RI = 0,6200. Die Zahlen an den Ästen geben Bootstrap-Werte an.

Dem Baum liegen die Sequenzen folgender Proteine zugrunde: *A. vinosum*: AAC35396; *T. denitrificans* ZP_00333746; *M. magnetotacticum*: ZP_00053121; *Magnetococcus* sp.: ZP_00288208; *C. tepidum*: CT0855 ; *M. capsulatus*: AAU92625; *S. flexneri*: NP_709119; *E. coli* CFT073 (YheN): NP_755983; *V. vulnificus* CMCP6: AAO09787; *V. vulnificus* YJ016: NP_935828; *S. enterica*: YP_152445; *E. coli* O157: AAG58452; *P. putida*: AAN69587; *S. oneidensis*: NP_717966; *V. parahaemolyticus*: NP_799155; *Y. pseudotuberculosis*: YP_072189; *P. syringae* B728a: ZP_00128303; *P. profundum*: YP_128551; *T. maritima*: NP_228789; *M. thermoacetica*: ZP_00330986; *P. luminescens*: NP_927779; *P. syringae* DC3000: NP_793121; *V. cholerae*: AAF93529; *E. carotova*: YP_052128; *M. thermoautotrophicus*: AAB85834; *I. loihiensis*: YP_155049. Angegeben ist jeweils die Datenbank-Nummer des zu DsrE-homologen Proteins. Die übrigen Proteine liegen in unmittelbarer Nachbarschaft.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch noch, daß die „*dsrEFH*“-Gene (einmal abgesehen von den Sulfidoxidierern, die ohnehin über ein *dsrC*-Gen verfügen) bei den im Stammbaum vertretenen Pseudomonaden, bei *Idiomarina loihiensis* sowie bei *Shewanella oneidensis* und *Methylococcus capsulatus* neben einem zu *dsrC* homologen Gen liegen. Damit fällt die Gruppe derjenigen Organismen, die einen konservierten Cysteinrest in ihrem

zu DsrH homologen Protein besitzen, beinahe mit der Gruppe derjenigen Organismen zusammen, bei denen ein „*dsrC*“-Gen in enge Beziehung zu den „*dsrEFH*“-Genen gebracht werden kann. Die einzigen Ausnahmen sind *Photobacterium profundum*, bei dem das DsrH-Protein zwar über einen konservierten Cysteinrest verfügt, aber nicht unmittelbar neben einem „*dsrC*“-Gen kodiert wird und *Idiomarina loihiensis*, das zwar über ein zu *dsrEFH* benachbartes *dsrC*-Gen, aber nicht über den konservierten Cysteinrest in DsrH verfügt.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den membranständigen DsrMKJOP-Komplex aus *Allochromatium vinosum* zu untersuchen. Dabei kamen biochemische, molekularbiologische und bioinformatische Methoden zum Einsatz.

Vorkommen, Lokalisation und Komplexbildung

Zunächst galt es nachzuweisen, dass die Proteine des DsrMKJOP-Komplexes in *A. vinosum* auch tatsächlich exprimiert werden. Für DsrK war dieser Nachweis bereits erfolgt (Engels 2001, Dahl et al. 2005), für die übrigen Proteine stand er allerdings noch aus. Dazu wurden gegen ein synthetisches Peptid der jeweiligen Proteine gerichtete Antikörper verwendet. Mit Hilfe der in *Escherichia coli* überexprimierten Proteine DsrJ und DsrO konnte dann gezeigt werden, dass diese Antikörper spezifisch und somit geeignet sind, diese beiden Proteine nachzuweisen (s. Abb. 3.1 und 3.2). Der Nachweis des Proteins DsrO im Rohextrakt von *A. vinosum* verlief positiv, so dass die Bildung dieses Proteins erwiesen ist (s. Abb. 3.4). Die Größe des Proteins deutet darauf hin, dass das Signalpeptid abgespalten wurde, was die vorher-gesagte Lokalisation im Periplasma unterstützt (Pott-Sperling, 2000; Dahl, et al. 2005). Hierzu passt, dass es auch bei dem in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierten DsrO-Protein Hinweise auf eine zumindest teilweise erfolgte Prozessierung des Proteins gibt (s. Abb. 3.3). Die Tatsache, dass es sich bei dem Signalpeptid von DsrO wahrscheinlich um ein Tat-Signalpeptid (Berks et al. 2000) handelt, kann bei der schlechteren Prozessierung in *E. coli* eine Rolle spielen. Zwar kommt das Tat-Exportsystem sowohl in *E. coli*, als auch in *A. vinosum* vor, aber es gibt immer wieder Fälle, in denen Tat-Signalpeptide aus einem Organismus von einem anderen Organismus nicht richtig erkannt werden. Ein Beispiel hierfür ist das PhoD-Protein aus *Bacillus subtilis*, das von *E. coli* nicht erkannt wird (Pop et al. 2002). Bei einer weiteren Auftrennung des Rohextraktes in die Cytoplasma- und die Membranfraktion lässt sich das DsrO-Protein ausschließlich in der Membranfraktion nachweisen (s. Abb. 3.5). Dies widerspricht zwar der Vorhersage aus der Peptidsequenz, wonach dieses Protein keine Transmembrandomänen enthält, passt aber zu der Annahme, dass dieses Protein zusammen mit den Proteinen DsrMKJ und P einen membrandurchspannenden Komplex bildet. Gleiches gilt für DsrK, das ebenfalls mit der Membranfraktion assoziiert ist (Engels 2001, Dahl et al. 2005).

DsrJ konnte zwar trotz der spezifischen Antikörper nicht in Rohextrakten von *A. vinosum* nachgewiesen werden, wohl aber zusammen mit DsrO in einer Proteinprobe, die über mehrere

Säulen (Anionenaustausch-, Hydroxyapatit- und Gelfiltrationschromatographie) aus solubilisierten Membranfraktionen auf DsrK hin angereichert worden war (s. Abb 3.5). Damit ist auch für DsrJ die Bildung des Proteins in *A. vinosum* erwiesen. Ferner ist klar, dass das Protein auch in der Membranfraktion vorkommt. Mit Hilfe des in *E. coli* HM125 überexprimierten DsrJ-Proteins konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei DsrJ tatsächlich um ein C-Typ-Cytochrom handelt (Deuster 2003). Da C-Typ-Cytochrome üblicherweise als Vorläufer-Proteine gebildet und dann ins Periplasma exportiert werden, wo der Einbau der Häm-c-Gruppen erfolgt (Thöny-Meyer und Künzler 1997), ist davon auszugehen, dass es sich bei DsrJ um ein periplasmatisches Protein handelt.

Da offensichtlich drei lösliche Proteine (DsrOJK) gemeinsam in der Membranfraktion von *A. vinosum* gefunden wurden, ergibt sich die Frage, wie diese Proteine an die Membran angeheftet werden. Mögliche Kandidaten hierfür sind die Proteine DsrM und DsrP, die beide über mutmaßliche Transmembrandomänen verfügen. Zwar konnten beide Proteine nicht in angereicherten DsrK-Präparationen nachgewiesen werden, aber es ist zumindest wahrscheinlich, dass diese Proteine, wenn auch in substöchiometrischen Mengen, in jener Probe vorkommen. Dazu passt, dass auch die den DsrMKJOP-Proteinen aus *A. vinosum* entsprechenden Proteine aus *Archaeoglobus fulgidus* (Proteine des Hme-Komplexes) gemeinsam aus der Membranfraktion des Organismus gereinigt werden konnten (Mander et al. 2002). Lediglich das DsrP entsprechende Protein (AF500) fehlte bei dieser Aufreinigung. Neben DsrJ und DsrO enthält die angereicherte Präparation von DsrK auch die Sulfitreduktase (DsrAB), sowie die Proteine DsrC und DsrEFH (Dahl et al. 2005). Offensichtlich interagieren also alle diese Proteine direkt oder indirekt miteinander. Dies deutet auf eine enge Interaktion *in vivo* und die Bildung eines Superkomplexes aus allen diesen Proteinen hin. Gerade bei DsrC und/oder DsrEFH ist hier an Elektronenaustauschprozesse über Thiol-/Disulfid-Übergänge zwischen konservierten Cysteinresten (s. z.B. Tab. 3.1 und Abb. 3.35) zu denken.

Rolle des DsrMKJOP-Komplexes im Schwefelstoffwechsel

Nachdem klar war, dass die Proteine des DsrMKJOP von *A. vinosum* gebildet werden und gemeinsam einen membranständigen Komplex bilden, stellte sich die Frage, welche Bedeutung sie für den Organismus haben. Aus Interposon-Mutanten (Pott-Sperling, 2000; Pott und Dahl 1998, Dahl et al. 2005) war zwar bereits bekannt, dass das *dsr*-Operon in seiner Gesamtheit für die Oxidation von Schwefel zu Sulfit wichtig ist, die individuelle Rolle der einzelnen Gene, bzw. der von diesen Genen gebildeten Proteine, war aber noch völlig

unbekannt. Um die Bedeutung der einzelnen Gene zu ermitteln, wurden Deletionsmutanten hergestellt, bei denen jeweils nur ein einziges Gen ausgeschaltet wurde. War es nicht möglich die Gene vollständig zu deletieren, so wurden zumindest die verbleibenden Reste des Gens *in-frame* miteinander verknüpft, um negative Effekte auf die nachfolgenden Gene des *dsr*-Operons zu vermeiden.

Der Phänotyp der Deletionsmutanten zeigt, dass alle Proteine des DsrMKJOP-Komplexes in *A. vinosum* absolut essentiell für die Oxidation von Schwefel zu Sulfit sind. Werden einzelne dieser Proteine nicht mehr gebildet, so ist der Schwefelabbau vollständig blockiert (s. Abb. 3.11 und 3.12). Der Defekt beschränkt sich zudem eindeutig auf die Schwefeloxidation. Die Oxidation von Sulfid, Thiosulfat und Polysulfiden (s. Abb. 3.13 und 3.14) ist nicht beeinträchtigt. Durch Komplementation der $\Delta dsrJ$ -Mutante konnte außerdem gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp tatsächlich auf dem Fehlen dieses Gens beruht (s. Abb. 3.15).

Homologien und Verbreitung der *dsr*-Gene

Als nun die zentrale Rolle des DsrMKJOP-Komplexes bei der Schwefeloxidation bekannt war, ergab sich die Frage, nach einer eventuell übergeordneten Bedeutung für den Schwefelstoffwechsel. Die deshalb durchgeführten Datenbanksuchen und anschließenden phylogenetischen Analysen führten zu der Erkenntnis, dass DsrM und DsrK zahlreiche Homologien zu der membranständigen (DsrM) und zur cytoplasmatischen Untereinheit (DsrK) von Heterodisulfidreduktasen (HdrDE) aus *Methanosarcina barkeri* (Heiden et al. 1994) aufweisen, während DsrO und DsrP einen Bezug zu Polysulfid-Reduktasen aus *Wolinella succinogenes* (Kraft et al. 1995) erkennen lassen. Oft ist es zudem so, dass zu DsrM und zu DsrK, bzw. zu DsrO und DsrP homologe Proteine unmittelbar nebeneinander kodiert werden.

Heterodisulfidreduktasen sind im Stoffwechsel von methanogenen Archaeen dafür verantwortlich, das im Rahmen der Kohlendioxidreduktion bei der Freisetzung von Methan gebildete Heterodisulfid CoM-S~S-CoB wieder in seine Bestandteile (CoM-SH und CoB-SH) zu spalten (Thauer 1998). Im Kontext des Schwefelstoffwechsel könnte dies auf einen möglicherweise von DsrK katalysierten Thiol-/Disulfid-Übergang im Rahmen einer Elektronenübertragung hinweisen (Pott und Dahl 1998).

Polysulfid-Reduktasen gehören zu einer recht großen Familie von Enzymen, die nicht nur Polysulfide, sondern auch andere Substanzen wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) oder Biotinsulfoxid reduzieren können (für eine Übersicht siehe Kisker et al. 1997). Diese Enzyme bestehen häufig aus drei Untereinheiten, einem

Membrananker (PsrC) einem FeS-Cluster-Protein (PsrB) und einem Molybdän-haltigen Protein (PsrA), das wahrscheinlich das aktive Zentrum trägt. Für das Enzym aus *W. succinogenes* wird ein Elektronentransport vom Menachinonpool über PsrC und PsrB zu PsrA diskutiert (Dietrich und Klimmek 2002).

DsrO ist homolog zu der FeS-Cluster haltigen PsrB-Untereinheit und DsrP zu der membranständigen PsrC-Untereinheit der Polysulfid-Reduktase. Die zu DsrO und zu DsrP homologen Proteine werden meist in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer mutmaßlichen PsrA-Untereinheit kodiert, für die es im *dsr*-Operon keine Entsprechung gibt. Dies weist darauf hin, dass zwar viele zu DsrO und zu DsrP homologe Proteine Bestandteil von Polysulfidreduktasen oder verwandten Enzymen sind, eine solche Funktion von DsrO und DsrP selbst aber nicht ausgeübt wird.

Aus den genannten Homologien lässt sich ein mögliches Bild für die evolutive Entstehung des DsrMKJOP-Komplexes aus verschiedenen Komponenten entwerfen. Demnach wäre es vorstellbar, dass der Komplex aus einem zu Heterodisulfid-Reduktasen homologen Modul und den beiden nicht-katalytischen, aber am Elektronentransport beteiligten Untereinheiten eines Enzyms aus der Polysulfidreduktase-Familie entstanden ist. Die Herkunft der dritten Komponente des Komplexes, des C-Typ-Cytochroms DsrJ, bleibt dabei allerdings unbekannt. Das postulierte Modell zur mutmaßlichen Entstehung des DsrMKJOP-Komplexes ist in Abb. 4.1 gezeigt.

Bei den zu DsrO-homologen Proteinen konnten nur dann mutmaßliche Tat-Signalpeptide gefunden werden, wenn diese nicht neben einem Gen für die katalytische Untereinheit einer Polysulfid-Reduktase (PsrA) kodiert werden. Dieses Protein verfügt allerdings meist selbst über ein mutmaßliches Tat-Signalpeptid. Es besteht somit die Möglichkeit, dass (bei Polysulfidreduktasen) die zu DsrO-homologe PsrB-Untereinheit gemeinsam mit der PsrA-Untereinheit ins Periplasma transportiert wird. Ähnliche Fälle wurden bereits in der Literatur beschrieben (Rodriguez et al. 1999). Beteiligt an diesem Prozess sind Chaperone, die nicht nur für den korrekten Einbau von Cofaktoren sorgen, sondern auch sicherstellen, dass bestimmte Polypeptide erst nach ihrer Zusammenlagerung im Cytoplasma vom Tat-Transportsystem erkannt werden (Jack et al. 2004). In der Tat liegt bei den mutmaßlichen DMSO-/Polysulfid-Reduktasen in der Regel neben den Genen für die drei Untereinheiten des Enzyms in vielen Fällen ein Gen, das wahrscheinlich für ein zu dem Chaperon TorD homologes Chaperon kodiert.

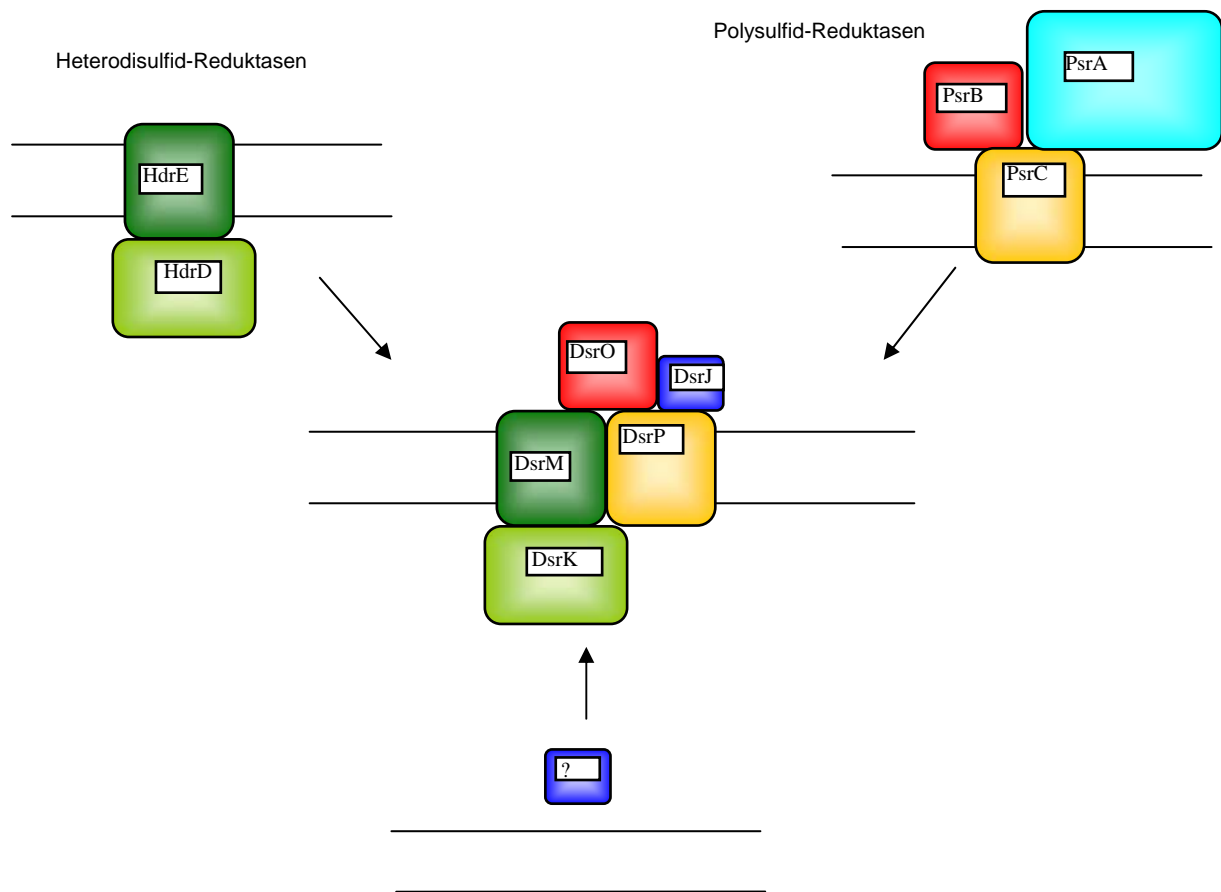


Abb. 4.1: Verschiedene Module des DsrMKJOP-Komplexes und ihre mögliche Herkunft.

Die zu den Proteinen des DsrMKJOP-Komplexes gefundenen Homologien beschränken sich keineswegs auf Heterodisulfid-Reduktasen oder Polysulfid-Reduktasen, sondern umfassen eine Reihe weiterer Proteine. Um aus der Fülle der Suchergebnisse diejenigen Homologien herauszufiltern, bei denen es sich möglicherweise ebenfalls um Dsr-Proteine handelt, wurden zwei Kriterien aufgestellt:

1. Die Gene dieser Proteine sollten in der Nachbarschaft anderer zu *dsr*-Gene homologer Gene zu finden sein (s. Abb. 3.22 und 3.23).
2. Die von diesen Genen abgeleiteten mutmaßlichen Proteine sollten bei phylogenetischen Analysen mit anderen Dsr-Proteinen in ein gemeinsames Cluster fallen (als Beispiel s. Abb. 3.18).

Nicht immer konnten beide Kriterien erfüllt werden. Es ist z.B. so, dass die *dsrc*-Gene bei den betrachteten Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel häufig isoliert liegen. Sofern Kriterium 2 erfüllt war, wurden diese Proteine aber dennoch unter die echten *dsr*-Gene gezählt. Bei dem zweiten für *M. thermoacetica* gefundenen Operon findet sich der gegenteilige Fall: Hier liegen zwar mehrere Gene beisammen, die Homologien zu *dsr*-Genen

aufweisen, aber weder die beiden zu DsrM und DsrK homologen abgeleiteten Proteinsequenzen, noch die Proteinsequenz des zweiten zu DsrC homologen Proteins fallen in Stammbäumen mit Dsr-Proteinen zusammen. Dementsprechend wurden die zugrunde liegenden Gene nicht als „echte“ *dsr*-Gene aufgefaßt. Eine Übersicht über die auf diese Weise gefundenen „echten“ *dsr*-Gene findet sich in Tab. 4.1.

Organismen/ <i>dsr</i> -Gene	AB	C	D	EFH	L	N	MKJOP	R	S	„T“
<i>A. vinosum</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>T. denitrificans</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. tepidum</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>C. phaeobacteroides</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>C. limicola</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>M. magnetotacticum</i>	+	+	-	+	+	+	+	?	-	-
<i>Magnetococcus</i> sp.	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>D. vulgaris</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>D. desulfuricans</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>D. psychrophila</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>D. hafniense</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>M. thermoactica</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>A. fulgidus</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+

Tab. 4.1: Übersicht über die *dsr*-Gene in den einzelnen Organismen. Arten mit oxidativem Stoffwechsel, bzw. die für diese Arten typischen Gene sind grün, solche mit reduktivem Stoffwechsel rot unterlegt (Ausnahme: „*dsrT*“ bei den Chlorobiaceae). *dsr*-Gene, die in allen Organismen vorkommen sind blau unterlegt.

Wie ein Blick auf die Tabelle zeigt kommen lediglich die Gene *dsrABCNMKJO* und *P* bei allen aufgeführten Organismen vor. Sie stellen somit eine Art Grundbestand an *dsr*-Genen dar. Diese Gene sind offensichtlich von fundamentaler Bedeutung für die Umsetzung von Schwefel nach Sulfit oder die Sulfidoxidation. Darüber hinaus gibt es einige Gene, die auf bestimmte Organismen oder Organismengruppen beschränkt sind. Von Interesse sind hier natürlich vor allem solche Gene, die für Organismen mit reduktivem oder oxidativem Stoffwechsel typisch sind. Bei den Sulfat-/Sulfit-Reduzierern ist dies das *dsrD*- und (abgesehen von den Chlorobiaceae) das „*dsrT*“-Gen. Die Tatsache, dass dieses Gen meist in

unmittelbarer Nähe zu den *dsrMKJOP*-Genen liegt (Ausnahme: *A. fulgidus*), deutet darauf hin, dass das Produkt etwas mit dem von diesen Genen kodierten Membrankomplex zu tun haben könnte. Welche Funktion ihm hierbei zukommt, lässt sich allerdings nur schwer sagen, da nur wenige verwertbare Informationen über das mutmaßliche Produkt des *dsrT*-Gens gewonnen werden konnten. Das abgeleitete Protein ist klein, wahrscheinlich cytoplasmatisch und auf Sequenzebene wenig konserviert. Eine gewisse strukturelle Konservierung könnte allerdings gegeben sein. Kovalent gebundene Cofaktoren scheinen zu fehlen. Die geringe Konservierung auf Sequenzebene könnte darauf hindeuten, dass das Protein keine enzymatische Funktion besitzt.

Die Gene für die Proteine DsrEFH, DsrL, DsrR und DsrS sind nach derzeitigem Wissensstand auf Sulfidoxidierer beschränkt und spielen daher möglicherweise speziell eine Rolle bei der Oxidation von Schwefel zu Sulfit. Vor allem DsrEFH und DsrL könnte dabei eine Funktion als möglichen Elektronenüberträgern zufallen. Dazu paßt, dass DsrEFH gemeinsam mit Proteinen des DsrMKJOP-Komplexes und der Sulfitreduktase in Präparationen aus der Membranfraktion von *A. vinosum* gefunden wurde (Dahl et al. 2005). Für DsrL konnte zudem gezeigt werden, dass es sich zusammen mit der Sulfit-Reduktase aufreinigen lässt (Yvonne Lübke, persönliche Mitteilung). Es wurde daher postuliert, dass DsrL möglicherweise der reversen Sulfit-Reduktase aus *A. vinosum*, aus Glutathionamidperthiol abgespaltenes Sulfid direkt als Substrat zuführt (Yvonne Lübke, persönliche Mitteilung, Dahl et al. 2005). Bei Sulfat-/Sulfit-Reduzierern wäre eine entsprechende Funktion überflüssig, da dort die Sulfitreduktase Sulfit zu Sulfid reduziert. Die Rückreaktion von Schwefel zur Oxidationsstufe des Sulfids wurde bereits früher von Pott und Dahl (1998) diskutiert. Unklar blieb dabei allerdings wie vermieden wird, dass das Sulfid direkt wieder zu Schwefel oxidiert wird. Eine direkte Übertragung des Schwefels der Oxidationsstufe –II von DsrL auf die Sulfitreduktase könnte eine Lösung dieses Problems darstellen.

Für DsrEFH wurde eine Interaktion mit DsrC postuliert (Andrea Schulte, persönliche Mitteilung). Interessanterweise tritt bei den Dsr-Proteinen, aller Pseudomonaden, *Shewanella oneidensis* und *Photobacterium profundum* außer dem konservierten Cysteinrest in DsrE (Cys78) ein konservierter Cysteinrest in DsrH auf. Damit deckt sich die Gruppe der Organismen, die über einen konservierten Cysteinrest in DsrH verfügen beinahe mit der Gruppe von Organismen, für die eine Interaktion zwischen einem DsrEFH-homologen Protein mit einem DsrC-homologen Protein wahrscheinlich ist: Bei den „echten“ Dsr-Proteinen ist eine Interaktion von DsrEFH mit DsrC analog zu der bei *A. vinosum* beobachteten Interaktion denkbar. Bei den übrigen Organismen mit konserviertem Cysteinrest

in DsrH (außer *Photobacterium profundum*) liegt neben den *dsrEFH*-homologen Genen ein *dsrC*-Gen, so dass auch hier eine Interaktion als möglich angesehen werden kann. Gleiches gilt für *Idiomarina loihiensis*, allerdings fehlt hier der konservierte Cysteinrest in dem zu DsrH-homologen Protein.

Der in Abb. 3.35 gezeigte Parsimony-Baum für DsrEFH ist insofern bemerkenswert, als aus der Gruppe der Dsr-Proteine ein Ast mit Sequenzen aus *Moorella thermoacetica*, *Thermotoga maritima* und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (MTM-Gruppe) herausragt. Bei dem entsprechenden NJ-Baum treten diese Proteine immerhin noch als Schwestergruppe der Dsr-Gruppe auf. Die drei Organismen dieser Gruppe passen stoffwechselphysiologisch nicht in das Dsr-Cluster. Alle Proteine dieser Gruppe besitzen aber in DsrE einen zweiten konservierten Cysteinrest (Cys81), der bei den übrigen in dem Baum gezeigten Proteinen fehlt. Lediglich *M. thermoacetica* besitzt einen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel, der allerdings reduktiv verläuft. Die übrigen Sulfat-/Sulfit-Reduzierer, bei denen sonst auch Dsr-Proteine gefunden wurden treten hier nicht auf. Es scheint daher äußerst fraglich, ob es sinnvoll ist, die zu DsrEFH-homologen Proteine aus *M. thermoacetica* als Dsr-Proteine anzusprechen.

Auffallend an der MTM-Gruppe ist die relativ große Astlänge, die diese Proteine voneinander und von den übrigen Proteinen trennt. Diese Proteine scheinen weder miteinander noch mit den übrigen im Stammbaum vertretenen Proteinen eng verwandt zu sein. Dies bestätigt auch ein Blick auf das Alignment und der UPGMA-Baum, bei dem die MTM-Gruppe eine Schwestergruppe zu allen anderen Proteinen bildet. Es ergibt sich somit die Vermutung, dass hier ein Fall von „long branch attraction“ vorliegt (Felsenstein 1978, Stevanovic et al. 2004). Dabei handelt es sich um eine statistische Inkonsistenz, die insbesondere bei der Parsimony-Methode, aber auch bei den anderen Methoden auftritt. Das Phänomen tritt vor allem dann auf, wenn mehrere lange Äste durch kurze Äste voneinander getrennt werden.

Die konservierten Cysteinreste Cys78 und Cys81 in DsrE, sowie die konservierten Cysteinreste Cys80 und Cys83 in DsrF liegen in mutmaßlichen aktiven Zentren. Da die Polypeptide DsrE, F und H auch untereinander Homologien aufweisen (Pott und Dahl 1998), entsprechen sich die jeweiligen Bereiche um die genannten Cysteine in DsrE und DsrF.

Bei den Genen *dsrR* und *dsrS* können aufgrund der Seltenheit dieser Gene und ihrer Position am Ende des *dsr*-Operons Zweifel daran aufkommen, ob sie wirklich noch Bestandteil dieses Operons sind. DsrR wird sowohl bei *A. vinosum*, als auch bei *T. denitrificans* und bei einer Probe aus der Sargasso-See (Venter et al. 2004) zusammen mit anderen Dsr-Proteinen in einem Operon codiert. Dies spricht in starkem Maße dafür, dass das *dsrR*-Gen wirklich zu

den *dsr*-Genen gehört. Unklar ist, ob auch *Magnetospirillum magnetotacticum* ein solches Gen besitzt. Zwar findet sich ein entsprechendes mutmaßliches Protein bei einer Datenbanksuche mit dem DsrR-Protein aus *A. vinosum*, die Sequenz dieses Proteins nimmt aber bei phylogenetischen Analysen keine eindeutige Position in dem Baum ein (s. Abb. 3.29). Allerdings ist die Aminosäuresequenz von DsrR auch nicht sehr stark konserviert, so dass es durchaus sein kann, dass für die Funktion des Proteins eher eine strukturelle Konservierung erforderlich ist. Das in *M. magnetotacticum* gefundene Gen könnte daher für ein Protein codieren, das die Funktion von DsrR übernimmt.

Bei DsrS ist die Situation weniger eindeutig. Nur bei *A. vinosum* ist das *dsrS*-Gen eindeutig mit dem *dsr*-Operon assoziiert. Bei *T. denitrificans* tritt ein entsprechendes Gen zwar auf, dort bildet es aber mit den übrigen *dsr*-Genen kein Operon. In den Proben aus der Sargasso-See (Venter et al. 2004) gibt es nur zwei Treffer. In beiden Fällen sind die Sequenzen so kurz, dass nicht gesagt werden kann, ob andere *dsr*-Gene in der Nähe liegen. Bei DsrS lässt sich also aufgrund der vorliegenden Sequenzdaten nicht entscheiden, ob es zu den Dsr-Proteinen gehört. Untersuchungen an Deletionsmutanten, die lediglich eine verlangsamte Schwefeloxidation zeigen (Grimm 2004) und somit nicht wie die Deletionsmutanten des DsrMKJOP-Komplexes vollständig im Schwefelabbau blockiert sind, deuten aber auf eine, wenn auch vielleicht untergeordnete, Funktion im Rahmen der Schwefeloxidation hin.

Am Rande sei noch speziell darauf aufmerksam gemacht, dass unter den zu DsrJ homologen Proteinen auch ein Protein aus *Desulfotalea psychrophila* ist. Dies ist deshalb von Interesse, weil im Rahmen der kürzlich erfolgten Veröffentlichung der Gesamtgenomsequenz dieses Organismus (Rabus et al. 2004) bisweilen der Eindruck entstand, dass C-Typ-Cytochrome im Genom völlig fehlen würden. Nun ist aber DsrJ eindeutig ein C-Typ-Cytochrom und das entsprechende Protein aus *D. psychrophila* besitzt auch die mutmaßlichen Häm-Bindestellen. Genaugenommen steht in der Veröffentlichung von Rabus et al. nur, dass in dem Genom keine typischen *Desulfovibrio*-Cytochrome wie z.B. *c₅₅₃*, *c₃* oder *ncc* zu finden sind. Außerdem wurden in einem Spektrum keine Absorptionsbanden, die auf C-Typ-Cytochrome hinweisen, gefunden. Dies alles deutet aber nicht auf das gänzliche Fehlen von C-Typ-Cytochromen hin, sondern besagt lediglich, dass bestimmte Prozesse im Rahmen der Sulfat-Reduktion bei *D. psychrophila* offensichtlich anders verlaufen als bei *Desulfovibrio*-Arten.

Phylogenetische Analysen zum DsrMKJOP-Komplex

Nachdem geklärt war, welche Organismen über welche *dsr*-Gen verfügen, konnte versucht werden, die Verwandtschaft der zugehörigen mutmaßlichen Proteine über phylogenetische

Analysen zu klären. Stammbäume, die ausschließlich als echt eingestufte Dsr-Proteine enthielten, wurden nur bei Proteinen errechnet, die sowohl bei Sulfidoxidierern, als auch bei Sulfat-/Sulfit-Reduzierern vorkommen. Bei Bäumen mit den Proteinen DsrA, B, C und N (s. Abb. 3.38), wurden in der Regel zwei Cluster gefunden. Eines dieser Cluster enthielt die Organismen mit reduktivem, das zweite die Organismen mit oxidativem Stoffwechselltyp. Die Abgrenzung dieser beiden Gruppen ist in hohem Maße reproduzierbar und unabhängig davon mit welchem Protein die Bäume erstellt wurden (s. Abb. 3.27; 3,28; 3,29; 4.2). Sie gilt auch dann, wenn dem Baum DNA statt Proteinsequenzen zugrundegelegt wurden. Die Aufteilung in die beiden Gruppen ist unabhängig von der verwendeten Methode (NJ, MP, ML, s. z.B. Abb. 3.27). Die Abtrennung der beiden Gruppen wird außerdem in nahezu allen Fällen durch hohe Bootstrap-Werte unterstützt (s. z.B. Abb. 4.2).

In einigen Fällen wurden Organismen allerdings „falsch“ eingruppiert. Am auffälligsten war dies bei *Chlorobaculum tepidum*, *Chlorobium limicola* und *C. phaeobacteroides* (s. Abb. 3.28 bis 3.32). Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, dass die Chlorobiaceen ihre *dsrMKJOP*-Gene über einen horizontalen Gentransfer von einem Organismus mit reduktiv-dissimilatorischem Stoffwechsel erhalten haben. Dafür sprechen mehrere Argumente:

1. Beim Vergleich der Alignments fallen einige Aspekte auf, die auf eine Verwandtschaft der jeweiligen mutmaßlichen Proteine aus *C. tepidum* mit den entsprechenden mutmaßlichen Proteinen aus Sulfat-/Sulfitreduzierern hindeuten. Zu nennen sind hier z.B. das Auftreten bestimmter Lücken in den Proteinen DsrM, DsrK und DsrJ oder konservierte Aminosäurereste, die nur bei *C. tepidum* und den Sulfat-/Sulfit-Reduzierern, bzw. nur bei den Sulfidoxidierern auftreten (s. Abb. 3.19 und Abb. 3.21).
2. Bei Stammbaumanalysen fallen die Sequenzen der am Komplex beteiligten Proteine aus *C. tepidum*, *C. limicola* und *C. phaeobacteroides* unabhängig von der verwendeten Methode zusammen mit den Sequenzen aus Sulfat-/Sulfit-Reduzierern in ein Cluster (s. Abb. 3.27-31).
3. *C. tepidum*, *C. limicola* und *C. phaeobacteroides* sind die einzigen Sulfidoxidierer, die über ein „*dsrT*“-Gen verfügt. Dieses Gen ist ansonsten, wie oben bereits ausgeführt, auf Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel beschränkt (s. Abb. 3.22).

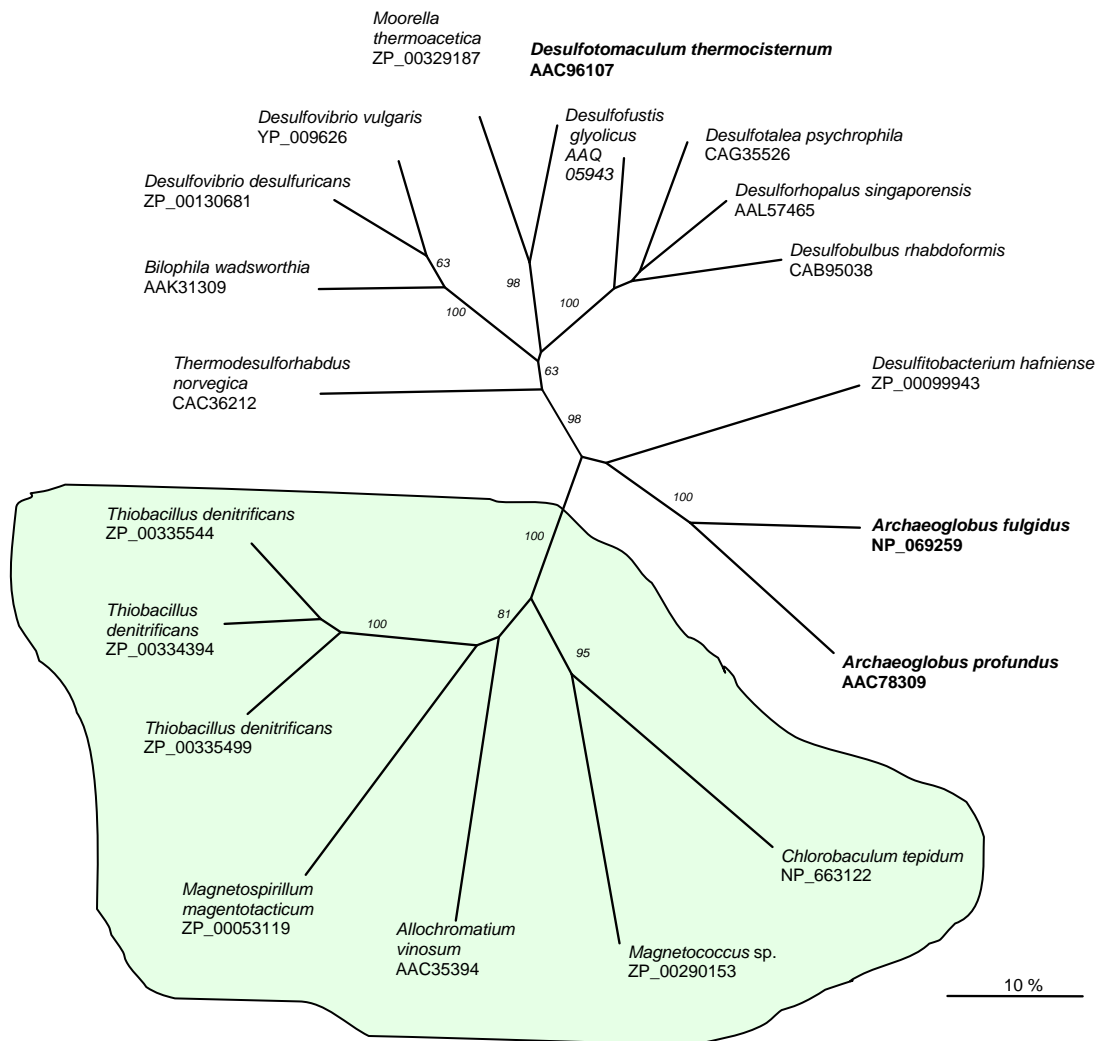


Abb. 4.2: NJ-Baum der ersten 20 bei einer PSI-BLAST-Suche mit der DsrA-Sequenz aus *A. vinosum* gefundenen DsrA-Proteine, bei denen ein Organismenname angegeben ist. Von *C. tepidum* wurde nur eine DsrA-Sequenz dem Baum hinzugefügt, da die Sequenzen der beiden abgeleiteten Proteine identisch sind. Die Nummern an den Ästen geben Bootstrap-Werte an. Die Sulfidoxidierer sind grün unterlegt.

Die Gene *dsrA*, *B*, *C* und *L*, die bei *C. tepidum* zweimal vorkommen, wurden wahrscheinlich erst vor kurzem verdoppelt. Dies trifft bei diesem Organismus offensichtlich auf viele am Schwefelstoffwechsel beteiligte Gene zu (Eisen et al. 2002). Dafür spricht, dass sich die abgeleiteten Proteinsequenzen kaum voneinander unterscheiden. Die beiden DsrL-Sequenzen weichen lediglich in drei Aminosäuren voneinander ab! Eine erst in jüngerer Zeit erfolgte Verdoppelung dieser Gene könnte auch die beobachtete Leserasterverschiebung im *dsrB*-Gen des ersten Clusters erklären: Nach der Verdoppelung könnte eines der beiden Gene überflüssig geworden sein, so dass es zu dieser Mutation kommen konnte. Alternativ besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass diese Leserasterverschiebung auf einen Sequenzierfehler zurückzuführen ist.

Die offensichtliche Ähnlichkeit der Gene *dsrA*, *B*, *C* und *L* lässt sich natürlich auch noch anders erklären: Zum einen könnte ein sehr hoher Evolutionsdruck ein Auseinanderentwickeln der Gene erschwert haben. In diesem Fall bleibt allerdings unklar, weshalb gerade bei *C. tepidum* ein entsprechender Selektionsdruck bestehen sollte. Vor allem setzt eine solche Annahme voraus, dass Dosiseffekte für den Organismus eine Rolle spielen, dass es also für den Organismus wirklich wichtig ist, zwei Kopien der jeweiligen Gene zu besitzen, weil andernfalls nicht in ausreichendem Maße Genprodukte gebildet werden können. Eine hinreichende Begründung hierfür fehlt aber.

Alternativ wäre noch an einen Genkonversionsprozess zu denken, also einen Prozess bei dem ein Gen durch eine zweite Kopie des Gens, die im gleichen Genom vorkommt, ersetzt wird. Bekannt ist dieser Prozess beispielsweise bei rRNA-Genen (Gonzalez-Escalona et al. 2005). Klassisches Beispiel hierfür ist allerdings der *MAT*-Locus bei Hefen (Wang et al. 2004). Solche Prozesse sind zwar gar nicht so selten, allerdings bleibt, wie bei dem oben diskutiert hohen Evolutionsdruck unklar, weshalb dies so ablaufen sollte.

Auch bei *A. fulgidus* gibt es gewisse Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer des DsrMKJOP-Komplexes (=Hme-Komplexes) (diesmal in umgekehrter Richtung von einem Sulfidoxidierer auf einen Sulfatreduzierer). Das stärkste Argument hierfür sind Stammbäume mit DsrP-Homologa (s. Abb. 3.30). In anderen Dsr-Stammbäumen nimmt das jeweilige Protein aus *A. fulgidus* (AF499) eine mittlere Position zwischen den Sulfidoxidierern und den Sulfat-/Sulfit-Reduzierern ein (s. Abb. 3.27). Insbesondere nach dem Hinzufügen der Hmc-Proteine zu dem DsrO-Stammbaum (s. Abb. 3.33) wird deutlich, dass es offensichtlich schwierig ist, das Protein AF499 eindeutig zuzuordnen. Eine Erklärung dafür, dass die Verhältnisse weniger eindeutig sind, als bei *C. tepidum*, könnte darin bestehen, dass das Transferereignis bei *A. fulgidus* wesentlich früher stattgefunden hat, als bei *C. tepidum*, so dass die Proteinsequenzen mehr Zeit hatten sich an die Erfordernisse der Sulfitreduktion anzupassen, die Spuren des Transfers also im Laufe der Evolution verwischt wurden.

Das Genom von *A. fulgidus* ist, sofern nur Gene betrachtet werden, die in Transkriptions-, Translations- und Replikationsprozesse, sowie in Biosynthesen involviert sind, zu 80 % mit dem Genom von *Methanococcus jannaschii* identisch. Bei Metabolismus-Genen besteht aber nur eine 35%ige Ähnlichkeit (Klenk et al. 1997). Es ist daher möglich, dass es sich bei *A. fulgidus* eigentlich um einen ursprünglich zu den Methanogenen gehörenden Organismus handelt, der durch zahlreiche Gentransferprozesse völlig neue metabolische Eigenschaften erworben hat. Für die Gene *dsrA* und *dsrB* aus *A. fulgidus* ist zudem bereits früher über den Erwerb durch einen horizontalen Gentransfer spekuliert worden (Wagner et al. 1998).

Horizontale Gentransferprozesse sind keine Seltenheit und wurden auch in anderen Fällen für die phylogenetisch besser untersuchte Sulfitreduktase postuliert. Die im DsrA-Baum in Abb. 4.2 vertretenen Gram-positiven Bakterien (*Moorella thermoacetica*, *Desulfitobacterium hafniense* und *Desulfotomaculum thermocisternum*) fallen z.B. keineswegs alle in eine Gruppe, so dass hier ebenfalls an horizontalen Gentransfer zu denken ist. In der Tat haben Zverlov et al. (2005) in einer groß angelegten Studie, bei der DsrA-Stammbäume mit 16S-rRNA-Stammbäumen verglichen wurden, bereits für einige Arten von *Desulfotomaculum*, darunter auch für den im vorliegenden Baum vertretenen *D. thermocisternum* einen horizontalen Gentransfer postuliert.

In diesem Kontext sind einige Unstimmigkeiten innerhalb der Gruppen der Sulfidoxidierer, bzw. Sulfat-/Sulfitreduzierer interessant. Zwar clustern bei allen in dieser Arbeit gezeigten Bäumen die Sequenzen aus *Desulfovibrio vulgaris* und *D. desulfuricans* zusammen, in anderen Fällen entspricht die Anordnung der Sequenzen in den Bäumen allerdings nicht der nach der Verwandtschaft der Organismen zu erwartenden Position: Die beiden Gram-positiven Sulfit-Reduzierer *Moorella thermoacetica* und *Desulfitobacterium hafniense* liegen z.B. nicht immer dicht beieinander und innerhalb der Sulfidoxidierer finden sich α - (*M. magnetotacticum*), β - (*T. denitrificans*) und γ -Proteobakterien (*A. vinosum*). Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Zverlov et al. (2005) kann somit vermutet werden, dass z.B. *Moorella thermoacetica*, der in dem vorliegenden DsrA-Baum (Abb. 4.2) zusammen mit *Desulfotomaculum thermocisternum* clustert, seine *dsr*-Gene über einen horizontalen Gentransfer erhalten hat, während *D. hafniense*, der von Zverlov et al. (2005) ebenfalls untersucht wurde, seine *dsr*-Gene einem vertikalen Gentransfer verdankt.

Der eigentlich als pathogen bekanntere *Bilophila wadsworthia* clustert wie bereits von Laue et al. (2001) beschrieben zusammen mit den ihm eng verwandten Desulfovibrionen. *B. wadsworthia* vermag Sulfit, das im Rahmen des von ihm betriebenen Abbaus organischer Sulfonate anfällt, zu Sulfid zu reduzieren. Interessant ist die bei ihm gefundene Fusion des DsrB-Proteins mit dem DsrD-Protein (Laue et al. 2001).

Für *Thermodesulforhabdus norvegica* konnte von Friedrich (2002) ein horizontaler Gentransfer des Gens für die große Untereinheit der APS-Reduktase (*apsA*) festgestellt werden. Ein in der gleichen Studie präsentierter Vergleich des ApsA-Baumes mit dem DsrAB-Baum zeigt aber, dass dies auf die *dsrAB*-Gene des Organismus nicht zutrifft. Für die *Archaeoglobus*-Arten konnte Friedrich über ApsA keinen horizontalen Gentransfer entdecken, da sowohl in dem 16S-rRNA-Baum, als auch in dem ApsA-Baum diese Gattung allen übrigen Organismen gegenübergestellt werden kann. *D. thermocisternum* wurde von

Friedrich nicht mit in die Untersuchung einbezogen. Vertreten sind in seinen Stammbäumen allerdings Organismen, die in der Analyse von Zverlov et al. (2005) gemeinsam mit *D. thermocisternum* ein Cluster bilden und für die dort ebenfalls ein horizontaler Gentransfer angenommen wurde (z.B. *Desulfotomaculum kuznetsovii*). Für diese Organismen gibt es bei Friedrich (2005) keinen Hinweis auf einen Transfer des *aprA*-Gens.

Es sei allerdings vor übertriebenen Schlüssen gewarnt, denn gerade die Feinverästelung der Bäume ist, je nach verwendetem Protein und verwendeter Methode, durchaus variabel und wird oft nicht durch sehr hohe Bootstrap-Werte unterstützt. Das genaue Ausmaß eines möglichen horizontalen Gentransfers und die mögliche Herkunft der jeweiligen Gene, läßt sich somit zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig ermitteln.

Der ebenfalls am Schwefelstoffwechsel beteiligte Hmc-Komplex aus *Desulfovibrio*-Arten ähnelt zwar in mancher Hinsicht dem DsrMKJOP-Komplex, jedoch kann er nach den Ergebnissen dieser Arbeit (s. Abb. 3.33 und 3.34) nicht als „echter“ Dsr-Komplex eingestuft werden. Lediglich zwei Proteine dieses Komplexes weisen signifikante Homologien zu Proteinen des DsrMKJOP-Komplexes auf. Hinzufügen dieser Proteine zu Stammbäumen mit Dsr-Proteinen zeigt, dass sie sich weder der Gruppe der Sulfat-/Sulfit-Reduzierer noch der Gruppe der Sulfidoxidierer zuordnen lassen, sondern einen eigenen Ast in dem Baum bilden. Bis auf eine einzige Ausnahme fallen alle Sequenzen mutmaßlicher Dsr-Proteine, die aus in der Sargassosee gefundenen DNA-Sequenzen (Venter et al. 2004) abgeleitet werden konnten, in das Cluster der Sulfidoxidierer. Unklar ist allerdings woher das Sulfid im offenen Ozean stammt. Möglicherweise nutzen diese Organismen aber auch gar kein Sulfid als Elektronenquelle, sondern andere reduzierte Schwefelverbindungen wie etwa Dimethylsulfid, das im marinen Oberflächenwasser vorkommt (Liss 1999). Dabei handelt es sich um ein Abbauprodukt von Dimethylsulfopropionat, das ein wichtiger Osmolyt mariner Pflanzen ist (Lengeler et al. 1999; Lovelock et al. 1972). Der mit *A. vinosum* eng verwandte *Thiocapsa roseopersicina* und auch einige *Thiobacilli* sind imstande, Dimethylsulfid zu Sulfat zu oxidieren (Jonkers et al. 1999; Visscher und Taylor, 1993).

Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat einige neue Erkenntnisse zu Bedeutung des DsrMKJOP-Komplexes für den dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel gebracht. Zahlreiche Fragen sind aber immer noch ungeklärt. So sind mögliche Partner des Komplexes von denen Elektronen empfangen oder an die Elektronen abgegeben werden immer noch unbekannt. Gleiches gilt für den Weg der Elektronen in dem Komplex selbst. Weitere biochemische Untersuchungen

werden in den nächsten Jahren erforderlich sein, um diese Fragen zu klären. Im Hinblick auf die phylogenetischen Untersuchungen ist zu erwarten, dass die zunehmende Zahl der in den Datenbanken verfügbaren Sequenzen in den nächsten Jahren dazu beitragen wird die bisherigen Erkenntnisse zu sichern, bzw. noch strittige Fälle zu klären.

5 Zusammenfassung

Für die Proteine DsrO und DsrJ konnte die Expression in *Allochromatium vinosum*, sowie die Lokalisation in der Membran nachgewiesen werden. Für DsrO konnte zudem gezeigt werden, dass das Signalpeptid des Proteins abgespalten wird. Die beiden wahrscheinlich periplasmatischen Proteine DsrO und DsrJ wurden gemeinsam mit dem cytoplasmatischen DsrK in Präparationen aus der Membranfraktion gefunden. Dies weist auf die Bildung eines integralen Membrankomplexes hin.

Mit Hilfe von Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass die Gene *dsrMKJOP* absolut essentiell für die Schwefeloxidation in *A. vinosum* sind. Andere Teilprozesse des Schwefelstoffwechsels, wie etwa die Sulfid- oder Thiosulfatoxidation sind nicht betroffen. Durch Komplementation der Δ *dsrJ*-Mutante konnte zudem gezeigt werden, dass in diesem Fall der beobachtete Phänotyp ausschließlich auf die Deletion des *dsrJ*-Gens zurückzuführen war.

Mit Hilfe von BLAST-Suchen in Sequenz-Datenbanken konnten weitere Organismen identifiziert werden, die über *dsr*-Gene verfügen. Alle diese Organismen verfügen über einen reduktiv- oder oxidativ-dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel. Hinsichtlich des Genbestandes gibt es allerdings deutliche Unterschiede zwischen Organismen mit oxidativem und Organismen mit reduktivem Schwefelstoffwechsel. Während z.B. die Gene *dsrD* und *dsrT* (mit Ausnahme der Chlorobiaceae) auf Sulfat-/Sulfitreduzierer beschränkt sind, kommen die Gene *dsrEFH* und *L* ausschließlich bei Sulfidoxidierern vor. Die Gene *dsrR* und *dsrR* treten nur bei *A. vinosum* und *Thiobacillus denitrificans* auf.

Mit den von diesen Genen abgeleiteten Proteinen wurden phylogenetische Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich in der Regel die Sulfidoxidierer klar von den Sulfat-/Sulfitreduzierern absetzen lassen. Eine Ausnahme bilden allerdings die mutmaßlichen Proteine des DsrMKJOP-Komplexes, bei denen die Sequenzen aus den Chlorobiaceae immer und die Sequenzen aus *Archaeoglobus fulgidus* manchmal „falsch“ eingruppiert werden. Wahrscheinlich ist dies auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen.

Mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes für die mutmaßlichen DsrEFH-Proteine und weitere homologe Proteine konnten schließlich Zusammenhänge zwischen der Position der Proteine im Stammbaum und konservierten Cysteinresten festgestellt werden.

6 Literatur

- Adachi, J. und Hasegawa, M.** 1992. MOLPHY: Programs for molecular phylogenetics, i. PROML: Maximum likelihood interference of protein phylogeny. Computer Science Monographs, 27.
- Altschul, S.F., Gish, W., Myers, W.M.E.W. und Lipman, D.J.,** 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Zhang, A.A.S.J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.,** 1997. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Altschul, S.F. und Koonin, E.V.** 1998. Iterated profile searches with PSI-BLAST – a tool for discovery in protein database. TIBS 23: 444-447.
- Anderson, J.O. und Roger, A.J.** 2002. Evolutionary analyses of the small subunit of glutamat synthase: gene order conservation, gene fusions, and prokaryotic-to-eukaryotic lateral gene transfers. Eukaryot. Cell 1: 304-310.
- Arslan, E., Schulz, R., Zufferey, R., Kunzler, P. und Thöny-Meyer, L.** 1998. Overproduction of *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb_3 oxidase in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251:744-747.
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** 1990-2005. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. New York.
- Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Hingamp, P., Sterk, P., Stoesser G. und Tuli, M. A.** 2000. The EMBL nucleotide sequence database. Nucleic Acids Res. 28: 19-23.
- Bazal, M. und Helsinski, D.R.** 1968. Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 36: 185-194.
- Bazylinski, D.A., Dean, A.J., Williams, T.J., Long, L.K., Middleton, S.L. und Dubbels, B.L.** 2004. Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2. Arch. Microbiol. 182(5): 373-387.
- Beaty, P.S. und Ljungdahl, L.G.** 1991. Growth of *Clostridium thermoaceticum* on methanol, ethanol, propanol, and butanol in medium containing either thiosulfate or dimethylsulfide, in: Abstracts of the Ann. Meet. Of the Am. Soc. For Microbiol. Abstract K-131: 236.
- Beffa, T., Pezet, R. und Turian, G.** 1988. Endogenous elemental sulfur (S^0) in dormant and germinatine α -spores of *Phomopsis viticola* Sacc. FEMS Microbiol. Lett. 50: 89-94.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. und Wheeler, D. L.** 2004. Genbank: update. Nucleic Acids Res. 16: 135-139.
- Berks, B.C.,** 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors. Mol. Microbiol. 22: 393-404.
- Berks, B.C., Sargent, F. und Palmer, T.** 2000. The Tat protein export pathway. Mol. Microbiol. 35: 260-274.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1522.

- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
- Brune, D.C.** 1989. Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim.Biophys. Acta* 975: 189-221
- Briantseva, I.A., Gorlenko, V.M., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Lysenko, A.M., Bykova, S.A., Galchenko, V.F., Mityushina, L.L. und Osipov, G.A.** 2000. *Heliobacterium sulfidophilum* sp. Nov. and *Heliobacterium undosum* sp. nov.: sulphide-oxidizing bacteria from thermal sulfidic springs. *Microbiology* 69: 325-334.
- Dagert, M. und Ehrlich, S.D.** 1974. Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-28.
- Dahl, C.** 1998. Enzymatische und molekulargenetische Grundlagen des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels in phototrophen Schwefelbakterien. Habilitationsschrift. Universität Bonn.
- Dahl, C., Rakhely, G., Pott-Sperling, A.S., Fodor, B., Takacs, M., Toth, A., Kraeling, M., Gy"orfi, K., Kovacs, A., Tusz, J. und Kovacs K.L.** 1999. Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 180(2): 317-324.
- Dahl, C., Prange, A. und Steudel, R.** 2002. Metabolism of natural polymeric sulfur compounds. In Steinbüchel, A. (Hrsg.) *Biopolymers* 9: 1-24.
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A.S., Schulte, A., Sander, J., Lübbe, Y., Deuster, O. und Brune, D.C.** 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*. *J. Bacteriol.* 187 (4): 1392-1404.
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. und Orcutt, B.C.** 1978. Atlas of protein sequences and structure, volume 5, chapter: A model of evolutionary change in proteins, pages 345-352. *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, DC.
- Debussche, L., Thibaut, D., Cameron, B., Crouzet, J. und Blanchet, F.** 1990. Purification and characterization of a cobyrinic acid a,c-diamide synthase from *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol.* 172: 6239-6244.
- Deuster, O.** 2003. Heterologe Expression von periplasmatischen Häm c- bzw. [4Fe-4S]-Cluster haltigen Proteinen in *Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Dickman, M.J., Inglestone, S.M., Sedelnikova, S.E., Rafferty, J.B., Lloyd, R.G., Grasby, J.A., Hornby, D.P.** 2002. The RuvABC resolvasome. *Eur. J. Biochem.* 269: 5492-5501.
- Dietrich, W. und Klimmek, O.** 2002. The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* 269: 1086-1095.
- Dolla, A., Poohorelic, B.K., Voordouw, J.K. und Voordouw G.** 2000. Deletion of the *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough hampers hydrogen metabolism and low-redox-potential niche establishment, *Arch. Microbiol.* 174(3): 143-51.
- Drake, H.L. und Daniel, S.L.** 2004: Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Res. in Microbiol.* 155: 869-883.

- Engels E.** 2001. Untersuchung der *dsrK* kodierenden Heterodisulfidreduktase aus *Allochromatium vinosum*. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Eck, R.V. und Dayhoff, M.O.** 1966. Atlas of protein sequence and structure. Natl. Biomed. Res. Found, Silver Spring.
- Eisen, J.A., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Heidelberg, J.F., Wu, M., Dodson, R.J., Deboy, R., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Durkin, A.S., Kolonay, J.L., Yang, F., Holt, I., Umayam, L.A., Mason, T., Brenner, M., Shea, T.P., Parksey, D., Nierman, W.C., Feldblyum, T.V., Hansen, C.L., Craven, M.B., Radune, D., Vamathevan, J., Khouri, H., White, O., Gruber, T.M., Ketchum, K.A., Venter, J.C., Tettelin, H., Bryant, D.A. und Fraser, C.M.** 2002. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. PNAS 99(14): 9509-9514.
- Farris, J.S.** 1988. Hennig86. Port Jefferson Station. New York.
- Felsenstein, J.** 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. Syst. Zool. 27(4): 401-410.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Felsenstein, J.** 1989. Phylip-phylogeny inference package (version 3.2). Cladistics, 5: 164-166.
- Feng, D.-F. und Doolittle, R.F.** 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. J. Mol. Evol. 24: 351-360.
- Fitch, W.M.** 1977. On the problem of discovering the most parsimonous tree. Am. Nat. 111: 223-257
- Fodor, B.D., Kovacs, A.T., Csaki, R., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Maroti, G., Meszaros, L.S., Medzihradzsky, K.F., Rakhely, G. und Kovacs, K.L.** 2004. Modular Broad-Host-Range Expression Vectors for Single-Protein and Protein Complex Purification. Appl. And Envir. Microbiol. 70(2): 712-721.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischwesky, F., Quentmeier, A. und Fischer, J.** 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? Appl. and Envir. Microbiol. 67 (7): 2873-2882.
- Friedrich, M.** 2002. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosin-5`-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. J. Bacteriol. 184(1): 278-289.
- Garnier, J., Gibrat, J.-F. und Robson, B.** 1996. GOR secondary structure prediction method version IV. Methods in Enzymology 266: 540-553.
- Gaspar, J.A., Liu, C., Vassal, K.A., Meglei, G., Stephen, R., Stathopoulos, P.B., Pineda-Lucena, A., Wu, B., Yee, A., Arrowsmith, C.H., Meiring, E.M.,** 2005. A novel member of the YchN-like fold: solution of the hypothetical protein TM0979 from *Thermotoga maritima*. Protein Sci. 14(1): 216-223.
- Gasteiger E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. und Bairoch, A.** 2005. Protein identification and analysis tools an the expasy server, in: John M. Walker (ed.): The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press: 571-607.

- Grimm, F.** 2004. In-frame-Mutagenese der Gene *dsrAB*, *dsrEFH*, *dsrC*, *dsrR* und *dsrS* in *Allochromatium vinosum*. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Gonzalez-Escalona, N., Romero, J. und Espero, R.T.** 2005. Polymorphism and gene conversion of the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 246(2): 213-219.
- Hagen, W.R., Silva, P.J., Amorim M.A., Hagedoorn, H., Wassink, H., Haaker, H. und Robb, F.T.** 2000. Novel structure and redox chemistry of the prothetic groups of the iron-sulfur flavoprotein sulfide dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus*; evidence for [2Fe-2S] cluster with Asp(Cys) ligands J. Biol. Inorg. Chem. 5: 527-534.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hansen, A.** 2004. Bioinformatik, Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler². Birkhäuser Verlag: Basel-Boston-Berlin.
- Hasegawa, M., Kishino, H. und Yano, T.** 1985. Dating of the human-ape splitting by molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 22: 160-174.
- Hedderich, R., Koch, J., Linder, D. und Thauer, R.K.** 1994. The heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains sequence motifs characteristic of pyridine-nucleotide-dependent thioredoxin reductases. Eur. J. Biochem. 225: 253-261.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M. und Stetter, K.O.** 1999. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. FEMS Microbiol. Rev. 22: 353-381.
- Heiden, S., Hedderich, R., Setzke, E. und Thauer, R.K.** 1994. Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfid reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. Eur. J. Biochem. 225: 253-261.
- Henifoff, S. und Henikoff, J.** 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 10915-10919.
- Hensen, D.,** 2001. Molekulargenetische Analyse des *sox*-Genclusters des phototrophen Schwefelbakteriums *Allochromatium vinosum*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Hillis, D.M. und Bull, J.J.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42: 182-192.
- Hipp, W.M., Pott, A.S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C. und Trüper, H.G.** 1997. Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. Microbiology 143: 2891-2902.
- Horton, R.M.,** 1995. PCR-mediated recombination and mutagenesis. Mol. Biotechnol. 3: 93-99.
- Imhoff, J.F.** 2003. Phylogenetic taxonomy of the family Chlorobiaceae on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 53(4): 941-51.
- Imhoff, J.F., Süling, J. und Petri R.** 1998. Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1129-1143.

- Imhoff, J.F. und Trüper, H.G.** 1977. *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch. Microbiol. 114: 115-121.
- Hall, T.A.** 1999. bioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic. Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- Heidelberg, J.F., Seshadri, R., Haveman, S.A., Hemme, C.L., Paulsen, I.T., Kolonay J.F., Eisen, J.A., Ward, N., Methe, B., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Nelson, W.C., Sullivan, S.A., Fouts, D., Haft, D.H., Selengut, J., Peterson, J.D., Davidson, T.M., Zafar, N., Zhou, L., Radune, D., Dimitrov, D., Hance, M., Tran, K., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T.R., Feldblyum, T.V., Wall, J.D., Voordouw, G. und Fraser, C.M.** 2004. The genome sequence of the anaerobic sulfat-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Nature 22(5): 554-559.
- Jack, R.L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. und Sargent, F.,** 2004. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. EMBO 23: 3962-3972.
- Jäger, W., Schäfer, A., Prühler, A., Labes, G. und Wohlleben, W.** 1992. Expression of the *bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. L. Bacteriol. 174: 5462-5465.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. und Thornton, J.M.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. CABIOS 8: 275-282.
- Jongsreejit, B., Rahman, R.N.Z.A., Fujiwara S., und Imaka, T.** 1997. Gene cloning, sequencing and enzymatic properties of glutamat synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1. Mol. Gen. Genet. 254: 635-642.
- Jonkers, H.M., Jansen, M., Van der Maarel, M.J.E.C. und van Gernerden, H.** 1999. Aerobic turnover of dimethyl sulfide by the anoxygenic phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. Arch. Microbiol. 172: 150-156.
- Jukes, T.H. und Cantor, C.R.** 1969. Evolution of Protein Molecules. In: Mamalian Protein Metabolism. Edited by Munro, H.N. New York. Academic Press: 12-132.
- Kämpf, C. und Pfennig N.** 1980. Capacity of Chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis violacea* and *Chromatium vinosum*. Arch. Microbiol. 127: 125-135.
- Kaschke, M., Russell, M.J., Cole, W.J.** 1994. [FeS/FeS₂], a redox system for the origin of life (some experiments on the pyrite-hypothesis). Orig. Life Evol. Biosph. 24(1):43-56.
- Kepler, H.** 1999. Experimental Evidence for the Source of Excess Sulfur in Explosive Volcanic Eruptions. Science 284: 1652-1654.
- Kierstein, G.** 2001. Phylogenetische Entwicklung asiatischer Wasserbüffel anhand Polymorphismen in der mitochondrialen D-loop Region. Dissertation, Universität Göttingen.
- Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Biol. 16(2): 111-120.
- Kisker, C., Schindeline, H. und Rees, D.C.** 1997. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: Structure and mechanism. Ann. Rev. Biochem.: 66: 233-267.

- Klimmek, O., Stein, T., Pisa, R., Simon, J., und Kröger, A.**, 1999. The single cystein residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfure transferase in *Wolinella succinogenes*. Eur. J. Biochem. 263: 79-84.
- Klenk, H.-P., Clayton, R.A., Tomb, J.-F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Kickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyripides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.K., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. und Venter, C.** 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Nature 390: 364-370.
- Kluge, A.G. und Farris, J.S.** 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Zool. 18: 1-32.
- Knoblauch, C., Sahn, K. und Jørgenson, B.B.** 1999. Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic sediments: Description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp.nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* General. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. Int. J. Bacteriol. 49: 1631-1643.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H. und Roop, R.M.** 1994. pBBR1-MCS: a broad-host-range cloning vector. Biotechniques 16:800.
- Kraft, T., Groß, R. und Kröger, A.** 1995. The function of *Wolinella succinogenes* *psr* genes in electron transport with polysulphide as the terminal electron acceptor. Eur. J. Biochem. 230: 601-606.
- Künel, A., Vaupel, M., Heim, S., Tahuer, R.K. und Hedderich, R.** 1997. Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoenzyme. Eur. J. Biochem. 244: 226-234.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Larsen, O., Lien, T., und Birkeland, N.-K.** 2000. Characterization of the desulforubidin operons from *Desulfobacter vibrioforme* and *Desulfobulbus rhabdiformis*. FEMS Microbiol. Lett. 186: 41-46.
- Laue, H., Friedrich, M., Ruff, J. Cook, A.M.** 2001. Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit. J. Bacteriol. 183(5): 1727-1733.
- Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.** 1999. Biology of the prokaryotes. Thieme-Verlag: Stuttgart-New-York.
- Lie, T.J., Godchaux, W. und Leadbetter, E.R.** 1999. Sulfonates as terminal electron acceptors for growth of sulfite-reducing bacteria (*Desulfitobacterium* spp.) and sulfate-reducing bacteria: effects of inhibitors of sulfidogenesis. Appl. & Env. Microbiol. 65(10): 4611-4617.
- Liss, P.** 1999. Take the shuttle from marine algae to atmospheric chemistry. Science 285: 1217-1218.
- Lovelock, J.E., Mags, R.J., Rasmussen, R.A.** 1972. Atmospheric dimethylsulfide and the natural sulfur cycle. Nature 237: 452-453.

- Needleman, S.B. und Wunsch, C.D.** (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48: 443-453.
- Mander, G.J., Duin, E.C., Linder, D., Stetter, K.O. und Hedderich, R.** 2002. Purification and characterization of a membran-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* 269: 1895-1904.
- Matias, P.M., Coelho, A.V., Valente, F.M., Placido, D., LeGall, J., Xavier, A.V., Pereira, I.A.C. und Carrondo, I.A.** 2002. Sulfate respiration in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Biol. Chem.* 277(49): 47907-47916.
- Matsudaira, P.** 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *The J. Bio. Chem.* 262, 21: 10035-10038.
- Matthews, J.C., Timkovich, C.R., Liu, M.Y. und LeGall, J.** 1995. Siroamide: a prosthetic group isolated from sulfite reductases in the genus *Desulfovibrio*. *Biochemistry* 32: 5248-5251.
- Mittenhuber, G., Sonomoto, K., Egert, M. und Friedrich, C.G.** 1991. Identification of the DNA region responsible for sulfur-oxidizing ability of *Thiosphaera pantotropha*. *J. Bacteriol.* 173: 7340-7344.
- Mullis, J.E. und Faloona, F.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* 155: 335-350.
- Page, P.D.** 1996. Tree-View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12 (4): 357-358.
- Parro, V. und Moreno-Paz, M.** 2003. Gene function analysis in environmental isolates: the *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. *PNAS* 100(13): 7883-7888.
- Pattaragulwanit, K. und Dahl, C.** 1995. Development of a genetic system for a purple sulfur bacterium: Conjugative Plasmid transfer in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 164: 217-222.
- Pattaragulwanit, K., Brune, D.C., Trüper, H.G. und Dahl, C.** 1998. Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 169: 434-444.
- Pfennig, N. und Trüper, H.G.** 1971. Type and neotype strains of the species of phototrophic bacteria maintained in pure culture. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 21: 19-24.
- Pfennig, N. und Trüper, H.G.** 1989. Anoxygenic phototrophic bacteria. In Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. und Holt, J. G. (Hrsg.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 3, 1635-1653. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Pfennig, N. und Trüper, H.G.** 1992. The family Chromatiaceae. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (Hrsg.) *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 3200-3221. Springer-Verlag, New York.
- Pop, O., Martin, U., Abel, C. und Muller, J.P.** 2002. The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J Biol Chem.* 277(5): 3268-73.

- Pott, A.S.** 1996. Interposonmutagenese der Gene für die "reverse" Sirohäm-Sulfitreduktase in *Chromatium vinosum*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Pott, A.S. und Dahl, C.** 1998. Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* 144: 1881-1894.
- Pott-Sperling, A.S.,** 2000. Das *dsr*-Operon von *Allochromatium vinosum*: molekularbiologische Charakterisierung der Gene für die Schwefeloxidation. Dissertation. Universität Bonn.
- Prange, A., Arzberger, I., Engemann, C., Modrow, H., Schumann, O., Trüper, H.G., Steudel, R., Dahl, C. und Hormes, J.** 1999. *In situ* analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1428: 446-454.
- Rabus, R. Ruepp, A., Frickey, T., Rattei, T., Fartmann, B., Stark, M., Bauer, M., Zibat, A., Lombardot, T., Becker, I., Amann, J., Gellner, K., Teeling, H., Leuschner, W.D., Glöckner, F.-O., Lupas, A.N., Amann, R. und Klenk, H.-P.** 2004. The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanent cold Arctic sediments. *Environ. Microbiol.* 6(9): 887-902.
- Rakhely, G., Colbeau, A., Garin, J., Vignais, P.M. und Kovacs, K.L.** 1998. Unusual Organization of the Genes Coding for HydSL, the Stable [NiFe]Hydrogenase in the Phototrophic Bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *J. Bacteriol.* 180(6): 1460-1465.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jörgensen, B.B. und Amann, R.,** 2000. Community structure and cellular rRNA content and activity of sulphate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3592-3602.
- Rees, D.C. und Howard, J.B.** 2003. The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science* 300: 929-930.
- Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, H. G. und Dahl, C.** 1998. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 170: 59-68.
- Rehm, H.** 2000. Proteinbiochemie/Proteomics³. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin.
- Rethmeier, J., Rabenstein, A., Langer, M. und Fischer, U.** 1997. Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography A* 760: 295-302.
- Reynolds, R., Bermudez-Cruz, R.M. und Champerlin, M.J.,** 1992. Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA. I. Analysis of 13 rho-independent terminators. *J. Mol. Biol.* 2224: 31-51.
- Rodriguez, A., Chanal, A., Beck, K. Müller, M. und Wu, L.F.** 1999. Cotranslocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial *tat* pathway. *J. Biol.Chem.* 274(19): 13223-13228.
- Rossi, M., Pollock, B.R., Reiji, M.W., Keon, R.G., Fu, R. und Voordouw, G.,** 1993. The *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex. *J. Bacteriol.* 175: 4699-4711.
- Rother, D., Henrich, H.-J., Quentmeier, A. Bardischewsky, F. und Friedrich, C.G.** 2001. Novel genes of the *sox* gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* 183 (15): 4499-4508.

- Sahm, K., Knoblauch, C. und Amann, R.**, 1999. Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfat-reducing isolates in marine arctic sediments. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 3976-3981.
- Seibl, R., Höltke, H.-J., Rüger, R., Meindl, A., Zauchau, H.G., Raßhofer, R., Roggendorf, M., Wolf, H., Arnold, N., Wienberg, J. und Kessler, C.**, 1990. Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 939-951.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. und Arnheim, N.** 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saitou, N. und Nei, M.**, 1987. The neighbor joining method: a new method for rconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez, O., Ferrera, I., Dahl, C. und Mas, J.** 2001. In vivo role of adenosine-5`- phosphosulfate reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 176: 301-305.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und Pühler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.
- Schedel, M., Vanselow, M. und Trüper, H.G.** 1979. Siroheme sulfite reductase from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. *Arch. Microbiol.* 121: 29-36.
- Schedel, M. und Trüper, H.G.** 1980. Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbio.* 124: 205-210.
- Schwarz, S.** 2001. Rhodanese und Thiosulfatreduktase im phototrophen Schwefelbakterium *Allochromatium vinosum*. Dissertation Universität Bonn.
- Selbitschka, W., Niemann, S. und Prühler, A.** 1993. Construction of gene replacement vectors for Gram⁻ bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 615-618.
- Seifritz, C., Daniel, S.L., Gossner, A. und Drake, H.I.** 1993. Nitrate as preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 175: 8008-8013.
- Simmons, S.L., Sievert, S.M., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. und Edwards, K.J.** 2004. Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Appl. & Envir. Microbiol.* 70(10): 6230-6239.
- Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technol.* 1: 784-791.
- Shin, D.H., Yokota, H., Kim, R. und Kim, S.-H.** 2002. Crystal structure of a conserved hypothetical protein from *Escherichia coli*. *J. Struct. Funct. Genom.* 14: 53-66.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olsen, B.J. und Klenk, D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Smith, T. und Waterman, M.S.** 1981a. Comparison of biosequences. *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489.
- Smith, T. und Waterman, M.S.** 1981b. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147:195-197.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Southern, E. M.** 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzymol.* 68: 152-176.
- Sperling, D.,** 2001. Molekularbiologische und enzymologische Untersuchung zum dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in *Allochromatium vinosum*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Archaeoglobus veneficus*. Dissertation, Universität Bonn.
- Stefanovic, S., Rice, D.W. und Plamer J.D.** 2004. Longa branch attraction, taxon sampling and the earliest angiosperms: *Amborella* or monocots? *BMC Evolutionary Biology*.
- Stetter, K.O.** 1988. *Archaeoglobus fulgidus* gen.nov. sp.nov.: a new taxon of extremely halophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 10:172-173.
- Storch, V., Welsch, U. und Wink, M.** 2001. *Evolutionsbiologie*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Stoye, J.** 1998. Multiple sequence alignment with the divide-and-conquer method. *Gene* 211: GC45-GC56.
- Swofford, D.L.** 2003. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tateno, Y., Miyazaki, S., Sugawara, H. und Gojobori, T.** 2000. DNA data bank of japan (DDBJ) in collaboration with mass sequencing teams. *Nucleic Acids Res.* 28: 24-26.
- Thauer, R.K.** 1998. Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406.
- Thein, S.L. und Wallace, R.B.** 1986. The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In Davies, K.E. (Hrsg.) *Human genetic diseases: a practical approach*, 33-50. IRL Press, Herndon, Virginia.
- Thöny-Meyer, L. und Künzler, P.** 1997. Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of the preapocytochrome c depend on Sec and Lep, but not on the *ccm* gene products. *Eur. J. Microbiol.* 246(3): 794.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. Plewniak, F. und Higgins D.G.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids. Res.* 24: 4876-4882.

- Trüper, H.G.**, 1984. Phototrophic bacteria and their sulfur metabolism. In Müller, A. und Krebs, B. (Hrsg.) Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio-, and cosmosphere and technology, 367-382. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*: 304: 66-74.
- Visscher, P.T. und Taylor, B.F.** 1993. A new mechanism for the aerobic catabolism of dimethyl sulphide. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3784-3789.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D.** 1979. Preparative und analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-619.
- Wagner, M., Rogers, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A. und Stahl, D.A.** 1998. Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an early Origin of Sulfate Respiration. *J. Bacteriol.* 180 (11): 2975-2982.
- Wahlund, T.M., Woese, C.R., Castenholz, R.W. und Madigan, M.T.** 1991. A thermophilic green sulphur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 156: 81-90.
- Wang, X., Ira, G., Tercero, J.A., Holmes, A.M., Diffler, J.F. und Haber, J.E.** 2004. Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 24(16): 6891-6899.
- Weaver, P.F., Wall, J.D. und Gest, H.** 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 105: 207-216.
- Zaar, A., Fuchs, G., Golecki, J.R., Overmann J.** 2003. A new purple sulfur bacterium isolated from a littoral microbial mat *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov.. *Arch. Microbiol.* 179 (3): 174-183.
- Zhang, Z., Schaeffer, A.A., Miller, W., Madden, T.L., Lipman, D.J., Koonin, E.V. und Altschul, S.F.**, 1998. Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. *Nucleic Acids Res.* 26: 3986-3990.
- Zverlov, V., Klein, M., Lücker, S., Friedrich, M.W., Kellermann, J., Stahl, D.M., Loy, A. und Wagner, M.** 2005. Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited. *J. Bacteriol.* 187(6): 2203-2208.

Veröffentlichungen

Artikel

Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A.S., Schulte, A., Sander, J., Lübke, Y., Deuster, O. und Brune, D.C. 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*. *J. Bacteriol.* 187 (4): 1392-1404.

Tagungsbeiträge

Schulte, A., Engels, S., Sander, J. und Dahl, C. 2001. The *dsr*-Operon in *Allochromatium vinosum*. *Biospektrum Sonderausgabe zur Frühjahrstagung der VAAM, Göttingen.*

Sander, J., Hüttig, B. und Dahl, C. 2005. In-frame mutants of the genes coding for the putative DsrMKJOP-complex of *Allochromatium vinosum*. *Biospektrum Sonderausgabe zur Herbsttagung der VAAM, Göttingen.*

Danksagung

Dissertatione peracto mihi gratias agendum est omnibus qui mihi consiliis aut operibus auxilio erant. Hi sunt mater huius dissertationis **Christiane Dahl** et omnes commilitones mei:

Oliver Deuster

Bettina Franz

Frauke Grimm

Daniela Hensen

Yvonne Lübbe

Alexander Prange

Andrea Schulte

Ute Selan

Imprimis gratiam reffero technicae nostrae **Birgittae Huettig**, qui mihi multis difficultatibus obstantibus saepe adiuvavit. Praeterea non modo commilitonibus sed etiam ceteris huius instituti sodalibus atque patribus (i.e. matri meo Christae Sander et patri meo Hans-Jürgen Sander, qui obiit anno MXMI p. Chr. natum) gratias agendum est. Postremo scilicet Deo omnipotente gratias refferendum est, quia, sicut scriptum est sine eum nihil possumus facere (... , οτι χωρις εμου ου δυνασθε ποιειν ουδεν [Joh 15,5]).