

**Biochemische und strukturelle Untersuchungen
der Proteine DsrE, DsrF, DsrH und DsrC
aus
*Allochromatium vinosum***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Schulte

aus

Trier

Bonn 2005

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

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

Tag der Promotion 9.11.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver
der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr 2005

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien und Materialien	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Organische Lösungsmittel	11
2.1.3	Säuren	11
2.1.4	Enzyme	12
2.1.5	Vitamine	12
2.1.6	Aminosäuren Fluka (Steinheim)	12
2.1.7	Geräte: Photometer; Zentrifugen, Ultraschall etc.	12
2.1.8	Chromatographiesäulen	12
2.1.9	Kits	13
2.1.10	Sonstige Materialien	13
2.2	Verwendete Software und Internetprogramme	13
2.3	Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	14
2.3.1	Organismen	14
2.3.2	Plasmide	14
2.3.3	Oligonukleotide	14
2.4	Antikörper	15
2.4.1	Zweit-Antikörper	15
2.5	Mikrobiologische Methoden	15
2.5.1	Kultivierung von <i>Allochromatium vinosum</i> DSM 180 ^T (Wildtyp)	15
2.5.1.1	Nährmedien	15
2.5.1.2	Thiosulfat-Medium, modifiziert nach Brune	17
2.5.1.3	RCV-Medium (nach Weaver et al., 1975)	17
2.5.2	Kultivierung von <i>Allochromatium vinosum</i> Wildtyp	18
2.5.2.1	Konservierung von <i>A. vinosum</i> Stämmen	18
2.5.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	18
2.5.3.1	LB-Medium (Luria Bertani-Medium)	19
2.5.3.2	2 x YT-Medium	19
2.5.3.3	SOC-Medium	19
2.5.3.4	Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	19
2.6	Molekularbiologische Methoden: DNA	20
2.6.1	Präparation von DNA	20
2.6.1.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>A. vinosum</i>	20
2.6.1.2	Plasmid-Präparation	21
2.6.2	Enzymatische Modifikation von DNA	21
2.6.2.1	Restriktionsverdau	21
2.6.2.2	Ligation	21
2.6.3	Amplifikation von DNA	21
2.6.3.1	PCR mit mutagenen Oligonukleotiden	21
2.6.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	22
2.6.4.1	DNA-Gelelektrophorese	22
2.6.4.2	DNA-Gelextraktion mit dem Qia-quick Gel-Extraktions-Kit	23
2.6.5	Reinigung und Konzentrierung von DNA	23
2.6.5.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	23
2.6.5.2	Ethanol-Fällung	23
2.6.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	24
2.6.6	Kompetente <i>E. coli</i> Zellen	24

Inhaltsverzeichnis

2.6.7	Transformation mit CaCl ₂ kompetenten und superkompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.7	Überexpression	25
2.7.1	Überexpression von rekombinanten Dsr-Proteinen aus <i>Allochromatium vinosum</i> ..	25
2.7.2	Expression von rekombinantem Protein mit Selenomethionin in einem Methionin auxotrophen <i>E coli</i> Bakterienstamm.....	26
2.7.2.1	Medien für die Markierung von Proteinen mit Selenomethionin in <i>E. coli</i> B834(DE3).....	26
2.7.2.2	Anzucht, Zellernte und Zellaufschluss von <i>E. coli</i> B834 (DE3) Zellen mit Selenomethionin	28
2.8	Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.8.1	Zellernte und Zellaufschluss.....	28
2.8.2	Ultrazentrifugation.....	29
2.8.3	Ammoniumsulfatfällung.....	29
2.8.4	Entsalzung von Proteinlösungen (Dialyse).....	29
2.8.5	Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration oder mit Polyethylenglykol	30
2.8.6	Proteinaufreinigung	30
2.8.6.1	Säulenchromatographische Methoden.....	30
2.8.6.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	31
2.8.6.3	Ionenaustauschchromatographie.....	31
2.8.6.4	Gelfiltration.....	32
2.8.7	Affinitätschromatographie: Aufreinigung von His-Tag-Proteinen	33
2.8.8	Zellaufschluss und Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Selenomethionin über die NTA-Säule.....	34
2.8.9	Bestimmung des Proteingehaltes	35
2.8.9.1	Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry.....	35
2.8.9.2	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....	35
2.8.9.3	Proteinbestimmung mit dem Micro-BCA-Assay	35
2.8.10	Elektrophoretische Methoden.....	36
2.8.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	36
2.8.10.2	Native PAGE	37
2.8.10.3	Färbung von Proteingelen.....	37
2.8.11	Elektroblotting	38
2.8.11.1	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	39
2.8.11.2	ECL Plus TM Western-Blot Detektion oder SuperSignal West Pico Chemilumineszens.....	39
2.9	Immunologischer Nachweis des His-Tags bei rekombinanten Proteinen	41
2.10	Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen.....	42
2.11	Analytischer Nachweis von Schwefelverbindungen mittels der HPLC	42
2.11.1	Aufarbeitung von Fermenterproben	43
2.11.2	Bestimmung von Thiolen	43
2.11.3	Nachweis von derivatisierten Thiolen mit der HPLC.....	43
2.11.4	Bestimmung von Elementarschwefel	44
2.11.5	Bestimmung von Sulfat	45
2.12	Enzymologische Methoden	45
2.12.1	Rhodanetest modifiziert nach Prieto 1997	45
2.13	Elektronenspray Ionisations-Massenspektroskopie.....	46
2.14	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen.....	47
2.14.1	Röntgenstrahlung.....	47
2.14.2	Durchführung der Strukturanalyse der DsrEFH Proteine von <i>A. vinosum</i>	47
2.14.3	SAD (Single Anomalous Dispersion) / MAD (multiple anomalous Dispersion).....	47
2.14.4	Die MR Methode	48

3 Ergebnisse	49
Teil I	49
3.1 Aufreinigung von DsrEFH aus <i>A. vinosum</i> DSMZ 180 T	49
3.1.1 DsrE ist ein lösliches Protein	49
3.1.2 Reinigung von DsrE, DsrF und DsrH aus <i>A. vinosum</i>	50
3.2 Die Bildung von DsrE, DsrF und DsrH wird durch Sulfid induziert	55
3.3 Herstellung von rekombinanten DsrE, DsrF, DsrH für biochemische Untersuchungen ...	56
3.4 Aufreinigung des rekombinanten DsrEFH-Proteins aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) mittels Affinitätschromatographie	58
3.4.1 Aufreinigung des rekombinanten DsrEFH-Proteins über die Mono-Q-Säule	59
3.5 Nachweis des N-terminalen His-Tag	60
3.6 Bestimmung der molekularen Massen der DsrEFH-Proteine und Nachweis von Schwefeladdukten durch Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	61
3.7 Ist das DsrEFH-Protein stabil?	63
3.8 Reduktion von Disulfidbrücken und Modifikation von Thiolgruppen	65
3.8.1 Sind die Proteine DsrE, DsrF und DsrH über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden?	65
3.9 Strukturanalyse von DsrE, DsrF, DsrH	68
3.9.1 DsrE und seine homologen Proteine	68
3.9.2 Strukturanalyse von DsrE, DsrF und DsrH aus <i>A. vinosum</i>	74
3.9.3 Expression vom rekombinanten DsrEFH mit Selenomethionin (Konstruktion von SeMetEFH) für die SAD-Methode	75
3.9.4 Die Kristallstruktur des nativen rekombinanten DsrEFH und des SeMetEFH	77
3.10 Aktivitätsuntersuchungen	79
3.10.1 Üben die Proteine DsrE, DsrF und DsrH Rhodaneseaktivität aus?	79
3.10.2 Chromatographische Aufreinigung von DsrEFH durch DEAE-Sephadex	80
3.10.3 Besitzt DsrEFH Polysulfid-Schwefeltransferase-Aktivität	84
Teil II	85
3.11 Ergebnisse der biochemischen und strukturellen Untersuchungen von DsrC aus <i>Allochromatium vinosum</i>	85
3.11.1 Aufreinigung des rekombinanten DsrC-Proteins zur biochemischen Charakterisierung	85
3.11.2 Aufreinigung des rekombinanten DsrC durch die Gelfiltrationschromatographie ...	86
3.12 Bestimmung der molekularen Masse des rekombinanten DsrC-Proteins durch ESI-MS-Analyse	87
3.13 Zwei DsrC-Monomere sind über eine Disulfidbrücke verbunden	88
3.14 Aufreinigung von DsrC aus <i>A. vinosum</i> Wildtyp	90
3.15 Homologieuntersuchungen zu DsrC aus <i>A. vinosum</i>	93
3.15.1 Zu DsrC gibt es viele homologe Proteine	93
3.16 Die Bildung von DsrC in <i>A. vinosum</i> wird durch Sulfid verstärkt	97
Teil III	98
3.17 Interaktionsuntersuchungen von DsrEFH und DsrC	98
3.17.1 Können rekombinantes DsrEFH und rekombinantes DsrC miteinander interagieren?	98
3.17.2 Aufreinigung von rekombinanten DsrEFH mit DsrC über die Superose-6-Säule	100
3.18 Nachweis der Interaktion von rekombinanten DsrC-Dimer und DsrEFH aufgereinigt aus <i>A. vinosum</i>	105

Inhaltsverzeichnis

Teil IV	106
3.19 Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen	106
4 Diskussion	109
4.1 DsrEFH aus <i>Allochromatium vinosum</i>	109
4.2 DsrC aus <i>A. vinosum</i> ist ein lösliches cytoplasmatisches Protein	127
5 Zusammenfassung	135
6 Literatur	137

Abkürzungen

Aqua demin	demineralisiertes Wasser
Aqua dest	destiliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
BSA	Bovin Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
ca.	circa
DEAE	Diethylaminoethyl
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
g	Erdbescheinigung
Hepes	N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethan-sulfonsäure]
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KDa	Kilodalton
NAD	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pkt.	Punkt
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.	siehe
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
Temed	Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
z.B.	zum Beispiel
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
rpm	rounds per minute

1 Einleitung

Der Schwefelkreislauf

Der Schwefel ist ein sehr wichtiges und weit verbreitetes Element im Naturkreislauf der Erde. Mit einem Anteil von 1 % der Trockenmasse ist der Schwefel ein essentieller Bestandteil aller lebenden Organismen. Für die Biosphäre ist die oxidierteste Form des Schwefels das Sulfat (Oxidationszahl 6+). Vor allem in Ozeanen ist viel Sulfat enthalten (28 mM oder 2,7 g/l). In der Biomasse liegt der Schwefel jedoch überwiegend in der reduzierten Form als Sulfidgruppe vor (Oxidationszahl -2, in Disulfidbrücken -1). In dieser Form ist er in den Aminosäuren Cystein und Methionin und in Eisen-Schwefel-Zentren von Proteinen enthalten, sowie in Koenzymen. Pflanzen, Pilze und Bakterien sind zur assimilatorischen Sulfatreduktion befähigt, bei der Schwefel bis zu der Oxidationsstufe -2 reduziert und in die Biomasse eingebaut wird (Trüper, 1984). Tier und Mensch dagegen müssen die reduzierten Schwefelverbindungen mit der Nahrung aufnehmen. Im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel, der ausschließlich auf Prokaryonten beschränkt ist, dienen die Schwefelverbindungen der Energiegewinnung. Schwefel oder Sulfat können unter anaeroben Bedingungen den schwefel- bzw. sulfatreduzierenden Bakterien als terminale Elektronenakzeptoren einer anaeroben Atmungskette dienen. Reduzierte Schwefelverbindungen werden von chemotrophen und auch phototrophen Schwefeloxidierern als Elektronendonatoren genutzt. Diese Organismen oxidieren Sulfid, Elementarschwefel, Thiosulfat oder Sulfit zu Sulfat. Es können jedoch auch unvollständige Oxidationen zu Tetrathionat, oder Elementarschwefel erfolgen. Zu den chemotrophen Schwefeloxidierern, die eine heterogene Gruppe darstellt, gehören Vertreter der Bakteria (z.B. *Beggiatoa* und *Thiobacillus*) und der Archaeobacteria (z.B. *Acidianus* und *Sulfolobus*), die reduzierte Schwefelverbindungen meist unter aeroben, zum Teil auch unter anaeroben Bedingungen oxidieren können. Unter anaeroben Bedingungen kann die chemotrophe Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen an die Reduktion von Nitrat gekoppelt werden (z.B. *Thiobacillus denitrificans*). Die anoxygenen phototrophen Schwefelbakterien verwenden die freiwerdenden Elektronen für die phototsynthetische CO₂-Reduktion. Zu den phototrophen Bakterien, die mit reduzierten Schwefelverbindungen eine anoxygene Photosynthese betreiben gehören die Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*), die grünen Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*), sowie Vertreter der schwefelfreien Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*) und der grünen gleitenden Bakterien (*Chloroflexaceae*) und die Gram-positiven Heliobakterien (Bryantseva et al., 2000). Einige Vertreter der Cyanobakterien können ebenfalls reduzierte Schwefelverbindungen für eine anoxygene Photosynthese nutzen (Brune, 1989). Die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen erfolgt bei den phototrophen Schwefelbakterien in drei Hauptschritten (Trüper und Fischer 1982, Trüper, 1984, Dahl und Trüper, 1994). Zuerst findet eine

Umsetzung von Sulfid oder Thiosulfat zum Schwefel statt, der bei den *Chromatiaceae* in Form von Schwefelkugeln intrazellulär, im Periplasma (Pattaragulwanit et al., 1998) gelagert wird. Bei den *Ectothiorhodospiraceae* und *Chlorobiaceae* werden die Schwefelkugeln außerhalb der Zelle gelagert. Im zweiten Schritt erfolgt eine Oxidation des in den Schwefelkugeln gespeicherten Schwefels zu Sulfit. Im dritten und letzten Schritt wird das Sulfit zum Sulfat oxidiert, das ins Medium ausgeschieden wird.

Der Organismus *Allochromatium vinosum*

Das zur Familie der *Chromatiaceae* zugeordnete phototrophe anoxygene Schwefelpurpurbakterium *Allochromatium vinosum* ist ein Gram-negatives, polar begeißeltes Stäbchen, mit einem intracytoplasmatischen Membransystem, das vesikulär vorliegt und in dem der Photosyntheseapparat lokalisiert ist. Die natürlichen Habitate von *A. vinosum* sind meist Gewässer und Sedimente mit stehendem schwefelwasserstoffhaltigem Süß- und Salzwasser (Pfennig und Trüper, 1989). Unter anaeroben Bedingungen wächst *A. vinosum* phototroph, es kann aber auch fakultativ chemolithoautotroph unter mikroanaeroben bis semianaeroben Bedingungen wachsen (Kämpf und Pfennig, 1980). Als photosynthetische Elektronendonatoren können molekularer Wasserstoff, Schwefel, Sulfat, Thiosulfat, Sulfit, Formiat, Acetat, Pyruvat, Malat, Propionat, Fumarat und Succinat (van Gemerden, 1987; Pfennig und Trüper, 1989; Steudel et al., 1990) dienen. *A. vinosum* ist eines der bestuntersuchten Schwefelpurpurbakterien. Aufgrund seiner hohen Stoffwechsel-flexibilität und der Möglichkeit zur manipulativen Genetik, (Pattaragulwanit und Dahl, 1995) eignet sich dieser Organismus besonders gut für die Untersuchung des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels phototropher Bakterien.

Oxidation von Sulfid oder Thiosulfat zu intermediärem Schwefel

Drei Enzyme, die reverse Siroamid-Sulfitreduktase, Flavocytochrom c_{552} und die Sulfid: Chinon-Oxidoreduktase (SQR) wurden für die Sulfidoxidation vorgeschlagen (Schedel 1979, Brune, 1989, 1995a.). Für die Enzyme Flavocytochrom c_{552} und die reverse Siroamid-Sulfitreduktase konnte mit Hilfe eine Insertionsinaktivierung bereits nachgewiesen werden, dass sie nicht allein für die Sulfidoxidation verantwortlich sind (Reinartz et al., 1998). Nach derzeitigem Kenntnisstand scheint die Sulfid: Chinon-Oxidoreduktase (SQR) für die Sulfidoxidation verantwortlich zu sein, ein bei Prokaryonten weit verbreitetes in der Membran inseriertes Flavoprotein (Dahl et al., 2002), das die Elektronen vom Sulfid in den Chinon-Pool der Membran überträgt. Die Enzymaktivität der SQR wurde in *A. vinosum* nachgewiesen (Reinartz et al., 1998), in dem grünen Schwefelbakterium *Chlorobium limicola*, in *Chlorobaculum tepidum* (früher *Chlorobium tepidum*, Imhoff, 2003) sowie in einigen weiteren phototrophen und chemotrophen Schwefeloxidierern. Bei der Katalyse durch

die SQR entstehen vermutlich Polysulfide, die auf Grund ihrer Instabilität zu Schwefelwasserstoff und elementarem Schwefel disproportionieren (Brune, 1989; Dahl et al., 2002). *A. vinosum* ist in der Lage Thiosulfat als Elektronendonator für die anoxygene Photosynthese zu nutzen, wobei das Thiosulfat zunächst in Sulfan- und Sulfon-Schwefel gespalten wird. Danach wird der Sulfan-Schwefel zunächst in Form intrazellulärer Schwefelkugeln akkumuliert, während der Sulfon-Schwefel schnell zu Sulfat oxidiert wird (Smith und Lascelles, 1966; Schedel und Trüper, 1980). In *Paracoccus denitrificans* wurde durch Mutageneseuntersuchungen eine für die Schwefeloxidation verantwortliche DNA-Region ausfindig gemacht, das *sox*-Gencluster (Mittenhuber et al., 1991). Zu den *sox*-Genen wurden homologe Gensequenzen auch in mehreren chemotrophen sowie phototrophen Bakterien nachgewiesen (Friedrich et al., 2001; Dahl et al., 2001; Hensen, 2001). Die *sox*-Gene in *A. vinosum* sind für die Thiosulfatoxidation sehr wichtig, jedoch nicht wie bei *P. pantotrophus* essentiell für die Sulfidoxidation (Chandra und Friedrich 1986; Daniela Hensen, pers. Mitteilung). In Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums kann *A. vinosum* Tetrathionat aus Thiosulfat bilden, das nicht weiter metabolisiert wird (Smith, 1966).

Schwefelkugeln

Die Schwefelkugeln erscheinen im lichtmikroskopischen Bild als stark lichtbrechende Strukturen mit einem Durchmesser von bis zu 1 μm und werden bei den *Chromatiaceae* im Inneren gelagert. Die Röntgendiffraktometrie frisch isolierter Schwefelkugeln aus *A. vinosum* zeigte, dass der Schwefel sich nicht in fester kristalliner Form, sondern in einem flüssigen amorphen Zustand befindet (Hageage et al., 1970). Zweifel kamen jedoch auf, als festgestellt wurde, dass die Dichte der Schwefelkugeln von *A. vinosum* viel geringer ist ($1,31 \text{ g/cm}^3$) (Guerrero et al., 1984), als die des flüssigen elementaren Schwefels ($1,89 \text{ g/cm}^3$) (Steudel et al., 1990). Aufgrund dieser Erkenntnis wurde vorgeschlagen, dass der Elementarschwefel in hydratisierter Form (Guerezo et al., 1984) oder in Form von langkettigen Polysulfiden vorliegen könnte (Mas und van Gemerden, 1987). Mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie im Nahkantenbereich (X-ray near edge absorption spectroscopy XANES) konnte die molekulare Struktur des Schwefels in den Schwefelkugeln intakter Zellen von *A. vinosum in situ* untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die Schwefelkugeln nur zu einem geringen Anteil aus S_8 -Schwefel bestehen, den Hauptanteil bilden vermutlich sogenannte bis-Organylsulfane mit einer Struktur $(\text{R-S}_n\text{-R}; n > 3)$. Polythionate und Polysulfide konnten in den Schwefelkugeln nicht nachgewiesen werden (Prange et al., 1999). Die Schwefelkugeln von *A. vinosum* sind von einer unimolekularen aus drei hydrophoben Proteinen bestehenden Schicht umgeben (Schmidt et al., 1971; Brune, 1995 a). Die Gensequenzen der Schwefelkugelproteine lassen auf abspaltbare N-terminale Signalpeptide schließen, was auf extracytoplasmatische Lokalisation der Proteine und somit auf eine extracytoplasmatische

Lokalisation der Schwefelkugeln hindeutet (Pattaragulwanit et al., 1998). Da innerhalb der Proteinsequenz der Schwefelkugelproteine keine Cysteinreste nachgewiesen wurden, ist es unwahrscheinlich das diese enzymatische Funktionen ausüben, sondern nur von struktureller Bedeutung sind (Pattaragulwanit et al., 1998).

Oxidation des intermediären Schwefels

Obwohl bereits viele Untersuchungen zum bakteriellen oxidativen Schwefelmetabolismus durchgeführt wurden, stehen auch auf Grund seiner Komplexität immer noch sehr viele Fragen offen. Insbesondere ist die Oxidation gespeicherten oder extern hinzugefügten Schwefels auf molekularer Ebene schlecht verstanden und stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Die genaue enzymatische Funktion der einzelnen Proteine, die an der Oxidation des gespeicherten Schwefels beteiligt sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Das einzige Enzym, dem bei der Oxidation des Schwefels bisher eine Funktion zugeordnet wurde, ist die dissimilatorische Sulfitreduktase aus *A. vinosum* (Schedel et al., 1979; Trüper, 1981, 1984; Trüper und Fischer, 1982; Pfennig und Trüper, 1992; Dahl und Trüper, 1994). Dissimilatorische Sulfitreduktasen katalysieren in den Sulfat reduzierenden Bakterien und Archaea die Reduktion von Sulfit zu Sulfid (Dahl et al., 1993). In *A. vinosum* wird von der Sulfitreduktase eine reverse Reaktion, wahrscheinlich die Oxidation von Sulfid zum Sulfit katalysiert. Das Enzym wird daher auch als reverse Sulfitreduktase bezeichnet (Schedel et al., 1979). Durch eine Interposonmutagenese der Gene, die für die reverse Siroamid-Sulfitreduktase in *A. vinosum* kodieren, wurde zum ersten Mal die Bedeutung dieses Enzyms für die Schwefeloxidation hervorgehoben (Pott und Dahl, 1998). Hierzu wurde das Gen *dsrB*, das für die β -Untereinheit der Siroamid-Sulfitreduktase kodiert durch die Insertion einer Kanamycin- Ω -Resistenzkassette inaktiviert. Die *dsrB*-Mutante war nicht mehr in der Lage den intermediär abgelagerten Schwefel weiter zu oxidieren. Die Oxidation von Sulfid wurde jedoch durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Um genauere Erkenntnisse über das bei der Schwefeloxidation beteiligte Enzymsystem zu gewinnen wurde die DNA-Region stromaufwärts und stromabwärts der *dsrA*- und *dsrB*-Gene, die für die Sulfitreduktase kodieren, sequenziert. Stromabwärts von *dsrB* wurden 13 weitere offene Leseraster detektiert. Die folgende **Abb. 1.1** zeigt eine schematische Übersicht zu der Lokalisation der *dsr*-Gene des *dsr*-Operons von *A. vinosum*

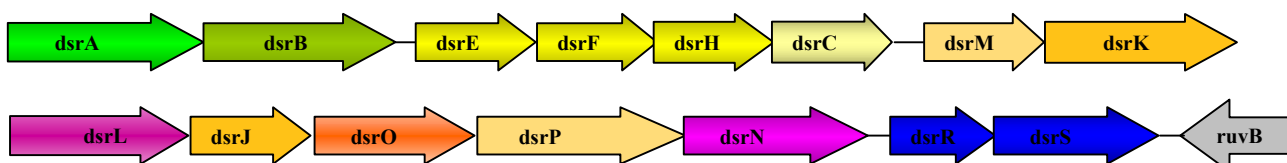


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der *dsr*-Gene des *dsr*-Operons von *A. vinosum*

Zusammen mit den Genen *dsrA/dsrB* bilden diese 13 Gene eine Transkriptionseinheit, das *dsr*-Operon. Das *dsr*-Operon umfasst 14467 bp. Stromaufwärts des *dsrA*-Gens befindet sich eine potentielle Promotor-Region (Pott-Sperling, 2000). Stromabwärts von *dsrS* wurde eine Sequenz mit einem Potential für eine Bildung von Haarnadelschleifen Strukturen identifiziert, welche möglicherweise als Transkriptionsterminator dienen könnte. Jedoch wurde eine typische Poly- (T)-Sequenz, die gewöhnlich direkt stromabwärts von solchen Haarnadelstrukturen in typischen eubakteriellen rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren vorkommt, hier nicht nachgewiesen (Dahl et al., 2005). Stromabwärts von *dsrS* befindet sich ein unvollständiger offener Leserahmen, der Homologien zu *ruvB* aufweist. In *E. coli* stellt das *ruvB* Genprodukt ein Teil des RuvABC Revalosom dar, das die Auflösung von Holiday-Kreuzungen katalysiert, welche während genetischer Rekombination und DNA-Reparaturen auftreten. Ergebnisse der Northern-Blot und Western-Blot-Analysen, sowie die Beobachtung das die Sulfitreduktase sich in einfach detektierbaren Mengen nachweisen lässt, sobald *A. vinosum* unter photolithoautotrophen Bedingungen gezogen wird, zeigen, dass das Sulfid oder der intrazelluläre Schwefel die Expression der *dsr*-Gene, sowie die Bildung der *dsr*-Proteine verstärkt induziert. Die beobachtete konstitutive Transkription von *dsrHC* ließ vermuten, dass es einen zusätzlichen Transkriptionsstartpunkt gibt, der im Bereich von *dsrF* liegt (Pott und Dahl, 1998; Pott-Sperling, 2000; Dahl et al., 2005). Mittels der Gensequenzen konnten erste Aussagen zur Lokalisation, über eventuelle Kofaktoren und eventuelle Funktion der *dsr*-Proteine gemacht werden, die nun weiter durch proteinchemische und molekulargenetische Methoden nachgewiesen werden müssen.

Die Gene der Sulfitreduktase *dsrAB*, deuten auf cytoplasmatische Lokalisation hin. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die prosthetische Gruppe der dissimilatorischen Sulfitreduktase nicht wie bislang angenommen das Sirohäm darstellt, sondern dass diese in der amidierten Form als Siro(häm)amid vorliegt (Y. Lübke, pers. Mitteilung; Dahl et al., 2005). Die für die Bindung der prosthetischen Gruppe benötigten Sequenzen sind nur in DsrA vollständig vorhanden. Beide Proteine weisen die für dissimilatorische Sulfitreduktasen typischen [Fe₄S₄]-Ferrodoxin Domänen auf (Dahl et al., 1993). Analog zu dissimilatorischen Sulfitreduktasen sulfatreduzierender Bakterien liegt die Sulfitreduktase von *A. vinosum* vermutlich als $\alpha_2\beta_2$ -strukturiertes Holoprotein vor. Die reverse dissimilatorische Sulfitreduktase von *A. vinosum* katalysiert einen sechs Elektronen Schritt, die Oxidation von Sulfid zu Sulfit. Da die reverse Sulfitreduktase cytoplasmatisch und die Schwefelkugeln periplasmatisch lokalisiert sind, kann die Sulfitreduktase den Schwefel aus den Schwefelkugeln nicht direkt weiter oxidieren. Vor der Oxidation muss der Schwefel zunächst reduziert und in Form eines geeigneten Intermediats über die Cytoplasmamembran transportiert und vermutlich auf die Oxidationsstufe des Sulfids reduziert werden. Die Sequenzanalysen der *dsr*-Genprodukte, insbesondere von DsrK lassen vermuten, dass dieses Protein einen solchen

Mechanismus katalysieren könnte (Pott-Sperling, 2000). Die Proteine DsrMKJOP bilden einen membranumspannenden elektronentransportierenden Komplex. Diese Idee wird unterstützt durch die Aufreinigung eines verwandten *Hme*-Transmembran-Komplexes aus *Archaeoglobus fulgidus* (Mander et al., 2002).

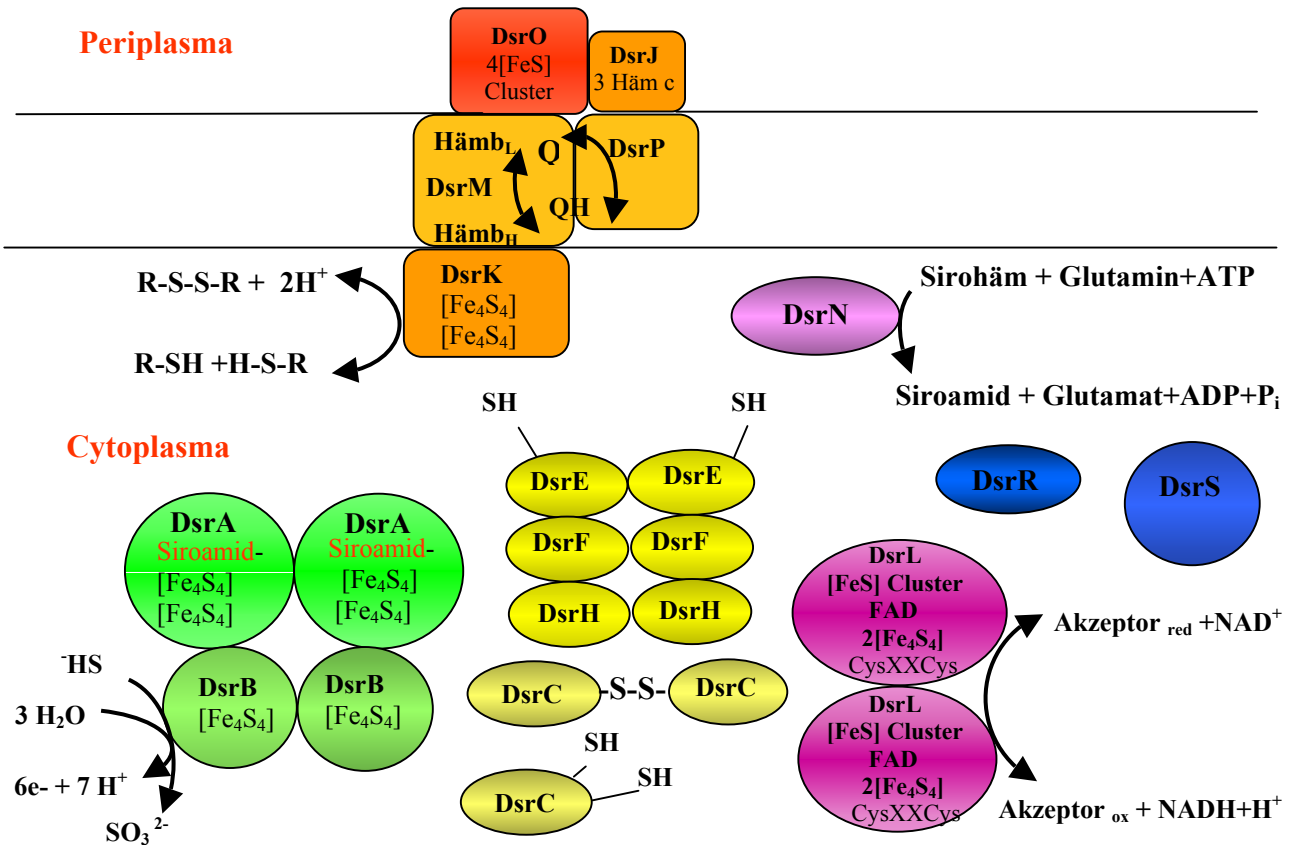


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Dsr-Proteine aus *A. vinosum*. Diese Darstellung beruht auf den aus genetischen Sequenzuntersuchungen und den bereits vorliegenden biochemischen Daten gewonnenen Ergebnissen (Dahl, 2000; Dahl et al., 2005).

DsrM, ein integrales Membranprotein, besitzt fünf potentielle Transmembranhelices. Es weist signifikante Ähnlichkeiten zu potentiellen b-Typ Cytochromen aus *A. fulgidus* auf (Klenk et al., 1997), sowie auch Ähnlichkeiten zu den Cytochrom b haltigen γ -Untereinheiten bakterieller Nitratreduktasen. Analog dazu weist DsrM vermutlich zwei b-Typ-Häm-Gruppen auf, eine mit niedrigem Redoxpotential (Häm b_L) zum Periplasma und eine mit hohem Redoxpotential (Häm b_H) zum Cytoplasma. DsrM könnte mit dem Chinon-Pool der Membran zum Cytoplasma hin interagieren. (Pott-Sperling, 2000). DsrK ist ein cytoplasmatisch lokalisiertes [4Fe-4S]-Cluster enthaltendes Protein, das signifikante Homologien zur katalytischen Untereinheit HdrD der Heterodisulfidreduktase von beispielsweise *Methanosaracina Bakeri* (Künkel et al., 1997), und zu Af502 aus *A. fulgidus* aufweist (Mander et al., 2002). DsrJ stellt vermutlich ein Trihäm-

Cytochrom c dar. Das periplasmatisch lokalisierte Protein wird wahrscheinlich über einen Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert (Fekkes et al., 1999). In dem DsrJ homologen Af503 von *A. fulgidus* wird das Signalpeptid nicht abgespalten. Möglicherweise könnte es dem reifen DsrJ als N-terminaler Anker in der Membran dienen (Dahl et al., 2005). DsrO ist ein Eisen-Schwefel-Protein mit 16 konservierten Cysteinresten, von denen vorhergesagt wird, dass sie 4[4Fe-4S]-Cluster binden. DsrO besitzt eine abspaltbare Doppel-Arginin Signalpeptidsequenz. Das Signalpeptid vermittelt einen Transport des Proteins im gefalteten Zustand durch das Tat-System (Brüser et al., 1998). Das Signalpeptid des nah verwandten Af499 aus *A. fulgidus* liegt im reifen Enzym nicht mehr vor. (Mander et al., 2002).

DsrP besitzt vermutlich 10 Transmembranhelices und ist nah verwandt mit dem Af500 aus *A. fulgidus* (Mander et al., 2000) und dem HmC von *Desulfovibrio vulgaris* (Rossi et al., 1993). Dagegen wurden für das nah verwandte NrfD-Protein aus *E. coli* nur 8 Transmembranhelices gefunden. NrfD ist die Membrankomponente einer Formiat abhängigen Nitritreduktase. Da keine Histidinreste innerhalb der Transmembranhelices für *dsrP* nachweisbar sind, bindet es vermutlich kein Häm b (Dahl et al., 2005). Aus der Membranfraktion von *A. vinosum* konnten bereits die Proteine DsrKJO aufgereinigt werden, was beweist, dass diese Proteine fest an integrale Membranproteine, vermutlich DsrMP binden, um so den elektronentransportierenden Transmembran Komplex DsrMKJOP zu bilden (Dahl et al., 2005).

DsrL ist ein lösliches, cytoplasmatisches [Fe₄-S₄]-Cluster enthaltendes Protein, das mit der cytoplasmatischen Sulfitreduktase zusammen aufgereinigt wurde (Lübbe, 2005). Aufgrund der Homologie von DsrL zur β-Untereinheit von Glutamat-Synthetasen wurde für DsrL zunächst eine Glutamat-Synthase-Funktion postuliert, die sich jedoch experimentell nicht bestätigen ließ (Y. Lübbe, pers. Mitteilung). DsrL weist zwei Adenylat-Bindungsmotive GXGXXG/A/P auf, von denen das eine mit FAD, das andere mit NADP(H) interagiert (Pelanda et al., 1993). Im C-terminalen Teil besitzt DsrL ein CXXC-Motiv, das eine wichtige Rolle bei der Katalyse von Redoxreaktionen spielen könnte, z.B. bei einem Thiol-Disulfid-Übergang (Dahl et al., 2005). Neueren Erkenntnissen zur Folge ist DsrL ein homodimeres, Eisen-Schwefel-Flavoprotein, das NADH Akzeptor-Oxidoreduktase-Aktivität aufweist (Y. Lübbe, pers. Mitteilung, 2005).

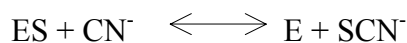
DsrN ist ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein, das ähnlich zu einer Corbyrinic-Säure-a,c-Diamid-Synthase ist, einem in die Vitamin-B12-Biosynthese involvierten Enzym. In einer ATP abhängigen Reaktion katalysiert es die Amidierung der Corbyrinsäure zu Corbyrinic-Säure-a,c-Diamid unter Verbrauch von zwei Molekülen Glutamin (Debussche et al., 1990). Vermutlich katalysiert das DsrN aus *A. vinosum* die Amidierung des Sirohäms zum Siroamid, der prosthetischen Gruppe der dissimilatorischen Sulfitreduktase (Pott-Sperling, 2000; Dahl, et al., 2005).

DsrR und DsrS sind cytoplasmatische Proteine. Homologe Gene zu DsrR und zu DsrS wurden unlängst in *Thiobacillus denitrificans* detektiert. DsrR besitzt eine Ähnlichkeit zu IscA und zu HesB Domänen, beides sind Proteine, die in die Bildung von Fe-S-Clustern beteiligt sind (Cupp-Vickery et al., 2004). Jedoch fehlen im Carboxy-terminalen Teil von DsrR zwei Cysteinreste, die in IscA und HesB konserviert sind (Dahl et al., 2005; Pott-Sperling, 2000). Ein weiteres Dsr-Protein DsrD wurde bislang nur bei sulfatreduzierenden Bakterien detektiert, was auf eine spezifische Rolle bei der Sulfatreduktion hindeutet (Dahl et al., 1999; Pott-Sperling, 2000; Dahl et al., 2005). DsrC ist ein kleines cytoplasmatisches Protein. Northern-Blot-Analysen zeigten, das *dsrC* konstitutiv exprimiert wird. Unter photolithoautotrophen Bedingungen, d.h. bei Wachstum mit Sulfid ist die Transkription des Gens verstärkt (Pott-Sperling, 2000). Das DsrC Protein aus *A. vinosum* weist signifikante Homologien auf zum *dsv(r)C* aus *Desulfovibrio vulgaris* (Karkhoff-Schweitzer et al., 1993), zu Genprodukten aus *yccK* *E. coli* (Blattner et al., 1997), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *A. fulgidus* (Klenk et al., 1997), *P. islandicum* (Molitor et al., 1998) und *P. aerophilum* (Cort et al., 2001). Im C-terminalen Bereich zeigen die Sequenzen hohe Übereinstimmungen, in dieser Region liegen bei allen Organismen, die dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel betreiben zwei strikt konservierte Cysteinreste vor, die vermutlich katalytische Funktion ausüben (Pott et al., 1998). Das von *dsvC* kodierte Protein wurde zusammen mit dissimilatorischen Sulfitreduktasen aus einigen sulfatreduzierenden Bakterien aufgereinigt (Pierik et al., 1992; Steuber et al., 1995), weshalb eine Funktion als dritte Untereinheit der dissimilatorischen Sulfitreduktasen vom Desulfovirdin-Typ postuliert wurde (Pierik et al., 1992). Für das DsrC aus *Desulfovibrio desulfuricans* wurde eine mögliche Funktion bei der Thiosulfat- und Trithionat-Reduktion vorgeschlagen (Pott et al., 1998). Für DsrC aus *A. vinosum* konnte bislang noch keine Funktion nachgewiesen werden.

Die Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* kodieren für kleine lösliche cytoplasmatische Proteine für die bislang noch keine enzymatische Funktion ermittelt wurde (Dahl et al., 2005). Die entsprechenden Proteine DsrE, DsrF und DsrH zeigten signifikante Homologien zu hypothetischen Proteinen YheN, YheM und YheL aus *Escherichia coli* (CFT073). Die Gene *yheN*, *yheM* und *yheL* aus *E. coli* (Blattner et al., 1997) sind wie *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* hintereinander angeordnet. Die zu *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* homologen Gene MTH1357, MTH1358 und MTH1360 liegen im Genom von *Mth. thermoautotrophicum* (Smith et al., 1997) ebenfalls hintereinander, wobei sich jedoch ein weiteres Gen zwischen dem *dsrF*- und dem *dsrH*-homologen Gen befindet. Alle drei untersuchten Dsr-Genprodukte weisen nur eine geringe Ähnlichkeit zu den hypothetischen Proteinen MJ0989 aus *Mtc. jannaschii* (Bult et al., 1996) und zum ORF 1 aus *Mtp. kandleri* (Klein und Thauer 1997) auf. Diese Homologien lassen sich dadurch erklären, dass DsrE, DsrF und DsrH zueinander sehr ähnlich sind (Pott und Dahl, 1998). Für das Protein DsrF wurde bislang nur eine mögliche Rhodanese-Funktion postuliert (Schwarz, Dissertation, 2001).

Rhodanesen (Schwefeltransferasen)

Rhodanesen, auch Schwefeltransferasen genannt, sind multifunktionale Enzyme, die in Pflanzen, Tieren und Bakterien vorkommen. Trotz weiter Verbreitung ist ihre physiologische Funktion weitgehend umstritten (Bordo et al., 1999; Melino et al., 2004). Rhodanesen beteiligen sich an der Detoxifikation (Entgiftung) von Cyanid, wobei diese Reaktion in einer Art Ping-Pong Mechanismus erfolgt. *In vitro* katalysiert das Enzym einen Transfer des äußeren Schwefelatoms (Sulfan) vom Thiosulfat auf Cyanid und wechselt dabei zwischen zwei distinkten Formen, dem freien Enzym (E) und dem Schwefel substituierten Enzym (ES) (Bonomi et al., 1977; Bordo et al., 1999). In der letzteren Form ist ein divalentes S-Atom über eine Persulfid Bindung an die Sulfhydryl Gruppe eines aktiven Cysteinrestes gebunden (Westley, 1980; Ploegman, 1978).



Weitere Funktionen, die für Rhodanesen vorgeschlagen wurden, sind z.B. die Beteiligung als Schwefel-Insertase bei der Entstehung oder Reparatur der Fe-S-Redoxzentren von Proteinen (Bonomi et al., 1977, 1985; Pagani et al.; 1984, 1987). *In vitro* Interaktionen mit Thioredoxin wurden für ein Rhodanese ähnliches Enzym GlpE aus *Escherichia coli* (Ray et al., 2000), sowie für eine 3-Mercaptopyruvat Schwefeltransferase, aus *Leishmania* (Williams et al., 2003), vorgeschlagen. Schwefeltransferasen wurde auch eine Funktion bei der Synthese von Biotin (TseSum Bui et al., 2000) und Molybdopterin (Leimkühler et al., 2001) zugeschrieben. Röntgenstrukturuntersuchungen der Rhobov (Rhodanese aus dem Kalb) (Ploegman et al., 1978) und der Rhodanese aus *Azotobacter vinelandii* (Bordo et al., 2000) zeigten, dass die Proteine strukturell sehr ähnlich sind. Sie bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die in zwei Domänen gefaltet ist, die über eine Peptidbrücke verknüpft sind. Der wichtige katalytische Cysteinrest liegt in der C-terminalen Domäne. Die N-terminale Domäne enthält Elemente, die für den Faltungsprozess der nativen Rhodanese aus *A. vinelandii* wichtig sein könnten (Melino et al., 2004). Rhodanesen wurden unter anderem auch nachgewiesen in *E. coli* (Alexandra und Volini, 1987), in chemotrophen Schwefeloxidierern (Tabita et al., 1969; Schedel und Trüper 1980) in sulfatreduzierenden Bakterien (Burton und Akagi, 1971) sowie in dem schwefeloxidierenden Organismus *A. vinosum*. Die Enzyme konnten jedoch bislang nicht gereinigt werden. (Smith und Lascelles, 1966; Schwarz, 2001). Zur Zeit gibt es noch keine physiologischen Experimente, die belegen können, dass eines der cytoplasmatischen löslichen *dsr*-Proteine eine Rhodanesefunktion ausüben könnte.

Oxidation von Sulfid zum Sulfat

Das bei der Oxidation von Sulfid und Thiosulfat anfallende Sulfid wird wahrscheinlich in *A. vinosum* auf direktem Wege durch eine Sulfid: Akzeptor-Oxidoreduktase (SOR) zum Sulfat oxidiert (Dahl et al., 1996; Kappler, 1999; Sanchez et al., 2001). Sulfid: Akzeptor-Oxidase-Enzyme aus Thiobacilli, Vögeln und Säugern sind Homodimere, die ein Häm b, ein Molybdän-Pterin-Kofaktor und einen konservierten Cysteinrest enthalten (Kappler und Dahl, 2001). Die Vermutung, dass in *A. vinosum* die Sulfidoxidation auch von einer Sulfid-Akzeptor-Oxidoreduktase katalysiert wird, konnte dadurch gestützt werden, dass Wolframat, ein spezifischer Antagonist von Molybdän, die Sulfatbildung hemmen kann (Dahl, 1996). Das Enzym konnte jedoch aus *A. vinosum* noch nicht gereinigt und charakterisiert werden. Alternativ kann die Sulfidoxidation von der Adenosin 5'-Phosphosulfat-Reduktase (APS-Reduktase) katalysiert werden. Die APS-Reduktase katalysiert die Oxidation von Sulfid unter Kondensation mit AMP zu Adenosin-5-Phosphosulfat. Das Sulfat wird anschließend von einer ATP-Sulfurylase oder Adenylylsulfat: Phosphat Adenylyltransferase (APAT) unter Bildung von ATP aus APS freigesetzt (Brüser et al., 2000). Der APS-Reduktase Weg ermöglicht eine zusätzliche Energiekonservierung und dürfte vor allem von Bedeutung sein, wenn Energie limitierende Bedingungen vorherrschen (Dahl, 1996; Sanchez et al., 2001).

Ziel der Arbeit

In dem Bestreben die Funktion der cytoplasmatischen Dsr-Proteine DsrE, DsrF, DsrH und DsrC im oxidativen Schwefelmetabolismus des Schwefelpurpurbakterium *A. vinosum* zu klären, sollten diese Proteine mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt werden, um sie anschließend mittels proteinbiochemischer Methoden zu charakterisieren. Die Überexpression der vom *dsr*-Operon kodierten Gene *dsrE*, *dsrF*, *dsrH* und *dsrC* in *Escherichia coli* sollte eine Methode schaffen die Ausbeute der Proteine zu erhöhen, um sie einerseits für funktionelle, andererseits auch für strukturelle Untersuchungen einzusetzen. ESI-MS (Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie) der aufgereinigten Dsr-Proteine sollte nicht nur die bislang postulierten Proteingrößen und Peptidsequenzen bestätigen, sondern auch zeigen, ob die einzelnen Proteine möglicherweise über ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen untereinander verknüpft sind. Mit der Durchführung von Interaktionsuntersuchungen sollte gezeigt werden, ob eine Wechselwirkung zwischen den einzelnen Proteinen möglich ist. Von weiterem Interesse war die Klärung der Frage ob eventuell eines der Proteine, DsrE, DsrF oder DsrH eine Schwefeltransferasefunktion ausüben könnte, so wie es bereits in einer vorangegangenen Arbeit für eines dieser Proteine postuliert wurde (Schwarz, 2001). Die Analyse sollte mittels eines bereits beschriebenen Rhodanasetests durchgeführt werden (Prieto et al., 1997). Mit Hilfe einer Deletionsmutante von DsrEFH sollte festgestellt werden, ob die Mutation einen Einfluss auf die Schwefeloxidation von *A. vinosum* hat.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

2.1.1 Chemikalien

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
ADA (N-[2-Acetamido]-2-iminodiaceticacid)	SIGMA (Neu-Ulm)
Agar Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Gibco BLR (Eggenstein)
Albumin Bovin	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumbicarbonat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Coomassie R (250)	SIGMA (Steinheim)
Calciumchlorid Dihydrat	SIGMA (Steinheim)
DTT (1,4- Dithiothreitol)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Entwickler	Kodak (New Haven)
Fixierer	Kodak (New Haven)
Hepes	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
IPTG	Roth (Karlsruhe)
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka (Steinheim)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	SIGMA (Steinheim)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Roti-Load 1	Roth (Karlsruhe)
Roti-Load 2	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
TCEP	SIGMA (Steinheim)

2.1.2 Organische Lösungsmittel

Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid	Roth (Karlsruhe)

2.1.3 Säuren

Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt)

2.1.4 Enzyme

T4 DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzyme:	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Xho</i> I	Gibco (Invitrogen; Karlsruhe)
<i>Nde</i> I	Fermentas (St. Leon Rot)
Ribonuklease A	Roth (Karlsruhe)
Complete Protease Inhibitor	Roche GmbH (Mannheim)

2.1.5 Vitamine

Thiamin (Vitamin B1)	Fluka (Steinheim)
Biotin (Vitamin H)	SIGMA (Steinheim)
Riboflavin (Vitamin B2)	Fluka (Steinheim)
Niacinamid (Vitamin B3)	Fluka (Steinheim)
Pyridoxin Monohydrochlorid (Vitamin B6)	SIGMA (Steinheim)

2.1.6 Aminosäuren

Fluka (Steinheim)

2.1.7 Geräte: Photometer; Zentrifugen, Ultraschall etc.

Powersupply	Biometra (Göttingen)
Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Novaspec II (Photometer)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
FPLC	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
High Load	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Dioden Array Spektralphotometer (Agilent 8453)	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
Beckmann Coulter Optima LE 80K (Ultrazentrifuge)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Beckmann Coulter Avanti TMJ 20XP (Zentrifuge)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
French Press (Cell Press)	Thermo Spectronic (Dreieich)
Branson Cell Disruptor B15	EMERSON Technologie GmbH (Diezenbach)
Mikrolaborzentrifuge	Heraeus (Hanau)
Megafuge 10	Heraeus (Hanau)
Sorvall-Zentrifuge RC-5 Superspeed	DUPONT Kendro (Hanau)

2.1.8 Chromatographiesäulen

Phenylsepharose Fast flow	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Superdex ^{TM200}	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Superdex ^{TM75}	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Superose 6 (HR10/30)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Mono-Q (HR 5/50)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.1.9 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce (Bonn)
QIA-prep-spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
QIA-quick Gel-Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
SuperSignal Western Blotting Kit	Pierce (Bonn)
ECL-Plus	Amers. Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.1.10 Sonstige Materialien

Cellulosenitrat-Filter (45 µm)	Satorius (Göttingen)
Centriprep/-plus YM 10	Millipore (Schwalbach)
Whatman Papier (3MM)	Whatman (Maidstone)
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Sterilfilter (0,2 µm)	Roth (Karlsruhe)
Röntgenfilm Kodak X-OMAT AR	Kodak (New Haven)

2.2 Verwendete Software und Internetprogramme

Tab. 2.1: Software und Internet-Programme

Programm	Beschreibung	Internetzugang
ψ-Blast	Vergleich von Proteinsequenzen mit Genbankeinträgen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/psiblast.cgi (Altschulten et al., 1997)
ClustalW	Alignments von Aminosäuresequenzen	http://clustalw.genome.jp . (Thompson et al., 1994)
Expasy	Zugang zu Internetprogrammen zur DNA- und Protein-Analyse	http://www.expasy.org
Pfam	Protein Familien Database of Alignments and HHM's	http://www.sanger.ac.uk/
BioEdit	Biologischer Sequenz Alignment Editor	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html ; (Hall, et.al., 1999)
Microsoft Excel	Rechnen/Kalkulationsprogramm	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2000	Schreibprogramm	Microsoft Corporation
Microsoft Power Point	Bildbearbeitung/Präsentation	Microsoft Corporation
Clone manager	Primer Design, Oligo Genomic & Proteomic Analysis	SEC/Central
Rasmol	Molekulare Darstellung von Protein Strukturen, DNA und Makromolekülen	http://www.umas.edu/microbio/rasmol/ (Sayle, et al., 1993)
Chime	Molekulare Darstellung von Protein Strukturen, DNA und Makromolekülen	http://www.umas.edu/microbio/chime (Adler, et. al., 1996)
BIGGER	Protein Docking Programm	http://www.biotecnol.com (Palma et al., 2000)

2.3 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Organismen

Tab. 2.2: Organismen

Bakterienstamm:	Genotyp:	Referenz:
<i>Allochromatium vinosum</i>	Wildtyp	Pfennig und Trüper 1971
<i>Escherichia coli:</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk ⁻ mk ⁺) supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA relA1	Hanahan 1983
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen Merckbiosciences (Darmstadt) (Wood., 1966)
B834 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B) <i>gal dcm met</i> (DE3)	Novagen Merckbiosciences (Darmstadt) (Leahy et al., 1992)

2.3.2 Plasmide

Tab. 2.3: Expressionsvektoren

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET15b	Ap ^r ; His-Tag (N-terminal)	Novagen (Madison)
pET22b	Ap ^r ; His-Tag (C-terminal)	Novagen (Madison)
pCex	mit Cexf und Cexr amplifiziertes und nach Restriktion mit <i>NdeI/BamHI</i> in mit <i>NdeI/BamHI</i> restringierten pET15b kloniertes <i>dsrC</i>	Pott-Sperling (2000)
pET15bEFH1	mit DsrEfor und DsrErev1 amplifiziertes <i>NdeI/XhoI</i> in mit <i>NdeI/XhoI</i> restringierten pET15b kloniertes DsrEFH	diese Arbeit
pET22bEFH2	mit DsrEfor und DsrErev2 amplifiziertes <i>NdeI/XhoI</i> in mit <i>NdeI/XhoI</i> restringierten pET22b kloniertes DsrEFH	diese Arbeit

2.3.3 Oligonukleotide

Tab. 2.4: Zur Klonierung von *dsr*-Genen in pET-Vektoren verwendete Oligonukleotide.

Die zur Erzeugung von Klonierungsschnittstellen gegenüber der *dsr*-Sequenz veränderten Nukleotide sind hervorgehoben.

Name	Sequenz von 5'-3'	Referenz
<i>dsr</i> EFH15b forward	CGAGG TCCATAT GAAAGTTCGCGCTTCAG	diese Arbeit
<i>dsr</i> EFH15b reverse	GTAAAGAAA ACTCGAGA ATTACAACCAG	diese Arbeit
<i>dsr</i> EFH22b forward	CGAGG TCCATAT GAAAGTTCGCGCTTCAG	diese Arbeit
<i>dsr</i> EFH22b reverse	ATCGAAA ACTCGAGCC AGGCCTGGACGG	diese Arbeit
Cexf	AGGAAGAT TCATAT GGCCGACACGAT	Pott-Sperling (2000)
Cexr	CCGGACG CGGATCC GCTTAGACGCA	Pott-Sperling (2000)

2.4 Antikörper

Gegen synthetische Peptide von DsrE (H₂N-VNNSTRLTTPPQDDRH-CONH₂) DsrF (H₂N-CLTRGQDTKGIGMKNF-CONH₂) und DsrH (H₂N-VNKSPFERNSLESC-CONH₂) wurden Antikörper in Kaninchen hergestellt.

Protein	Name des Antigens	Tier	Hersteller
DsrE	EP011787	Kaninchen	Eurogentec (Seraing, Belgien)
DsrF	EP011788	Kaninchen	Eurogentec (Seraing, Belgien)
DsrH	EP011789	Kaninchen	Eurogentec (Seraing, Belgien)
DsrC	-	Kaninchen	Pott-Sperling (2000)

Für längere Haltbarkeit wurden die Antikörper bei -70°C gelagert

2.4.1 Zweit-Antikörper

Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-Konjugat, aus der Ziege (Produkt Nr. A9169 Fa.SIGMA Aldrich)

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von *Allochrodatum vinosum* DSM 180^T (Wildtyp)

Allochrodatum vinosum wurde photolithoautotroph auf Pfennigmedium (modifiziert nach Pfennig und Trüper 1992), oder auf Thiosulfat-Medium (modifiziert nach Brune) oder photoorgano-heterotroph auf RCV-Medium (Weaver et al., 1975) angezogen.

2.5.1.1 Nährmedien

Pfennigmedium (nach Trüper und Pfennig 1992):

Lösung 1 (Salzlösung):

KCl	3,3 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3,3 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4,3 g
NH ₄ Cl	3,3 g
Spurenelementlösung SL12	10 ml
Aqua demin.	9250 ml

Lösung 2 (Phosphatlösung):

KH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	3,3 g
Aqua demin.	500 ml

Lösung 3 (Carbonatlösung):

NaHCO ₃	15 g
Aqua demin.	500 ml

Lösung 4 (Sulfidlösung):

HNaS x 1 H ₂ O	3,6 g
Aqua dest.	250 ml

Da *A. vinosum* für sein Wachstum kein Vitamin B12 benötigt (Imhoff et al., 1998) wurde dieses nicht dem Medium zugesetzt.

Die Spurenelementlösung SL12 (nach Pfennig und Trüper 1992) setzte sich wie folgt zusammen:

EDTA-Di-Natrium-Salz	3,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,1 g
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ x H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50 mg
ZnCl ₂	42 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ x 6 H ₂ O	18 mg
CuCl x 2 H ₂ O	2 mg
Aqua dest.	ad 1 l

Der pH-Wert der Spurenelementlösung lag bei pH 3,5-4. Die SL 12-Lösung wurde bei 4°C gelagert, wodurch sie nach einigen Wochen eine charakteristische rote Farbe einnahm.

Spurenelementlösung (SLA) :

FeCl ₂ x 6 H ₂ O	1800 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	250 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	70 mg
ZnCl ₂	100 mg
H ₃ BO ₃	500 mg
Na ₂ MO ₄ x H ₂ O	30 mg
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	10 mg
Aqua dest	ad 1000 ml

mit konz. HCl auf pH 2-3 ansäuern Lagerung bei 4°C im Kühlschrank!

Futterlösung:

HNaS x H ₂ O	3,1 g
NaHCO ₃	5 g
Aqua dest	ad 100 ml

Die Futterlösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.1.2 Thiosulfat-Medium, modifiziert nach Brune**Lösung A:**

100 x Makroelementlösung	100 ml
Aqua demin	ad 9,5 l

Lösung B:

Na ₂ CO ₃	26,5 g
NaHCO ₃	21 g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	31 g
Sulfidlösung	25 ml
Aqua demin.	ad 500 ml

100 x Makroelementlösung

KH ₂ PO ₄	100 g
NH ₄ Cl	70 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	40 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 g
SL 12	100 ml
HCl konz.	193 ml
Aqua. demin	ad. 1 l
Lagerung bei 4° C	

Sulfidlösung (1M)

HNaS x H ₂ O	18,5 g
Aqua demin.	250 ml

Die Lösungen A und B werden getrennt autoklaviert und nach Abkühlen vereint. Der pH-Wert des Mediums sollte bei 7.5 liegen.

2.5.1.3 RCV-Medium (nach Weaver et al., 1975)**RCV-Medium Ansatz für 1 l:**

Lösung A (20x RÄH-Medium)	50 ml
Hefe-Extrakt	0,5 g
Natrium Hydroxid-Plätzchen	1,8 g
Aqua demin.	800 ml

den pH Wert auf 7,0 regulieren, ad. 950 ml Aqua demin. Je 85 ml RCV-Medium in 100 ml Kulturflaschen abfüllen und autoklavieren.

RÄH-Medium (20x):

Malat	60 g
NH ₄ Cl	25 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	4 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,4 g
SLA (10x) oder	100 ml
SL 12 (100x)	2 ml
Aqua demin.	ad 1000 ml

Das RÄH-Medium wird bei 4°C gelagert.

KPO₄-Puffer:

180 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄-Puffer pH 7,0 (20-fach) Lagerung unsteril bei 4°C

RCV-Agar-Platten:

RCV-Medium	950 ml
Agar	15 g
KPP-Puffer (180 mM)	50 ml

2.5.2 Kultivierung von *Allochromatium vinosum* Wildtyp

Allochromatium vinosum wurde als Flüssigkultur in randvollen 100 ml Kulturflaschen mit einem gasdichtem Schraubverschluss kultiviert. Frisches Medium wurde jeweils 10 %ig mit der Vorkultur beimpft und bei 30°C in einem Lichtbrutschrank für 3-5 Tage inkubiert. Für die Anzucht von *A. vinosum* in einem 10 l Fermenter wurde mit einem Liter Vorkultur 9 l frisches Medium (Thiosulfat- oder Pfennigmedium) beimpft. Die Kultur wurde anaerob (N₂-Gasballon) unter ständigem Rühren (Magnetrührer), bei Raumtemperatur und einer Beleuchtungsstärke von 1000-2000 Lux (15-20 cm vor einem 60 Watt Strahler) für 5 Tage inkubiert. Die Zellen durch Zentrifugation bei 14000 x g, 4°C in der Kühlzentrifuge geerntet. Die Zellpaste (ca.16-19g) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.5.2.1 Konservierung von *A. vinosum* Stämmen

A. vinosum wurde für 2-3 Tage im Licht auf Thiosulfatmedium kultiviert bis eine maximale Schwefelkugelbildung erreicht wurde, dann wurden die Kulturflaschen bei 4°C im Kühlraum gelagert.

2.5.3 Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen

E. coli wurde aerob bei 37° C auf Luria Bertani-Medium (LB-Medium) oder 2 YT-Medium (Sambrook et al., 1989) kultiviert. Die Medien setzten sich wie folgt zusammen:

2.5.3.1 LB-Medium (Luria Bertani-Medium)

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

2.5.3.2 2 x YT-Medium

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

2.5.3.3 SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Trypton	2,0 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl x 6 H ₂ O	10 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mM
Glucose	20 mM
pH	7,5

Für die Herstellung von LB-Platten wurden 15 g Agar auf 1 l Medium zugefügt. Bei plasmidhaltigen *E. coli*-Stämmen wurde nach dem Autolavieren und Abkühlung des Mediums auf 55°C zur Selektion Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben. Das Antibiotikum wurde in einer Stammlösung von 100 mg/ml Aqua reinst gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Für die schnelle Anzucht von *E. coli*, z.B. nach einer Transformation bzw. bei der Herstellung von kompetenten Zellen, wurde das besonders nährstoffreiche 2 YT-Medium eingesetzt. Für den superkompetenten Methionin auxotrophen *E. coli* Stamm B834 (DE3) wurden die Zellen nach einer Transformation zunächst in SOC-Medium resuspendiert, bevor sie auf ampicillin-haltigen Platten ausgespatelt wurden.

2.5.3.4 Konservierung von *E. coli* -Stämmen

Sterile Glycerinlösung: 65 % Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 0,25 M Tris/HCl pH 8, autoklaviert.

E. coli-Kulturen auf Agarplatten können für 1-2 Monate bei 4° C gelagert werden. Für die Langzeitkonservierung von *E. coli*-Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden Übernachtskulturen in LB-Medium in sterilen 2 ml Kunststoffröhrchen mit der sterilen Glycerinlösung in einem Verhältnis 1:1 gemischt und bei -20° C oder -70° C gelagert (Ausubel et al., 1990-1999).

2.6 Molekularbiologische Methoden: DNA

2.6.1 Präparation von DNA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TES-Puffer: 50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA pH 8

Saccharose-TES-Puffer : 20 % Saccharose in TES-Puffer

Lysozym-RNase-Lösung : 20 mg/ml Lysozym, 1mg/ml RNase

Sarcosin-Lösung : 10 % Laurylsarcosin, 250 mM EDTA

2.6.1.1 Isolierung genomischer DNA aus *A. vinosum*

Die genomische DNA aus *A. vinosum* wurde nach einem Schnellverfahren isoliert. Diese Methode beruht auf einer Sarkosyl-Lyse (modifiziert nach Bazaral und Helsinki, 1968). Im Anschluss an die Lyse erfolgte eine weitere Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Dialyse. Für die DNA-Isolierung wurde das nach Zentrifugation geerntete Zellmaterial von *A. vinosum* aus einer Flüssigkultur in 50 mM Tris/HCl, pH 8 resuspendiert, in dem selben Puffer gewaschen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Isolierung der DNA wurden 50-100 mg des Zellmaterials in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß in 1 ml eiskaltem TES-Puffer resuspendiert und mit 1 ml TES-Puffer versetzt. In einer Labormikrozentrifuge (Heraeus 15 R) wurde das resuspendierte Material bei $15000 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0,25 ml Saccharose-TES-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,25 ml Lysozym-RNase Lösung wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml Sarcosin-Lösung zum Ansatz gegeben und der Ansatz wurde geschwenkt. Dadurch bildete sich eine viskose Masse. Durch 10-maliges Aufziehen des Ansatzes durch eine Kanüle ($18 \times 1\frac{1}{2}$ - $1,2 \times 45$ mm) in eine sterilen Spritze und wiederherausdrücken wurde die DNA geschert. Daraufhin wurde zum Ansatz 0,3 ml steriles Aqua reinst. zugegeben und die DNA wurde durch zweimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmalige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aufgereinigt. Nach der Extraktion der DNA mit Chloroform/Isoamylalkohol wurde die DNA zur weiteren Reinigung in Dialyseschläuche (Servapor, MWCO 12000-1400) gefüllt und mit Klammern verschlossen. Die DNA wurde einmal für 3 Stunden bei 4°C gegen TE-Puffer pH 8 dialysiert, anschließend erneut für 12 Stunden bei 4°C gegen frischen TE-Puffer und schließlich für 2 Stunden bei 4°C gegen steriles A. dest. dialysiert. Zur Aufbewahrung wurde die DNA in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 4°C gelagert.

2.6.1.2 Plasmid-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte mittels des Qiaprep-spin-Plasmid-Kit von der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Qiaprep-spin-Säulen besitzen eine einheitliche Silica-Gel-Membran, an der DNA in Gegenwart von einer hohen Konzentration chaotroper Salze gebunden wird. Die Elution erfolgte in einem kleinen Volumen in sterilem reinst H₂O.

2.6.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.2.1 Restriktionsverdau

Die Restriktion von Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. Für die Restriktion wurden die vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffer eingesetzt. Für einen Kontrollverdau wurde die Plasmid-DNA 1 Stunde, für einen präparativen Verdau 3 Stunden, bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Zum Beenden der Restriktion wurden die Ansätze für 10 min bei 65°C inaktiviert

2.6.2.2 Ligation

Für die Ligation wurden die in Aqua reinst gelösten DNA-Fragmente mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Fermentas) ligiert. Dazu wurde der Vektor und das Insert meist in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Der Ligationsansatz hatte ein Volumen von 20 µl. Es wurde der vom Hersteller gelieferte Ligationspuffer verwendet und in den Ligationsansatz wurden 2-3 U T4 DNA Ligase eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C (in einem Wasserbad).

2.6.3 Amplifikation von DNA

2.6.3.1 PCR mit mutagenen Oligonukleotiden

Für die Überexpression eines Gens mit einem N-terminalen Polyhistidinrest in *E. coli*, wurde das Gen genau hinter die für einen Polyhistidinrest kodierende Region in den Expressionsvektor pET15b (Novagen; Madison) kloniert. In dem Expressionsvektor pET15b ist dafür eine NdeI Schnittstelle vorgesehen. Das zu klonierende Gen wurde somit mit mutagenen Primern, die am Genanfang eine NdeI Schnittstelle, am Genende eine XhoI Schnittstelle erzeugen, amplifiziert. Der Expressionsvektor pET15b sowie auch das PCR-Produkt wurden vor dem Klonieren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Die PCR mit mutagenen Primern

wurde in dieser Arbeit sowohl mit der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase Fermentas), als auch mit der DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase, Stratagene) durchgeführt. Die Pfu-Polymerase ermöglicht aufgrund ihrer 3'-5'-Korrekturleseaktivität eine niedrigere Fehlerquote im PCR-Fragment. Für die PCR mit mutagenen Primern und der Pfu-Polymerase wurde folgender Standardansatz und folgendes Standardprogramm angewandt.

Standardansatz für die PCR mit der Pfu-Polymerase	eingesetzte Menge
ddH ₂ O	ad 50 µl
Puffer (10x)	5 µl
MgSO ₄ (20 mM)	1-5 mM
dNTP's	je 200 µM
DNA (<i>A. vinosum</i>)	0,25 µg
Primer forward	100 pM
Primer reverse	100 pM
Pfu-Polymerase	1-1,5 U

PCR-Programm:

Step	Zeit in min	°C
Initiale Denaturierung	3	95
Denaturierung	0.45	95
Primeranlagerung	0.45	56
Synthesephase	2.30	72
Schleife 4 an 2	35 x	
Elongation	10	72
Kühlung	∞	4

2.6.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

2.6.4.1 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Beschwerungslösung (10x):

0,025 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose

50 x TAE:

2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA

Die Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook et al. (1989), wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Hierzu wurde die Agarose 1 %ig in 1 x TAE-Puffer durch Kochen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 1/10 Volumen der 10 x DNA-Beschwerungslösung versetzt. Um die Größe der

DNA und DNA-Fragmente zu ermitteln wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen (1 kB DNA-Leiter, Fermentas). Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung zwischen 80-100 V für 1-2 Stunden. Danach wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen den DNA-Doppelsträngen interkaliert und somit die DNA in den Agarosegelen sichtbar macht. Die Agarosegele wurden dann in eine Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) gelegt und unter leichtem Schütteln für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um nicht interkaliertes Ethidiumbromid zu entfernen, wurde das Gel anschließend mehrmals mit Aqua demin. gespült. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele wurden auf einem Transilluminator im UV-Licht betrachtet und über ein Videodokumentationssystem (Fa. INTAS, Göttingen) dokumentiert.

2.6.4.2 DNA-Gelextraktion mit dem Qia-quick Gel-Extraktions-Kit

Die Extrahierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Qia-quick Gel-Extraktions-Kit (Qiagen Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.6.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.6.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine klassische Methode um Nukleinsäurelösungen von unerwünschten Verunreinigungen, meist handelt es sich dabei um Proteine, zu reinigen ist die Phenol Chloroform Extraktion (Wallace, 1987; Sambrook et al.1989). Hierzu wurde die Nukleinsäurelösung zweimal mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1; v/v) und einmal mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Dazwischen wurde bei 15000 x g , RT für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wird unter Vermeidung der Interphase, nach jeder Zentrifugation, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Verunreinigungen sammeln sich an der Grenzschicht zwischen den Phasen an. Zur Entfernung verbleibender Phenolreste wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt.

2.6.5.2 Ethanol-Fällung

Natriumacetat-Lösung: 3 M Natriumacetat pH 5,2

Um DNA zu präzipitieren wurden 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung und 2 Vol eiskalter Ethanol zu einer Nukleinsäurelösung zugegeben. Diese Probe wurde durch Invertieren gut gemischt und anschließend für mindestens 30 min bei -20° C inkubiert (Wallace 1987 b; Sambrook et al 1989). Die DNA wurde daraufhin für 30 min bei 15000 x g, 4°C in einer Heraeus 15R

Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Sediment wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol durch erneute Zentrifugation bei 15000 x g, 4°C für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment wurde für 10 min an der Luft, bzw. in einem Heizblock bei 50°C getrocknet und schließlich in einem geeigneten Volumen TE-Puffer, bzw. sterilem reinst H₂O resuspendiert.

2.6.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen erfolgte spektralphotometrisch, d.h. durch Messung der Absorption bei 260 nm, mit dem Dioden-Array-Spektralphotometer (der Firma Alignment Technologie GmbH). Ein Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke (Quarzküvette) entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml. Der Quotient 260nm/280nm erlaubt eine Aussage über die Reinheit von Nukleinsäurelösungen und sollte idealerweise in einem Bereich zwischen 1,8-2,0 liegen (Sambrook et al., 1989). Proteine und Phenol können diesen Wert negativ beeinflussen. Allerdings ist zu bedenken, dass die beiden Wellenlängen nicht alle Verunreinigungen erfassen. Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösung wurde folgende Formel eingesetzt :

$$c \text{ [pmol/ml]} = (E \text{ 260 nm} \times \text{Verdünnung}) / (\text{Anzahl der Nukleotide} \times 0,01).$$

2.6.6 Kompetente *E. coli* Zellen

Für 70 ml Zellen wurden 50 ml CaCl₂/MgSO₄-Lösung (70 mM CaCl₂/ 20 mM MgSO₄) angesetzt:

40 ml steriles Aqua dest. vorlegen,
3,5 ml 1 M CaCl₂ (steril),
1 ml MgSO₄ (steril)
ad 50 ml steriles Aqua. dest.

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Calciumchloridmethode (Dagert und Ehrlich, 1974). Um die *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent zu machen, wurden 5 ml 2 x YT-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 70 ml 2 x YT Medium mit 700 µl Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37° C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert. Die Kultur wurde in einer Sorvall-Zentrifuge in zwei sterilen Röhrchen bei 4°C, 2500 x g für 6 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in jeweils 10,5 ml eiskalter CaCl₂/ MgSO₄-Lösung durch Schütteln resuspendiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Minuten bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3,5 ml eiskalter CaCl₂/MgSO₄-Lösung aufgenommen, durch Schütteln resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis

gekühlt. Die Suspension wurde mit 875 µl sterilem Glycerin gemischt, zu 0,2 ml in sterilen Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und direkt bei -70°C gelagert.

2.6.7 Transformation mit CaCl_2 kompetenten und superkompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurde 1 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz mit 0,1 ml kompetenten Zellen versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42°C), wurde der Ansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, mit 0,5 ml 2 x YT-Medium versetzt und für 45–60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden von dem Transformationsansatz 50, 100, 200 µl und der Rest auf LB-Platten mit Antibiotikum (z.B. Ampicillin) ausgespatelt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Transformation mit den superkompetenten *E. coli* **B 834(DE3)**-Zellen wurde 1 µl Plasmid-DNA mit 0,02 ml superkompetenten Zellen versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (30 s bei 42°C) wurde der Ansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden 0,08 ml SOC-Medium zugefügt und der Ansatz wurde für eine Stunde im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5, 10, 20 µl des Transformationsansatzes und der Rest auf LB-Amp-Platten, in ca. 100 µl SOC-Medium, ausgespatelt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

2.7 Überexpression

2.7.1 Überexpression von rekombinanten Dsr-Proteinen aus *Allochrochromatium vinosum*

In dieser Arbeit wurde der pET15b Vektor (Novagen Madison), der einen N-terminalen Oligohistidinrest (His-Tag) enthält, für die Expression von Dsr-Proteinen aus *Allochrochromatium vinosum* eingesetzt. Als Wirtstamm diente *E. coli* BL21(DE3), bei dem das Gen der T7-Phagen-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors im Chromosom integriert ist. Durch die Zugabe von IPTG wird die T7-Phagen-RNA-Polymerase synthetisiert, die dann die Transkription der heterologen Gene, in diesem Fall aus *A. vinosum* einleiten konnte.

Für die Überexpression der heterologen *dsr*-Gene aus *A. vinosum* wurde von einer LB-Amp-Platte aus dem Transformationsexperiment mit kompetenten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, eine Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Amp-Medium überführt. Die Kultur wurde über die Nacht bei 37°C unter Schütteln, bei 180 rpm, inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Übernachtskultur für 10 min bei 4000 x g und bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das

Sediment wurde in ca. 100-200 µl LB-Amp-Medium resuspendiert und in 100 ml LB-Amp-Medium in einem Nasenkolben angeimpft. Die frisch angeimpfte Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln im Inkubator bebrütet. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Induktion der Expression der rekombinanten *dsr*-Gene durch Zugabe von 100 µl 0,1 M IPTG Lösung eingeleitet. Zwei Stunden nach der Induktion erfolgte die Ernte der Zellen, durch Zentrifugation für 30 min bei 25000 x g und 4°C in einer Sorvall-Zentrifuge.

2.7.2 Expression von rekombinantem Protein mit Selenomethionin in einem Methionin auxotrophem *E coli* Bakterienstamm

Die Produktion rekombinanten Proteins mit Selenomethionin wurde nach der von V. Ramakrishnan et al. (1993) beschriebenen Methode durchgeführt.

2.7.2.1 Medien für die Markierung von Proteinen mit Selenomethionin in *E. coli* B834(DE3)

Folgende Medien und Lösungen wurden benötigt:

Minimalmedium M9 (10 x):

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	80 g
KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	40 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	5 g

Medium A für die Überexpression des Se-Met-Proteins:

M9 Medium (10 x)	100 ml
Spurenelementlösung 100 x	10 ml
Glukose 20 % (w/v)	20 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (1M)	1 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	0,3 ml
Aqua demin. ad	1 l

Spurenelementlösung 100 x :

EDTA	5 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,83 g
ZnCl ₂	84 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	13 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
MnCl ₂ x 6 H ₂ O	1,6 mg
Aqua dest. ad.	1 l

Das EDTA wurde zuerst in 800 ml Aqua dest. gelöst und der pH wurde auf 7,5 eingestellt. Daraufhin wurden die anderen Komponenten hinzugefügt und das Ganze wurde auf 1 l aufgefüllt und die Spurenelementlösung wurde mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

Weitere Stammlösungen:

1 M CaCl₂ x 2 H₂O	14,7 g
Aqua demin	100 ml

1 M MgSO₄ x 7 H₂O	24,64 g
Aqua demin.	100 ml

Glukose 20 %	20 g
Aqua demin.	100 ml

Die Medien und die Lösungen wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert.

Verwendete Aminosäurelösungen:

Aminosäure-Mix1: L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Prolin, L-Serin, L-Tyrosin, L-Valin (je 1 mg/ml)
Aminosäure-Mix2: L-Phenylalanin; L-Tryptophan; L-Threonin (je 1 mg/ml)

Für die Aminosäurestammlösung wurde von jeder Aminosäure jeweils 100 mg abgewogen und in 100 ml 0,1 M HCl gelöst. Der pH-Wert wurde bei dem Aminosäuremix 2 mit NaOH auf pH 8 eingestellt, beim Aminosäuremix 1 wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Beide Aminosäurestammlösungen wurden sterilfiltriert.

Methionin-Stammlösung:

L-Methionin	50 mg
Aqua reinst	1 ml

Selenomethionin-Stammlösung:

Seleno-L-Methionin	50 mg
Aqua reinst	1 ml

Vitamin-Stammlösung:

Riboflavin	10 mg
Niacinamid	10 mg
Pyridoxin Monochlorid	10 mg
Thiamin	10 mg
Biotin	10 mg
Aqua reinst	10 ml

Die Aminosäurelösungen L-Methionin und L-Selenomethionin und die Vitaminstammlösung wurden sterilfiltriert.

Die Aufreinigung von **Selenomethionin markierten Proteinen** ist die Basis für kristallographische Untersuchungen nach der **SAD-Methode!**

2.7.2.2 Anzucht, Zellernte und Zellaufschluss von *E. coli* B834 (DE3) Zellen mit Selenomethionin

Für die Überexpression rekombinanter Proteine mit Selenomethionin wurde eine Kolonie aus der Transformation mit Methionin auxotrophen *E. coli*. B834(DE3)-Zellen und dem entsprechenden pET15b Derivat (Novagen, Madison) gepickt und in 25 ml 1 x M9-Ampicillin-Medium angeimpft. Das LB-Amp-Medium wurde zuvor mit 25 µl Vitamin-Mix (bestehend aus Vitamin B1, B2, B3, B6 und Vitamin H), 250 µl Aminosäure-Mix 1 und 350 µl Aminosäuremix 2 versetzt. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln bei 180 rpm, inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in sterilen Falcon-Reaktionsgefäßen bei 4000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml 1 x M9-Amp-Medium, versetzt mit Vitaminen, Aminosäure Mix 1 und 2, resuspendiert und in 500 ml 1 x M9-Medium, versetzt mit 500 µl Ampicillin, 500 µl Vitaminmix, 6,25 ml Aminosäure Mix 2, 5 ml Aminosäure-Mix 1, und 500 µl Selenomethionin, angeimpft. Die *E. coli* B834 (DE3) Kultur wurde bei 37°C und unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Stündlich wurde die OD₆₀₀ photometrisch (Novaspec II Amersham, Pharmacia) gemessen. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 wurden 500 µl 0,2 M Imidazol hinzugegeben und die Kultur wurde für weitere sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation für 30 min, 9000 x g bei 4°C geerntet. Das Sediment wurde bis zur weiteren Behandlung bei -20°C gelagert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Zellernte und Zellaufschluss

Kulturen von *E. coli* bzw. von *Allochrodatum* wurden bei einem Volumen bis 3 l, z.B. durch Zentrifugation für 20-30 min bei 25000 x g und 4°C geerntet. Größere Volumina von *A. vinosum* (Wildtyp) Kulturen, z.B. 10 l wurden mit einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia, Oelde) oder durch Zentrifugation bei 9000 x g und 4°C für 30 min in einer Heraeus Sorvall Zentrifuge abgeerntet. Die Zellpaste wurde durch Resuspendieren in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 und erneute Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpaste wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Frisches oder aufgetautes Zellmaterial wurde in Aufschlusspuffer (3 ml/g Nassgewicht) resuspendiert und mit Hilfe eines Glashomogenisators (Braun, Melsungen)

homogenisiert. Das homogenisierte Zellmaterial wurde daraufhin durch Ultraschall (Cell Disruptor B15, Branson) bei 50 % Leistung und einer Beschallungszeit von 1 min/ml Homogenisat aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Zellmaterial wurde mit Complete [Protease Inhibitor, Boehringer GmbH (1 Tab/ 50 ml Zellmaterial)] versetzt. Nach Auflösen der Tablette wurde das aufgeschlossene Zellmaterial für 30 min bei 25000 x g und 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand aus dieser Zentrifugation wurde als Rohextrakt bezeichnet.

2.8.2 Ultrazentrifugation

Der Rohextrakt von *A. vinosum* wurde zur Entfernung der Membranen in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, Krefeld) bei 144000 x g (Rotor Typ 60 Ti), 4°C für 3 Stunden zentrifugiert. Der Überstand, d.h. die lösliche Proteinfraction wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment, die Membranfraction, wurde in dem Aufschlusspuffer resuspendiert. Beide Fractionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.8.3 Ammoniumsulfatfällung

1,7 M (NH₄)₂SO₄ Lösung : 226 g auf 1 l 50 mM KPP-Puffer pH 7,5, filtriert

22,6 g (NH₄)₂SO₄ bei 100 ml Überstand nach Ultrazentrifugation

Die Ammoniumsulfatfällung wurde zur Vorbereitung der Proteinproben für die Hydrophobe Interaktionschromatographie sowie für die fraktionierte Fällung von Proteinen durch Anreicherung eingesetzt. Die Proteinlösung wurde dazu auf Eis gerührt und die der gewünschten Molarität entsprechenden Menge an Ammoniumsulfatpulver wurde in kleinen Portionen mit der Spatelspitze innerhalb von einer Stunde zugegeben (nach einer Tabelle aus dem Buch "Biochemisches Praktikum" Gustav Fischer Verlag, 1987). Nach Zugabe des Ammoniumsulfats wurde die Probe über Nacht bei 4°C auf Eis im Kühlraum gerührt. Am darauffolgenden Tag wurden die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation für 30 min bei 25000 x g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde direkt in die Hydrophobe-Interaktionschromatographie eingesetzt. Das Sediment wurde in einem geeigneten Volumen des verwendeten Puffers resuspendiert und aufbewahrt.

2.8.4 Entsalzung von Proteinlösungen (Dialyse)

Für die Entsalzung und Umpufferung wurden Proteinlösungen über Nacht bei 4°C gegen den entsprechenden Puffer dialysiert. Die Dialyseschläuche mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa (Servapor, Serva) wurden für 10 min in einem großen Volumen 2 %iger Bicarbonatlösung mit 1

mM EDTA, pH 8,0 gekocht und anschließend kurz in sterilem Aqua reinst gespült. Daraufhin wurden die Dialyseschläuche für 10 min in 1 mM EDTA pH 8 autoklaviert und in dieser Lösung aufbewahrt.

2.8.5 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration oder mit Polyethylenglykol

Für die Aufreinigung von Proteinen über die Gelfiltrationssäule musste die Proteinlösung zunächst konzentriert werden. Die Konzentrierung erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren (Centricon 10/30, Amicon) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa. Die Proteinlösung wurde dazu in die Zentrifugations-Konzentratoren überführt und durch langsame Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C auf das gewünschte Volumen konzentriert. Eine andere Methode um Proteinlösungen zu konzentrieren, ist die Konzentrierung mit Hilfe von PEG (Polyethylenglykol). Dazu wurde die Proteinprobe in einen Dialyseschlauch überführt, in eine Schachtel mit Polyethylenglykol (20000) gelegt und für 2-12 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Polyethylenglykol ist stark hygroskopisch und entzieht der Proteinlösung Wasser, wodurch die Proteinlösung konzentriert wird.

2.8.6 Proteinaufreinigung

2.8.6.1 Säulenchromatographische Methoden

Säulenchromatographie

Die Aufreinigung von Proteinen durch Säulenchromatographie erfolgte mit Hilfe des Fast-Performance-Liquid-Chromatographie (FPLC)-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech. (Freiburg). Vor jeder Säulenchromatographischen Aufreinigung wurden die verwendeten Puffer entgast und filtriert (Cellulosenitrat, Porengröße 0,45 µm Satorius). Für alle chromatographischen Aufreinigungen wurden die Säulen auf 4°C (Wasserbad) gekühlt. Partikuläre Bestandteile in den Proben wurden durch kurze Zentrifugation bzw. durch Filtrieren mit Sterilfiltern (Porengröße 0,45 µm (Roth)) entfernt, bevor die Proben auf die Säule aufgetragen wurden.

2.8.6.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Säulenmaterial: Phenyl-Sepharose-6 Fast-Flow-low-substitution (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Säule : XK 26 (Gelvolumen 75 ml), gepackt mit einer Flussrate von 10 ml/min

Äquilibrierungs- und Auftragspuffer: 50 mM KPP-Puffer pH 7,5, 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Elutionspuffer: 50 mM KPP pH 7,5

Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde die Ammoniumsulfatkonzentration im Überstand auf 1,7 M eingestellt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 25000 x g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde vor Auftrag auf die Säule noch filtriert (0,22 µm, Sterilfilter). Der filtrierte Überstand wurde auf eine zuvor mit 2-3 Säulenvolumen Elutionspuffer gespülte und mit 5 Säulenvolumen Start- bzw. Auftragspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen (Flussrate 4-5 ml/min). Nach Auftrag der Probe auf die Säule wurde diese solange mit dem Startpuffer gespült bis alle ungebundenen Proteine entfernt waren. Die Elution der Proteine (2ml/min) erfolgte in einem absteigenden linearen Ammoniumsulfatgradienten (40-0 %). Die Säule wurde für die chromatographische Aufreinigung der Proteine bei 4°C gekühlt.

2.8.6.3 Ionenaustauschchromatographie

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel:

Säulenmaterial: DEAE-Sephacel (SIGMA)

Säule: XK 50 (Gelvolumen 128 ml) gepackt mit einer Flussrate von 10 ml/min

Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl

Die Diethylaminoethylgruppe (DEAE) stellt einen schwachen Anionenaustauscher dar. Das Säulenmaterial wurde vor der chromatographischen Auftrennung zuerst mit einem Volumen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 , 2 Volumen 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl gespült und mit drei bis vier Volumen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 äquilibriert. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf die Säule filtriert. Nach Auftrag der Proteinprobe auf die Säule erfolgte ein Waschschriff mit 150 mM des Hochsalzpuffers (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl). Nachdem alle ungebundene Proteine von der Säule eluiert waren, erfolgte die Elution der Proteine in einem ansteigenden NaCl Gradienten von 150-500 mM NaCl.

Anionenaustauschchromatographie an Mono-Q

Säule: Mono-Q HR 5/5 Fertigsäule (Amersham Pharmacia Biotech.(Freiburg))

Säulenvolumen : 1 ml

Äquilibrierungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Elutionspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7, 5, 1 M NaCl

Die Mono-Q-Säule (HR5/5) stellt einen starken Anionenaustauscher dar, die quarternäre Ammoniumverbindungen Trimethylaminoethyl-Gruppen (Q) als Trägermaterial besitzt (Mono-Beads). Vor dem Auftrag auf die Säule wurden die Proteine gegen den Äquilibrierungspuffer dialysiert. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach Auftrag auf die Säule erfolgte ein Waschschriff mit 150 mM des Elutionspuffers. Nachdem alle ungebundenen Proteine von der Säule eluiert waren, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine in einem ansteigenden NaCl Gradienten.

2.8.6.4 Gelfiltration

Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufzureinigenden Proteine durch die Gelfiltrationschromatographie wurden folgende Säulen eingesetzt, s. **Tab. 2.5**

Tab. 2.5: Säulen für die Gelfiltrationschromatographie

Säule	HiLoad 16/60 Superdex ^{TM 75} *	HiLoad 16/60 Superdex ^{TM 200} *	Superose-6 HR 10/30
Säulendimension	124 ml	124 ml	24 ml
Trennbereich	3-70 kDa	10-600 kDa	5-5000 kDa
Flussraten	0,5 ml/min	0,5 ml / min	0,2 ml/min
Laufpuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl.	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl.	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl.

* (Amersham Pharmacia Biotech. Com. (Freiburg))

Vor dem Auftrag der Proteinprobe wurde die Säule mit 1-2 Säulenvolumen des Laufpuffers äquilibriert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurden die Säulen mit Proteinen bekannter Größe geeicht. Für die Größenbestimmung mittels der Superdex^{TM 200} wurden Eichläufe mit Cytochrom c (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Albumin (66 kDa), Aldolase (158 kDa) und Ferritin (440 kDa) durchgeführt. Um das Ausschlussvolumen zu bestimmen, wurde Dextranblau eingesetzt. Es wurden jeweils 200 µl der Eichproteinlösungen in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt.

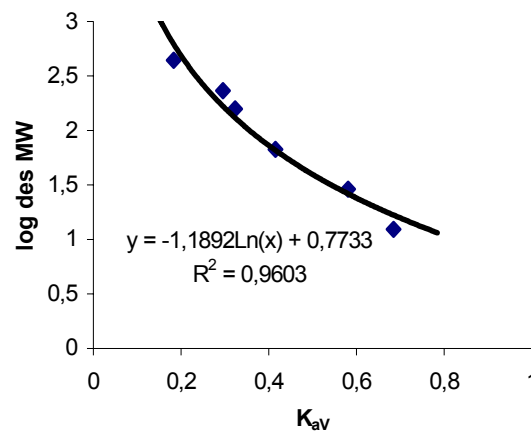


Abb. 2.1: Eichkurve der Superdex^{TM200} zur Bestimmung des Molekulargewichtes

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen bzw. dem spezifischen Verteilungskoeffizienten (K_{av}) und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Zur Bestimmung der K_{av} -Werte wurde folgende Formel eingesetzt:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e = Elutionsvolumen des Proteins
 V_t = Gesamtvolumen der Säule (126 ml)
 V_0 = Ausschlussvolumen (43,6 ml)

2.8.7 Affinitätschromatographie: Aufreinigung von His-Tag-Proteinen

Das Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic Acid) Proteinaufreinigungssystem beruht darauf, dass Proteine die einen Tag von 5 Histidinresten aufweisen, selektiv aufgereinigt werden können. NTA hat vier Chelat-Stellen für Nickelionen. Das NTA bindet Nickel mehr als ein anderes Metall chelatierendes Aufreinigungs-System, das nur drei Bindestellen für die Interaktion mit Metallionen liefert

Die Aufreinigung von His-Tag Proteinen lässt sich in 4 Schritte einteilen:

1. Zellyse **2.** Auftrag und Bindung des Zellysats **3.** Waschschrift **4.** Elution des His-Tag Proteins.

Folgende Lösungen wurden für die Aufreinigung benötigt:

Lysepuffer:

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

10 mM Imidazol pH 8

Das Zellpellet aus der Überexpression von rekombinanten Protein in 100 ml *E. coli* BL21(DE3) Kultur wurde in 1ml Lysepuffer resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym (Stammlösung 100 mg/ml) versetzt. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde auf Eis inkubiert, wobei eine schleimige Masse entstand. Daraufhin wurden die lysierten Zellen für 30 min. bei 25000 x g und 4°C abzentrifugiert. In ein 5 ml Säulchen wurde 1 ml des Säulenmaterials (Nickel-NTA-Agarose von QIAGEN) pipettiert und mit 2-3 Säulenvolumen äquilibriert. Der Überstand nach der abzentrifugierten Zellen wurde aufgetragen. Der Durchfluss wurde verworfen. Die an das Säulenmaterial gebundenen Proteine wurden mit Imidazolkonzentrationen in einem Bereich von 20-500 mM Imidazol von der Säule eluiert. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Bei größeren Aufreinigungen von Zellmaterial aus einer 1 l Überexpressionen wurde eine größere Säule gegossen (z.B. mit einer Säulendimension von 5 ml). Dementsprechend wurde auch das Elutionsvolumen erhöht.

2.8.8 Zellaufschluss und Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Selenomethionin über die NTA-Säule

Die Zellpaste aus dem Überexpressionsexperiment der rekombinanten Proteine mit Selenomethionin wurde in mindestens 3 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH8 (TCEP ist ein reduzierendes Agens, dass der Stabilisierung der zu kristallisierenden Proteine dient.) aufgenommen. Pro 1 g Nassgewicht wurde das resuspendierte Zellmaterial mit Lysozym 1 mg/ml (Stammlösung 100 mg/ml) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurde das mit Lysozym behandelte Zellmaterial noch zusätzlich mit Ultraschall (Cell Disruptor B15 Branson) für 1-2 min/ml bei 4 °C beschallt. Das Lysat wurde daraufhin zur Entfernung der Zelltrümmer für 30 min. bei 25000 x g und 4°C in einer Sorvall-Kühlzentrifuge (Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in die Aufreinigung über die NTA-Säule eingesetzt. Die Elution der Proteine erfolgte wie unter **2.8.7** beschrieben. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Fraktionen mit den zu weiter aufreinigenden Proteinen vereint und über Nacht in 10 mM Tris/HCL pH 7,5, 2 mM TCEP, für die weitere chromatographische Aufreinigung durch die Mono-Q-Säule dialysiert.

2.8.9 Bestimmung des Proteingehaltes

2.8.9.1 Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry

Folgende Lösungen wurden benötigt:

Lösung A : 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH

Lösung B : 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in 0,8 %iger Essigsäure

Lösung C: 1 % K-Na-Tatrat

Lösung D: 50 ml 2 %ige Na_2CO_3 -Lösung werden mit 1ml Lösung B und 1 ml Lösung C gut gemischt. Lösung D immer frisch ansetzen!

Lösung E: Folin-Ciocalteu-Reagenz und Aqua. demin. in einem Verhältnis 1:1 mischen.

Für die Bestimmung des Proteingehaltes von *A. vinosum* Kulturen wurde die Proteinbestimmung modifiziert nach Lowry et al. (1951) angewendet. Die Zellen wurden vor der Konzentrationsbestimmung entfärbt. Dazu wurde 200 μl Kulturflüssigkeit mit 1 ml eiskaltem Aceton/Methanol in einem Verhältnis von 7:2 versetzt, gemischt und auf Eis für 10 min inkubiert, anschließend in einer Heraeus Kühlmikrozentrifuge 10 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 μl Aqua dest. resuspendiert. Zu der resuspendierten Probe wurde 1 ml Lösung D zugegeben und anschließend für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl Lösung E (Folin-Ciocalteu-Reagenz) wurde die Probe für weitere 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Proben für 5 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 650 nm gegen Wasser bestimmt. Es wurde eine Eichkurve mit BSA (Bovin-Serum-Albumin) im Bereich von 0-100 μg Protein pro Ansatz erstellt.

2.8.9.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Folgende Fertiglösung wurde eingesetzt: Bradford Reagent (SIGMA)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford (1976). Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wurden 33 μl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (SIGMA) versetzt und gemischt. Nach 10 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen Wasser gemessen. Die Eichkurve wurde mit BSA im Bereich von 0-1 mg Protein pro Ansatz aufgenommen.

2.8.9.3 Proteinbestimmung mit dem Micro-BCA-Assay

Die Proteinbestimmung von aufgereinigten Proteine wurde im Mikrotiterplatten-Verfahren mit Hilfe des Mikro-BCA-Protein-Assay-Reagenzienkits (Pierce, Rotterdam) nach der Bicinchoninic

Säure Methode von Smith et al., (1985) bestimmt. Hierzu wurde jeweils 25 µl einer Probe in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 200 µl des BCA-Reagenz gegeben. Die Platte wurde 30 min bei 37°C inkubiert, kurz auf RT abgekühlt und mit einem Plattenlesegerät wurde die Proteinkonzentration photometrisch bei 550nm bestimmt. Eine Eichreihe wurde mit BSA in einem Bereich von 0-500 µg/ml Protein pro Ansatz angesetzt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufgereinigten Proteine wurden diese in einem Verhältnis von 1:10, 1:20 und 1:50 verdünnt.

2.8.10 Elektrophoretische Methoden

2.8.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Stammlösungen:

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

Puffer A: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,3 % SDS

Puffer B: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS

APS 10 %ig,

Temed 5 µl

4 x Protein Probenpuffer: 4 x Roti-Load 1(Roth) oder

2x SDS-Proteinladepuffer: 25 ml 4 x Tris/HCl /SDS pH 6,8, 20 ml Glycerol, 4 g SDS, 2 ml 2-Mercaptoethanol oder 3,1 g DTT ad 100 ml Aqua reinst, bei -70 °C lagern

5x Elektrophorese-Puffer: 15g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS ad 1 l Aqua reinst.

Für die diskontinuierliche SDS-Proteingelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurden unterschiedliche Trenngelkonzentrationen verwendet (abhängig von der Größe der Proteine, die aufgetrennt werden sollen). Die nachfolgende **Tab. 2.6** zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele:

Tab. 2.6: Trenn-/Sammelgelkonzentrationen

Lösung	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4,5 %
Aqua. reinst	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	3 ml
Acrylamid (30 %)	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	0,75 ml
Puffer A	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	-
Puffer B	-	-	-	-	1,25 ml
APS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Temed	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Zusammensetzung von SDS-Proteingelen mit unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration. Die Mengenangaben beziehen sich auf zwei Gele einer Mini-Protean II Gelkammer (BioRad).

Zunächst wurden die Trenngele gegossen, die mit Wasser überschichtet wurden, so dass sich eine klare Trennlinie bilden konnte. Nachdem das Trenngel polymerisiert (ca. 45 min) war, wurde das Sammelgel gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit dem 4 x Roti-Load-Puffer in einem Verhältnis 1:4 versetzt (Fa., Roth), für 5 min bei 100°C aufgekocht, kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert, und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte zwischen 60-110 V für 2-3 Std. Für die Gelelektrophorese wurde 1 x Elektrophoresepuffer eingesetzt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele gefärbt oder geblottet.

2.8.10.2 Native PAGE

4x Ladepuffer für Native Gele: 100 mM Mops pH 6,8, 40 % Glycerin, 0,014 % Bromphenolblau

Die nativen diskontinuierlichen Polyacrylamidgele wurden wie die SDS-Polyacrylamidgele hergestellt, wobei die verwendeten Puffer und Lösungen kein SDS enthielten. Es wurden 7,5 %ige Proteingele gegossen. Zur Zusammensetzung des Trenngels, bzw. des Sammelgels, s. **Tab. 2.6.** Die Proteinproben wurden mit dem 4 x Ladepuffer in einem Verhältnis 1:4 versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 60-80 V für 3-4 Stunden. Um die Denaturierung der Proteine durch Wärme zu verhindern wurde die Kammer mit Hilfe eines Wasserbades gekühlt.

2.8.10.3 Färbung von Proteingelen

Färbung mit Coomassie Brilliant Blue: (das Detektionslimit liegt bei ca. 100 ng Protein)

Coomassie Färbelösung: 1 % Coomassie Blue R-250, 10 % Essigsäure, 45 % Methanol, 45 % H₂O

Coomassie Entfärbungslösung: 10 % Essigsäure (konz.), 20 % Methanol, 70 % H₂O

Für die Anfärbung von Protein mit Coomassie Brillant Blue wurden die Proteingele für mindestens 1 Stunde in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Daraufhin wurden die Proteingele durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung wieder entfärbt.

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen : (Detektionslimit liegt bei ca. 100 pg)

Fixierlösung: 10 % Essigsäure (konz.), 20 % Methanol, 70 % H₂O (reinst)

Lösung 2: 30 % Ethanol, 0,5 M NaAc, 0,5 % Glutaraldehyd, 0,2 % Na₂S₂O₃, ad 1 l H₂O (reinst)

Lösung 3: 0,1 % AgNO₃, 0,01 % Formaldehyd , ad 500 ml H₂O (reinst)

Lösung 4: 2,5 % Na₂CO₃, 0,01 % Formaldehyd, ad 1000 ml H₂O (reinst)

Lösung 5: 0,05M Na₂CO₃, 10 % Essigsäure, ad 1000 ml H₂O (reinst)

Der Vorteil der Silberfärbung gegenüber der Färbung mit Coomassie besteht in der deutlich niedrigeren Nachweisgrenze von nur 100 pg Protein im Vergleich zu 100 ng mit Hilfe von Coomassie. Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ Ion Komplexe mit Glutamin, Asparagin und Cysteinresten, der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag. Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1988). Die Proteingele wurden nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

1. Fixierung für mindestens 1 Stunde in der Fixierlösung
2. Inkubation für mindestens 20 min in Lösung 2
3. Waschschrift: 3 x für 5-10 min mit H_2O (reinst)
4. Färben: 15 min in Lösung 3
5. Waschschrift: 20 s in H_2O reinst
6. Entwicklung: Inkubation für 5-20 min in Lösung 4 (Lösung 4 mehrmals erneuern)
7. Abstoppen der Entwicklung durch Zugabe von Lösung 5

2.8.11 Elektrophoretik

Towbin-Blot-Puffer: 1,52 g Tris, 7,2 g Glycin, 100ml Methanol ad 400 ml H_2O (reinst), pH 8,3

Darf nicht mit Säure oder Base titriert werden!

Der Transfer von Proteinen aus den SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte durch Elektrophoretik mit Towbinpuffer (Towbin et al., 1979). Das Proteingel und die auf Gelgröße zugeschnittene Membran (Protran BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden 10-15 min in Towbin-Blotpuffer vorinkubiert. Nach 15 min wurden 3 in Towbinpuffer getränkte Lagen Whatman 3MM-Papier, in Gelgröße, auf die Anode eines Semi-Dry Transblotgerätes (Fa. BioRad, München) gelegt. Auf das Whatman 3MM-Papier wurde die äquilibrierte Membran, dann das äquilibrierte Gel gelegt. Daraufhin wurden drei in Towbinpuffer getränkte Lagen Whatman 3MM-Papier, in Gelgröße bzw. etwas kleiner, wurden oben auf das Gel aufgelegt. Durch Rollen mit der breiten Seite einer Pasteurpipette wurden die Luftblasen aus dem Gel entfernt. Die Kathode wurde aufgesetzt und das Gerät wurde mit einem Deckel verschlossen. Das Transblotgerät wurde an den Powersupply angeschlossen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte in 15 min bis 1 Std. bei 15V.

2.8.11.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 M Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3

10 x PBS (Phosphat-Buffered-Saline): 80 g NaCl, 2 g KCl, 7,6 g Na₂HPO₄ x H₂O
(oder 6,1 g Na₂HPO₄), 2 g KH₂PO₄

Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern aus immunisierten Kaninchen nachgewiesen. Die Antiseren wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sahl, Universität Bonn, oder durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Der immunologische Nachweis der auf die Membran transferierten Proteine erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode nach Sambrook et al. (1989). Die Membran wurde über Nacht in 100 ml 1x PBS, 5 % Skim-Milk (Magermilchpulver) inkubiert, am darauffolgenden Tag für 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach 5 mal Waschen der Membran in 1 x PBS für jeweils 5 min, erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Antiserum für 3 Stunden in 20 ml 1 x PBS, 0,5 % BSA. Die Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:500-1:1000 zugegeben. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 5 min mit 1 x PBS gewaschen, anschließend für eine Stunde in 20 ml 1 X PBS, 0,5 % BSA mit dem sekundärem Antikörper inkubiert. Das Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Fa. SIGMA Aldrich) wurde in einer Verdünnung 1:5000-1:10000 zugegeben. Nach der Inkubation wurde die Membran 2 mal mit 1x PBS für jeweils 5 min gewaschen. Für die Farbreaktion mit 4-Chloro-1-Naphthol wurden 7 ml Ethanol in einem Pyrex-Röhrchen mit 30 mg 4 Chloro-1-Naphthol versetzt und auf Eis gestellt. Die Membran wurde in eine saubere Schale mit 43 ml Reinstwasser gelegt. Zu der Membran wurden 20 µl H₂O₂, anschließend die 4-Chloro1-Naphthol-Lösung zugefügt. Die Membran wurde im Dunkeln solange inkubiert bis Banden auf der Membran erkennbar wurden. Die überschüssige Färbelösung wurde entfernt. Nach mehrmaligem Waschen der Membran wurde diese zum Trocknen zwischen Whatman 3MM-Papier gelegt. Zur Aufbewahrung der Membran wurde diese in Folie eingeschweißt und mit Alufolie umwickelt.

2.8.11.2 ECL PlusTM Western-Blot Detektion oder SuperSignal West Pico Chemilumineszens

Das ECL-PlusTM Western Blotting Detektions Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg) bzw. das SuperSignal West Pico Chemilumineszens Substrat (Prestige, Bonn), beide Kits wurden in dieser Arbeit verwendet. Es handelt sich um hochempfindliche Detektionssysteme, um Antikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase auf Immunoblots zu detektieren. Sie ermöglichen die Detektion von Picogramm-Mengen Antigen. Beim ECL-Plus-System katalysieren die Meerrettich Peroxidase und das Peroxid die Oxidation des Luminigen PS-3 Substrats. Die Reaktion führt zur Bildung von Arcidinium-Estern, die mit dem Peroxid weiter reagieren und dabei unter den leicht alkalischen

Bedingungen ein starkes Chemilumineszenz Signal erzeugen, wobei Licht mit einem Maximum von 430 nm emittiert wird, das durch einen Röntgenfilm erfasst wird (Akhavan-Tafti et al., 2001; Walker, et al., 1995).

PBS-Tween (Phosphat Buffered Saline + Tween 20) für **ECL Plus**:

11,5 g Na₂HPO₄ (80 mM), 3,72 g NaH₂PO₄ (20 mM) x 2 H₂O, 5,84 g NaCl (100 mM),
1 ml Tween 20 (0,1 %), ad 1000ml Aqua reinst, pH 7,5

TBS-Tween (Tris Buffered Saline+Tween 20) für das SuperSignal West Pico Chemilumineszenz:

2,42 g Tris (20 mM), 8,0 g NaCl, 3,8 ml HCL (1 M), 0,5 ml Tween 20 (0,05 %), Aqua reinst ad
1000 ml , pH 7,5

Die über Nacht in 100 ml PBS-T, 5 % Skim-Milk geblockte Membran wurde am nächsten Tag fünfmal mit ca. 30 ml PBS-T gespült. Nach dem Waschen wurde die Membran für 3 Stunden mit dem Erst-Antikörper, 1:4000-1:10000 verdünnt in 20 ml PBS-T, 0,5 % RSA inkubiert. Nach Waschen der Membran zweimal kurz, einmal für 15 min mit 50 ml 1 x PBS-T und zweimal jeweils für 5 min mit ca. 20-30 ml PBS-T wurde die Membran mit dem Anti-Kaninchen-Antikörper für eine Stunde inkubiert, der dazu 1:10000-1:20000 in 20 ml PBS-T, 0,5 % BSA verdünnt wurde. Nach Waschen der Membran, (s.o.) erfolgte die Chemilumineszenz-Detektion. Hierzu wurden Lösung A und Lösung B in einem Verhältnis 40:1 gemischt. Die eingesetzte Menge der Detektionslösung hängt von der Größe der Membran ab (0,1 ml/ cm²). Der Überschuss der Flüssigkeit vom Waschen der Membran wurde durch Tupfen mit einem fusselfreiem Papier entfernt. Die Membran wurde mit der Oberseite in ein Schälchen mit Whatman 3MM-Papier gelegt. Auf die Membran wurde die Detektionslösung pipettiert. Nach 5 min Inkubation im Dunkeln bei RT wurde der Überschuss der Detektionslösung mit einem Tuch entfernt. Die Membran wurde eingeschweißt, in eine Filmkassette gelegt, im Dunkeln ein Röntgenfilm (X-Omat) für 1-15 min aufgelegt. Danach erfolgte die Entwicklung des Films.

2.9 Immunologischer Nachweis des His-Tags bei rekombinanten Proteinen

Der His-Tag monoklonale Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper, der sich gegen die His-Tag Sequenz von Fusionsproteinen richtet.

Folgende Stammlösungen wurden benötigt:

20 x TBS: 200 mM TrisHCl, pH 7,5, 3 M NaCl

10 x TBSTT : 200 mM Tris/HCl pH 7,5 , 5 M NaCl, 2 % Triton X-100(v/v), 0,5 % Tween 20
10 %ige Triton-Lösung herstellen, vor der Zugabe zu dem 10 x TBS Puffer!

Blocking Lösung (33,3 ml):

1 g BSA, 1,65 ml 20 x TBS und 31,65 ml Reinstwasser.

Waschpuffer:

1. 18 ml 10 x TBSTT + 162 ml Reinstwasser
2. 3 ml 20 x TBS + 57 ml Reinstwasser

Zum Nachweis des His-Tags am rekombinanten DsrEFH-Protein wurde nach einer Aufreinigung über die His-Tag-Säule die DsrEFH-haltigen Proteinproben auf ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach erfolgter Proteingelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran elektrophoretisch transferiert (Western-Blot). Die Membran wurde nach dem Blotten zweimal für 10 min mit 15 ml 1 x TBS gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 1 Stunde bzw. auch über die Nacht in 50-100 ml 1 x TBS-Puffer + 5 % Skim-Milk geblockt. Nach dem Blocken wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml 1 x TBSTT gewaschen und einmal für 10 min mit 15 ml 1x TBS. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem His-Tag monoklonalen Antikörper, 1: 1000 verdünnt in 10 ml Blocking-Lösung inkubiert. Nach Waschen der Membran für jeweils 10 min mit 20 ml 1 x TBSTT Puffer und einmal für 10 min mit 1 x TBS-Puffer, wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper, d.h. mit einem Anti-Maus-IgG aus der Ziege, 1:5000 verdünnt in 10 ml Blocking-Lösung, für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 mal für jeweils 5-10 min mit 20 ml 1 x TBSTT Puffer gewaschen. Der colorimetrische Nachweis erfolgte mit Hilfe von 4-Chloro 1-Naphthol (s. 2.8.11.1).

2.10 Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen

Die Umsetzung reduzierter Schwefelverbindungen durch *A. vinosum*-Mutanten erfolgte in temperierbaren Glasfermentern mit 1 l Kulturvolumen. Der Glasdeckel des Fermenters hatte 6 Öffnungen, wovon eine der sterilen Begasung des Fermenters, eine weitere der Befüllung des Fermenters diente. Durch eine dritte wurde 1 M Salzsäure bzw. 1 M Natriumcarbonatlösung, gesteuert über eine pH-Regulationseinheit (pH-mV Regler M7832N, Mostec, Liestal, CH) zugeführt. In die vierte Öffnung wurde eine pH-Elektrode (SteamLine SL 80-325 pH, Schott Geräte GmbH, Mainz, D) eingesetzt. Ein Entnahmeschlauch reichte in das Medium, aus dem steril Proben für die Bestimmung von Thiolen, Sulfid, Sulfat, Schwefel, Tetrathionat für die HPLC entnommen wurden. Vor Versuchsbeginn wurden der Fermenter mit Magnetrührstab, dem Begasungsschlauch, dem Probenentnahmeschlauch und der pH-Elektrode autoklaviert. Die Sterilen Säure und Base-Vorratsbehälter, sowie eine Wassertemperierung (Lauda M3/MT, MWG, Laude Königshofen), die auf 30°C reguliert wurde, wurden vor Versuchsbeginn angeschlossen. Der Fermenter wurde mit zwei 60 Watt Strahlern (Osram) belichtet. Der Fermenter wurde vor dem Befüllen mit sterilem Pfennig-Medium und der Vorkultur mit Stickstoff durchblasen. Eine Vorkultur wurde photoorganoheterotroph angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase (nach 3 Tagen) durch Zentrifugation in sterilen Zentrifugenbechern (GSA) für 10 min bei 8000 x g (Beckmann Coulter Avanti J-20XP, JA-10) geerntet. Das Sediment wurde in einem kleinem Mediumrückstand resuspendiert und in einem N₂-Rückstrom über die Öffnung des Fermenters (steril) überführt. Während des Versuches wurde eine mit Stickstoff gefüllte Gummiblase an den Begasungsschlauch angeschlossen.

2.11 Analytischer Nachweis von Schwefelverbindungen mittels der HPLC

Die Bestimmung der Schwefelverbindungen erfolgte mit Hilfe der High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC). Es wurde die HPLC-Anlage der Firma Thermo Separation Products (Engelsbach) eingesetzt, die aus einer Pumpe P 2000 mit Vakuum-Entgaser SCM 100, UV-Detektor UV 6000 LP und UV 150, Fluoreszenzdetektor FL3000 und dem Säulenofen Column Thermostat Jetstream 2 besteht. Alle für die HPLC-Messungen verwendeten Puffer wurden zuvor filtriert (PVDF-Filter, Porengröße 0,22 µm, (Roth)). Die partikulären Bestandteile wurden vor dem Auftragen auf die Säulen durch Zentrifugation aus den Fermenterproben entfernt. Alle HPLC-Säulen wurden nach Angaben des Herstellers eingefahren und regeneriert.

2.11.1 Aufarbeitung von Fermenterproben

Für die Bestimmung von Schwefelverbindungen, mit Ausnahme von Elementarschwefel, wurde nur zellfreie Kulturflüssigkeit eingesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 15000 x g (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf) für 5 min sedimentiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde für die Bestimmung von Thiolen direkt derivatisiert, der verbleibende Überstand wurde für die Bestimmung von Sulfat und Thionaten zunächst bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.2 Bestimmung von Thiolen

Derivatisierung:

Hepes-Puffer: 50 mM Hepes , 5 mM EDTA pH8 (mit NaOH titrieren)

Monobrombiman-Lösung: 48 mM in Acetonitril, Lagerung bei -20°C

Methansulfonsäure 65 mM: 403 µl Methansulfonsäure ad 100 ml Aqua reinst.

Der Nachweis von Thiolen, wie z.B. Sulfid, Sulfit, Thiosulfat erfolgte mittels der HPLC. Die Proben wurden dazu mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman (Rethmeier et al., 1997) derivatisiert. In 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 50 µl Hepes-Puffer und 55 µl Acetonitril vorgelegt. Nach Zugabe von 50 µl Kulturflüssigkeit aus den Fermenterexperimenten wurden direkt 5 µl Monobrombiman-Lösung zugegeben, die Probe wurde gut gemischt und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min Inkubation im Dunkeln durch Zugabe von 100 µl 65 mM Methansulfonsäure abgestoppt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren. Die Thiolkonzentration der Probe sollte nicht über 2 mM liegen, da der Fluoreszenzdetektor der HPLC sich bei höheren Konzentrationen aufgrund von zu starken Signalen abschaltet.

2.11.3 Nachweis von derivatisierten Thiolen mit der HPLC

Säule: LiChrospher® 100 RP 18 ec Select (250-4,5µm (Merck, Darmstadt))

Flussrate: 1 ml/min

Säulentemperatur: 35°C

Detektion: Fluoreszenzdetektion: Anregung 380 nm, Emission 420 nm

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

Laufmittel: B: Methanol (HPLC grade)

Elution: Binärer Gradient:

0-5 min	85 % A	15 % B
5-50 min	55 % A	45 % B
50-58 min		100 % B
58-76 min	85 % A	15 % B

Der Nachweis derivatisierter Thiole erfolgte mit der Reversed-Phase-HPLC mit Gradientenelution und Fluoreszenzdetektion (Rethmeier et al., 1997). Es wurden 100 µl derivatisierte Probe in ein Vial mit Septum pipettiert. Vom Autosampler wurden 50 µl in eine 100 µl Probenschleife injiziert. Es wurden Eichkurven in einem Bereich folgender Konzentrationen aufgenommen: Sulfid: 50-750 µM, Sulfit 50 µM-1 mM, Thiosulfat 50 µM- 1 mM. Die Retentionszeiten bzw. Nachweisempfindlichkeiten betragen 4 min für Sulfit, 9 min für Thiosulfat, 40 min für Sulfid und 39 bzw. 44 min für Polysulfide.

2.11.4 Bestimmung von Elementarschwefel

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

Flussrate : 1,2 ml/min

Säulentemperatur: 35°C

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

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

Für die Bestimmung des Elementarschwefelgehaltes in Proben aus den Fermenterexperimenten wurden 100 µl der Kulturflüssigkeit mit 100 µl Chloroform versetzt und gevortext. Die so extrahierten Proben wurden stehen gelassen, bis sich zwei Phasen ausbildeten. Die untere Phase enthielt den durch Chloroform extrahierten Schwefel. Der Schwefelgehalt wurde mittels Reversed-Phase-HPLC und UV-Absorption bestimmt (Rethmeier et al. 1997; Beffa et. al., 1988). Es wurden 50 µl des extrahierten Schwefels direkt in ein Rheodyne-Ventil mit einer Probenschleife von 20 µl injiziert. Für die Erstellung einer Eichkurve wurde Elementarschwefel in Chloroform gelöst. Die Eichkurve wurde in einem Bereich von 25 µM bis 5 mM Schwefel erstellt. Die Retentionszeit bzw. die Nachweisempfindlichkeit betrug für den Elementarschwefel 4,5 min bzw. 50 µM.

2.11.5 Bestimmung von Sulfat

Säule: Polyspher IC AN1 (Merck, Darmstadt)

Flussrate: 1,3 ml/min, Säulentemperatur 35°C

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

Elution: isokratisch

Detektion: indirekte UV-Detektion bei 254 nm (UV-Detektor UV 150)

Die Sulfatbestimmung erfolgte durch Ionenaustausch-HPLC mit indirekter UV-Detektion. Bei der indirekten UV-Detektion absorbiert das Laufmittel stärker als die zu messenden Verbindungen, so dass negative Signale gemessen werden. Die Kulturüberstände wurden nach dem Auftauen für 10 min bei 15000 x g (Zentrifuge 5415, Eppendorf) zentrifugiert, um ausgefallene Bestandteile zu entfernen. Von dem Autosampler wurden 60 µl in eine 100 µl Probenschleife injiziert. Es wurde eine Eichkurve in einem Bereich von 50 µM bis 2 mM erstellt. Die Retentionszeit bzw. die Nachweisempfindlichkeit für Sulfat betrug 12,5 min bzw. 50 µM. Die Polymersäule wurde nach den Angaben des Herstellers gespült und gelagert.

2.12 Enzymologische Methoden

2.12.1 Rhodanese test modifiziert nach Prieto 1997

Um Rhodaneseaktivität in Proteinproben nachzuweisen wurde folgender photometrischer Testansatz vorbereitet, welcher auf einem ursprünglichen Test von Sorbö (1953 a,b; 1955) beruhte und von Prieto et. al. (1997) modifiziert wurde. Die Aktivität der Rhodanese wird hierbei durch die Messung der Bildung von SCN⁻ (Rhodanit) bestimmt. Das im Test gebildete SCN⁻ wird in Form eines Fe(SCN)₃ Komplexes photometrisch bei einer Wellenlänge von 460 nm ermittelt. Der molare Extinktionskoeffizient für das gebildete Rhodanit beträgt:

$$\epsilon_{460\text{nm}} = 3 \times 10^{-3} [(\mu\text{mol/l})^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

(Der modifizierte Test wurde in dieser Arbeit weiter verändert!)

Stammlösungen:

1 M Tris/HCl pH 7,8; 0,5 M NaSH; 0,1 M Na₂S₂O₅; 0,5 M NaCN; 0,5 M FeCl₃ in 20 % H₂SO₄

Testansatz (Gesamtvolumen 750 µl):

10 mM Tris/HCl pH 7,8

10 mM Na₂S₂O₃ x 5 H₂O

40 mM NaCN

2-20 µl Proteinprobe

520-538 µl reinst H₂O

Der Ansatz ohne die Proteinprobe wurde für 10 min bei 30°C vorinkubiert, dann wurde die Proteinprobe zugegeben, alles gut gemischt und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde zu dem Ansatz 250 µl 0,5 M FeCl₃ in 20 % H₂SO₄ zugefügt und die Extinktionsänderung, d.h. die Bildung von Rhodanit wurde photometrisch bei 460 nm bestimmt. Aus der Absorption konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon_{460\text{nm}} = 3 \times 10^{-3} [(\mu\text{mol/l})^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

die Menge des gebildeten Fe(SCN)₃ bestimmt werden. Zur Berechnung des Thiosulfat-Umsatzes musste berücksichtigt werden, dass pro gebildetem Äquivalent Fe(SCN)₃ drei Äquivalente Thiosulfat umgesetzt werden mussten.

2.13 Elektronenspray Ionisations-Massenspektroskopie

Die Elektronen Ionisations-Massenspektroskopie ist eine Methode zur Bestimmung der molekularen Masse chemischer Verbindungen, Proteine und Peptide, zudem können Mutationen an Proteinen verifiziert werden. Sie ist zudem eine empfindliche Methode zur Aufklärung posttranslationaler Modifikationen sowie unvollständiger Prozessierungen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

ESI-MS der Proteine DsrE, DsrF, DsrH und DsrC aus *A. vinosum*:

Die Durchführung der Bestimmung der molekularen Massen von aufgereinigtem rekombinantem DsrEFH und DsrC sowie von DsrEFH aus *Allochromatium* mittels der ESI-Methode wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt (PD. Dr. H. Prinz, 2004).

2.14 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Für ein besseres Verständnis der Funktion von Proteinen bei biochemischen Prozessen in der Zelle ist es wichtig, deren dreidimensionale Struktur kennen zu lernen. Der Analyse von Proteinstrukturen stehen drei Methoden zur Verfügung: **1.** Die Elektronenmikroskopie, zur Darstellung der Oberfläche von Proteinen. **2.** NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie). Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie ermöglicht die Struktur von Makromolekülen, bis zu einer Masse von ca. 30 kDa zu analysieren. Sie liefert Informationen über die Dynamik von Proteinen in Lösung. Ein Vorteil gegenüber der Röntgenkristallographie ist, dass das Protein nicht kristallisiert werden muss. **3.** Die Röntgenkristallographie ist die mächtigste Methode zur Analyse der Struktur von Makromolekülen. Mit ihr lässt sich jede Struktur von Proteinen mit prinzipiell jeder Größe aufklären. Voraussetzung ist ein hochqualitativer Proteinkristall!

2.14.1 Röntgenstrahlung

In der Röntgenkristallographie wird vorwiegend Röntgenstrahlung mit Wellenlängen zwischen 0,6 - 2Å eingesetzt. Die Röntgenstrahlen können auf unterschiedlichen Wegen erzeugt werden. In kristallographischen Laboren werden vorwiegend Drehanodengeneratoren eingesetzt. Eine weitere Quelle für die Erzeugung von Röntgenstrahlen sind Synchronstrahlungsquellen.

2.14.2 Durchführung der Strukturanalyse der DsrEFH Proteine von *A. vinosum*

Die in dieser Arbeit ermittelten Strukturen des rekombinanten SeMetEFH wurde von Herrn Dong Hae Shin am Biochemischen Institut, der Universität von Berkeley (Kalifornien) durchgeführt. Die analysierten Strukturen wurden mittels der Single Anomalous Methode (SAD) und mit der des Molekularen Ersatzes (MR) gelöst, die im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden:

2.14.3 SAD (Single Anomalous Dispersion) / MAD (multiple anomalous Dispersion)

Die Methode der Single Anomalous Dispersion (SAD) bzw. die Methode der Multiple Anomalous Dispersion (MAD) (erstmalig beschrieben von Hendrickson et al., 1988) beruhen auf der Eigenschaft von Schwermetallatomen, Röntgenstrahlung spezifischer Wellenlänge zu absorbieren. Für die Single Anomalous Dispersion (SAD) ist eine Röntgenstrahlung von einer frei wählbaren

Wellenlänge wichtig, andererseits aber auch das Vorhandensein anormal streuender Atome im Kristall. Anormal streuende Atome können entweder im zu analysierenden Protein natürlich vorkommen, oder die nativen Proteinkristalle werden in Lösungen verschiedener Schweratomsalze getränkt. Darüber hinaus besteht noch die Möglichkeit, dass das Protein in einem selenomethioninhaltigen Medium exprimiert wird. Hierbei wird während der Proteinbiosynthese die Selenverbindung anstelle des normalen Aminosäure Methionin in die Proteinsequenz eingebaut. Wenn das Selenomethionin an einer ausgezeichneten Position der Proteinmoleküls eingebaut wurde, kann ihre Lage durch die Pattersonmethode bestimmt werden. Die Phaseninformationen können daraufhin aus dem Unterschied der Strukturfaktorbeträge des nativen Proteins und des mit Selenomethionin substituierten Proteins berechnet werden.

2.14.4 Die MR Methode

Bei der Methode des molekularen Ersatzes auch Faltmolekülmethode oder „Molecular Replacement“ genannt (MR) (Hoppe, 1957, Rossmann and Blow, 1962), muss ein Atommodell mit bekannter Kristallstruktur vorliegen und eine hinreichende Ähnlichkeit zu dem zu untersuchenden Modell aufweisen. Aus den Koordinaten der bekannten Proteinstruktur können dann quasi rückwärts die Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) und die Phasen (a_{calc}) für das Modell ermittelt werden. Mit den Modellphasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) lässt sich eine Elektronendichtekarte für die neue Kristallstruktur ermitteln. Das bekannte Strukturmodell muss zunächst in der neuen Kristallzelle platziert werden. Das sechsdimensionale Suchproblem mit drei Rotations- und drei Translationsvariablen wird in zwei Schritte aufgeteilt. Zuerst wird die Rotationsorientierung mittels der Patterson-Funktion berechnet. Es werden hierbei zwei Patterson-Funktionen berechnet, die eine mit Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) aus den gemessenen Beugungsintensitäten die andere mit den Strukturfaktoramplituden, die aus den Atomkoordinaten des Suchmodells berechnet werden. Die zwei Sätze der Patterson-Vektoren werden durch die Produktinformation miteinander korreliert, wobei der eine Vektorensatz des einen gegen den anderen in kleine Winkelschritten um alle drei Achsen gedreht wird (Rotationsfunktion). Das Suchmodell wird rotiert und durch die Kristallzelle translatiert, wobei nach jedem Schritt eine Korrelation zu den experimentellen Strukturfaktoramplituden berechnet wird. Nach dem Platzieren des Suchmodells in der neuen Kristallzelle, kann die Elektronendichte berechnet und eine Korrektur und Verfeinerung der Struktur kann begonnen werden (Drenth, 1999).

3 Ergebnisse

Teil I

3.1 Aufreinigung von DsrEFH aus *A. vinosum* DSMZ 180 T

3.1.1 DsrE ist ein lösliches Protein

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur wenige Informationen über die Proteine DsrE, DsrF und DsrH. Ihre physiologische und biochemische Bedeutung im Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* war noch weitgehend ungeklärt. Um die tatsächliche Existenz sowie die Lokalisation dieser Proteine in den Zellen von *A. vinosum*, die bislang nicht nachgewiesen wurde, zu bestätigen wurde zuerst eine Isolierung und Aufreinigung der DsrE-, DsrF- und DsrH-Proteine aus dem Original Wildtyporganismus *A. vinosum* (DSM^{180T}) durchgeführt. Für den Nachweis der cytoplasmatischen Lokalisation von DsrE aus *A. vinosum* wurde das in 50mM KPP-Puffer pH 7,5 resuspendierte Zellmaterial mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach zwei Zentrifugationschritten wurden insgesamt drei Fraktionen gewonnen, Rohextrakt, lösliche Fraktion und Membranfraktion. Nach Analyse der erhaltenen Fraktionen über SDS-Proteingel (12,5 %) und anschließendem Western-Blot zum Nachweis von DsrE zeigte sich, dass das DsrE sowohl im Rohextrakt als auch in der löslichen Fraktion enthalten war. In der Membranfraktion wurde kein DsrE nachgewiesen (s. **Abb. 3.1**). DsrE ist demnach ein lösliches im Cytoplasma lokalisiertes Protein.

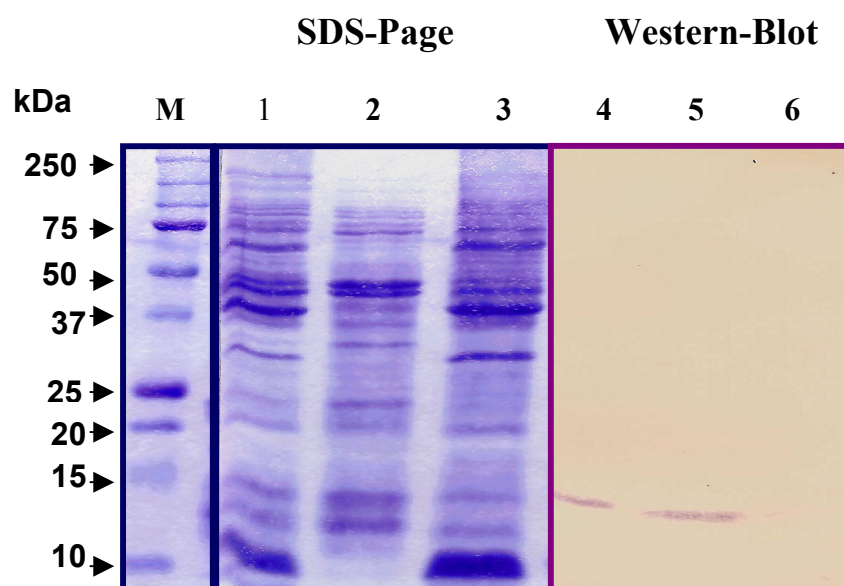


Abb. 3.1: SDS-Proteingel (12,5 %) und Western-Blot zum Nachweis, dass DsrE ein lösliches Protein und cytoplasmatisch lokalisiert ist. Für den Immunoblot wurde das DsrE-Antiserum 1:1000 verdünnt eingesetzt. Spur: 1 u. 4 Rohextrakt; 2 u. 5 lösliches Protein; 3 u. 6 Membranfraktion; M= Marker

3.1.2 Reinigung von DsrE, DsrF und DsrH aus *A. vinosum*

Für die Proteine DsrE, DsrF, DsrH aus *Allochrodatum vinosum* konnte ein effektives Aufreinigungsschema entwickelt werden. Der Überstand, die lösliche Proteinfraction, wurde nach der Ultrazentrifugation einer Ammoniumsulfatfällung mit 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unterzogen. Die über Nacht bei 4°C gefällte Proteinprobe wurde am darauffolgenden Tag zuerst für 30 min zentrifugiert, bevor sie auf eine mit 50 mM KPP-Puffer pH 7,5 und 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibrierte Phenylsepharose 6F-Säule ($V_{\text{total}} = 75$ ml) aufgetragen wurde. Nach einem Waschschriff mit 100 % Puffer B (50 mM KPP pH 7,5, 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) erfolgte die Elution der Proteine in einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von 40-0 %. DsrE, eluierte zwischen 20-15 % von der Phenylsepharose-Säule. Die **Abb. 3.2** zeigt ein Chromatogramm zur Aufreinigung von DsrE über die Phenylsepharose-Säule.

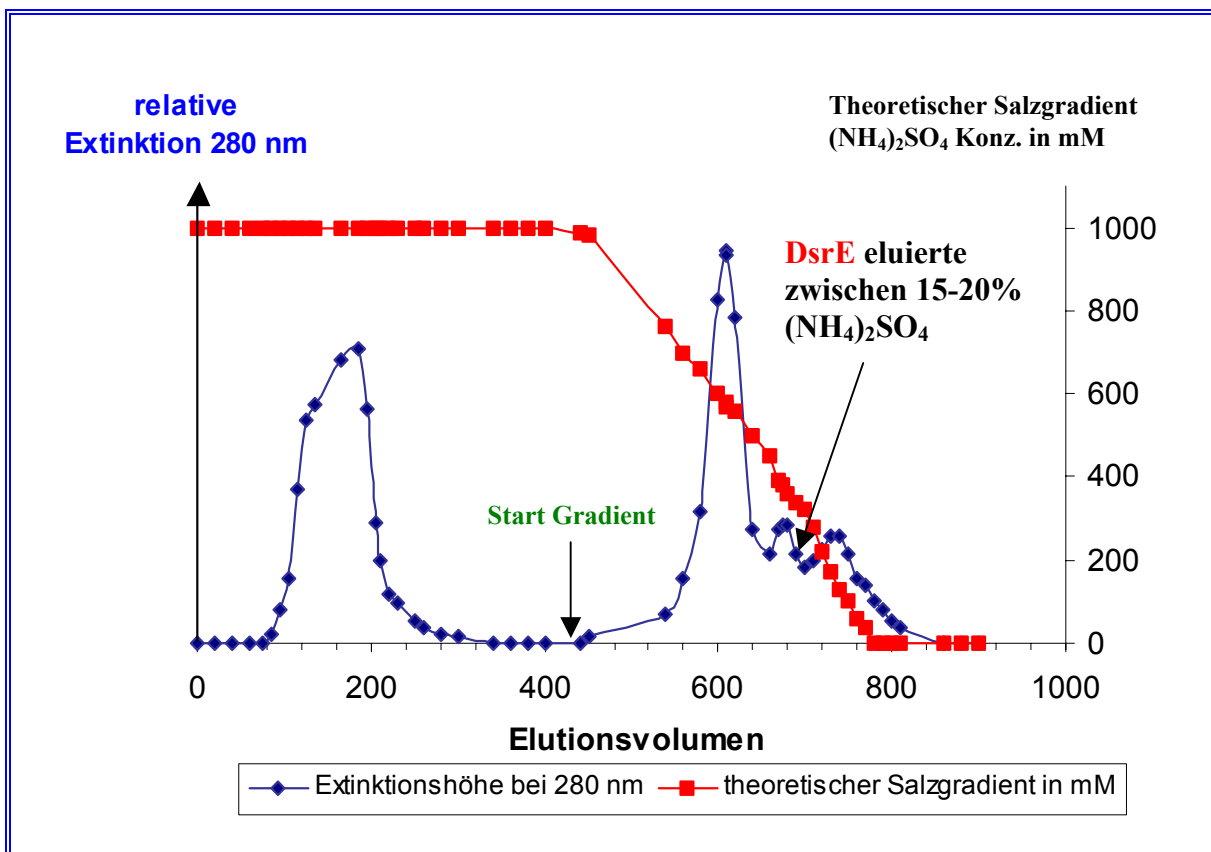


Abb. 3.2: Chromatogramm: Elutionsprofil der Aufreinigung von DsrE, aus *A. vinosum* durch **hydrophobe Interaktionschromatographie** (Phenylsepharose-6F (Amersham Pharmacia). Flussrate: 2ml/ min. Gradientenvolumen: 350 ml Puffer A: 50 mM KPP pH 7,5 Puffer B : 50 mM KPP pH 7,5 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 %); DsrE eluierte in einem Bereich zwischen 15-20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von der Säule.

Nach erfolgter Aufreinigung wurde mit Hilfe von Western-Blots getestet, in welchen Fraktionen das Protein DsrE vorliegt. Für den Immunologischen Nachweis stand ein Antikörper gegen DsrE aus Kaninchen (hergestellt von der Firma Eurogentec s. Material u Methoden 2.4) zur Verfügung. Die Proteine DsrF und DsrH konnten nach dem ersten Aufreinigungsschritt noch nicht immunologisch nachgewiesen werden. Die **Abb. 3.3** zeigt das Ergebnis der SDS-Page und des Western-Blots zum Nachweis von DsrE von einer DsrE-haltigen Fraktion. Für den immunologischen Nachweis wurde das DsrE-Antiserum 1:1000 verdünnt eingesetzt.

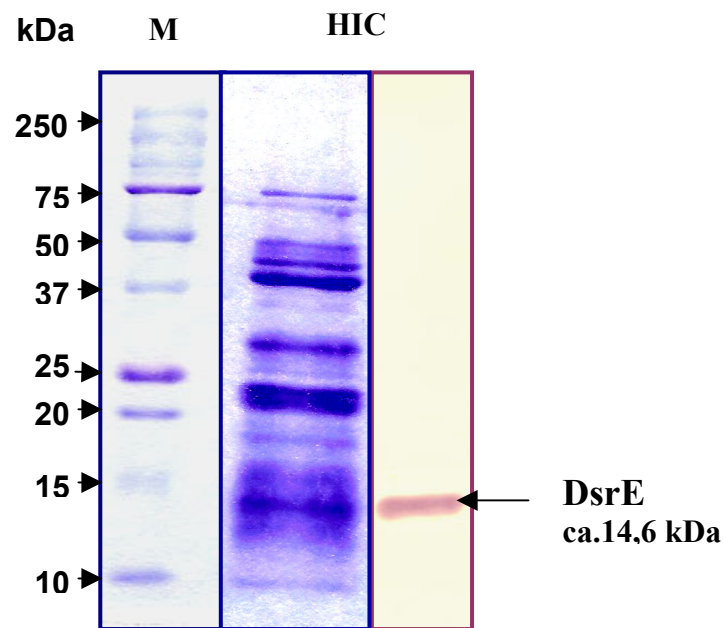


Abb. 3.3: SDS-Proteingel (12,5 %) und Western-Blot zum Nachweis von DsrE in Proteinproben nach der Aufreinigung über die Phenylsepharose-6F-Säule. Das Antiserum gegen DsrE wurde im Immunoblot 1:1000 verdünnt eingesetzt. Als Marker für den Western-Blot wurde der Precision Plus Protein-Standard Marker (low range) (Bio-Rad) eingesetzt.

Für die weitere Proteinaufreinigung wurden alle DsrE-haltigen Fraktionen vereint und über Nacht gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert, um sie für die Aufreinigung durch Anionenaustauschchromatographie auf die Mono-Q-Säule (HR5/5), aufzutragen. Diese wurde zuvor mit 2-3 Volumen 10 mM Tris/HCL pH 7,5 1 M NaCl und 5 Volumen 10 mM Tris/HCl äquilibriert. Nach Auftrag auf die Säule und einem Waschschritt mit 30 % Puffer B (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl) erfolgte die Elution der Proteine in einem linearen Gradienten von 300-700 mM NaCl von der Säule. DsrE eluierte zwischen 465-490 mM NaCl. Die nachfolgende **Abb. 3.4** zeigt ein Chromatogramm zur Aufreinigung von DsrE über die Mono-Q-Säule.

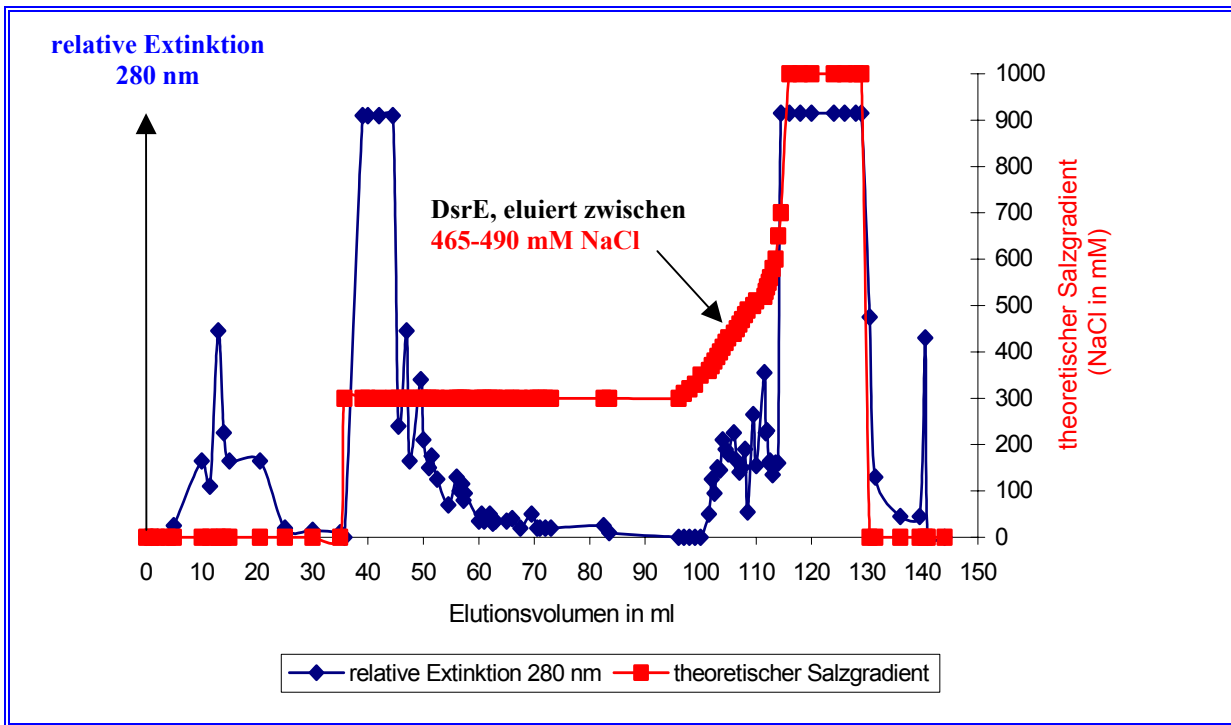


Abb. 3.4: Chromatogramm: Elutionsprofil der Aufreinigung von DsrE, durch Anionenaustauschchromatographie (Mono-Q-Säule (HR5/5); Amersham Pharmacia): Flussrate 1 ml / min; Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; Puffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl; Fraktionsvolumen: 1 ml.

Nach erfolgter Aufreinigung wurde erneut eine SDS-Page und Western-Blot-Analyse zum Nachweis von DsrE in den erhaltenen Fraktionen durchgeführt. Die nachfolgende **Abb. 3.5** zeigt das Ergebnis.

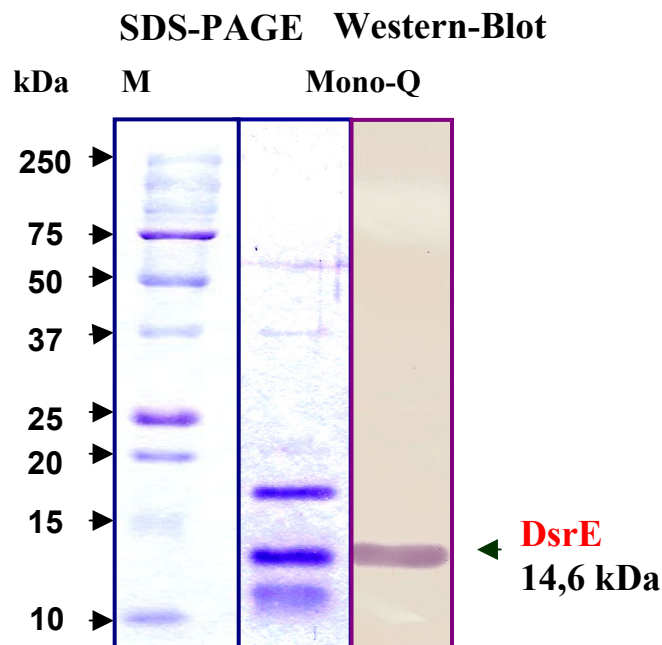


Abb. 3.5: Nachweis von DsrE in Proteinproben nach Aufreinigung über die Mono-Q-Säule (HR5/50). Das DsrE-Antiserum wurde 1:1000 verdünnt . M= Marker (s.o.)

Auffallend war, dass außer der DsrE-Proteinbande noch zwei weitere Proteinbanden im Gel auftraten, im Bereich zwischen 15-20 kDa und im Bereich von 10-15 kDa, s. **Abb. 3.5**. Hierbei könnte es sich möglicherweise um die Proteine DsrH und DsrF handeln, die mit DsrE aufgereinigt werden. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden alle DsrE haltigen Proteine nach der Mono-Q-Aufreinigung vereint und durch eine Ultrafiltration (Centriplus YM10 (Millipore)) auf ein Volumen von 2 ml konzentriert. Die konzentrierte Proteinprobe wurde auf eine zuvor mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex^{TM200} aufgetragen. Nach Elution der Proteine (1 ml Fraktionen, in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) und erfolgter SDS-Page zeigte sich erneut, dass mit dem DsrE-Protein noch zwei weitere Proteine aufgereinigt wurden. Eine anschließende Western-Blot-Analyse, s. **Abb. 3.7** bestätigte, dass es sich hier um die Proteine DsrE, DsrF und DsrH handelt. Die Proteine DsrE, DsrF und DsrH eluieren somit nicht einzeln, sondern zusammen von der Superdex TM²⁰⁰. Sie wurden homogen aufgereinigt. Im SDS- Gel, s. **Abb. 3.6** liegen die Proteine DsrE, DsrF und DsrH in einem Verhältnis 1:1:1 vor. DsrE, DsrF und DsrH eluieren gemeinsam nach ca. 77,5 ml von der Säule. Da die Gelfiltrationssäule geeicht war, konnte das Molekulargewicht bestimmt werden. Das Molekulargewicht des DsrEFH- Proteins betrug 83 kDa. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, das DsrEFH als Heterohexamer mit einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Struktur im Cytoplasma von *A. vinosum* vorliegt. Auf der nachfolgenden Seite sind das Chromatogramm zur Gelfiltration und die Ergebnisse aus SDS-Page und Western-Blot-Analyse dargestellt, s. **Abb. 3.7**. Die Proteine DsrE, DsrF und DsrH konnten letztendlich homogen aufgereinigt werden, jedoch war die Ausbeute an gereinigtem Protein sehr gering. Aus 80 g Zellen wurden nach drei erfolgten chromatographischen Aufreinigungsschritten nur 0,4 mg sauberes DsrEFH-Protein gewonnen.

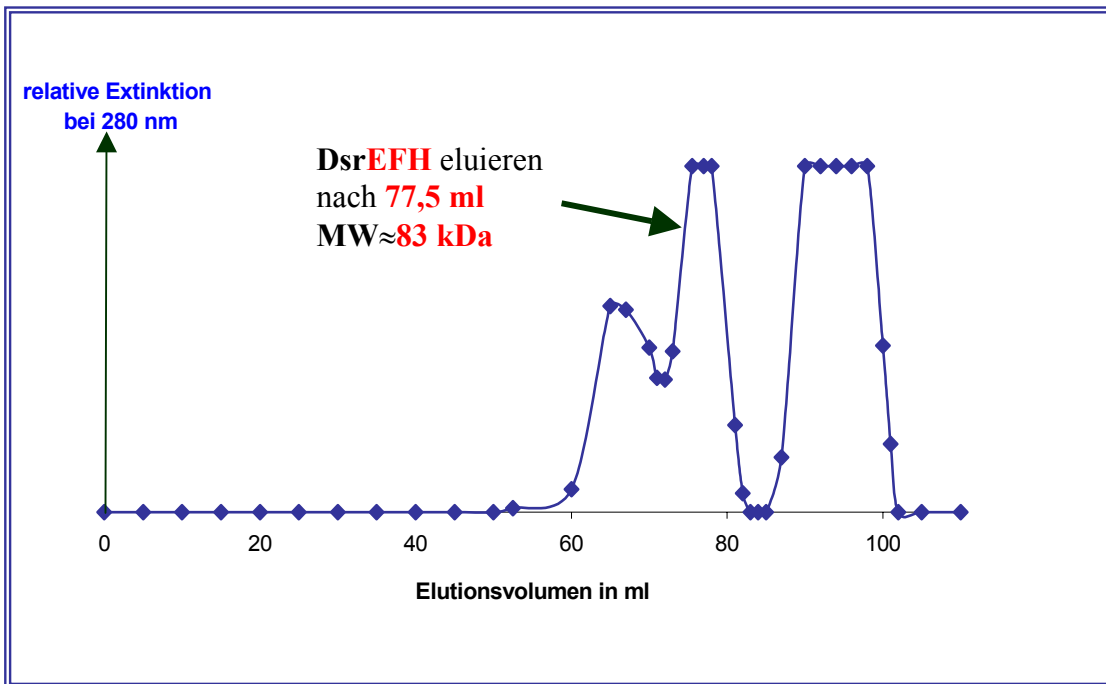


Abb. 3.6: Chromatogramm: Elutionsprofil der Aufreinigung von DsrEFH über die Superdex^{TM200}-Säule (Gelfiltration); Flussrate: 0,5 ml/min ; Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl; Fraktionsvolumen: 1 ml.

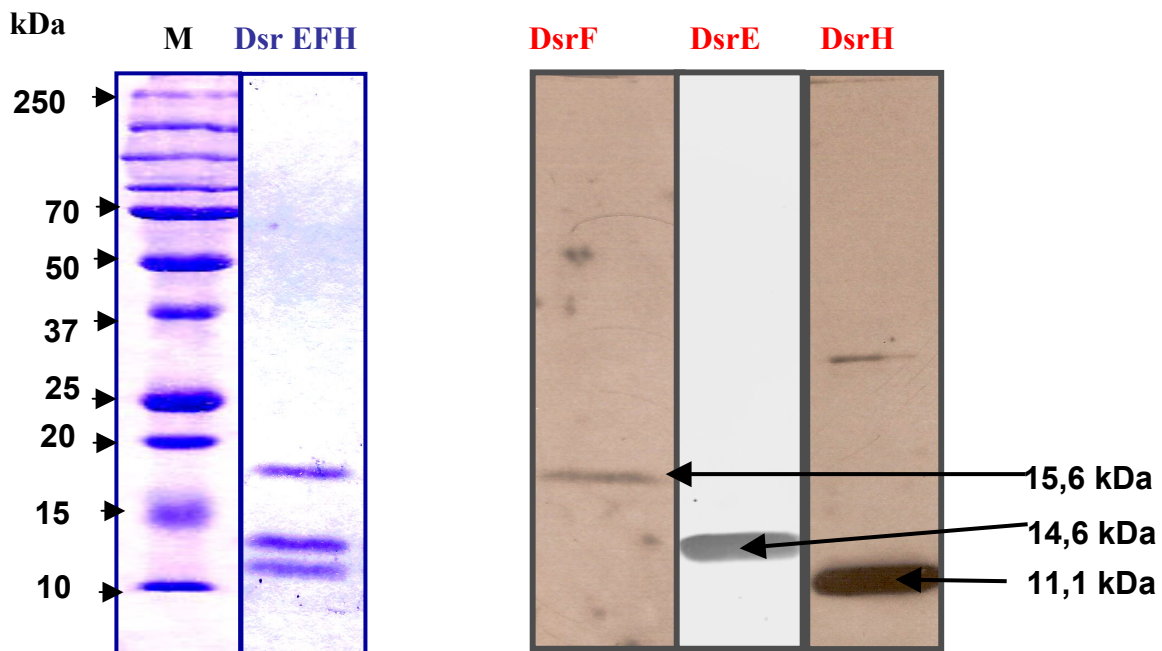


Abb. 3.7: SDS-Proteingel (12,5 %) und Western-Blots zum Nachweis von DsrE, DsrF und DsrH in Proben nach Aufreinigung über die Superdex^{TM200}-Säule. Für den Immunoblot wurde das DsrE-Antiserum 1:1000 verdünnt. Für den Nachweis von DsrF und DsrH wurden die HPLC-aufgereinigtem Antikörper (Eurogentech, Belgien) in einem Verhältnis 1:4000-1:5000 verdünnt eingesetzt. Der Nachweis für DsrF und DsrH erfolgte mittels des ECL-Systems (s. Material u. Methode, 2.8.11.2 (Akhavan-Tafti et al., 2001)). (M= Marker, s.o.)

3.2 Die Bildung von DsrE, DsrF und DsrH wird durch Sulfid induziert

Um festzustellen, ob die Bildung der Proteine DsrE, DsrF und DsrH von Sulfid abhängig ist, wurden Sulfidinduktionsexperimente durchgeführt. *A. vinosum* Wildtyp wurde photoorganoheterotroph auf Malat gezogen. Nach dem Erreichen der späten exponentiellen Phase wurde dem Medium 4,2 mM Sulfid zugesetzt. Die Konzentration des Sulfids im Medium nahm rapide ab. Die Aufnahme von Sulfid durch die *Allochromatium*-Zellen schien nach 5 Stunden beendet, d.h. die Konzentration an intrazellulärem Schwefel hatte ein Maximum erreicht. Von den Zellen wurde sowohl vor als auch nach Zugabe von Sulfid 2 ml Probe entnommen. Zum Nachweis von DsrE und DsrH wurde eine SDS-Page und Western-Blot-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zum Nachweis von DsrE und DsrH in Rohextrakten vor und nach Induktion mit Sulfid zeigt die nachfolgende **Abb. 3.8**. Die Bildung von DsrE und DsrH in dem Schwefelpurpurbakterium *A. vinosum* ist von Sulfid abhängig. In Abwesenheit von Sulfid ist kein DsrE und kein DsrH in den Zellen nachweisbar. Nach Zugabe von Sulfid zu dem Medium wurden die Proteine DsrE und DsrH in den Zellen detektiert.

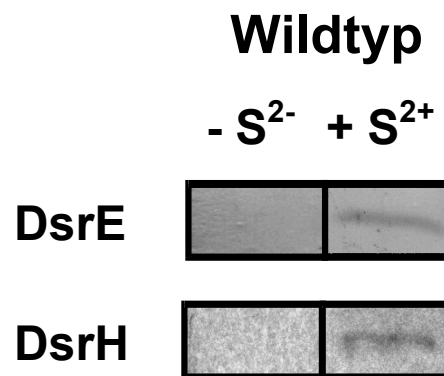


Abb. 3.8: Western-Blot zum Nachweis der Sulfidabhängigen Bildung von DsrE und DsrH in *A. vinosum*. Für den immunologischen Nachweis wurde das DsrE-Antiserum und der DsrH-Antikörper 1: 2000 verdünnt eingesetzt. Nachweis von DsrE mittels 4-Chloro-1-Naphthol, DsrH mittels des ECL-Systems (Amersham Pharmacia Biotech.).

3.3 Herstellung von rekombinanten DsrE, DsrF, DsrH für biochemische Untersuchungen

Mit Hilfe der heterologen Expression der Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* in *E. coli* sollte die Proteinaufreinigung und die Proteinausbeute von DsrE, DsrF und DsrH effektiver gestaltet werden. Das Anfügen eines N-terminalen Oligohistidinrestes ermöglichte eine vereinfachte Reinigung des rekombinanten DsrEFH-Proteinhexamers. Dazu wurden die Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* über eine PCR mit mutagenen Oligonukleotiden (**Tab. 2.4** Material & Methode) so amplifiziert, dass in der Nähe des Startcodons von DsrE eine **NdeI** Schnittstelle eingefügt wurde und hinter dem Stoppcodon der Gensequenz von DsrH eine **Xho I** Schnittstelle. Diese Schnittstellen erlaubten, dass die Gene *dsrE*, *dsrF*, *dsrH* hintereinander in einen Expressionsvektor pET15b (Novagen Madison) eingesetzt werden konnten. Die Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* wurden in dem gleichen Leseraster hinter eine für einen Oligohistidinrest kodierende Sequenz kloniert. Auf diese Weise entstand der Vektor **pETEFH**, korrekte Bezeichnung *dsrE*, *dsrF*, *dsrH* in pET15b. Die Nukleotidsequenz wurde verifiziert (Fa. Sequiservice, Vaterstetten). Der erhaltene Expressionsvektor wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expression des rekombinanten DsrE, DsrF und DsrH sowie der Zellaufschluss erfolgten wie unter Material und Methoden beschrieben. Zum Vergleich wurde ein analoges Experiment mit *E. coli* BL21(DE3) ohne das Plasmid durchgeführt. Die nachfolgenden **Abb. 3.9** und **Abb. 3.10** zeigen eine schematische Darstellung des Expressionsvektors, **pETEFH** sowie das Ergebnis der Expression von *E. coli* BL21(DE3) ohne Plasmid und von *E. coli* BL21(DE3): **pETEFH**. Das Zellysats, der Zentrifugationsüberstand, nach 30 minütiger Zentrifugation des Zellysats bei 25000 x g, in einer Kühlzentrifuge, sowie das Zentrifugationspellet wurden in einem entsprechenden Volumen 20 mM Tris/HCl pH7,5 Puffer aufgenommen, mit Roti-Load (Auftragspuffer) in einem Verhältnis 1:4 versetzt, aufgeköcht und in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

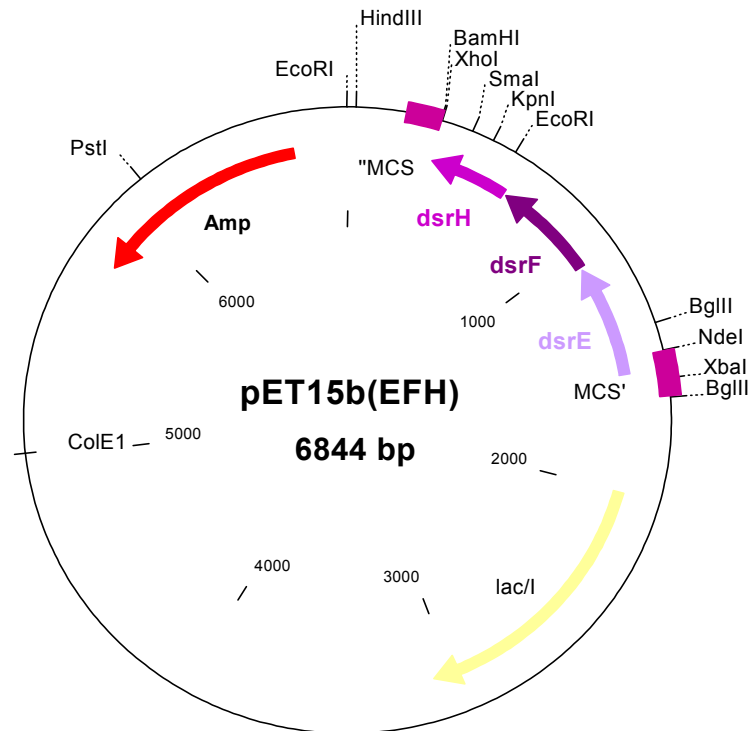


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des pET^{EFH}-Vektors für die Überexpression der Proteine DsrEFH in *E. coli* BL21(DE3)

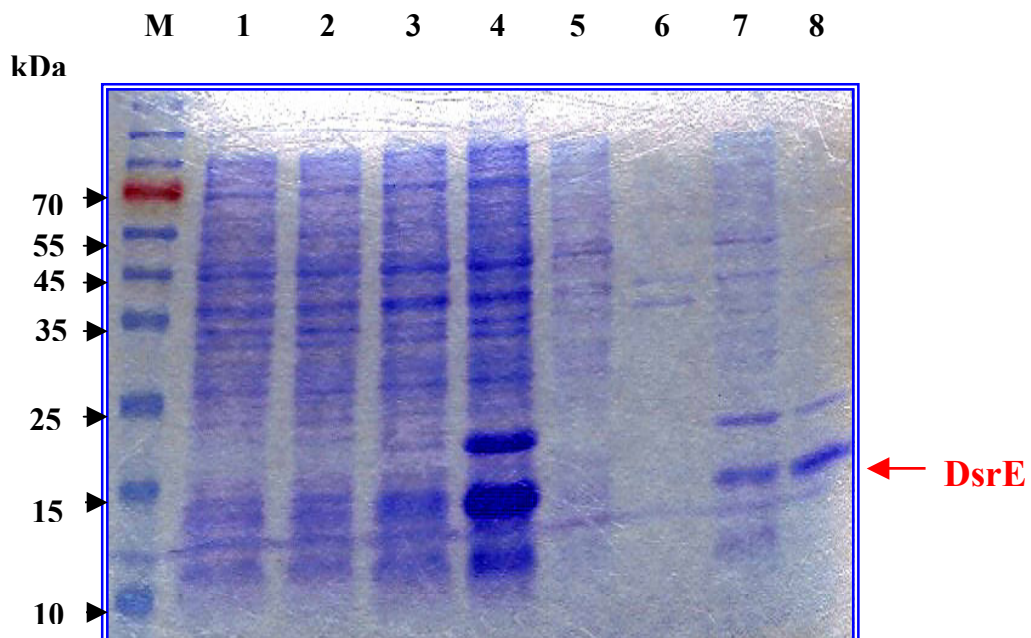


Abb. 3.10: SDS-Proteingel (12,5 %) nach Überexpression von DsrE, DsrF, DsrH in *E. coli* BL21(DE3). Spur: M = Prestained Marker (Fermentas); 1. u. 2. Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) ohne Insert vor und nach Induktion mit 100 μ l 0,1 M IPTG; 3. u. 4. Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3): pET^{EFH} vor und nach Induktion mit IPTG; 5. u. 6. Lysat und Pellet von *E. coli* BL21(DE3) nach der Induktion 1:10 verdünnt; 7 u. 8. Lysat und Pellet von *E. coli* BL21(DE3) pET^{EFH} nach Induktion 1:10 verdünnt.

3.4 Aufreinigung des rekombinanten DsrEFH-Proteins aus *Escherichia coli* BL21(DE3) mittels Affinitätschromatographie

Für die rekombinanten DsrEFH-Proteine konnte ein effektives Aufreinigungsschema entwickelt werden. Die Aufreinigung beruht auf der Affinität des N-terminalen Oligohistidinrestes des rekombinanten Proteins zu divalenten Kationen (pET System Manual Novagen, Madison). Das Zellmaterial aus der Überexpression von DsrEFH in *E. coli* BL21(DE3) wurde wie im Material und Methodenteil beschrieben einer Affinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Matrix unterzogen. Die Elution, der an das Säulenmaterial gebundenen Proteine, erfolgte mit aufsteigenden Imidazolkonzentrationen von 20-500 mM Imidazol. Die Hauptmenge des DsrEFH-Proteins eluierte in einem Bereich von 100 und 150mM Imidazol von der Säule. Nach erfolgter Aufreinigung wurde eine SDS-Page und Western-Blot-Analyse zum Nachweis von DsrE durchgeführt. Das Ergebnis der Aufreinigung zeigt die nachfolgende **Abb. 3.11**.

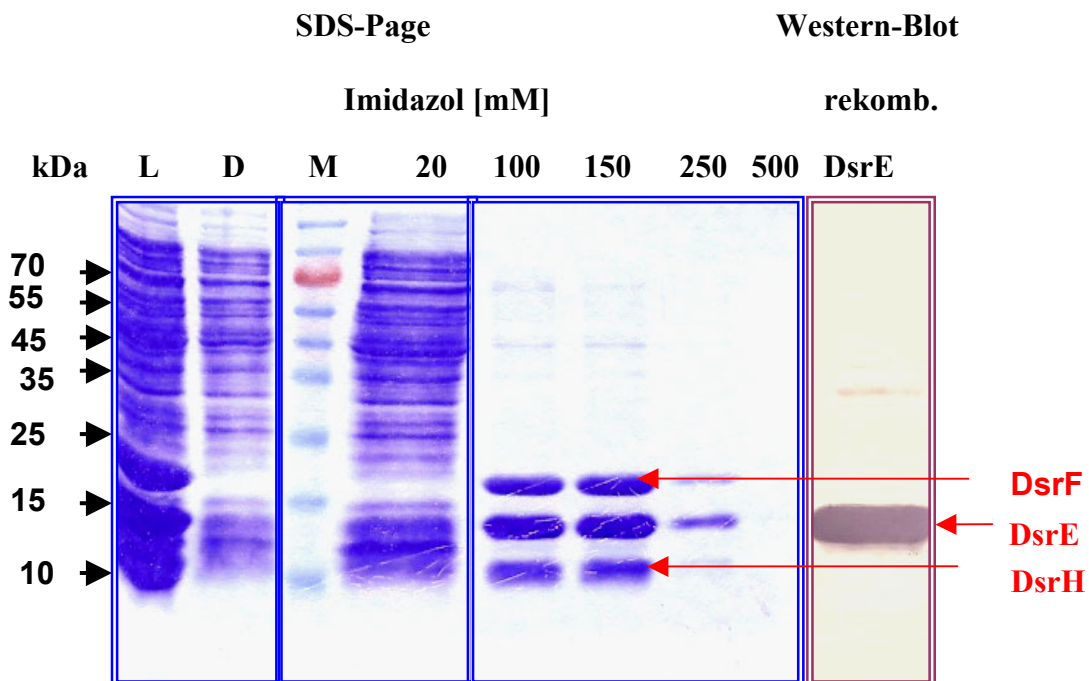


Abb. 3.11: SDS- Proteingel (12,5 %) und Western-Blot zum Nachweis des rekombinanten DsrEFH nach Aufreinigung über die NTA-Säule. Spur: L = Lysat; D = Durchfluss; M = Prestained Marker; 20, 50, 100, 150, 250, 500 mM Imidazol-Fraktionen. Die Hauptmenge von DsrEFH eluiert bei 100-150 mM Imidazol von der Säule.

3.4.1 Aufreinigung des rekombinanten DsrEFH-Proteins über die Mono-Q-Säule

Die DsrEFH-haltigen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie über die NTA-Säule wurden vereinigt und über Nacht in einem großen Volumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert, um so die Proben in den entsprechenden Puffer für die Aufreinigung durch Anionenaustauschchromatographie über eine Mono-Q-Säule umzupuffern. Die dialysierte DsrEFH-haltige Probe wurde auf die mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 äquilibrierte Mono-Q-Säule (HR5/5 1 ml Säulenvolumen; Amersham Pharmacia) aufgetragen. Nach Auftrag der Probe auf die Säule erfolgte zuerst ein Waschschriff mit 15 % Puffer B (10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 M NaCl) mit einer Flussrate von 1 ml/min. Daraufhin wurden die Proteine EFH in einem aufsteigenden Salzgradienten von 15-50 % Puffer B (10 mM Tris HCl pH 7,5 1 M NaCl) mit einer Flussrate von 1 ml/min der Säule eluiert. Die nachfolgende **Abb. 3.12** zeigt das Ergebnis der Elution von DsrEFH über die Mono-Q-Säule.

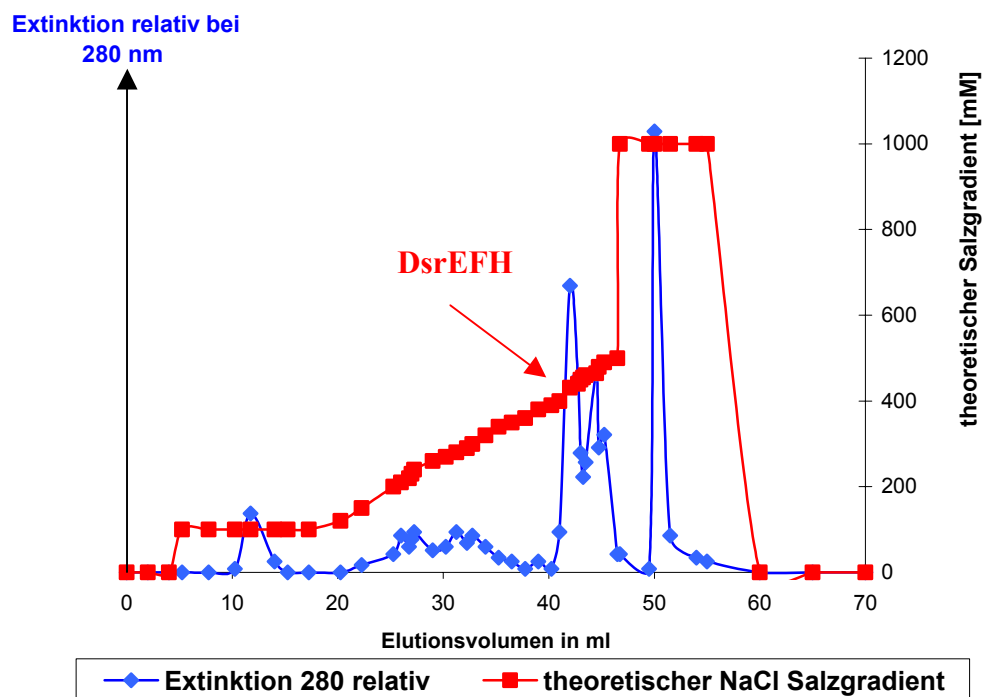


Abb. 3.12: Elutionsprofil der Aufreinigung von rekombinantem DsrEFH über die Mono-Q-Säule: Gradientenvolumen: 30 ml; Flussrate: 1 m/min; Fraktionsvolumen: 1 ml; Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,5 ;Puffer B :10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 M NaCl. DsrEFH eluierten zwischen 430 und 440 mM NaCl (nach ca. 23-28 ml) von der Säule.

Nach der Aufreinigung über die Mono-Q-Säule wurden die erhaltenen Fraktionen einer SDS-Page unterzogen um festzustellen in welchen Fraktionen DsrEFH enthalten war. Die **Abb. 3.13** zeigt das Ergebnis der SDS-Page und der Western-Blot-Analyse zum Nachweis von DsrE nach der Mono-Q-Aufreinigung. Die Proteine DsrEFH wurden homogen aufgereinigt. Die Proteinbanden für DsrE, DsrF und DsrH liegen im Gel in einem Verhältnis 1:1:1 vor. Im Vergleich zu früheren Aufreinigungen von DsrEFH aus *Allochromatium vinosum* konnte mit der Aufreinigung des rekombinanten DsrEFH die Proteinausbeute deutlich erhöht werden. Aus 80 g Zellmaterial von *A. vinosum* (geerntet aus 40-50l *Allochromatium* (WT)-Flüssigkultur, auf Thiosulfatmedium) wurden nach drei Aufreinigungsstufen 0,4 mg sauberes Protein gewonnen. Mit der Überexpression von DsrEFH in *E. coli* BL21(DE3) wurden nach zwei Aufreinigungsschritten ca. 15 mg gereinigtes rekombinantes DsrEFH-Protein pro Liter *E. coli* Kultur gewonnen.

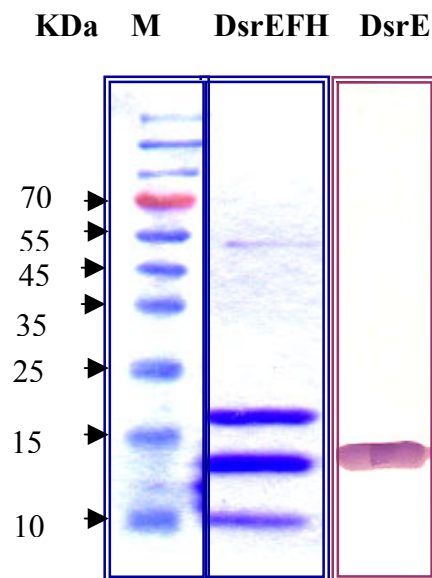


Abb. 3.13: SDS-Gel (12,5 %) zum Nachweis des rekombinanten DsrEFH u. Western-Blot zum Nachweis von DsrE in Proben nach der Mono-Q-Aufreinigung. Das DsrE-Antiserum wurde für die Detektion 1:1000 verdünnt eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit der 4-Chloro-1-Naphthol.

3.5 Nachweis des N-terminalen His-Tag

Die Detektion der Oligohistidinreste eines His-Tag-Fusionsproteins erfolgt mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen His-Tag-Antikörpers (einem Maus IgG, Novagen Madison). Für die Immundetektion des Oligohistidinrestes im rekombinanten DsrEFH wurde mit einer Probe des aufgereinigten rekombinanten DsrEFH eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Zur Durchführung der Nachweisreaktion, siehe Material und Methode Pkt. 2.9. Der Nachweis des Oligohistidinrestes

des rekombinanten DsrEFH war positiv, siehe nachfolgende **Abb. 3.14**. Das Signal für den Oligohistidinrest liegt auf der Höhe, wie auch das Signal für das DsrE-Protein (s. **Abb. 3.13**).

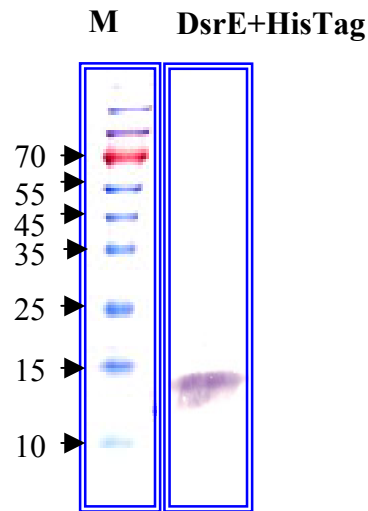


Abb. 3.14: Nachweis des His-Tag am rekombinanten DsrEFH. Der His-Tag Antikörper wurde 1:1000 verdünnt für die Immundetektion eingesetzt.

3.6 Bestimmung der molekularen Massen der DsrEFH-Proteine und Nachweis von Schwefeladdukten durch Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie ist eine Methode, die sich besonders gut für die Analyse labiler Moleküle eignet, wie z.B. die von Proteinen. Die anderen Ionisierungsmethoden (z.B. Laser-Ionisation) führen oft zu Fragmentierungen der Proteinprobe. Für eine Analyse der tatsächlichen Massen von DsrE, DsrF und DsrH, die bislang nur postuliert wurden, sollte daher eine ESI-MS-Analyse der aufgereinigten Proteinproben erfolgen. Die Bestimmung der molekularen Massen von rekombinanten DsrEFH und DsrEFH aus *A. vinosum* durch ESI-MS wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt (Prinz, 2004). Mit Hilfe der Massenanalyse sollte auch festgestellt werden, ob eine der drei Untereinheiten des DsrEFH-Holoproteins aus *A. vinosum* Addukte mit Schwefelverbindungen bildet. Vor der Massenanalyse der Proteine wurden die Proben noch auf eine Reversed-Phase-HPLC aufgetragen. Die Massen für das rekombinante DsrEFH, als auch für die Proteine DsrEFH aus *A. vinosum* mittels der Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie war erfolgreich. Das Ergebnis dieser Analyse zeigt die folgende **Abb. 3**.

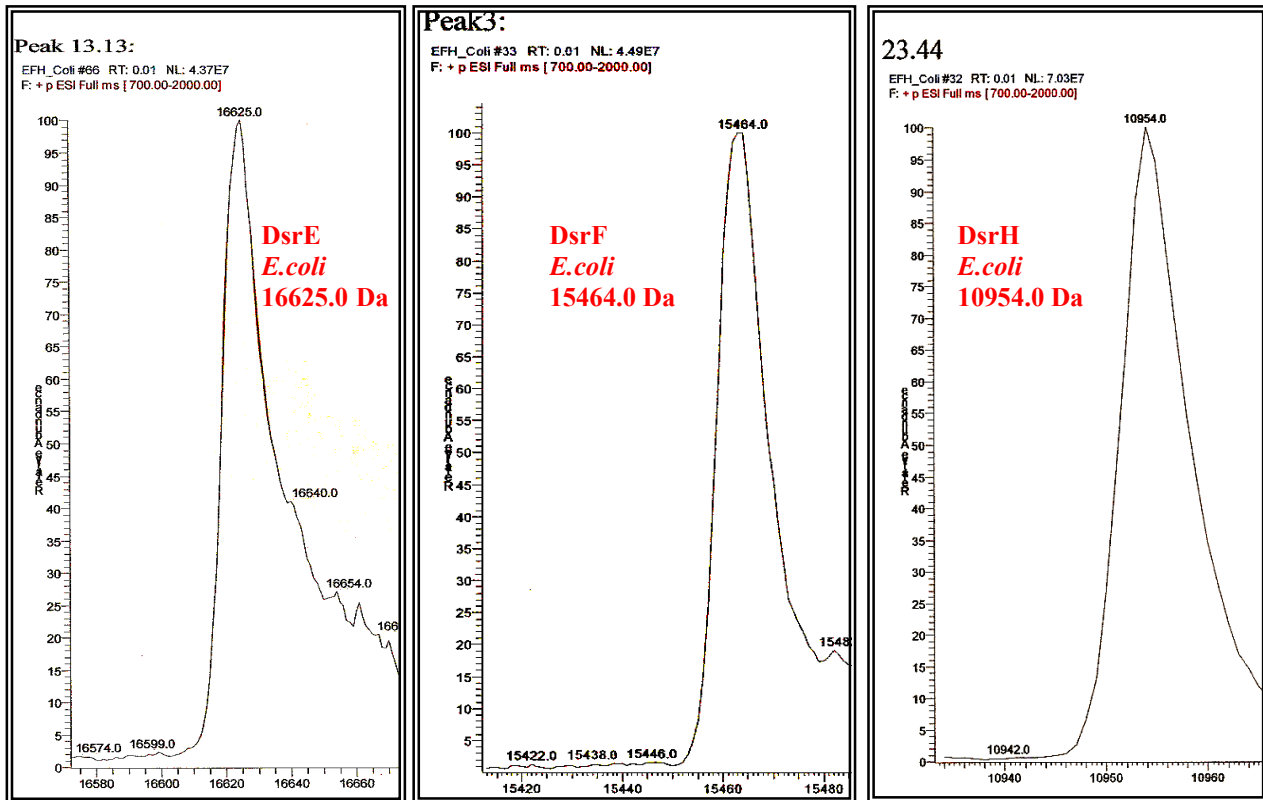


Abb. 3.15: Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) von DsrE, DsrF und DsrH. Dargestellt sind die Massen, die für das rekombinante DsrEFH aufgereinigt aus *E. coli* BL21(DE3) bestimmt wurden (analysiert von Dr. H. Prinz, Juni 2004).

Tab. 3.1: Vergleich der vorhergesagten und durch ESI-MS-Analyse ermittelten Massen für DsrE, DsrF und DsrH aus *A. vinosum* und für rekombinantes DsrEFH aus *E. coli*

Protein	<i>Allochro matium vinosum</i> Masse in Da		<i>Escherichia coli</i> Masse in Da	
	vorhergesagt +/- Initiator Methionin	gemessen	vorhergesagt +/- Initiator Methionin	gemessen
DsrE	14,588/14,457	14,590 + Initiator Met	16,752/16,621	16,625 -Initiator Met+His-Tag
DsrF	15,593/15,462	15,463 - Initiator Met	15,594/15,462	15,464 - Initiator Met
DsrH	11,085/10,955	10,954 - Initiator Met	11,085/10,955	10,954 - Initiator Met

Die ESI-MS-Analyse bestätigte sowohl die vorhergesagten Massen für DsrE, DsrF und DsrH aus *Allochromatium vinosum* als auch für das rekombinante DsrEFH, siehe auch **Tab. 3.1**. Durch die ESI-MS-Analyse wurden die Sequenzen für die Proteine bestätigt. Es zeigte sich zudem, dass keine der drei Proteinuntereinheiten aus *A. vinosum* kovalente Addukte mit Schwefelverbindungen bildet. Die höhere Masse, die für das rekombinante DsrE ermittelt wurde, ist darauf zurückzuführen, dass an dem DsrE-Protein noch ein Oligohistidinrest von 5 Histidinresten hängt.

3.7 Ist das DsrEFH-Protein stabil?

Eine wichtige Voraussetzung für strukturelle Untersuchungen von Proteinen ist ihre Stabilität gegenüber Temperaturveränderungen. Dazu wurde folgendes Experiment durchgeführt. Rekombinantes DsrEFH-Protein wurde eine Woche bei unterschiedlichen Temperaturen, d.h. bei Raumtemperatur (RT), 4°C, -20°C und -70°C inkubiert. Eine Woche nach Inkubation bei den verschiedenen Temperaturen wurden die Inkubationsansätze in einem 12,5 %igen SDS-Proteingel elektrophoretisch aufgetrennt. Die **Abb. 3.16** zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. In Spur 1 ist zu erkennen, dass das DsrEFH-Protein, das für eine Woche bei RT inkubiert wurde, im Vergleich zu den anderen Proteinproben, die bei kühleren Temperaturen gelagert wurden, ein anderes Laufverhalten zeigt. Das DsrE-Protein, das bei Raumtemperatur gelagert wurde, wandert im SDS-Gel weiter als die anderen Proteinproben. Um festzustellen, ob das DsrEFH-Protein (RT-Probe) eine Veränderung in seiner Primärstruktur erfahren hat, d.h. ein Abbau von Aminosäuren erfolgt ist, was sich in einer Veränderung der Masse zeigen würde, wurde die Probe einer ESI-MS-Analyse unterzogen. Die Massenbestimmung der DsrEFH-RT-Proteinprobe durch ESI-MS-Analyse zeigte, dass ein sukzessiver Abbau des N-terminalen His-Tags im rekombinanten DsrEFH-Protein erfolgt war, siehe **Abb. 3.17**. Möglicherweise ist der His-Tag im Vergleich zum Gesamtprotein nach außen exponiert, so dass er leichter abfallen kann.

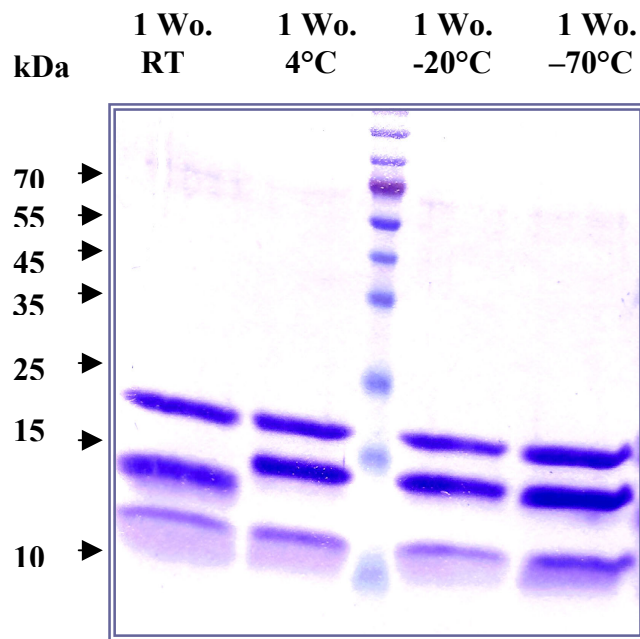


Abb. 3.16: SDS-Proteingel (12,5 %) von rekombinantem DsrEFH zum Nachweis der Stabilität. DsrEFH wurde eine Woche bei RT (Raumtemperatur), 4°C, -20°C und bei -70°C inkubiert.

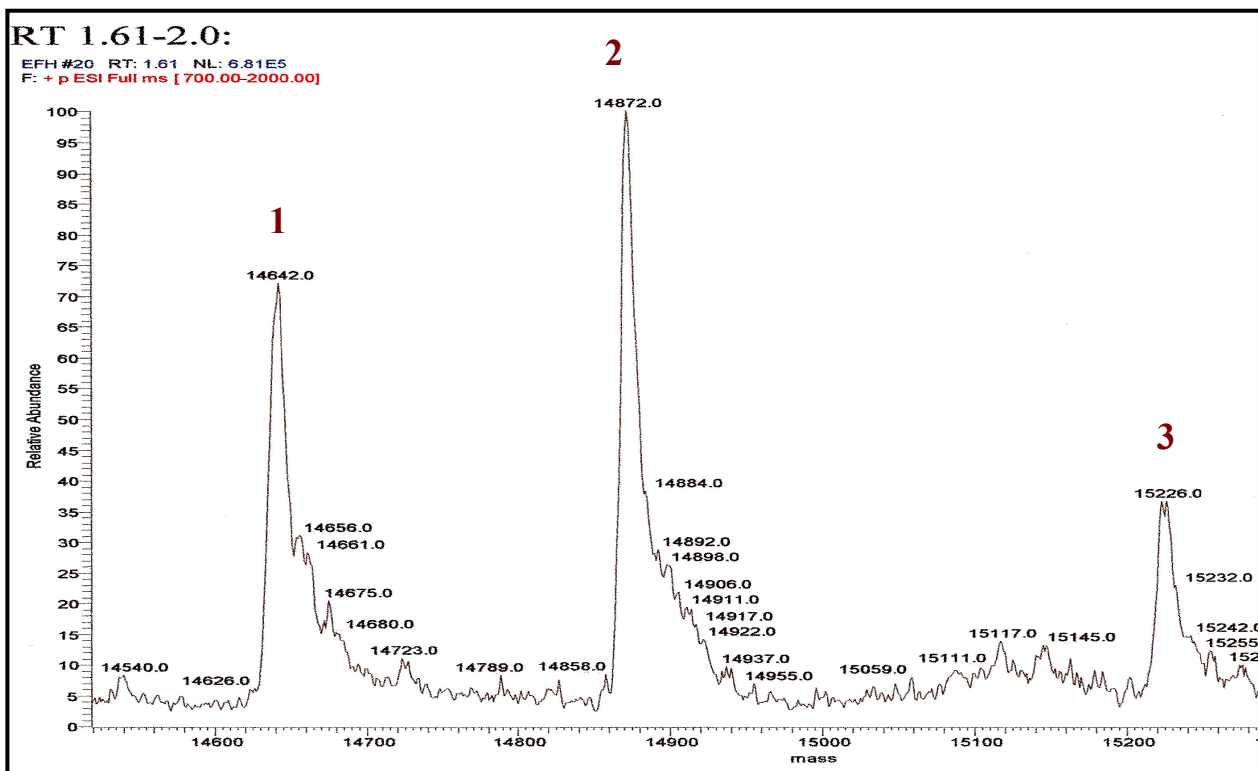


Abb. 3.17: ESI-MS-Spektrum des rekombinanten DsrEFH nach 1 Woche bei RT: Peak1: 14,642 kDa. 20 AS fehlen nach dem Methionin des His-Tags. Peak2: 14,872 kDa. 17 AS fehlen nach dem Methionin des His-Tags. Peak3: 15,226 kDa 14 AS fehlen nach dem Methionin des His-Tags.

3.8 Reduktion von Disulfidbrücken und Modifikation von Thiolgruppen

Die Spaltung von Disulfidbrücken kann einerseits durch Oxidation erfolgen, wobei die Disulfidbrücke durch Perameisensäure zu Cysteinsäuren oxidiert wird. Andererseits können die Disulfidbrücken auch durch Verwendung mit reduzierenden Agenzien, wie 2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT, Cleland's Reagens) oder Tributylphosphin reduziert werden. Letzteres wird beim Edman-Abbau eingesetzt, da es leicht flüchtig ist. DTT besitzt ein niedriges Redoxpotential und kann deshalb in kurzer Zeit Disulfidbrücken spalten. Um eine Reoxidation der Cysteinreste zu verhindern, werden alkylierende Reagenzien, z.B. Iodacetamid eingesetzt, das die freien Thiolgruppen (SH-Gruppen) modifiziert. Die nachfolgende **Abb. 3.18** zeigt beispielhaft die Reduktion einer Disulfidbrücke und anschließend die Modifizierung der SH-Gruppen mit Iodacetamid:

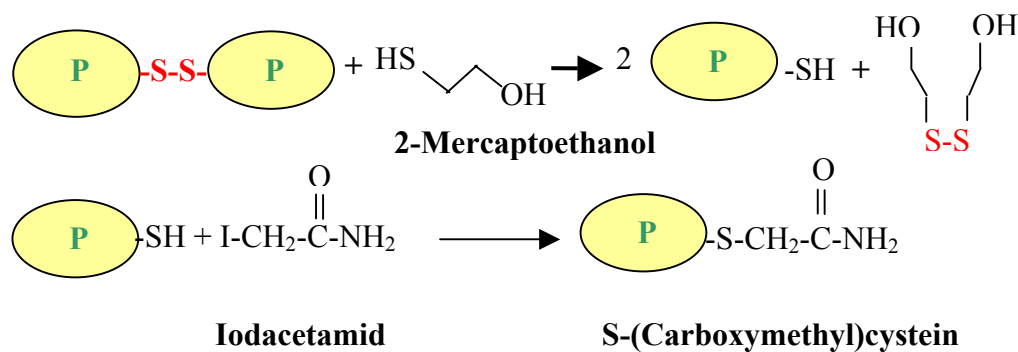


Abb. 3.18: Reduktion der Disulfidbrücke.

3.8.1 Sind die Proteine DsrE, DsrF und DsrH über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden?

Die Identifizierung intermolekularer Disulfidbrücken ist wichtig, um eine Aussage über die Struktur der Untereinheiten eines nativen Proteins zu machen! Um festzustellen, ob die Proteine DsrE, DsrF und DsrH über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind, wurde das aufgereinigte rekombinante DsrEFH-Protein in Gegenwart reduzierender und nicht reduzierender Agenzien denaturiert. Hierbei muss beachtet werden, dass unter nicht reduzierenden, jedoch denaturierenden Bedingungen artifizielle Disulfidbrücken durch freie Cysteinreste hervorgerufen werden können, die sonst in dem nativen Protein nicht auftreten (Kumar und Davidson, 1990).

Eine aufgereinigte DsrEFH-Proteinprobe wurde einmal mit reduzierendem Puffer Roti-Load 1 (enthält 2-Mercaptoethanol) und einmal mit nicht reduzierendem Puffer Roti-Load 2, jeweils in

einem Verhältnis 1:4 verdünnt, versetzt. Außerdem wurde eine Probe des aufgereinigten DsrEFH-Proteins mit 10 mM Iodacetamid und mit 2 x SDS-Puffer in einem Verhältnis 1:4 verdünnt, versetzt und für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das SDS-Gel noch für 5 min bei 100°C aufgeköcht. Das Ergebnis dieses Inkubationsexperiments von DsrEFH mit und ohne reduzierenden Agenzien und Iodacetamid zeigt die **Abb. 3.19**. Wird DsrEFH mit 2-Mercaptoethanol reduziert und anschließend aufgeköcht, so lässt sich im Proteingel nur das DsrEFH-Proteintrimer beobachten, d.h. es sind nur jeweils eine Proteinbande für DsrE, eine für DsrF und eine für DsrH im Gel zu erkennen. Wird DsrEFH mit nicht reduzierendem Puffer inkubiert und aufgeköcht, so lassen sich im Gel noch zusätzliche Proteinbanden beobachten. Die Probe, die mit Iodacetamid versetzt wurde, zeigte nach dem Aufkochen keine zusätzlichen Proteinbanden. Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Proteine DsrE, DsrF und DsrH untereinander nicht über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden sind. Nicht reduzierende und denaturierende Bedingungen (Spur 2: DsrEFH ohne 2-Mercaptoethanol versetzt) haben vermutlich hier eine artifizielle Disulfidbrücke hervorgerufen.

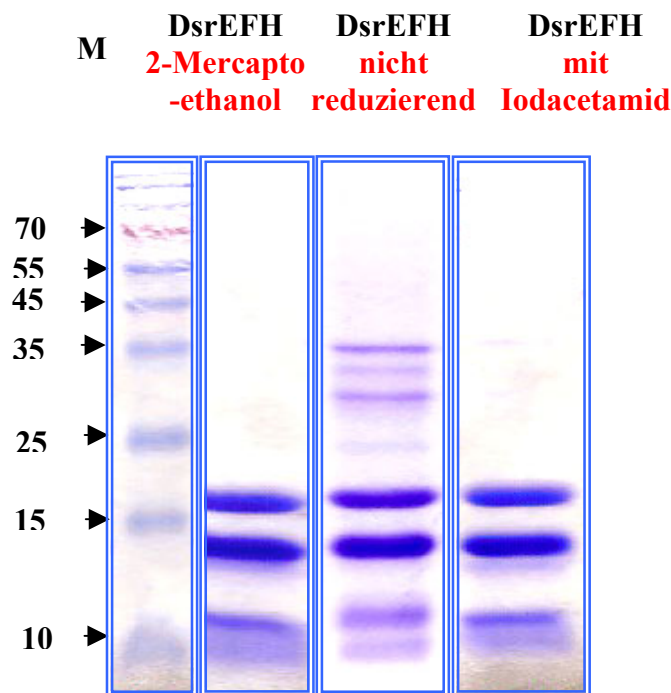


Abb. 3.19: SDS-Proteingel (15 %) zum Nachweis, dass die Proteine DsrE, DsrF und DsrH nicht über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden sind. Die Proben wurden 5 min bei 100°C aufgeköcht. Jeweils 20 µl von den Proben wurden aufgetragen.

Bestätigt wurde die Bildung artifizieller Disulfidbrücken zwischen den drei Polypeptiden, indem die Probe aus Spur 2 anschließend noch geblottet wurde, siehe **Abb. 3.20**.

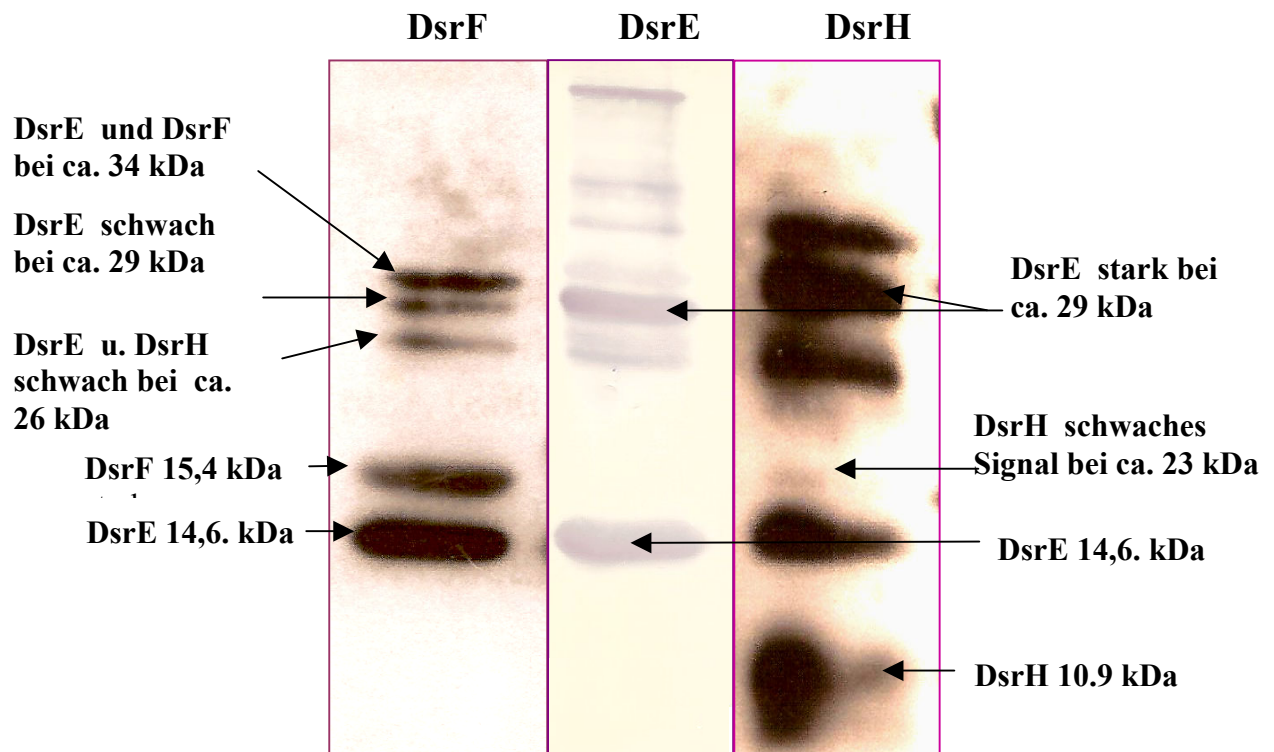


Abb. 3.20: Western-Blot zum Nachweis der artifiziellen Disulfidbrücken. Der DsrF- und DsrH-Antikörper wurden für den Nachweis 1:5000 verdünnt eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des ECL-Western-Blot Detektionssystems (Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg). Für den Nachweis von DsrE wurde das DsrE-Antiserum 1: 2000 verdünnt eingesetzt. Die Detektion von DsrE erfolgte nach der konventionellen Methode (mit 4-Chloro 1-Naphthol).

DsrE zeigte zwei starke Signale (Spur 2). Ein Signal erscheint in der Höhe von 14,6 kDa, das der Größe des DsrE-Polypeptids entspricht. Ein zweites Signal erscheint in der Höhe von ca. 29 kDa. Dieses Signal deutet auf ein artifiziell gebildetes DsrE-Dimer hin. DsrH (Spur 3) zeigt ein Signal in der Höhe von 10,9 kDa, entsprechend der Größe des DsrH-Polypeptids. Weitere Signale lassen sich in Höhe von DsrE bei 14,6 kDa erkennen. Oberhalb von 15 kDa, bei ca. 23 kDa ist ein zweites schwaches Signal zu erkennen. Dieses Signal deutet auf ein artifiziell gebildetes DsrH-Dimer hin. Drei Signale lassen sich oberhalb von 25 kDa beobachten. Diese Signale deuten auf artifiziell gebildete DsrEF-, DsrEE- bzw. DsrEH-Dimere hin, siehe auch in Spur 1. DsrF (Spur 1) zeigt ein Signal in der Höhe von 15,4 kDa, das der Größe des DsrF-Polypeptids entspricht. Weitere Signale sind zu erkennen in Höhe von ca. 34 kDa ein relativ starkes Signal, das auf ein artifiziell gebildetes DsrEF-Dimer hindeutete. Ein schwaches zweites Signal für DsrE liegt in Höhe von ca. 28 kDa und ein starkes Signal für DsrE in Höhe von 14,6 kDa. Ein schwaches Signal ist zudem erkennbar in Höhe von ca. 26 kDa, das auf ein artifiziell gebildetes DsrEH-Dimer hindeutet. Diese zusätzlichen Signale lassen sich in den Western-Blots nicht beobachten, wenn die DsrEFH-Probe unter reduzierenden oder alkylierenden Bedingungen aufgetrennt wurde. Die Disulfidbrücken in den DsrEF-, DsrEH- und DsrEE-Dimeren wurden demnach artifiziell hervorgerufen. Eine weitere

Bestätigung dafür, dass DsrEFH nicht über kovalente Disulfidbrücken verbunden sind, lieferten auch die Ergebnisse der Massenbestimmung von DsrEFH mittels der ESI-MS-Analyse. Die drei Polypeptide wurden bei der ESI-MS-Analyse auseinandergerissen. Es wurde für jedes einzelne Protein die molekulare Masse bestimmt. Würden die drei Proteine DsrE, DsrF und DsrH über Disulfidbrücken untereinander zusammengehalten, so würden die kovalenten Verbindungen während der ESI-Messung nicht auseinandergerissen werden. Wahrscheinlich interagieren DsrE, DsrF und DsrH untereinander über hydrophobe Wechselwirkungen.

3.9 Strukturanalyse von DsrE, DsrF, DsrH

3.9.1 DsrE und seine homologen Proteine

Bei einer ψ -Blast-Suche zeigte sich, dass es zu DsrE viele homologe Proteine in schwefeloxidierenden Bakterien gibt, z.B. *Chlorobium tepidum*, *Thiobacillus denitrificans*, *Magnetococcus* sp. und *Magnetospirillum magnetotacticum*. DsrE-homologe Proteine werden auch bei den *methanogenen* Archaeobakterien, z.B. *Methanothermobacterium thermoautotrophicum* sowie bei einigen Enterobakterien, z.B. *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* etc. gefunden. Ein weiteres DsrE-homologes Protein ist das YchN aus *E. coli* K12, das Ende 2002 zufällig aus dem offenen Leserahmen der Cha-CnarL-Region von *E. coli* isoliert wurde. Das YchN-Protein ist ein Dimer aus Homotrimeren mit einer Masse von 12,5 kDa. Die ψ -Blast-Suche zeigte, dass es zum YchN-Protein sieben homologe Sequenzen gibt, die eine Sequenzidentität von 28-88 % aufweisen. Zu den YchN-Homologen gehören auch das DsrE-homologe Protein YheN aus *E. coli*, sowie das Tm 0981 aus *Thermotoga*. Alle DsrE-homologen Proteine gehören zu einem Cluster orthologer Proteine (COG1553), deren Peptidsequenzen in der Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen (NCBI) niedergelegt sind. Zu einigen DsrE-homologen Proteinen gibt es auch bereits strukturelle Informationen, z.B. YchN aus *E. coli* bzw. zum MTH1491-Protein aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Auf den folgenden vier Seiten wurden Sequenzvergleiche von DsrE, DsrF und DsrH dargestellt und beschrieben. Die Alignments wurden mit Hilfe des ClustalW-Programmes erstellt (<http://align.Genome.jp>; Thompson et al., 1999).

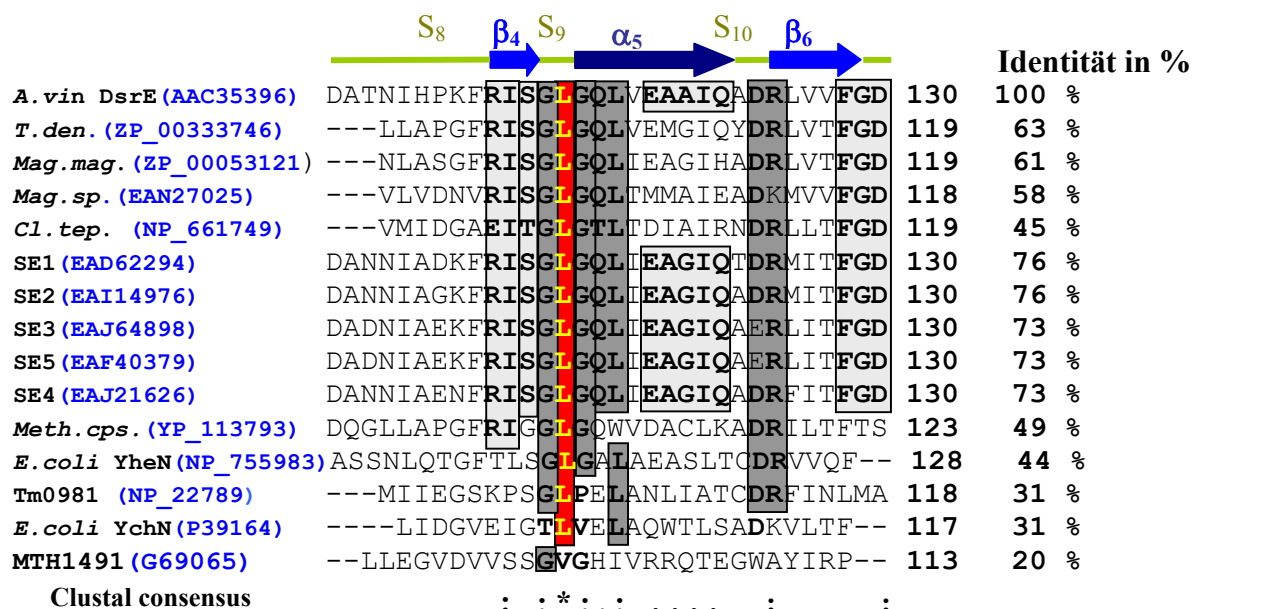
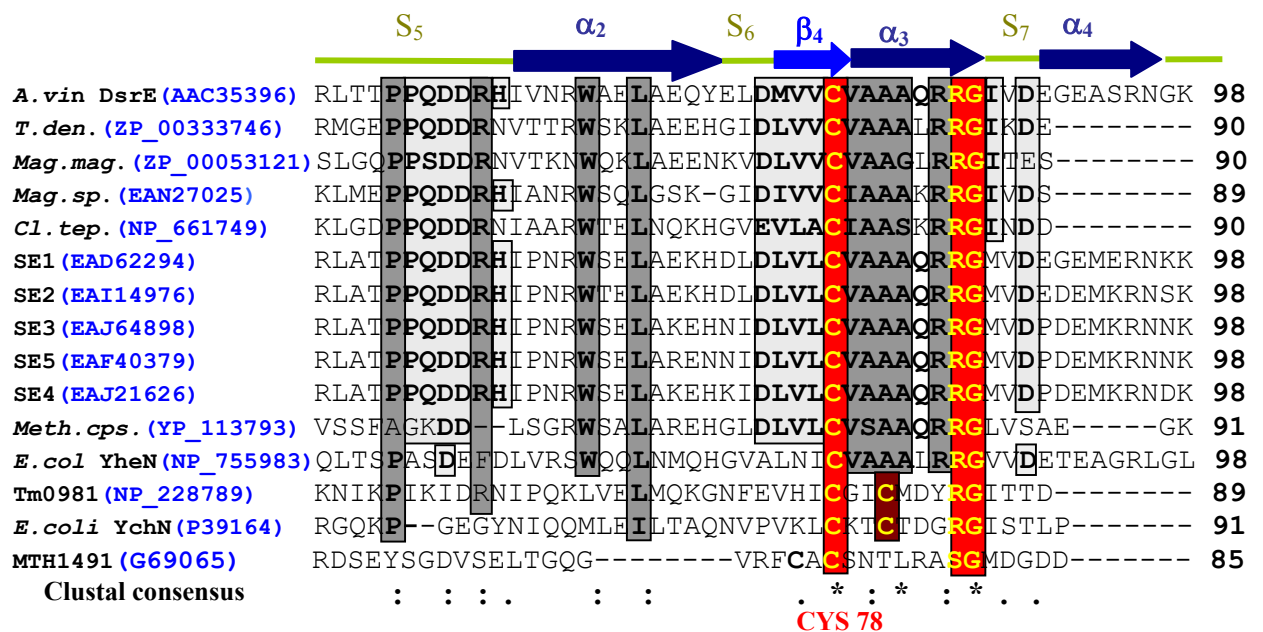
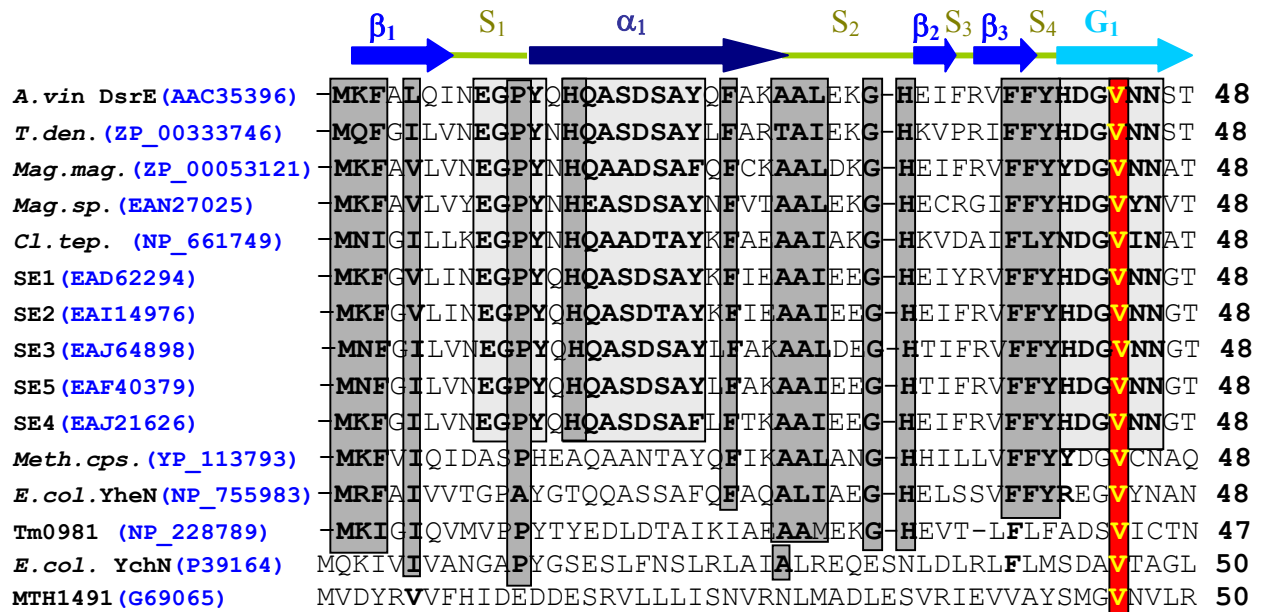


Abb. 3.21: Vergleich der Proteinsequenz DsrE aus *A. vinosum* mit 13 homologen DsrE-Proteinsequenzen, erstellt mit Hilfe von ClustalW (<http://align.Genome.jp>; Matrix: PFAM/Blossum): Zu DsrE aus *Allochrodatum vinosum* gibt es homologe Proteine in *Thiobacillus denitrificans* (*T. den.*), *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (*Mag. mag.*), *Magneto-coccus* sp. (*Mag. sp.*) und *Chlorobium tepidum* TLS (*Cl. tep.*). S1E-S5E sind DsrE-homologe Proteine von bislang nicht charakterisierten Organismen aus dem Sargasso Meer. Weitere DsrE-homologe Proteine werden gefunden in *Methylococcus capsulatus* (*Meth. cps*), *Escherichia coli*. YheN (*E. coli* CFT073, YheN), in *Thermotoga maritima* (Tm0981), in *Escherichia coli*. YchN (*E. coli* YchN) und in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MTH1491). Identische, konservierte Aminosäurereste wurden mit fetter gelber Schrift und rotem Hintergrund hervorgehoben. Ähnliche Aminosäurereste wurden mit fetter schwarzer Schrift und dunkelgrauem Hintergrund und nahezu ähnliche Aminosäurereste, bzw. eine ähnliche Abfolge von Aminosäuren wurden mit schwarzer Schrift und hellgrauem Hintergrund dargestellt. Über der DsrE-Proteinsequenz von *A. vinosum* wurde die Sekundärstruktur von DsrE angegeben. Die Accession-Nummern der einzelnen Proteine wurden in Klammern hinter dem Speziesnamen angegeben. Über der Peptidsequenz wurde die Sekundärstruktur angegeben. **G₁ = 3₁₀ Helix**, **α₁₋₅ = α-Helices**; **β₁₋₆ = β-Faltblätter**; **S₁₋₁₀ = Schleifen**

Bei Betrachtung der verglichenen Sequenzen fällt auf, dass die Sequenzfolge **CVAAAXRRG** (Pos. 78-86) bei einer größeren Zahl der alignierten Sequenzen insgesamt gut konserviert ist. Die Sequenz **EGPYXHQHXSAY** (Pos. 9-21) ist offensichtlich charakteristisch für Proteine aus den Schwefeloxidierern. Weiterhin scheint die Sequenzfolge **PPQDDR** (Pos. 53-58) und die Sequenzfolge **HDGVNNXT** (Pos. 41-48) ebenfalls bei Schwefeloxidierern gut konserviert vorzuliegen. Die Sequenzfolge **FFY** (Pos. 38-40) ist recht gut konserviert bei nahezu allen verglichenen Organismen. Charakteristisch für die Schwefeloxidierer sind weiterhin folgende Sequenzfolgen: **RISXXGQL** (Pos. 108-116) und am Sequenzende das **FGD** (Pos. 128-130). Identisch bei allen verglichenen Proteinsequenzen sind die Aminosäurereste **Valin 44**, **Cystein 78**, **Arginin 85** und **Glycin 86** und die Aminosäure **Leucin 112**.

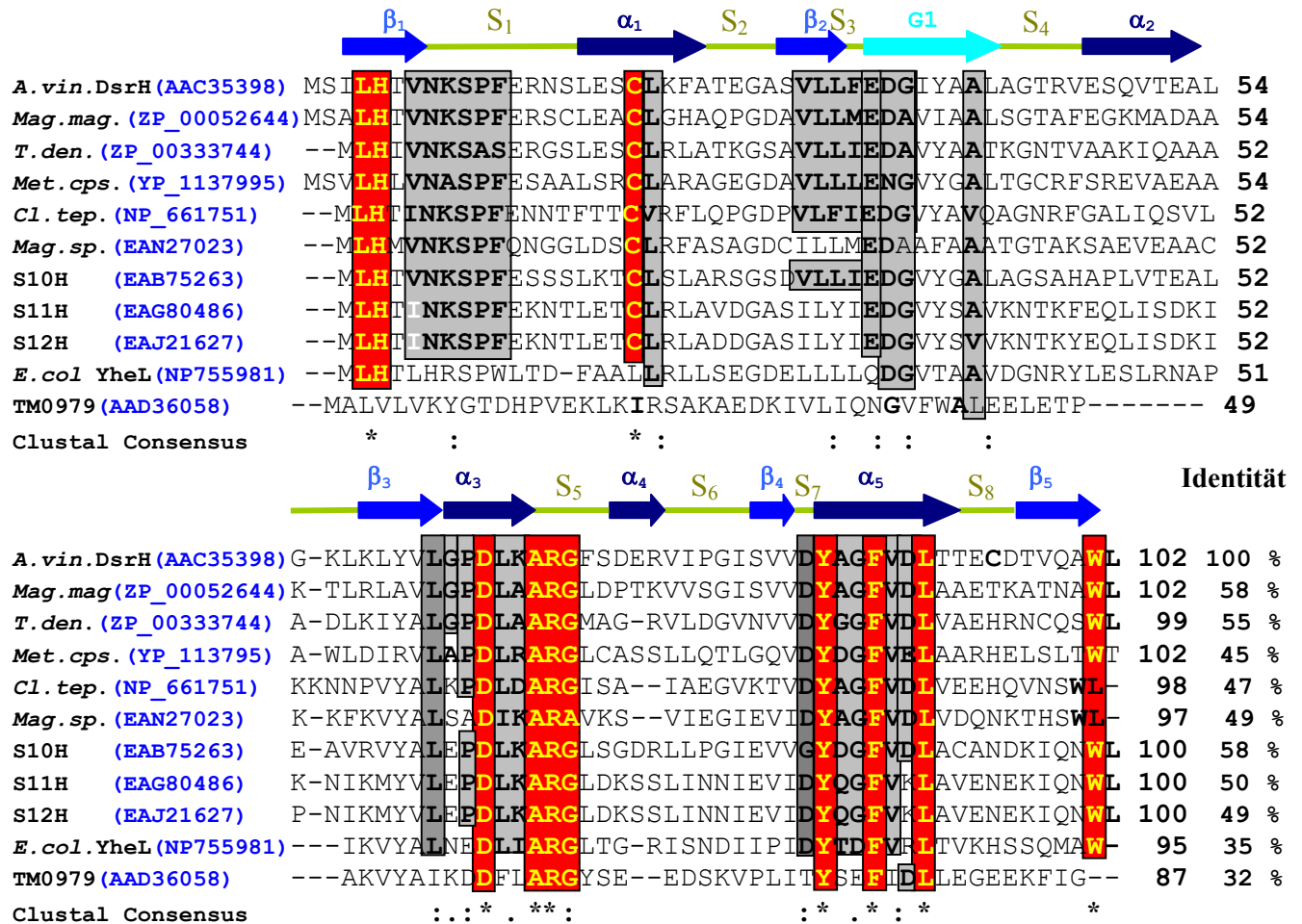
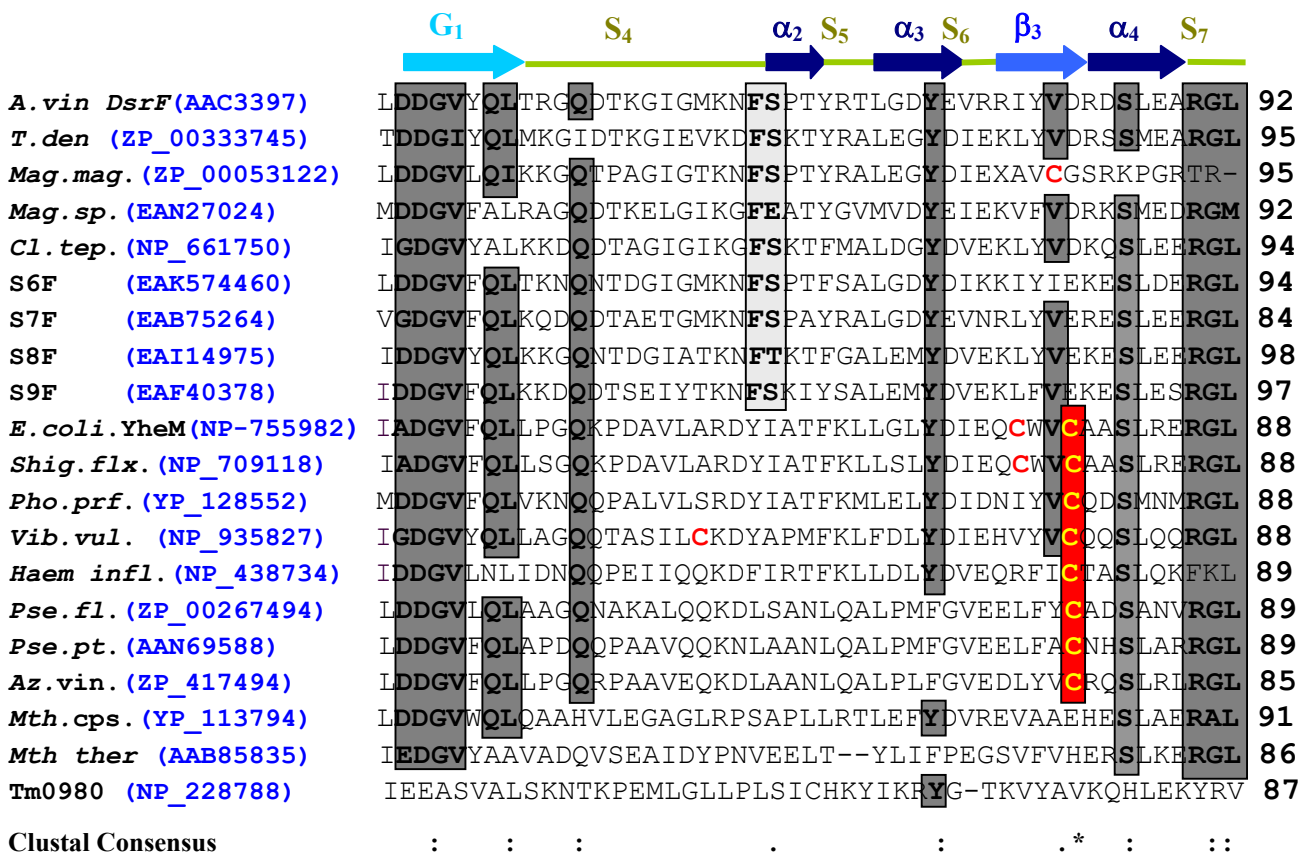
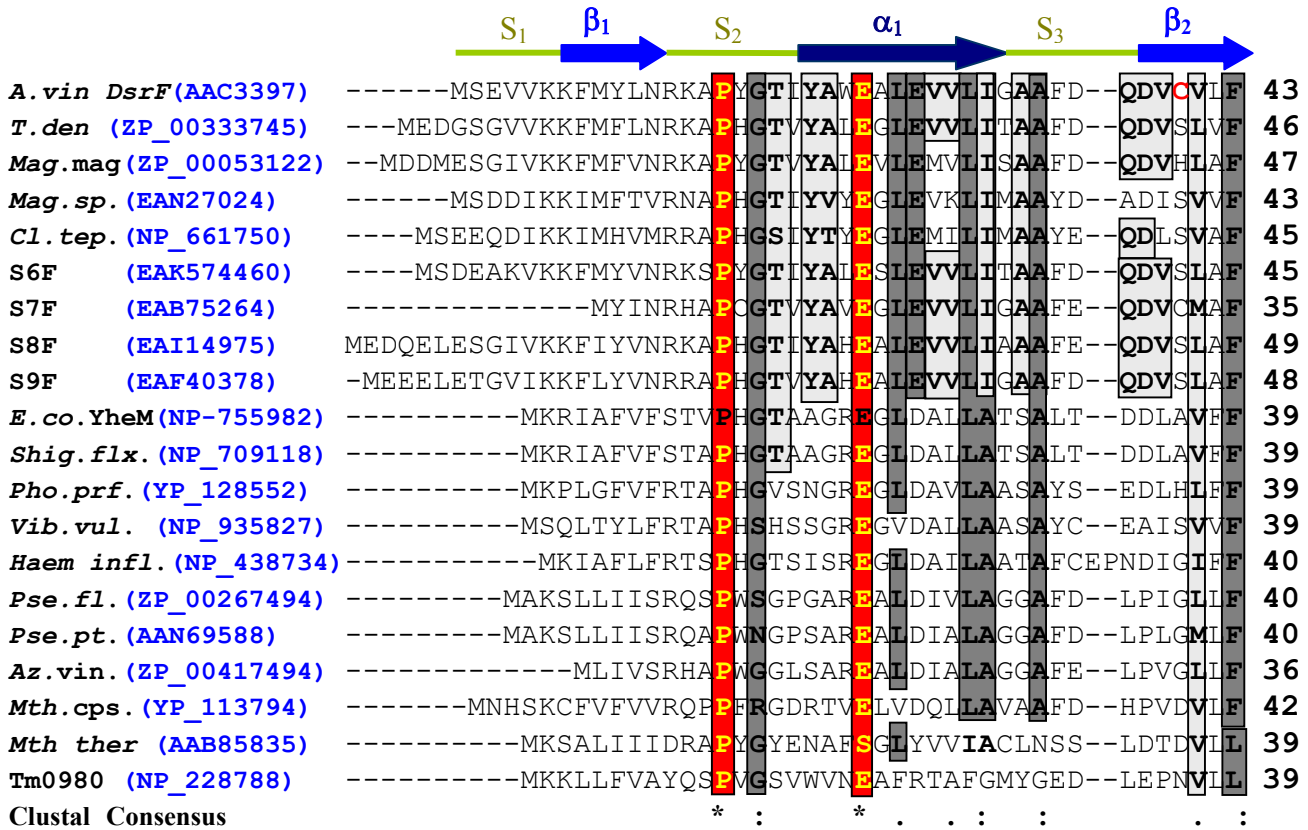


Abb. 3.22: Sequenzalignment der Proteinsequenz DsrH von *A. vinosum* und dessen homologen Proteinen, erstellt mit Hilfe von ClustalW (<http://align.Genome.jp>; Matrix: PFAM/Blossum). DsrH-homologe Proteine gibt es in *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (*Mag. mag.*), *Thiobacillus denitrificans* (*Thi. den.*), *Chlorobium tepidum* TLS (*Cl. tep.*), *Magnetococcus* sp. (*Mag. sp.*), *Methylococcus capsulatus* (*Met. cps.*); S10H-S12H, sind hypothetische DsrH-Proteine von bislang nicht charakterisierten Organismen aus dem Sargasso Meer. Ein DsrH-homologes Protein ist auch das YheL-Protein aus *Escherichia coli*. und das YchN-Protein aus *Thermotoga maritima* (Tm0979). Identische Aminosäuren wurden in fetter gelber Schrift mit rotem Hintergrund, ähnliche Aminosäuren in fetter schwarzer Schrift und dunkelgrauem Hintergrund und eine nahezu ähnliche Aminosäureabfolge wurde in fetter schwarzer Schrift mit hellgrauem Hintergrund dargestellt. Die Accession-Nummern der einzelnen Proteine wurden in Klammern hinter dem Speziesnamen angegeben. Über der Peptidsequenz wurde die Sekundärstruktur angegeben. $G1 = 3_{10}$ Helix, α_{1-5} = α -Helices; β_{1-5} = β -Faltblätter; S_{1-8} = Schleifen.

Leucin (4) und Histidin (5) kommen bei allen verglichenen Peptidsequenzen vor, bis auf *T. maritima*, das an dieser Stelle ein Alanin und Leucin aufweist. Offensichtlich handelt es sich um hoch konservierte Aminosäurereste. DsrH besitzt zwei Cysteinreste (Cys20) und (Cys 95). Cystein 20, das bei allen hier verglichenen Organismen vorkommt ist, im Gegensatz zu Cys 95 ein hoch konservierter Aminosäurerest. Weitere hoch konservierte Aminosäurereste innerhalb der DsrH-Peptidsequenz sind die Asparaginsäure (Asp 65), Alanin (Ala 68), Arginin (Arg 69), Glycin (Gly 70), Tyrosin (Tyr 85),

Phenylalanin (Phe 88), Leucin (Leu 91) und Tryptophan (Trp 101). Die Aminosäuresequenzfolge VNKSPF (7-12) und VLLFEDG (30-36) ist nur charakteristisch für die schwefeloxidierenden Organismen. YheL aus *E. coli* und Tm0979 aus *T. maritima* besitzen diese Aminosäuresequenzfolge nicht.



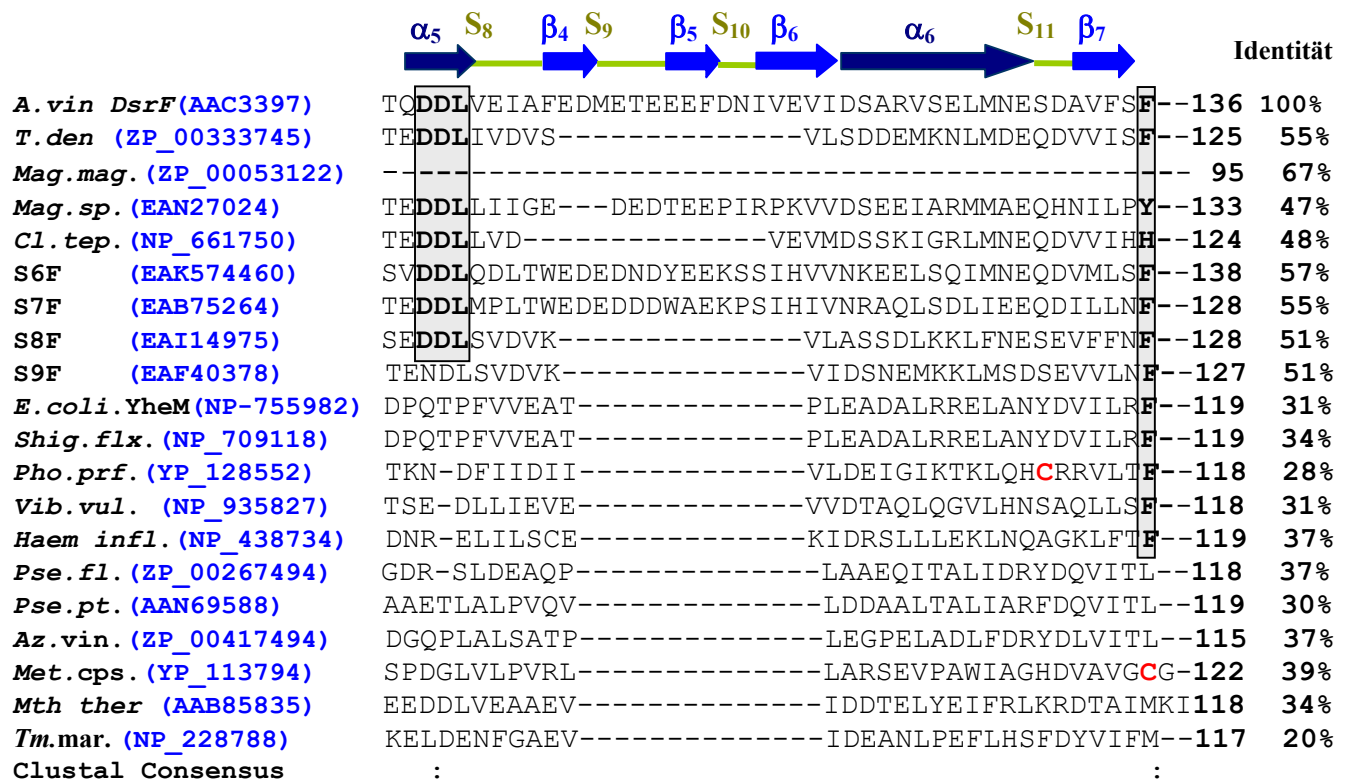


Abb. 3.23: Sequenzalignment der Proteinsequenz DsrF von *A. vinosum* und dessen homologen Proteinen, erstellt mit Hilfe von ClustalW (<http://align.Genome.jp>; Matrix: PFAM/Blossum). DsrF-homologe Proteine gibt es in *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (*Mag. mag.*), *Thiobacillus denitrificans* (*T. den.*), *Chlorobium tepidum* TLS (*Cl. tep.*), *Magnetococcus* sp. (*Mag. sp.*), *Methylococcus capsulatus* (*Met. cps.*); S6F-S9F sind hypothetische DsrF-Proteine aus bislang nicht charakterisierten Organismen aus dem Sargasso Meer. Weitere DsrF-homologe Proteine werden gefunden bei *E. coli* YheM, *Shigella flexneri* (*Shig. flx.*), *Photobacterium profundum* (*Pho. prf.*), bei *Vibrio vulnificus* YJO16 (*Vib. vul.*), *Haemophilus influenzae* (*Haem. infl.*), *Pseudomonas fluorescens* (*Pse. fl.*) *Pseudomonas putida* (*Pse. pt.*), *Azotobacter vinelandii* (*Az. vin.*), MTH1358 *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (*Mth. ther.*). Ein weiteres DsrF-homologes Protein ist das Tm0980-Protein aus *Thermotoga maritima* (*Tm. mar.*). Hoch konservierte Reste wurden in gelber Schrift mit rotem Hintergrund, ähnliche Aminosäurereste wurden fett mit grauem Hintergrund und Aminosäurereste, die hauptsächlich bei den schwefeloxidierenden Bakterien gefunden werden, wurden fett mit hellgrauem Hintergrund hervorgehoben. Die Accession-Nummern der einzelnen Proteine wurden in Klammern hinter dem Speziesnamen angegeben. Über der Peptidsequenz wurde die Sekundärstruktur angegeben. $G_1 = 3_{10}$ Helix, $\alpha_{1-6} = \alpha$ -Helices; $\beta_{1-7} = \beta$ -Faltblätter; $S_{1-11} =$ Schleifen.

Die Sequenzabfolge **FXDDGVXQL** (Position 43-51) ist insgesamt gut konserviert in der DsrF-Peptidsequenz. Die Aminosäurefolge **DGV** (Position 47-49) in DsrF ist ebenfalls konserviert in DsrE (Pos 42-44). Das Valin 44 in dieser Sequenzfolge ist in DsrE ein hoch konservierter Aminosäurerest. Die Aminosäuresequenzfolgen **AAFDQ** (Pos. 32-36), **QDV** (Pos. 37-39), **FS** (Pos. 6-66) und **DDL** (Pos 95-97) sind typisch für Proteine aus den schwefeloxidierenden Bakterien. Besonders hoch konserviert scheinen bei allen verglichenen Organismen die Aminosäuren Glutaminsäure (E 30) und Prolin (P20) zu sein. Weitere konservierte Aminosäuren sind Serin 86 und Leucin 92 und Arginin 90 und Glycin 91. Die Proteinsequenz eines hypothetischen DsrF-Protein aus *Thermotoga maritima* zeigt

die geringsten Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenzfolge. Der Cysteinrest an der Pos. 40 ist kein konservierter Cysteinrest. Es gibt einen konservierten Cysteinrest in DsrF, das Cys 79, das jedoch nur bei *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio vulnificus* und *Azotobacter vinelandii* konserviert vorliegt. Ein äquivalentes Cystein an dieser Position wird bei den Schwefeloxidierern nicht gefunden. Auffällig ist die Aminosäuresequenz um das konservierte Cystein **VCAAXXXXRG**. Eine ähnliche Anordnung diese Aminosäuren wird um den hoch konservierten Cysteinrest in der DsrE-Peptidsequenz wiedergefunden.

3.9.2 Strukturanalyse von DsrE, DsrF und DsrH aus *A. vinosum*

Um die dreidimensionale Struktur der Proteine DsrE, DsrF und DsrH aus *A. vinosum* zu analysieren, die möglicherweise für die Aufklärung der Funktion dienlich sein könnte, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe unter Herrn Prof. Kim Sung Hou, am chemischen Institut der Universität in Berkeley (Kalifornien), eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Für die Analyse des nativen DsrEFH-Proteins wurde zunächst eine Überproduktion von rekombinanten DsrEFH in 2 l *E. coli* BL21(DE3) Zellkultur durchgeführt und das Protein wurde wie unter 3.4 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde die DsrEFH-haltige Proteinprobe mittels der Ultrafiltration durch Ultrafiltrationseinheiten (Centriplus YM-10) auf ca. 34 mg/ml konzentriert. Die Konzentrierung der Proteinprobe war wichtig für die nachfolgende Strukturanalyse durch Röntgenkristallographie. Mit der Konzentrierung der Proteinprobe sollte auch festgestellt werden, ob das Protein möglicherweise ausfällt, was sich in einer Trübung der Proteinlösung zeigen würde. Die Proteinlösung blieb klar, d.h. die DsrEFH-Proteinprobe war nicht ausgefallen. Die **Abb. 3.24** zeigt das Ergebnis der SDS-Page nach der Konzentrierung von DsrEFH durch Ultrafiltration, was sowohl der Kontrolle der Homogenität als auch der Sauberkeit der aufgereinigten Proteinproben diene, einem wichtigen Kriterium für die Kristallisation. Ein weiteres Kriterium war die Überprüfung der Stabilität der Probe gegenüber Temperaturveränderungen, s.o. Die Masse der aufgereinigten und hoch konzentrierten DsrEFH-Probe wurde anschließend noch durch die ESI-MS-Analyse überprüft.

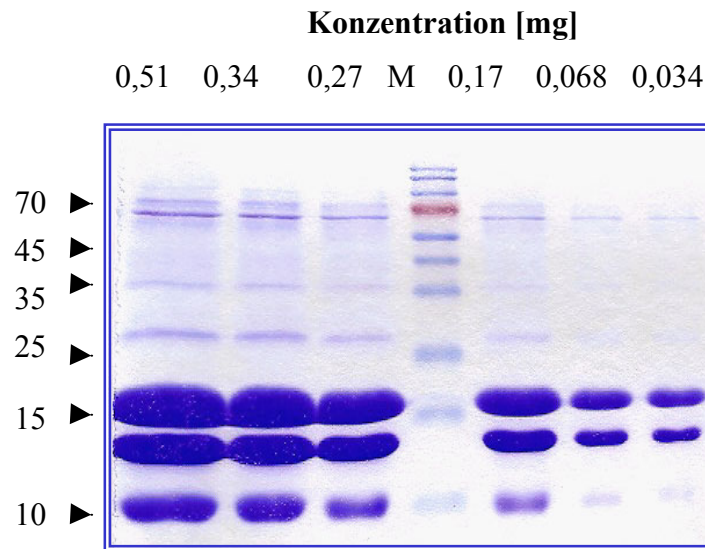


Abb. 3.24: SDS-Proteingel (15 %) des konzentrierten rekombinanten DsrEFH-Proteins.

Die Konzentrationen der aufgetragenen Proben wurden über dem Bild (in mg) aufgeführt.

3.9.3 Expression vom rekombinanten DsrEFH mit Selenomethionin (Konstruktion von SeMetEFH) für die SAD-Methode

Die in dieser Arbeit ermittelten Strukturen wurden mit Hilfe der Single Anomalous Dispersion (SAD-Methode) und des Molecular Replacement (MR = Molekularer Ersatz) gelöst. (Beschreibung beider Methoden s. Material & Methode 2.14.3 u. 2.14.4). Für eine bessere Ermittlung der Kristallstruktur wurde eine Überproduktion des rekombinanten DsrEFH-Proteins mit Selenomethionin durchgeführt (Material & Methode, s. 2.7.2). Die Überexpression des rekombinanten DsrEFH mit Selenomethionin war erfolgreich. Die Aufreinigung des rekombinanten SeMetEFH erfolgte nach demselben Schema wie für das native rekombinante DsrEFH. Für eine bessere Ausbeute der Aufreinigung von SeMetEFH wurde dem Puffer noch zusätzlich 2 mM TCEP (reduzierendes Agens) zugefügt. Nach Konzentrierung der Probe durch Ultrafiltration (Centriplus YM-10) auf 90 mg/ml und Umpufferung in 0,1 M ADA-Puffer pH 6,8 wurde die Masse des aufgereinigten SeMetEFH-Proteins durch eine ESI-MS überprüft. Die **Abb. 3.25** zeigt das Ergebnis der ESI-MS von SeMetEFH. Die nachfolgende **Tab. 3.2** zeigt eine Übersicht zum Massenvergleich von SeMetEFH.

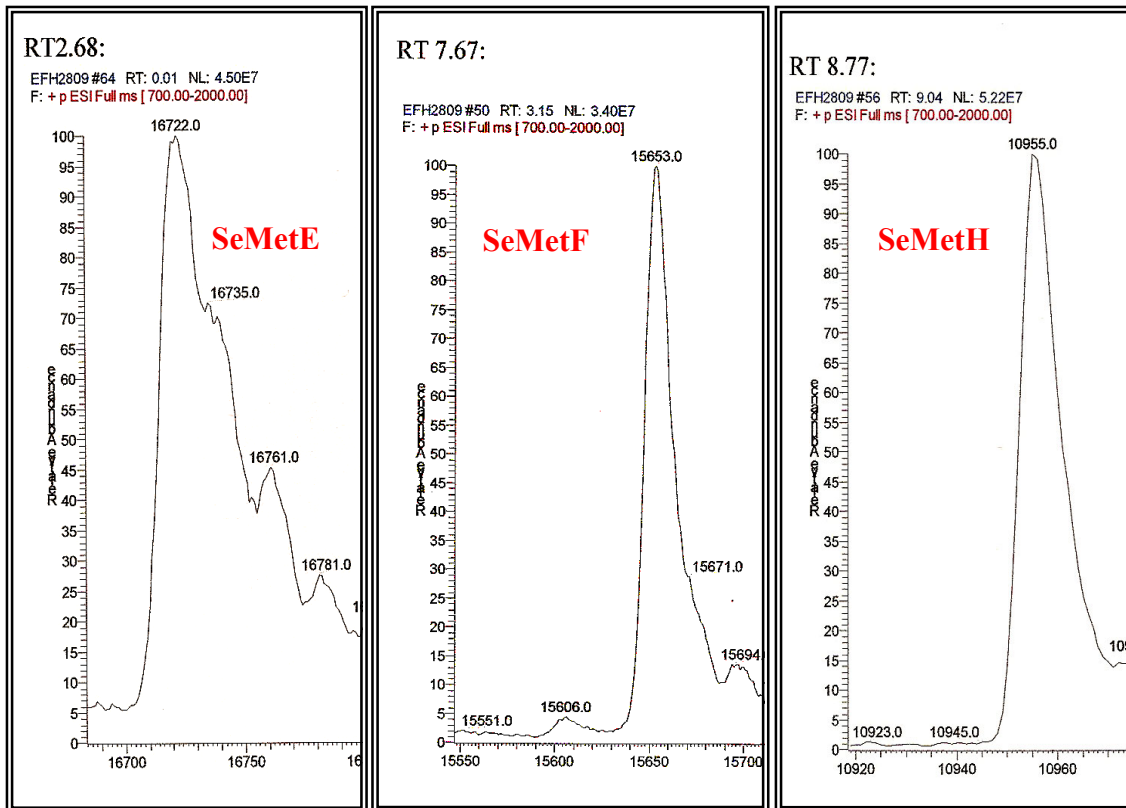


Abb. 3.25: ESI-MS-Spektren von SeMetEFH, aufgereinigt aus *E. coli* B834 (DE3) für die Bestimmung der Kristallstruktur

Tab. 3.2: Übersicht zum Massenvergleich von SeMetEFH

Protein [Anzahl SeMet]	<i>Escherichia coli</i> Masse in kDa	
	errechnet	gemessen
DsrE [3]	16,761	16,722 +2 SeMet
DsrF [4]	15,650	15,653 +4 SeMet
DsrH [0]	10,954	10,955 -SeMet

Wie aus der Tab. 3.2 und der Abb. 3.25. aus den Spektren des SeMetEFH-Proteins zu entnehmen ist, wurde das Selenomethionin in die Proteinsequenz von DsrF komplett eingebaut. DsrE wurde mit zwei Selenomethionin beladen. In DsrH wurde, wie erwartet, kein Selenomethionin eingebaut. Nach Bestätigung des korrekten Einbaus von Selenomethionin in das rekombinante EFH-Protein erfolgte die Kristallstrukturbestimmung von SeMetEFH .

3.9.4 Die Kristallstruktur des nativen rekombinanten DsrEFH und des SeMetEFH

Die Bestimmung der Kristallstrukturen des nativen und des SeMetEFH-Proteins waren erfolgreich. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigte, dass DsrEFH tatsächlich ein Proteinheterohexamer darstellt. Die **Tab. 3.3** und **Tab. 3.4** geben eine Übersicht über die wichtigsten Daten zur Kristallstrukturbestimmung von SeMetEFH. Danach folgen erste Abbildungen zur Struktur des DsrEFH-Trimers, sowie auch eine Abbildung zur hexameren Struktur von DsrEFH. In **Abb. 3.26** wird das DsrEFH-Trimer einmal in Form eines Bänderdiagrammes und als Kalottenmodell dargestellt. Der hoch konservierte Cysteinrest Cys 78 des DsrE-Proteins wurde in beiden Abbildungen in Form von van-der-Waals-Radien dargestellt. In beiden Modellen wurden außerdem der Cysteinrest des DsrF-Peptids und ein Methioninrest des DsrF dargestellt. Beide Reste sind nicht konservierte Aminosäuren. In der **Abb. 3.27** darunter wurde das elektrostatische Oberflächenpotential des DsrEFH-Hexamers dargestellt. Auffallend ist insbesondere der positive geladene Bereich um den konservierten Cysteinrest des DsrE-Proteins. Oberhalb des Cys 78 befindet sich ein Tunnel, der in das Protein hineinläuft und von Aminosäuren begrenzt wird, die von DsrH kommen. Im Diskussionsteil wird noch einmal auf die mögliche Bedeutung des Tunnels eingegangen, zudem werden in diesem Teil der Arbeit auch noch andere Strukturbesonderheiten des DsrEFH-Hexamers diskutiert.

Tab. 3.3: Statistik der Peak-Wellenlängen SAD-Datensatz

Daten	DsrEFH SeMet (P21)	DsrEFH SeMet (C2)
Wellenlänge Å	0.97956	0.9795
Auflösung Å	99.0-2.50	50.0-1.70
Redundanz	6.2 (4.0) ^a	1.2 (0.1) ^b
Einheitliche Reflektion	72952 (2988)	64650 (340)
Vollständigkeit %	97.8 (81.1)	87.1 (9.2)
I/σ	13.7 (1.7)	10.7 (1.7)
R _{sym} ^c (%)	12.1 (65.3)	5.8 (16.2)

a. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösung, die zwischen 2.54-2.50 Å für den vollständigen Peak-Wellenlängen Datensatz liegt.

b. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösung, die zwischen 2.03-2.00 Å für den vollständigen Peak-Wellenlängen Datensatz liegt. $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},i} - \langle I \rangle_{\text{hkl}}|}{\sum |I_{\text{hkl}}|}$

Tab. 3.4: Kristall-Parameter und Auflösungs-Statistiken

Daten	DsrEFH SeMet	DsrEFH SeMet
Raumgruppe	P21	C2
Zelldimensionen (Å ³)	56.6 x 183.1x107.8 β=99.57	98.7 x 68.0 x 62.0 β=122.9
Volumenanteil des Lösungsmittels	42.6 %	39.7 %
V _m (Å ³ /Dalton)	2.23	2.12
Gesamtanzahl der Reste	2178	363
Gesamtzahl der nicht H-Atome	17614	3215
Zahl der Wassermoleküle	418	342
Durchschnittstemperaturfaktoren		
Protein	36.6 Å ²	15.8 Å ²
Lösung	29.4 Å ²	30.2 Å ²
Auflösungsbereich der verwendeten Reflektionen	20.0-2.5 Å	20-1,7 Å
Amplitudenbegrenzung	0.0 σ	0.0 σ
R-Faktor	20.5 %	18.2 %
Freier R-Faktor	26.2 %	21.2 %
Stereochemische Idealität		
Bindung	0,007 Å	0,006 Å
Winkel	1,302°	1,207°
Improper diedral	0,776°	0,667°
dihedral	23,70°	24,05°

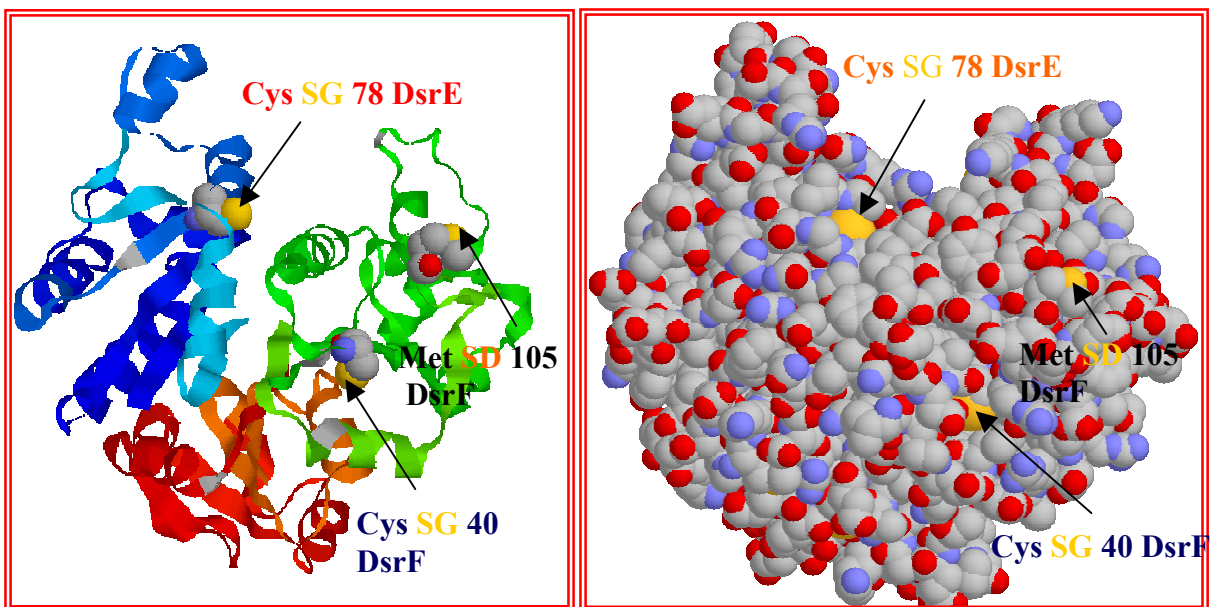


Abb. 3.26: Struktur vom DsrEFH-Trimer: A. Bänderdiagramm; B. Kalottenmodell; Die Aminosäurereste wurden dargestellt als van-der-Waals-Radien mit **Cys 78 des DsrE** (hoch konserviert) und **Cys 40 des DsrF** (nicht konserviert).

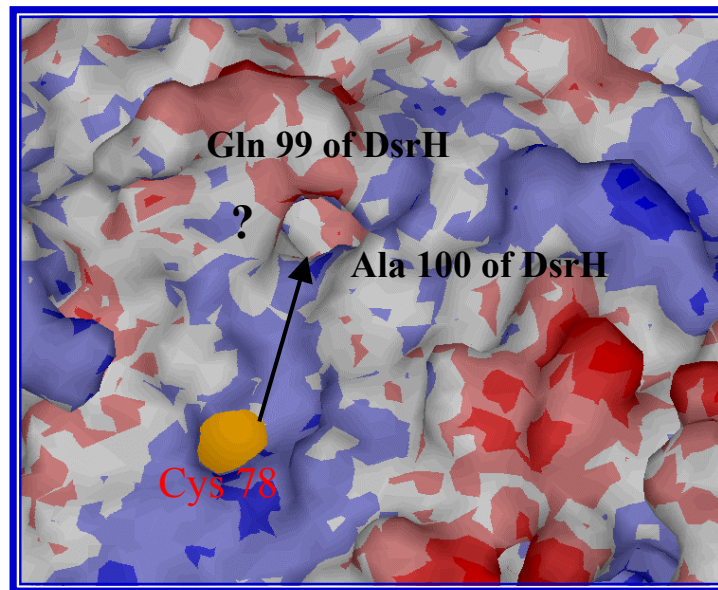


Abb. 3.27: Elektrostatisches Oberflächenpotential des DsrEFH-Hexamers erstellt mit Hilfe des Protein-Explorers von Chime (Martz, 2002): rot = negative, blau = positive, weiß = neutrale Ladungen;

In **Abb. 3.27** liegt der Schwefel (dargestellt als Kalotte) des Cys 78 in einer kleinen Vertiefung nahe an der Proteinoberfläche. Oberhalb des Cys 78 führt ein Tunnel in das Protein. Die Aminosäurereste Glutamin 99 und Alanin 100 sind Aminosäuren aus dem C-Terminus von DsrH. Sie begrenzen die Öffnung des Tunnels von oben und unten.

3.10 Aktivitätsuntersuchungen

3.10.1 Üben die Proteine DsrE, DsrF und DsrH Rhodaneseaktivität aus?

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter anderem auch die Funktion der Proteine DsrEFH bestimmt werden. Erste Hinweise, dass das DsrF-Protein möglicherweise Rhodaneseaktivität ausüben könnte, stammten aus einer früheren Doktorarbeit (Schwarz, 2001).

Um die aufgestellte These zu überprüfen, wurden im Laufe der Aufreinigung der Proteine DsrE, DsrF und DsrH aus *Allochrochromatium vinosum* alle entsprechenden Proteinfractionen auf Rhodaneseaktivität getestet. Für die Isolierung des aktiven Enzyms wurde eine andere Aufreinigungsmethode als die ursprüngliche angewendet. Es zeigte sich, dass die Ammoniumsulfatfällung, als eine der ersten Aufreinigungsschritte der DsrEFH-Proteine aus *Allochrochromatium vinosum*, die Bestimmung von Rhodaneseaktivität beeinträchtigte. Es wurde ein Aktivitätsverlust von mehr als 50 % mit steigender Inkubationsdauer beobachtet. Daher konnte die hydrophobe Interaktionschromatographie nicht als erster Reinigungsschritt für DsrEFH eingesetzt werden.

3.10.2 Chromatographische Aufreinigung von DsrEFH durch DEAE-Sephacel

Als Alternative zur hydrophoben Interaktionschromatographie wurde in Anlehnung an Reinigungen von Dsr-Proteinen aus *A. vinosum* durch S. Schwarz (Dissertation, 2001) eine Aufreinigung über die DEAE-Sephacel-Säule (schwacher Anionenaustauscher) durchgeführt. Das in einer geeigneten Menge 50 mM Tris/HCl pH 7,8 resuspendierte Zellmaterial vom *A. vinosum* Wildtyp wurde mittels Ultraschall (Beschallungszeit: 1min/ml Zellsuspension) aufgeschlossen. Nach zwei Zentrifugationen wurde die lösliche Proteinfraction auf eine zuvor mit 50 mM Tris/HCl pH 7,8 äquilibrierte DEAE-Säule aufgetragen. Zuerst erfolgte ein Waschschriff mit 150 mM NaCl, im Anschluss erfolgte die Elution der gebundenen Proteine in einem aufsteigenden Salzgradienten von 150-500 mM NaCl über ein Säulenvolumen von 300 ml. Die weitere Aufreinigung der DsrEFH-haltigen Proben erfolgte nach dem gleichen Schema wie schon zuvor beschrieben wurde (s. Punkt 3.1.2). Die **Abb. 3.28** zeigt das Chromatogramm der Aufreinigung von DsrEFH über die DEAE-Sephacel-Säule, die **Abb. 3.29** zeigt eine Graphik zur Verteilung der Rhodaneseaktivität in einzelnen Proteinproben im Verlauf der Anionenaustauschchromatographie.

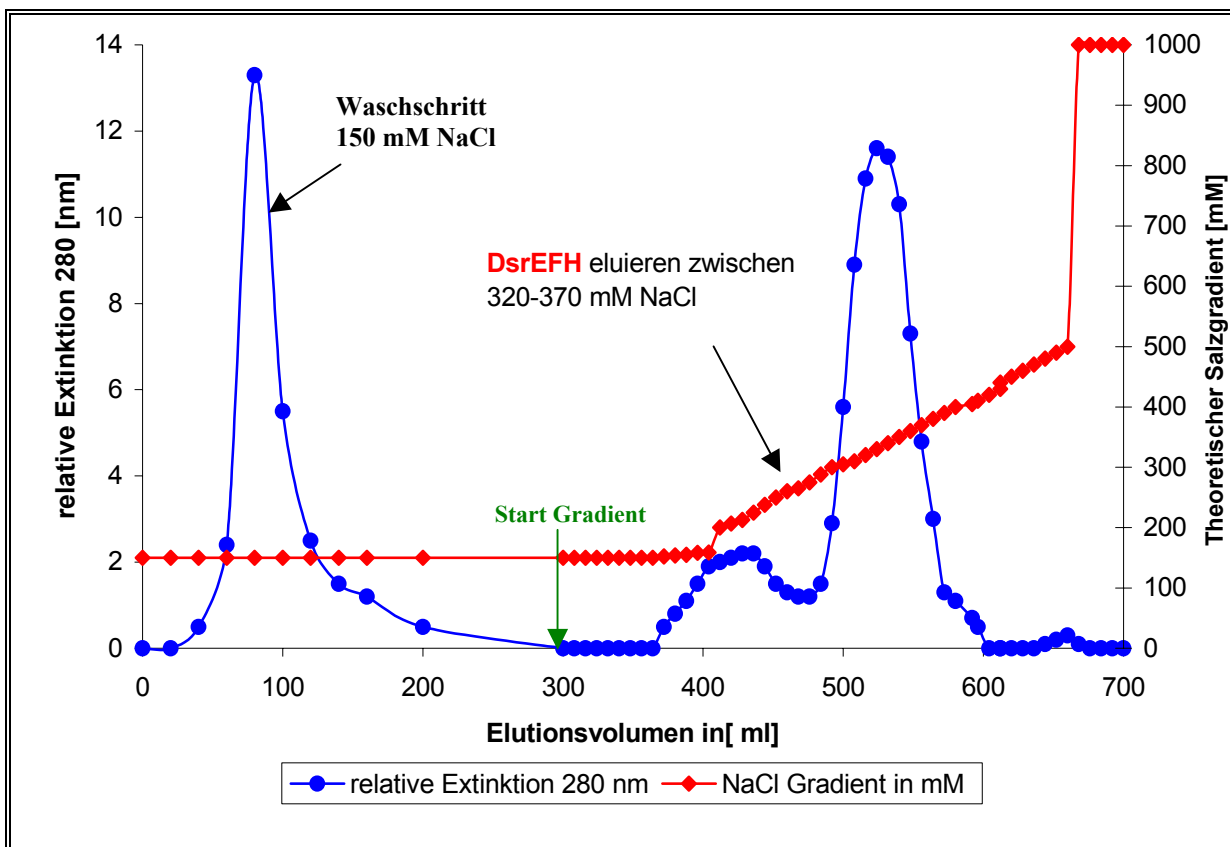


Abb. 3.28: Chromatogramm zur Aufreinigung von DsrE, DsrF und DsrH über die DEAE-Sephacel-Säule; Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,8 1 M NaCl, Flussrate:2 ml/min Fraktionsvolumen: 4 ml/min. DsrE, DsrF und DsrH eluieren zwischen 320-370 mM NaCl von der Säule.

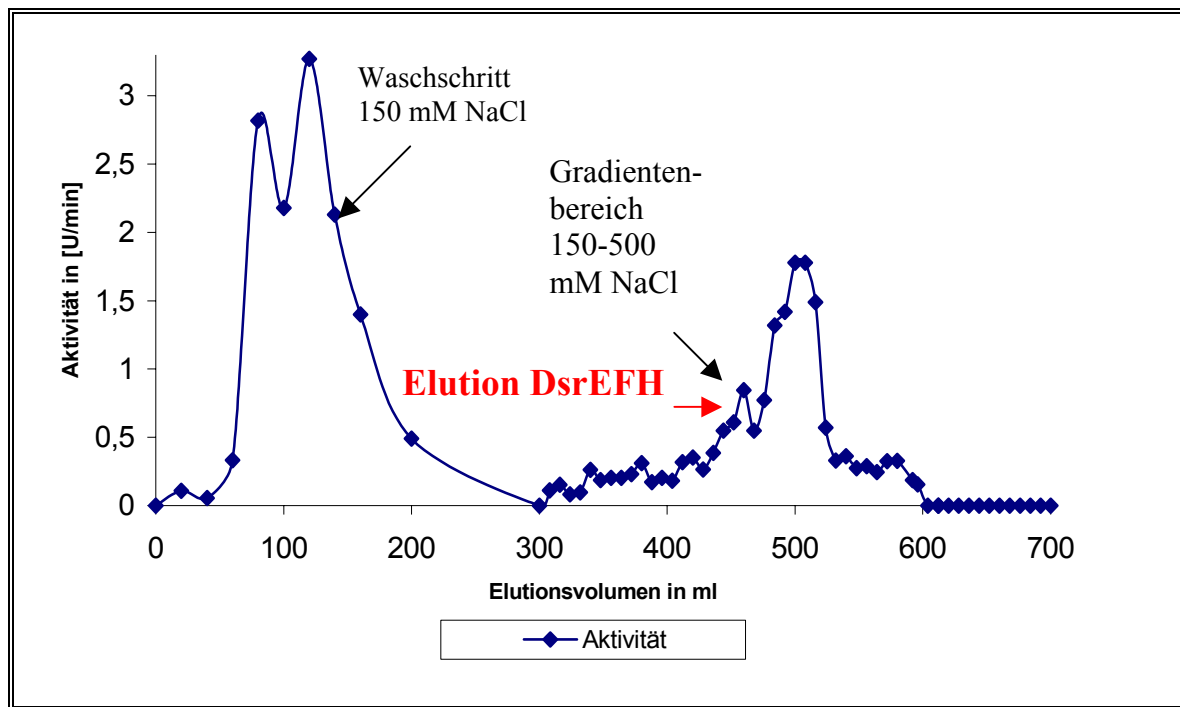


Abb. 3.29: Verteilung der Rhodaneseaktivität einzelner Proteinproben im Laufe der Aufreinigung von DsrE, DsrF und DsrH über die DEAE-Sephacel-Säule.

In **Abb. 3.29** ist zu erkennen, dass die Aktivität sich auf zwei Peaks verteilte, wobei der erste Peak für die Rhodaneseaktivität von den Proben aus dem Waschschr. scheinbar höher ist als der Aktivitätspeak für die einzelnen Proteinproben aus dem Gradientenbereich. DsrEFH eluierten in dem aufsteigenden Aktivitätspeak, d.h. im Bereich von 400-500 ml. In den Proben aus dem Waschschr. wurde kein DsrEFH detektiert, siehe **Abb. 3.30**. Da mit der ersten Aufreinigung noch keine eindeutige Aussage gemacht werden konnte, ob DsrEFH tatsächlich diese Funktion ausüben könnte, folgten weitere chromatographische Aufreinigungen (Mono-Q und Gelfiltration), sowie die dazu entsprechenden Aktivitätsbestimmungen. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung sind in **Abb. 3.31** dargestellt.

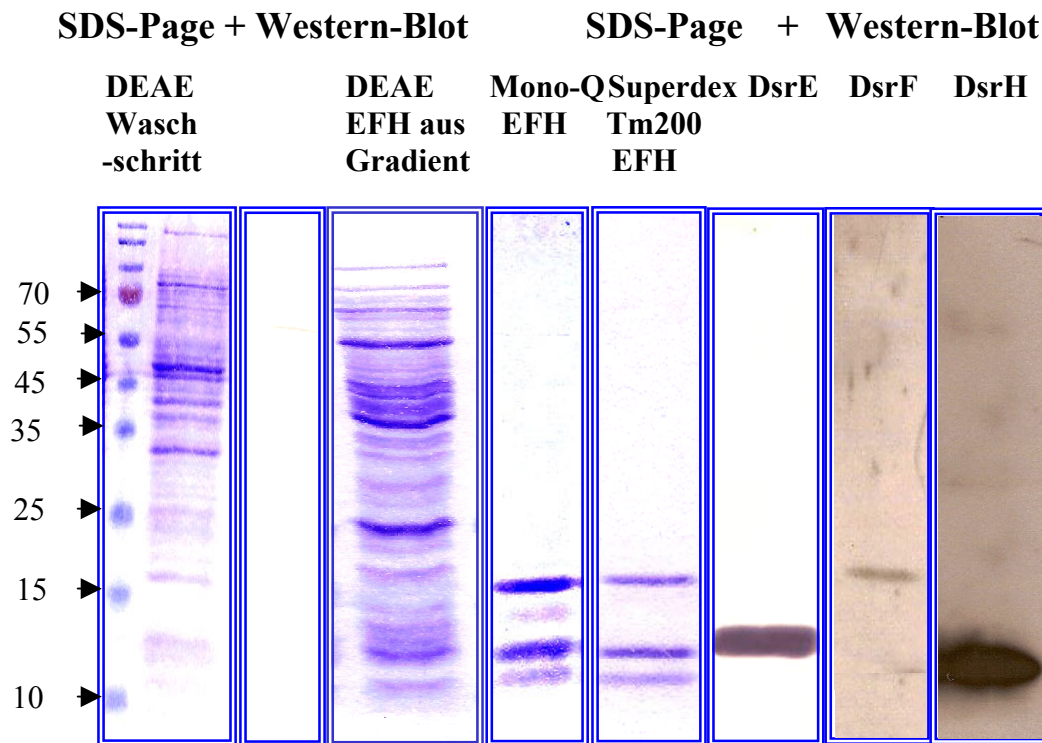


Abb. 3.30: SDS- Proteingele (12,5 %), Western-Blot zum Nachweis von DsrEFH nach Aufreinigung über die DEAE-Sephacel-, die Mono-Q-Säule und die Superdex^{TM200}. Der Nachweis von DsrF und DsrH erfolgte mittels des ECL-Systems. Für die Immundetektion wurden die DsrF- und DsrH-Antikörper 1:5000 verdünnt eingesetzt. Der Nachweis von DsrE erfolgte nach der herkömmlichen Methode (mit 4-Chloro1-Naphthol).

In der zweiten Spur ist eine Probe aus dem Waschschritt aufgetragen worden. Die Western-Blot-Analyse zum Nachweis von DsrE, hier Spur 3, bestätigte, dass in dieser Probe kein DsrEFH enthalten ist. Das Proteinhexamer DsrEFH konnte trotz leichter Modifikation des Aufreinigungsprozesses erneut homogen aufgereinigt werden, siehe Spur 5 (Superdex^{TM200}).

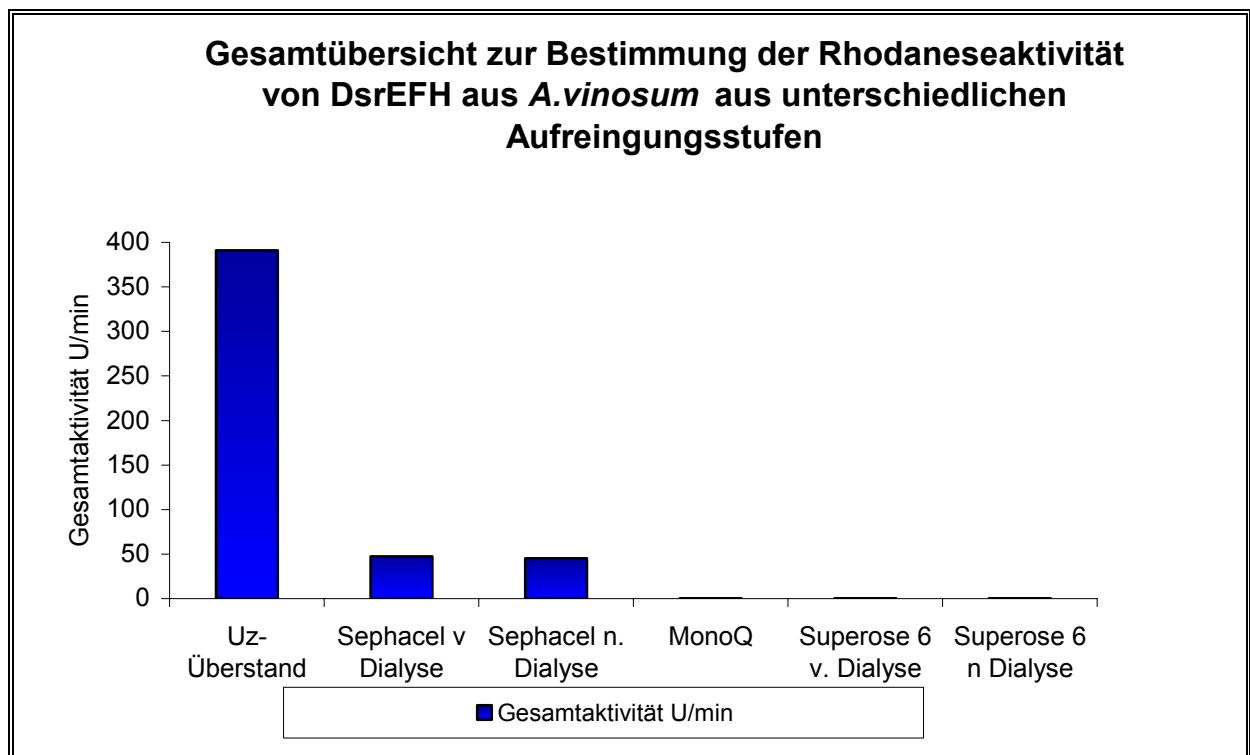


Abb. 3.31: Diagramm zur Darstellung der bestimmten Rhodaneseaktivität für DsrE, DsrF und DsrH aus unterschiedlichen Aufreinigungsstufen.

Tab. 3.5: Reinigungstabelle zur Rhodaneseaktivität der DsrEFH-aufgereinigten Proteine

Probe	Volumen in ml	Protein-konzentration mg/ml	Gesamtaktivität U/min	Spezifische Aktivität [U/ min x mg]	Ausbeute [%]
Zu-Überstand	220	21,5	937,2	0,198	100
DEAE-Sephacel vor Dialyse	62,5	0,98	112,5	1,91	12
DEAE-Sephacel nach Dialyse	64,5	1	50,31	0,78	5,4
Mono-Q konzentriert	1	0,4	3,65	3,65	0,4
Superdex TM 200	4	0,109	0,6	1,38	0,06
Mono-Q konzentriert	0,2	1	0,56	2,8	0,06
Superose-6	2	0,036	0,216	3	0,02

Mit jeder Aufreinigungsstufe fiel die gemessene Aktivität in den DsrEFH-Proteinproben deutlich ab. Die rapide Abnahme der Rhodaneseaktivität innerhalb des Aufreinigungsprozesses von DsrE, DsrF und DsrH wurde in dem Diagramm, **Abb. 3.31**, dargestellt. Die Graphik, in der die Gesamtaktivität aufgezeichnet ist und die Reinigungstabelle zur Bestimmung von Rhodaneseaktivität bestätigen, dass die Proteine DsrE, DsrF, DsrH keine Rhodaneseaktivität haben. Die aufgestellte These für das Protein DsrF (s. Schwarz, 2001) ließ sich mit diesem Experiment nicht bestätigen. DsrE, DsrF und DsrH üben offensichtlich eine andere Funktion im Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* aus.

3.10.3 Besitzt DsrEFH Polysulfid-Schwefeltransferase-Aktivität

Ein weiterer Versuch, die Aktivität des DsrEFH-Proteinhexamers zu ermitteln, waren Untersuchungen zur Bestimmung der Polysulfid-Schwefeltransferase-Aktivität.

(Klimmek et al., 1991, 1998). Es konnte jedoch keine Polysulfid-Schwefeltransferase-Aktivität für das aufgereinigte DsrEFH-Protein nachgewiesen werden.

Teil II

3.11 Ergebnisse der biochemischen und strukturellen Untersuchungen von DsrC aus *Allochromatium vinosum*

3.11.1 Aufreinigung des rekombinanten DsrC-Proteins zur biochemischen Charakterisierung

Die Aufreinigung des DsrC-Proteins aus *Allochromatium vinosum* erwies sich von Anfang an als sehr schwierig. Deshalb wurde zunächst eine Aufreinigung von einem überexprimierten, rekombinanten DsrC-Protein durchgeführt, um das DsrC-Protein biochemisch charakterisieren zu können. Der Expressionsvektor pCex, der für die Überexpression von rekombinantem DsrC in *E. coli* BL21(DE3) diente, stand zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung (Pott-Sperling, 2000). Für die Konstruktion des pCex-Vektors war das *dsrC*-Gen mit Hilfe einer PCR mit mutagenen Oligonukleotiden amplifiziert worden, so dass es am Startcodon eine **NdeI** Schnittstelle und am Stoppcodon eine **BamH I** Schnittstelle enthielt. Dieses Konstrukt konnte daraufhin in einen Expressionsvektor pET15b (Novagen Madison) hinter eine für einen Oligohistidinrest kodierende Sequenz inkloniert werden (Pott-Sperling, 2000). Für das rekombinante DsrC konnte ebenfalls ein effektives Aufreinigungsschema entwickelt werden (Pott-Sperling, 2000). In Anlehnung an das Reinigungsschema wurde der Zellrohextrakt einer Affinitätschromatographie über eine Nickel-Chelat-Matrix unterzogen. Die Elution des rekombinanten DsrC-Proteins erfolgte in einem linearen Imidazolgradienten von 60-400 mM Imidazol. DsrC eluierte zwischen 80-150 mM Imidazol. Die **Abb. 3.32** zeigt das Ergebnis der SDS-Page nach der Aufreinigung des rekombinanten DsrC-Proteins über eine 5 ml NTA- Säule (Qiagen).

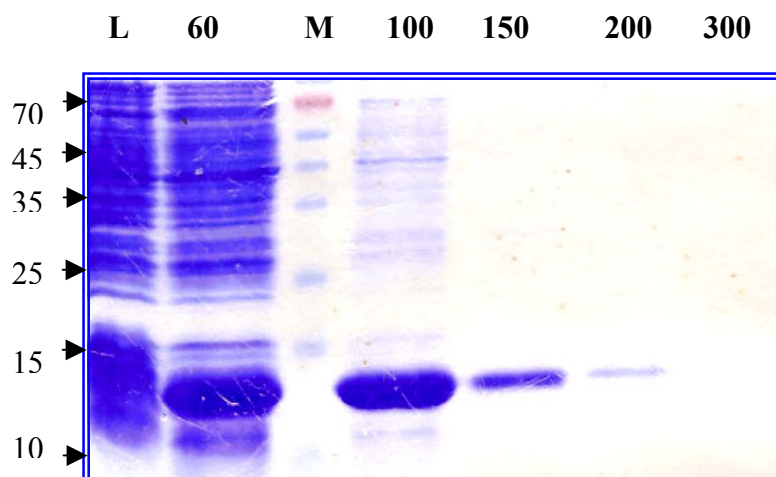


Abb. 3.32: SDS-Proteingel (15 %). Rekombinantes DsrC nach Aufreinigung über die NTA-Säule Spur: L: lysierte Zellen; 2. 60 mM Imidazol; M: Prestained Marker (Fermentas); 4-7:100-300 mM Imidazol

3.11.2 Aufreinigung des rekombinanten DsrC durch die Gelfiltrationschromatographie

Die DsrC-haltigen Proteinfractionen wurden vereint und über Nacht in einem großen Volumen 50 mM Tris/HCl pH 8 Puffer dialysiert, dem zur Stabilisierung des rekombinanten DsrC-Proteins 500 mM Natriumchlorid zugefügt wurde. Nach Konzentrierung der dialysierten DsrC-Probe (Centriplus YM-10) auf 2 ml wurde diese auf die mit 50 mM Tris/HCl pH 8 500mM NaCl äquilibrierte Superdex^{TM 75}-Säule (präparative Gelfiltrationssäule, Amersham Pharmacia Freiburg) aufgetragen. Im Gegensatz zu früheren Aufreinigungsergebnissen eluierte das rekombinante DsrC-Protein unerwartet in zwei Peaks von der Superdex^{TM 75}. Der erste Peak erstreckte sich über ein Elutionsvolumen von 65-70 ml, der zweite Peak über ein Elutionsvolumen von 75-80 ml. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass das rekombinante DsrC-Protein in zwei Zuständen vorkommen könnte, als Monomer und als Dimer. Da die Gelfiltrationssäule geeicht war, konnte das Molekulargewicht der beiden aufgereinigten DsrC-Proteine bestimmt werden. Für das DsrC-Dimer wurde ein Molekulargewicht von 28,9 kDa und für das DsrC-Monomer ein Molekulargewicht von ca. 14 kDa ermittelt. Die **Abb. 3.33** zeigt das Chromatogramm zur Aufreinigung des rekombinanten DsrC-Proteins über die Superdex^{TM 75}-Säule. Die im Anschluss an die Aufreinigung durchgeführte SDS-Page und der Western-Blot bestätigten, dass DsrC in zwei Zuständen von der Gelfiltrationssäule gereinigt wird, s. **Abb. 3.34**.

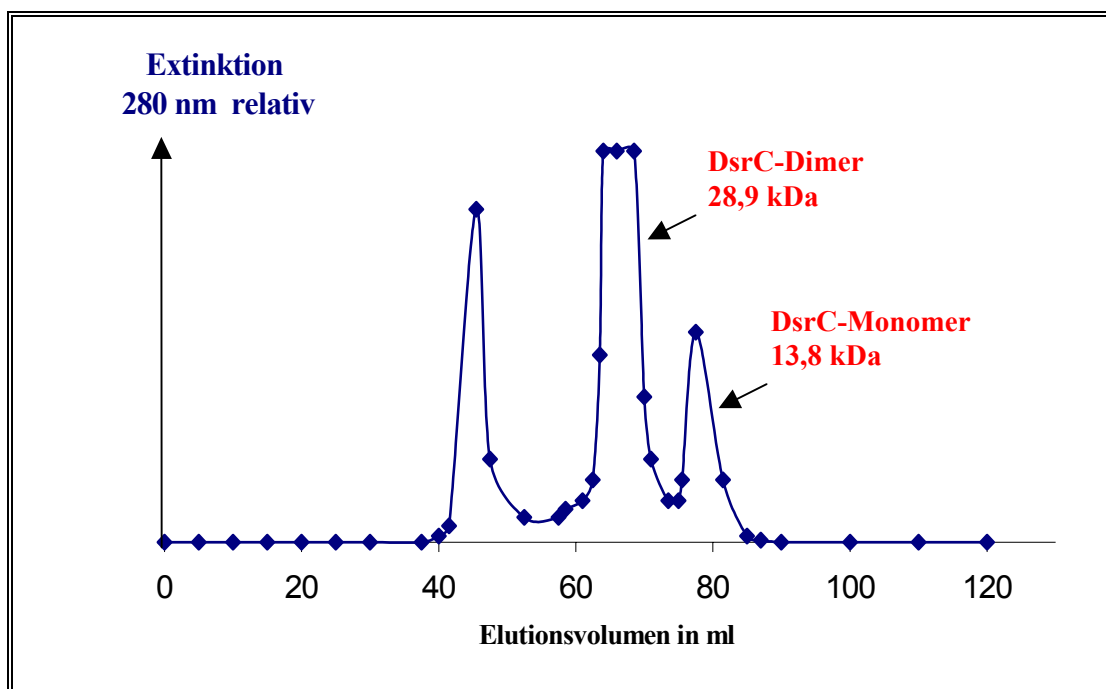


Abb. 3.33: Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinanten DsrC-Proteins durch Gelfiltrationschromatographie; Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl; Flussrate: 0,5 ml/min; Fraktionsvolumen: 1 ml. Die Aufreinigung erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen.

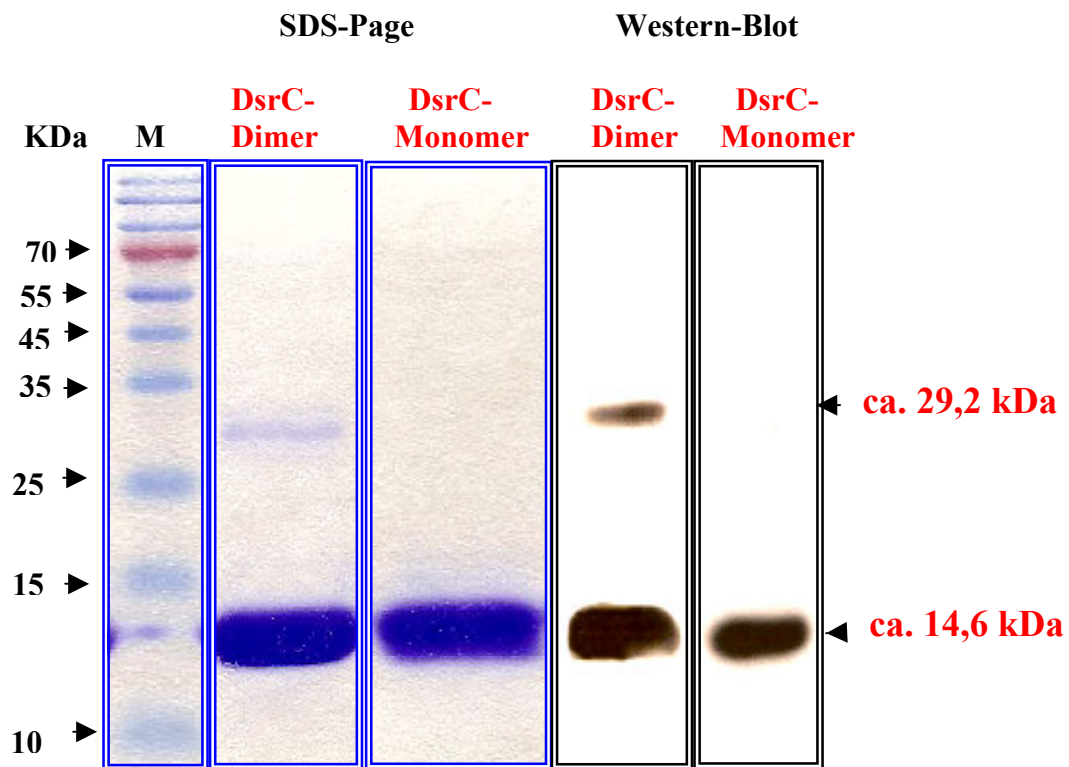
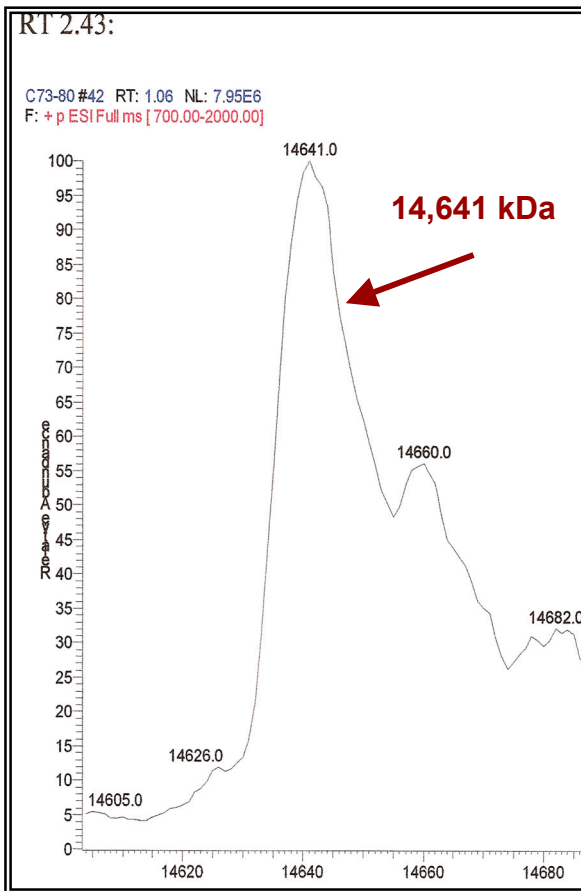


Abb. 3.34: SDS-Proteingel (15 %); Nachweis von monomerem und dimerem DsrC: Spur: 1 . Marker; 2. dimeres DsrC-Protein, zeigt eine zweite Proteinbande in der Höhe von 29 kDa; 3. monomeres DsrC, zeigt eine Proteinbande bei ca.14,6 kDa. Der immunologische Nachweis von DsrC erfolgte mit dem SuperSignal Western Blotting Kit (Prebio, Bonn). Für den Nachweis wurde das DsrC-Antiserum 1: 4000 verdünnt eingesetzt.

3.12 Bestimmung der molekularen Masse des rekombinanten DsrC- Proteins durch ESI-MS-Analyse

Für das DsrC-Protein aus *Allochromatium vinosum* wurde bisher nur **eine** molekulare Masse postuliert. Um nachzuweisen, dass das DsrC-Protein tatsächlich als Monomer und Dimer vorkommt, wurde jeweils mit einem Aliquot des konzentrierten, aufgereinigten dimeren DsrC-Proteins und des monomeren DsrC-Proteins eine Massenanalyse durch die Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie durchgeführt (Prinz, 2004). Die ESI-MS-Analyse bestätigte die monomere und dimere Form des DsrC-Proteins. In der **Abb. 3.35** sind die Spektren mit den ermittelten Massen für das DsrC-Monomer und DsrC-Dimer dargestellt. Werden durch ESI-MS-Analyse Proteindimere detektiert, so müssen starke ionische oder auch kovalente Bindungen vorliegen, da die Proteinuntereinheiten sonst auseinandergerissen würden.

DsrC-Monomer



DsrC-Dimer

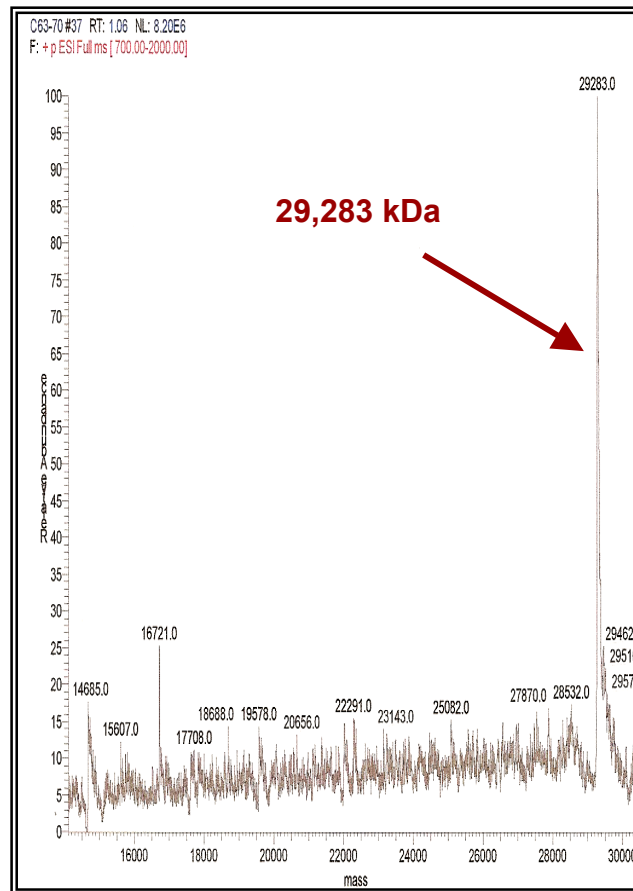


Abb. 3.35: Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS). Dargestellt sind die bestimmten molekularen Massen für das rekombinante DsrC-Protein, das aus *E. coli* BL21(DE3) aufgereinigt wurde. Die Massenanalyse bestätigte, dass DsrC in zwei Formen auftreten kann, als Monomer und als Dimer

3.13 Zwei DsrC-Monomere sind über eine Disulfidbrücke verbunden

Die ESI-MS-Analyse des aufgereinigten rekombinanten DsrC-Proteins bestätigte, dass DsrC auch als Dimer vorliegt. Um festzustellen, ob die Bindung darauf beruht, dass zwei DsrC-Monomere durch eine kovalente Disulfidbrücke zusammengehalten werden, wurde eine einfache Methode zum Nachweis von Disulfidbrücken angewendet. Diese beruht auf einer Inkubation dimerer Proteine mit reduzierenden und alkylierenden Agenzien (s. 3.8.1). Für die Reduktion von Disulfidbrücken wurde hier 2-Mercaptoethanol eingesetzt. Um die Reduktion irreversibel durchzuführen und eine unerwünschte Reorganisation von Cysteinresten zu vermeiden, sollten die SH-Gruppen durch Alkylierung modifiziert und stabilisiert werden, welches durch die Zugabe von Iodacetamid erzielt wurde. Für den Nachweis, dass zwei DsrC-Monomere über ein Disulfidbrücke verknüpft sind,

wurden folgende Inkubationsansätze hergestellt: **1.** Rekombinantes dimeres DsrC-Protein wurde mit Roti-Load 2 (nicht reduzierend, Fa. Roth) versetzt. **2.** Rekombinantes dimeres DsrC-Protein wurde mit 10 mM 2-Mercaptoethanol versetzt. **3.** Rekombinantes dimeres DsrC-Protein wurde mit 10 mM Iodacetamid versetzt. **4.** Rekombinantes dimeres DsrC-Protein wurde mit 10 mM 2-Mercaptoethanol und 20 mM Iodacetamid versetzt. Der vierte Ansatz wurde zuerst für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wurde das Iodacetamid zugegeben und die Probe wurde für zwei weitere Stunden bei 37°C inkubiert. Die anderen drei Ansätze wurden ebenfalls für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min bei 100°C aufgekocht und elektrophoretisch aufgetrennt. Die **Abb. 3.36:** SDS-Gel und **Abb. 3.:** Western-Blot zeigen das Ergebnis dieses Inkubationsexperimentes. **Spur 1:** Dimeres DsrC-Protein unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen, zeigte deutlich nur die Proteinbande des DsrC-Dimers, d.h. im Bereich von 29 kDa. **Spur 2:** Durch die Zugabe von 10 mM Mercaptoethanol wurde nur teilweise das DsrC-Dimer reduziert. Möglicherweise konnten sich einige freie Cysteinreste wieder zum Disulfid reorganisieren. **Spur 3:** Durch Zugabe von 10 mM Iodacetamid alleine zu dem DsrC-Dimer wurde keine Spaltung hervorgerufen, da Iodacetamid nur freiliegende SH-Gruppen modifizieren kann. **Spur 4:** Erst mit der Zugabe von 2-Mercaptoethanol und anschließender Zugabe eines Überschusses an Iodacetamid zu dem Inkubationsansatz wurde die vollständige Reduktion des DsrC-Dimers erreicht. Im Gel war nur noch eine Proteinbande zu erkennen und zwar die des DsrC-Monomers. In diesem Fall hat Iodacetamid die freiliegenden SH-Gruppen modifiziert und somit eine irreversible Reorganisation der Cysteinreste ermöglicht.

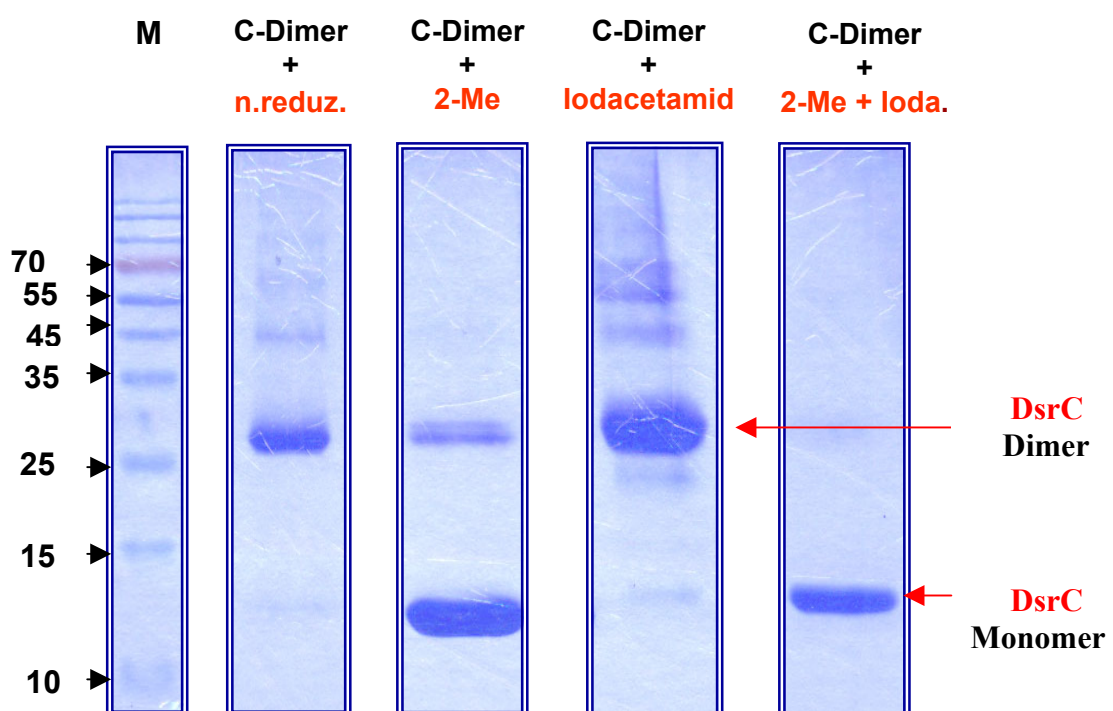


Abb. 3.36: SDS-Gel (15 %) Nachweis der Spaltung der Disulfidbrücke im rekombinanten DsrC-Dimer.

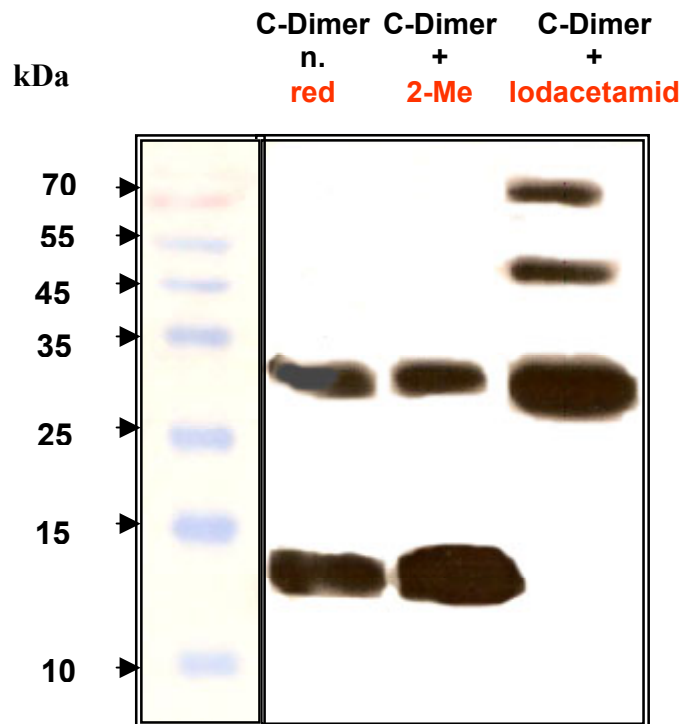


Abb. 3.37: Western-Blot: Nachweis der Spaltung der Disulfidbrücke im rekombinanten dimeren DsrC-Protein. Für den Nachweis wurde der SuperSignal Western Blotting Kit (Prestige, Bonn) eingesetzt. Das DsrC-Antiserum wurde 1:4000 verdünnt eingesetzt.

3.14 Aufreinigung von DsrC aus *A. vinosum* Wildtyp

Die Aufreinigung des DsrC-Proteins aus *A. vinosum* Wildtyp war anfänglich sehr schwierig, da bereits mit dem ersten Aufreinigungsschritt, d.h. der Aufreinigung von Dsr-Proteinen durch die hydrophobe Interaktionschromatographie, das DsrC-Protein in einem sehr ausgedehnten Elutionsbereich (ca. 36 Fraktionen) von der Phenylsepharose-Säule eluiert wurde. DsrC eluierte zusammen mit dem DsrEFH, außerdem war es auch in den Fraktionen enthalten, in denen das Protein DsrL und die Proteine DsrAB (die Sulfitreduktase) von der Säule eluierten. Infolge einer leichten Abänderung der Pufferzusammensetzung, d.h. mit der Verwendung eines reduzierenden Agens, wie z.B. 1 mM TCEP, der Zugabe von 10 % Glycerol und 1 mM EDTA zu dem 50 mM KPP Puffer pH 7,5, für die Hydrophobe-Interaktionschromatographie (Lübbe pers. Mitteilung, 2005) wurde die Aufreinigung für DsrC verbessert. Der Elutionsbereich für das DsrC wurde durch die Aufreinigung unter reduzierenden Bedingungen (1 mM TCEP) eingengt. DsrC eluierte zwischen 224-236 ml (bei ca. 33-36 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) von der Säule. Die DsrC-haltigen Proben wurden für die weitere Aufreinigung durch die Gelchromatographie (SuperdexTM 75) in 50 mM

Tris/HCl Puffer pH 8, 500 mM NaCl, umgepuffert. Die Dialyse diente vor allem der Entfernung von TCEP aus der Probe, um DsrC unter nicht reduzierenden Bedingungen weiter aufzureinigen und um feststellen zu können, ob das DsrC-Protein aus *Allochromatium* auch ein Dimer bildet. Nach Konzentrierung der dialysierten DsrC-Probe auf 2 ml (Centriplus YM-10) wurde sie auf eine zuvor mit 50 mM Tris/HCl pH 8 500 mM NaCl äquilibrierte Superdex^{TM75}-Säule aufgetragen. Die DsrC-Proteine eluieren zwischen 64-70 ml und bei 75 ml von der Gelfiltrationssäule. Die **Abb. 3.38** zeigt das Chromatogramm zur Aufreinigung von DsrC über die Superdex^{TM75}. Die **Abb. 3.39**, **Abb. 3.40** und **Abb. 3.** zeigen die Ergebnisse aus SDS-Page und Western-Blot-Analysen des DsrC aus *A. vinosum* von zwei erfolgten Aufreinigungsschritten.

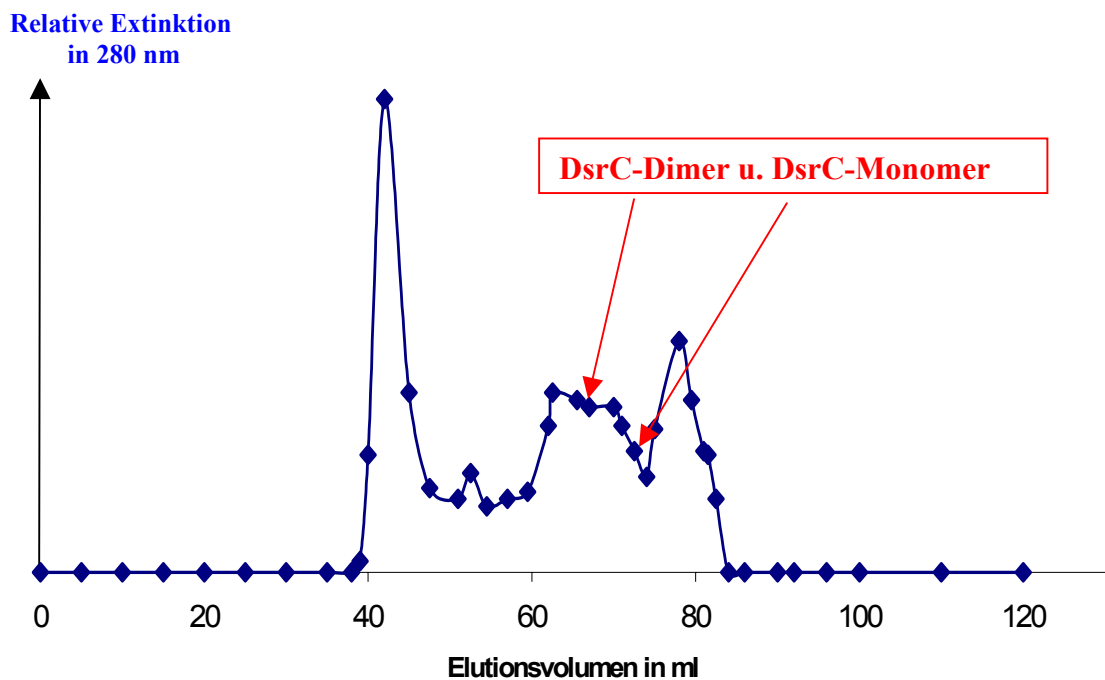


Abb. 3.38: Elutionsprofil der Aufreinigung des DsrC-Proteins über die Superdex^{TM75}-Säule. Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl ; Flussrate: 0,5 ml/min; Fraktionsvolumen: 1°ml; dimeres DsrC-Protein eluiert zwischen 64 und 70 ml von der Säule, monomeres DsrC-Protein ist nur in sehr geringen Mengen, d.h. es wurde nur in der Probe 75 detektiert

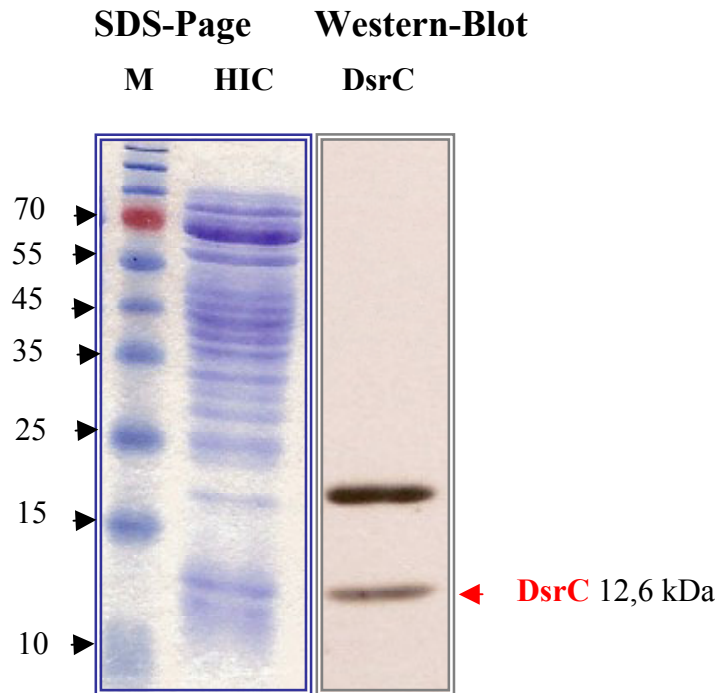


Abb. 3.39: SDS-Proteingel und Western-Blot-Nachweis von DsrC nach Aufreinigung über die Phenylsepharose-Säule. Für den Nachweis im Immunoblot wurde das DsrC-Antiserum 1:4000 verdünnt eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem SuperSignal Western Blotting Kit (Prebio, Bonn). Spur: M: Prestained Marker (Fermentas); HIC: Hydrophobe Interaktionschromatographie, Probe 58 Elution bei ca. 224 ml. Die obere stärkere auftretende Bande ist vermutlich eine Kreuzhybridisierung des DsrC Antiserums mit einem anderen Protein.

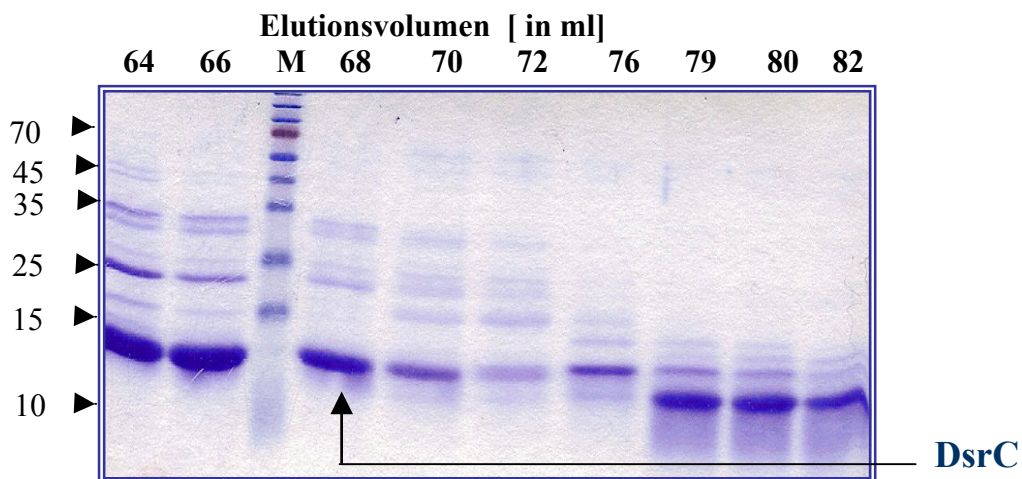


Abb. 3.40: SDS-Gel (15 %). Nachweis von DsrC nach Aufreinigung über die SuperdexTM 75-Säule. Obere Leiste: Angabe des Elutionsvolumens der Proben in ml. M= Prestained-Marker. Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (verdünnt in einem Verhältnis 1: 4 mit Roti-Load 1 (enthält 2-Mercaptoethanol)). **DsrC ist nachweisbar bis zu der Probe, die nach 76 ml** von der Säule eluierte. In den nachfolgenden Fraktionen 79-80 ml wurde **kein DsrC** mehr nachgewiesen. In diesem Bereich eluierte ein kleineres Protein als das DsrC-Protein von der Säule.

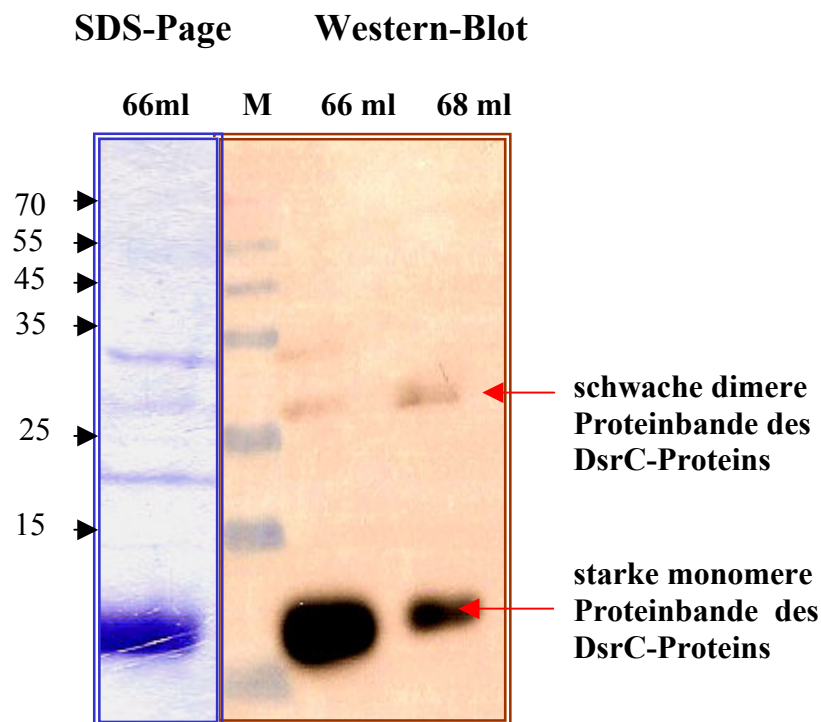
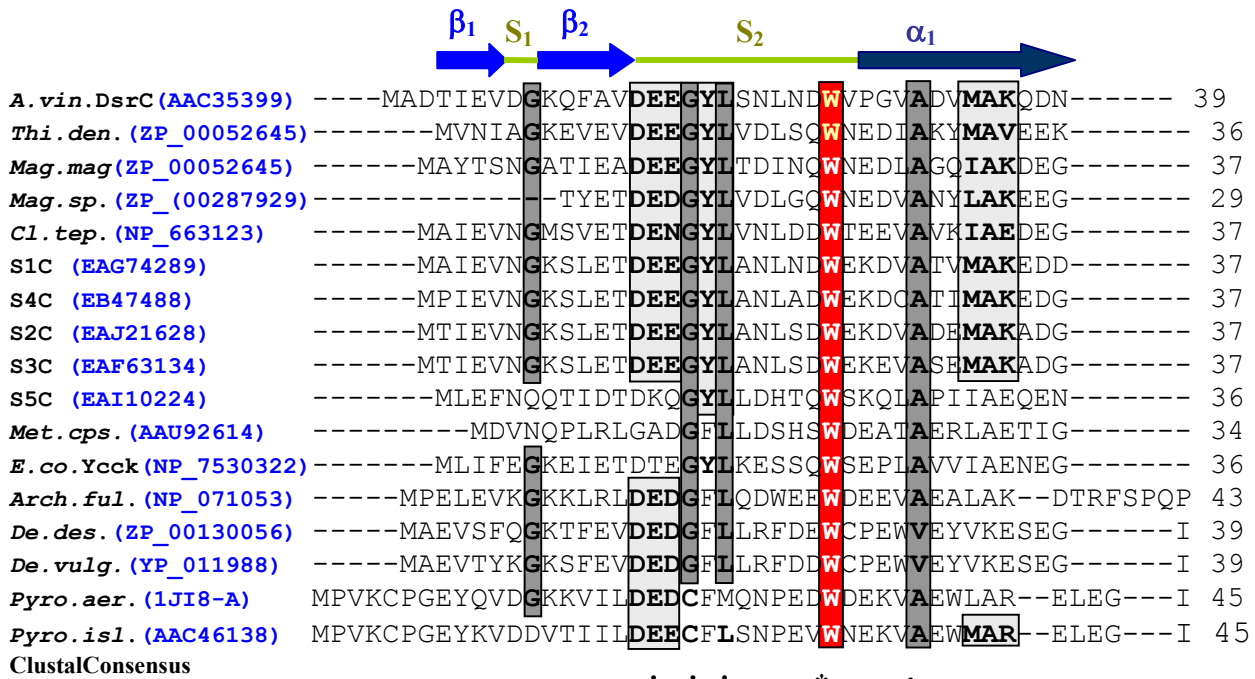


Abb. 3.41: SDS-Proteingel (15 %) und Western-Blot zum Nachweis des dimeren DsrC-Proteins nach Aufreinigung über die Gelfiltrationssäule SuperdexTM 75. Die Proteinproben wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (versetzt 1:4 mit Roti-Load 2, Ladebuffer ohne 2-Mercaptoethanol). Spur: 1. Probe 66 ml ; M.= Marker; Western-Blot: Spur: 1-2. Probe 66 ml (\approx 30 kDa) u. Probe 68 ml (\approx 27 kDa); Nachweis von DsrC mit dem SuperSignal Western Blotting Kit. Das DsrC-Antiserum wurde dazu 1:4000 verdünnt eingesetzt. Im Western-Blot und SDS-Proteingel lässt sich oberhalb der 25 kDa Proteinbande des Markers eine schwache zweite Proteinbande des DsrC-Dimers beobachten.

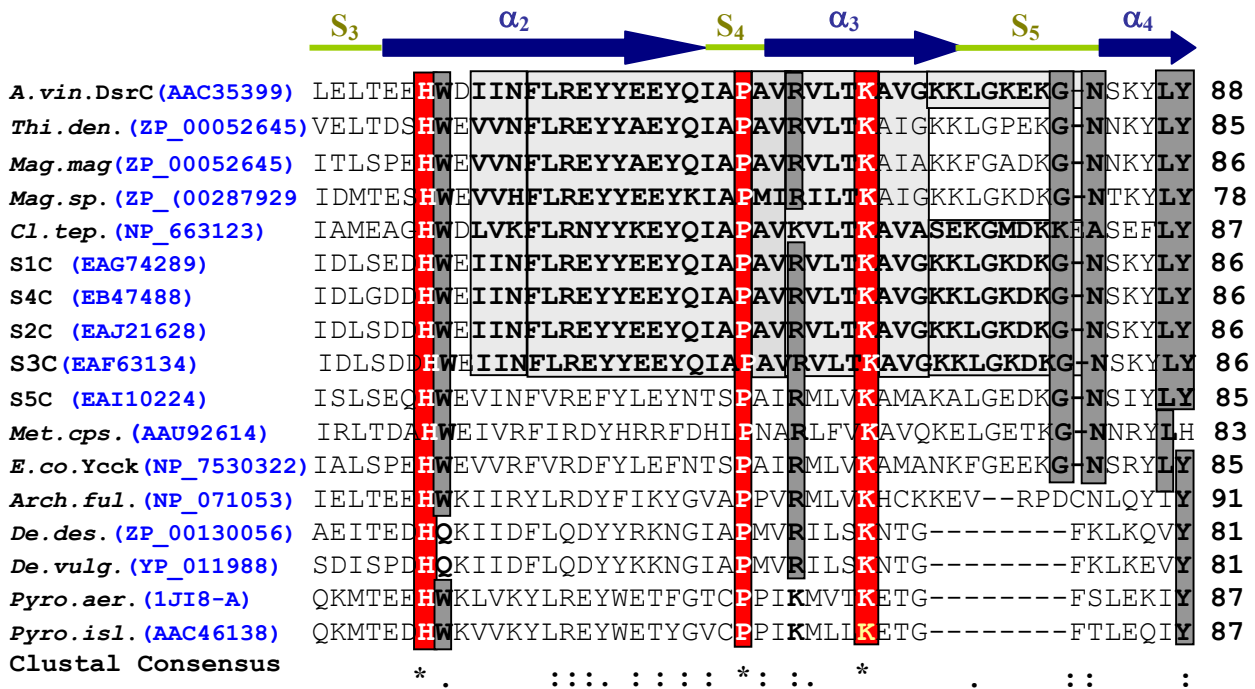
3.15 Homologieuntersuchungen zu DsrC aus *A. vinosum*

3.15.1 Zu DsrC gibt es viele homologe Proteine

Die ψ -Blast-Suche zeigte, dass es zu DsrC aus *A. vinosum* sehr viele homologe Proteine gibt sowohl bei den sulfatreduzierenden, als auch bei den schwefeloxidierenden Bakterien. Die nachfolgende **Abb. 3.42** zeigt ein Alignments von DsrC und DsrC-homologen Proteinsequenzen, das erstellt wurde mit Hilfe von ClustalW (Thompson et al, 1994). Eine besonders hohe Homologie liegt im C-terminalen Bereich des DsrC-Proteins vor. In diesem Bereich weisen die Sequenzen aus Organismen mit dissimilatorischem Schwefelstoffwechsel zwei konservierte Cysteinreste auf, **Cys 100** und **Cys 111**. Das Yeck-Protein aus *E. coli* und das S5C-Protein von einem bislang noch nicht charakterisierten Organismus aus dem Sargasso Meer besitzen nur ein konserviertes Cystein. Diese konservierten Cysteine könnten von funktioneller Bedeutung sein.



HTH-Motiv bei *P. islandicum*



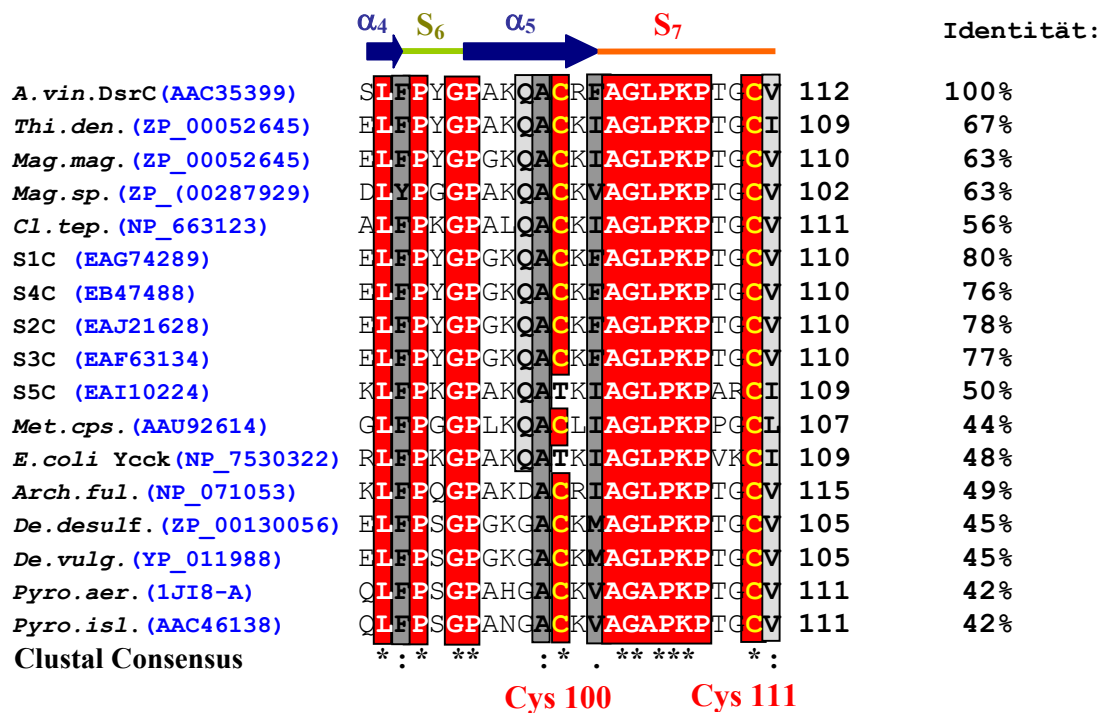


Abb. 3.42: Sequenzalignment der Proteinsequenz des DsrC-Proteins von *Allochrochromatium vinosum* von DsrC-homologen Proteinen, erstellt mit Hilfe von ClustalW (<http://align.Genome.jp>): Zu DsrC gibt es homologe DsrC-Proteine in *Thiobacillus denitrificans* ATCC25259 (*Thi. den.*), *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (*Mag. mag.*), *Magnetococcus* sp. MC-1 (*Mag. sp.*), *Chlorobium tepidum* TLS (*Cl. tep.*), *Methylococcus capsulatus* (*Met. cps.*), *Escherichia coli* (*E. coli*. YccK), *Archaeoglobus fulgidus* (*Arch. ful.*), *Desulfovibrio desulfuricans*, (*De. desulf.*) *Desulfovibrio vulgaris* (*De. vulg.*), *Pyrobaculum aerophilum* (*Pyro. aer.*), *Pyrobaculum islandicum* (*Pyro. isl.*). S1C-S5C sind hypothetische DsrC-Proteine von bislang noch nicht charakterisierten Organismen aus dem Sargasso Meer. Identische Aminosäuren wurden hier in weißer fettgedruckter Schrift mit rotem Hintergrund hervorgehoben. Ähnliche Aminosäurereste wurden in fetter Schrift mit dunkelgrauem Hintergrund und eine nahezu ähnliche Aminosäureabfolge unter den hier verglichenen Proteinsequenzen wurde mit fetter Schrift auf hellgrauem Hintergrund hervorgehoben. Die hoch konservierten Cysteinreste sind in fetter gelber Schrift mit rotem Hintergrund dargestellt. Die Identität der hier verglichenen homologen DsrC-Proteinsequenzen umfasst einen Bereich zwischen 42-80 %. Die Accession-Nummern sind blau und fettgedruckt hinter dem jeweiligen Speziesnamen aufgeführt worden. Oberhalb der Proteinsequenz wurde die Sekundärstruktur des DsrC-Proteins von *A. vinosum* angegeben. α_{1-6} = α -Helices; β_{1-2} = β -Faltblätter; S_{1-6} = Schleifen; S_7 = unstrukturierter Arm.

Besonders gut konservierte Aminosäuren sind Tryptophan (W26), Histidin (H 46), Prolin (P64), Leucin (L90), Prolin (P106; P108), Lysin (K107) und die Cysteine (C100 und C111). Die Sequenzfolge **FLREYYEYQIA** (52-61) ist vermutlich typisch für die DsrC-Proteine aus den Sulfidoxidierern. Die Sequenzfolge **AVGKKL** (72-77) scheint nur typisch für die DsrC-Proteine aus *A. vinosum* und die DsrC-Proteine von den Organismen aus dem Sargasso Meer zu sein. Sehr ähnlich zu der Sequenzfolge **AVGKKL** ist die Sequenzfolge **AIGKKL** (72-77), bei der anstelle

des Valins ein Isoleucin nach dem Alanin steht. Diese Sequenzfolge ist typisch für das DsrC-Protein aus den schwefeloxidierenden Organismen wie beispielsweise für *Chlorobium tepidum*, *Thiobacillus denitrificans*, *Magnetospirillum magnetotacticum* und *Magnetococcus* sp.

Die Aminosäurefolgen **KGXNS** (80-83) und **LY** (87-88) sind recht gut konserviert bei allen verglichenen Organismen. Der Aminosäurerest Cystein an der Position 100 (Cys100) der DsrC Peptidsequenz von *A. vinosum* ist besonders konserviert und kommt in allen verglichenen DsrC - Sequenzen der Organismen vor, die eine dissimilatorische Sulfitreduktase besitzen. Cys100 fehlt bei allen anderen Organismen, die dieses Enzym nicht besitzen. Die Sequenzfolge **PKPTGCV** (106-112) am C-Terminus des DsrC-Proteins ist bei allen schwefeloxidierenden Organismen hoch konserviert. Diese Aminosäuresequenzfolge, zusammen mit der Aminosäure Cys111 gestalten die β -Haarnadelstruktur des DsrC-Proteins. Diese β -Haarnadel, bzw. auch unstrukturierter Arm genannt, ragt aus dem DsrC-Protein heraus (Cort, 2001). Diese Strukturbesonderheit wurde bereits nachgewiesen für das DsrC-Protein aus *Pyrobaculum aerophilum* und für das DsrC aus *A. vinosum*, dessen Struktur unlängst analysiert wurde. Auffallend ist andererseits auch die Deletion von 8 Aminosäuren (72-80), die zwischen der α -Helix₃ und α -Helix₄ bei den zwei *Pyrobaculum*s (Sulfit - reduzierende Archaea), *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfovibrio desulfuricans* (Sulfatreduzierer) liegt. Diese Deletion lässt sich nicht bei den schwefeloxidierenden Organismen, wie z.B. *Allochromatium vinosum* und *Thiobacillus denitrificans* beobachten. Alle DsrC-Homologen, denen DsrAB fehlt, haben die Deletion von 8 Aminosäuren ebenfalls nicht.

3.16 Die Bildung von DsrC in *A. vinosum* wird durch Sulfid verstärkt

Um auf Proteinebene nachzuweisen, dass die Bildung von DsrC von Sulfid abhängig ist, wurden Sulfidinduktionsexperimente durchgeführt. Für das Experiment wurden *Allochromatium vinosum* Zellen einerseits unter photolithoautotrophen Bedingungen, d.h. mit Sulfid, und andererseits unter photoorganoheterotrophen Bedingungen nur mit Malat, ohne Sulfidzugabe, angezogen. Es zeigte sich, dass *Allochromatium* unter photoorganoheterotrophen Wachstumsbedingungen geringe Mengen DsrC in den Zellen bildete, siehe auch **Abb. 3.43**. Nach der Zugabe von Sulfid zu den im Wachstum befindlichen Zellen wurde das Protein in den Zellen verstärkt exprimiert. Diese Sulfidinduktionsexperimente wurden bereits von einer früheren Doktorandin (Andrea Pott) auf Transkriptionsebene durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass das *dsrC* von zwei mRNA's kodiert wird, d.h. es wurde für *dsrC* ein langes mRNA-Transkript und ein kurzes mRNA-Transkript gebildet. Das kurze mRNA-Transkript wurde in den Zellen gebildet, sowohl unter photoorganoheterotrophen, als auch unter photolithoautotrophen Wachstumsbedingungen, mit Sulfid. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass es sich um ein konstitutiv gebildetes Transkript handelt (Pott und Dahl, 1998). Da sich die Ergebnisse der Sulfidinduktion von DsrC auf der Proteinebene widerspiegeln, ist anzunehmen, dass DsrC konstitutiv in den Zellen vorkommt, auch bei photoorganoheterotrophem Wachstum. Werden die *A. vinosum* Zellen dagegen mit Sulfid gefüttert, so wird das DsrC-Protein verstärkt gebildet.

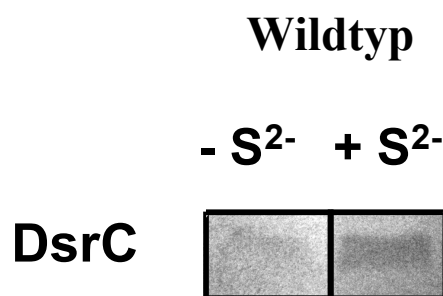


Abb. 3.43: Western-Blot zum Nachweis von DsrC vor und nach Induktion mit Sulfid

Teil III

3.17 Interaktionsuntersuchungen von DsrEFH und DsrC

3.17.1 Können rekombinantes DsrEFH und rekombinantes DsrC miteinander interagieren?

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war der Nachweis von Wechselwirkungen zwischen den Dsr-Proteinen. Ein vorausgegangenes Experiment, d.h. die Inkubation von rekombinantem DsrEFH mit einer löslichen Proteinfraktion vom *A. vinosum* (Wildtyp) brachte keinen Aufschluss über mögliche Proteininteraktionen. Für die Untersuchung der Wechselwirkung von Dsr-Proteinen wurde daher ein Inkubationsexperiment mit den aufgereinigten Proben der rekombinanten Proteine DsrEFH und DsrC durchgeführt. Jeweils 40 µl des aufgereinigten rekombinanten DsrEFH-Proteins und 40 µl des rekombinanten dimeren, bzw. 40 µl des monomeren DsrC-Proteins, wurden für 2-3 Stunden zusammen bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 20 µl der Ansätze elektrophoretisch in einem nativen Gel aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Aliquot von jeder Proteinprobe alleine, d.h. von DsrEFH und vom DsrC-Dimer. Das Ergebnis dieser Untersuchung zur Interaktion von DsrEFH und DsrC zeigen die **Abb. 3.44 a und b**.

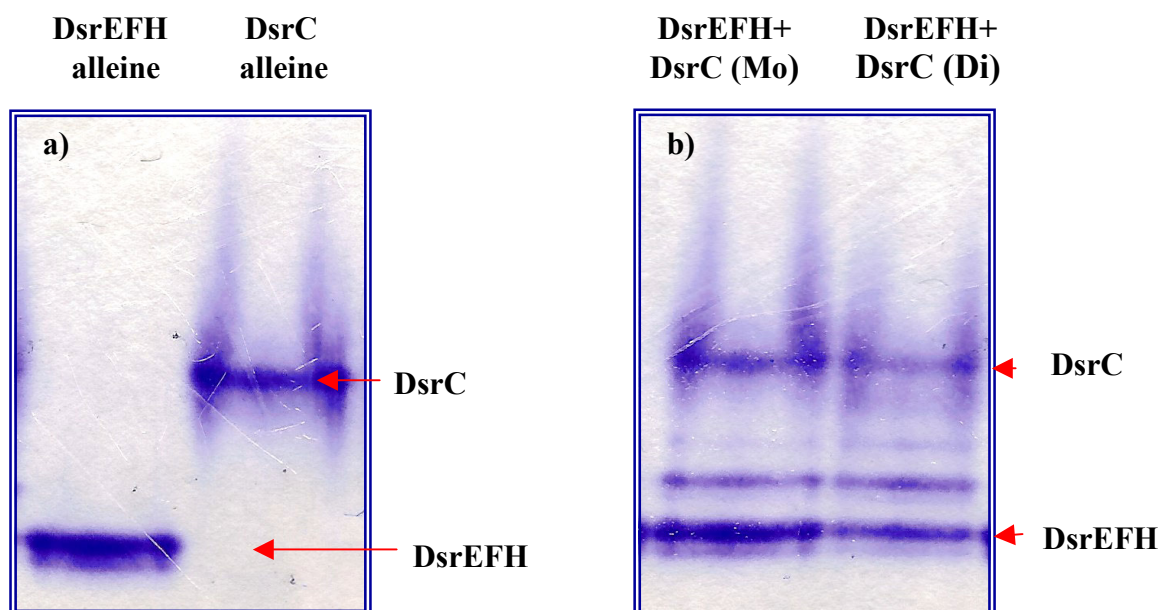


Abb. 3.44: Native Proteingele (7,5 %). Nachweis der Interaktion von DsrEFH und DsrC
DsrC (Mo) = Monomeres DsrC; DsrC (Di) = Dimeres DsrC

Bei Betrachtung der beiden Coomassie-gefärbten Proteingele fällt auf, dass jedes Protein für sich alleine, d.h. DsrEFH und DsrC alleine, in dem nativen Gel als einzelne Proteinbanden laufen. Da die Proteine in dem nativen Gel nicht nur nach Größe, sondern auch nach Ladung getrennt werden, verhalten sich die Proteine DsrC und DsrEFH in ihrem Laufverhalten unterschiedlich. Die Inkubation von DsrEFH mit DsrC rief im nativen Proteingel zusätzliche Banden hervor. Zwischen der Hauptproteinbande für das DsrEFH und für das DsrC sind zwei weitere Proteinbanden zu erkennen. Die Inkubation von DsrEFH mit DsrC hatte einen Bandshift in den nativen Proteingelen hervorgerufen. Um zu beweisen, dass diese Banden spezifisch sind und nur bei der Inkubation von DsrEFH mit DsrC auftreten, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, z.B. mit Bovin Serum Albumin (BSA). Das Ergebnis der Inkubation von DsrEFH mit BSA und DsrC mit BSA zeigt die **Abb. 3.45**

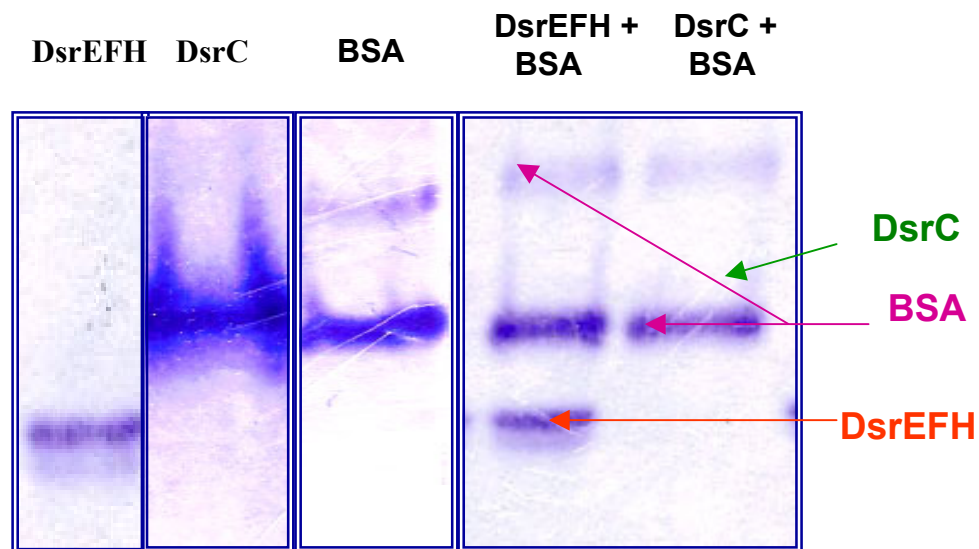


Abb. 3.45: Native Proteingele (7,5 %). Kontrollexperiment: BSA und DsrEFH, BSA und DsrC können nicht miteinander interagieren.

Wurden das DsrEFH-Protein und das DsrC-Protein alleine im Gel elektrophoretisch aufgetrennt, so war im nativen Gel nur eine Proteinbande zu erkennen. BSA zeigte zwei Proteinbanden. Wurde BSA (Bovin Serum Albumin) mit DsrEFH, bzw. BSA mit DsrC inkubiert, so ließ sich für jedes Protein seine charakteristische Proteinbande beobachten. BSA, DsrC und DsrEFH wurden in dem nativen Gel unabhängig voneinander aufgetrennt. Zusätzliche Proteinbanden wurden nicht hervorgerufen. In der Spur 5 ist die Proteinbande für DsrC nur sehr schwach zu erkennen, dennoch lag sie von der Proteinbande des BSA getrennt. Das BSA verursachte keinen Bandshift. Der Bandshift, der durch die Inkubation von DsrEFH mit DsrC verursacht wurde, scheint offensichtlich spezifisch zu sein.

3.17.2 Aufreinigung von rekombinantem DsrEFH mit DsrC über die Superose-6-Säule

Die Inkubation von DsrEFH mit DsrC rief zwar einen spezifischen Bandshift in den nativen Proteingelen hervor, jedoch konnte mit diesem Experiment nicht festgestellt werden, ob die langsamere Proteinbande in dem Gel ein Aggregat von DsrEFH mit DsrC darstellt. Die Western-Blots lieferten keinen Aufschluss über ein DsrEFH+DsrC-Proteinaggregat. Um nachweisen zu können, ob die langsamere Proteinbande ein Aggregat von DsrEFH und DsrC darstellt, was sich in einer Veränderung der molekularen Masse äußern dürfte, wurden die Inkubationsansätze einer Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule (Superose-6) und anschließend einer ESI-MS-Analyse unterzogen. Die Aufreinigung von DsrEFH und DsrC erfolgte mit einem spezifischen Inkubationspuffer, der für Gelshift-Analysen eingesetzt wurde (Carr et al., 1991, 1992). Der Inkubationspuffer wurde für dieses Experiment etwas modifiziert. Für die Inkubation wurden 100 µl aufgereinigtes, rekombinantes DsrEFH mit 100 µl aufgereinigtem rekombinantem dimeren DsrC-Protein und 30 µl Inkubationspuffer (50 mM Hepes, 1 M KCl und 10 mM DTT) versetzt. Der Inkubationsansatz wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er auf eine zuvor mit 50 mM Hepes, pH 7,8 100 mM KCl, 225 mM NaCl und 10 mM DTT äquilibrierte Superose-6-Säule aufgetragen wurde. Die Elution der Proteinproben (0,25 ml) erfolgte mit einer Flussrate von 0,2 ml/min in dem Äquilibrierungspuffer. Die Proteine DsrEFH und DsrC eluierten nicht zusammen, sondern nacheinander von der Gelfiltrationssäule, siehe **Abb. 3.46**.

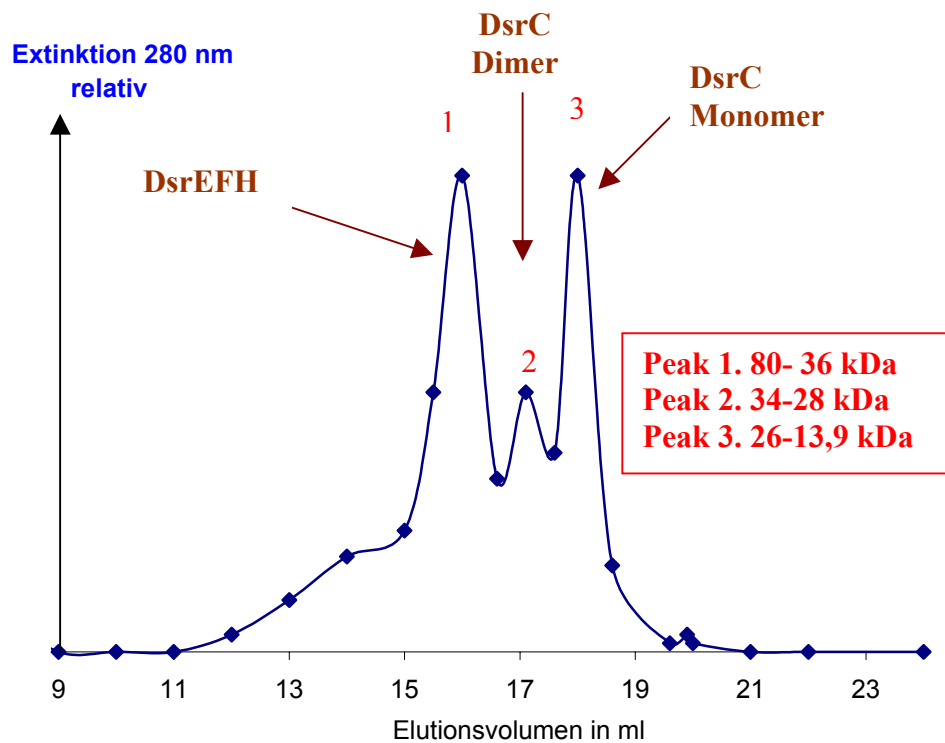


Abb. 3.46: Ausschnitt eines Chromatogramms zur Aufreinigung von rekombinantem DsrEFH mit rekombinantem DsrC über die Superose-6-Säule. Dargestellt ist der Elutionsbereich von DsrEFH und DsrC; **Elutionspuffer:** 50 mM Hepes, 225 mM NaCl, 100 mM KCl 10 mM DTT; **Flussrate** 0,2 ml/min; **Elutionsvolumen:** 0,25 ml

Da die Superose-6-Säule geeicht war, konnte die molekulare Masse der eluierenden Proteine bestimmt werden. DsrEFH und DsrC bildeten kein Aggregat, was sich sonst in einer Probe mit höherer molekularer Masse hätte widerspiegeln müssen. Zuerst eluierte rekombinantes DsrEFH alleine, hier in einem Bereich zwischen 15,5 ml und 17 ml von der Säule (Elutionspeak 1). Das rekombinante dimere DsrC-Protein eluierte nach dem DsrEFH in zwei Zuständen. Es wurde beobachtet, dass DsrC zu einem geringen Teil als Dimer von der Superose-6-Säule eluierte, d.h. in einem Bereich zwischen 17,25-17,5 ml (Elutionspeak 2). Das meiste DsrC-Protein eluierte jedoch als Monomer von der Säule, d.h. in einem Bereich zwischen 17,75-19 ml (Elutionspeak 3), (s. **Abb. 3.48**). Zur Kontrolle wurden rekombinantes DsrEFH und rekombinantes DsrC getrennt voneinander in dem Inkubationpuffer inkubiert und anschließend unabhängig voneinander über die Superose-6-Säule aufgereinigt. Nach jeder erfolgten Gelfiltration wurden die Proben in einer Nativen-Page auf das Vorkommen von DsrEFH und DsrC überprüft. Die **Abb. 3.47**, **Abb. 3.48** und **Abb. 3.49** zeigen die Ergebnisse aus den getrennten Inkubationen der Proteine und der gemeinsamen Inkubation. Der Hauptanteil des DsrEFH-Proteins eluiert bei 16 ml (66 kDa). Im nativen Gel wandert DsrEFH nur als eine Proteinbande, wie in **Abb. 3.47** zu erkennen ist. Dieses Ergebnis bestätigte bereits die vorangegangene Inkubationsuntersuchung. Dimeres DsrC alleine eluiert nach der Inkubation mit

DTT noch in zwei Zuständen, als Dimer bei 17,5 ml ($\approx 28,8$ kDa) und als Monomer zwischen 17,75-19 ml von (≈ 26 -13,9 kDa) der Superose-6-Säule. Das weitere Vorkommen der zwei Zustandsformen ist darauf zurückzuführen, dass nicht alles dimere DsrC-Protein zum Monomer gespalten wurde. Das DsrC-Monomer und das DsrC-Dimer wandern ebenfalls nur als eine Proteinbande in dem nativen Gel, siehe **Abb. 3.48**. Die Inkubation von rekombinantem DsrEFH mit DsrC dagegen bewirkte erneut das Auftreten zusätzlicher Proteinbanden, d.h. einen Bandshift (s. **Abb. 3.49**). Da sich jedoch die molekulare Masse der höher laufenden Proteinbande nicht so ohne weiteres ermitteln ließ und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse keine aufschlussreiche Aussage gemacht werden konnte, ob in der langsameren Proteinbande noch DsrC vorliegt oder nicht, wurde eine Probe aus dem Bereich, in dem der Bandshift im Silbergel am stärksten ausgeprägt war, einer Massenbestimmung durch ESI-MS-Analyse unterzogen. Die ESI-MS-Messung bestätigte, siehe **Abb. 3.50**, dass die Probe mit der langsamen Proteinbande nur DsrEFH enthält. So scheint es offensichtlich, dass mit der Inkubation von DsrEFH mit DsrC, in DsrEFH eine Konformationsänderung hervorgerufen wurde. Welche Bedeutung diese Konformationsänderung für den Schwefelstoffwechsel haben könnte, bleibt weiterhin zu klären.

EFH alleine

15,5 ml 16 ml 16,5 ml 17ml 17,5 ml

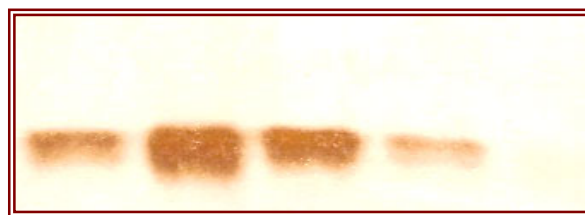


Abb. 3.47: Natives silbergefärbtes Proteingel (7,5 %). Rekombinantes DsrEFH wurde mit 10 mM DTT inkubiert und über die Superose-6-Säule aufgereinigt.

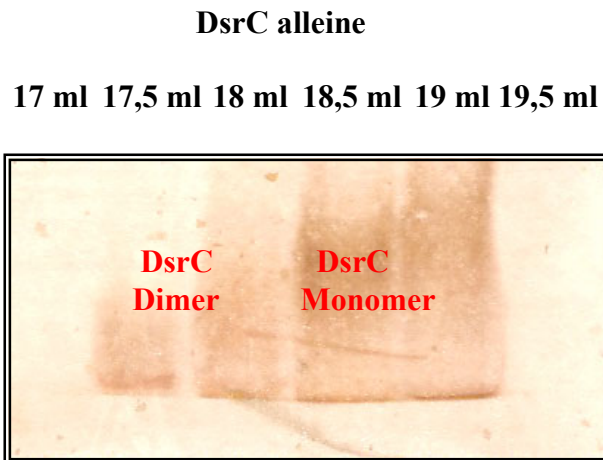


Abb. 3.48: Natives silbergefärbtes Proteingel (7,5 %). Rekombinantes dimeres DsrC wurde mit 10 mM DTT inkubiert und über die Superose-6-Säule aufgereinigt

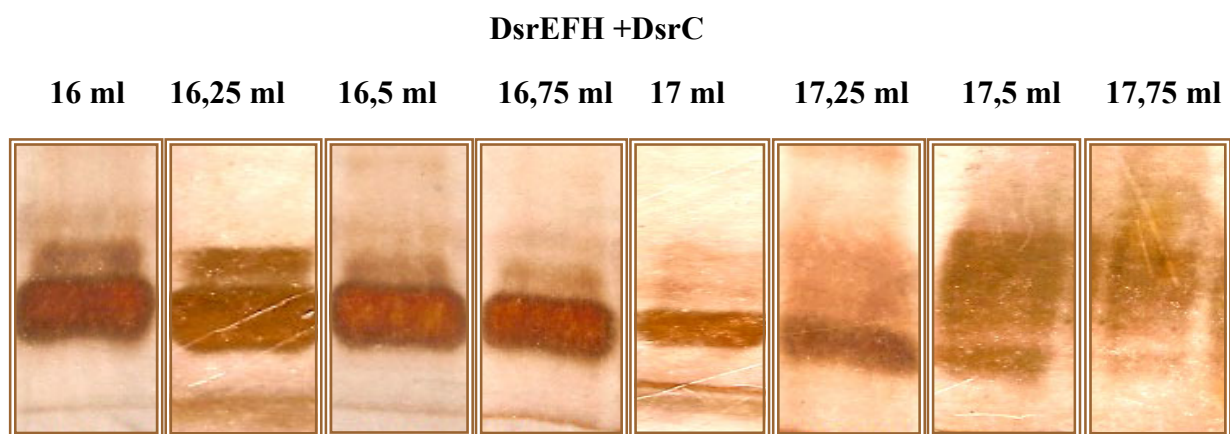


Abb. 3.49: Natives silbergefärbtes Proteingel (7,5 %) nach der Inkubation von rekombinatem DsrEFH-Protein mit rekombinatem DsrC-Protein und deren Aufreinigung über die Superose-6-Säule. Die Inkubation von DsrEFH mit DsrC bewirkte einen Bandshift. Es lassen sich zusätzliche Proteinbanden im Gel außer der Hauptproteinbande für das DsrEFH-Proteinhexamer beobachten.

Die langsamere Proteinbande enthält nur DsrE, DsrF und DsrH!

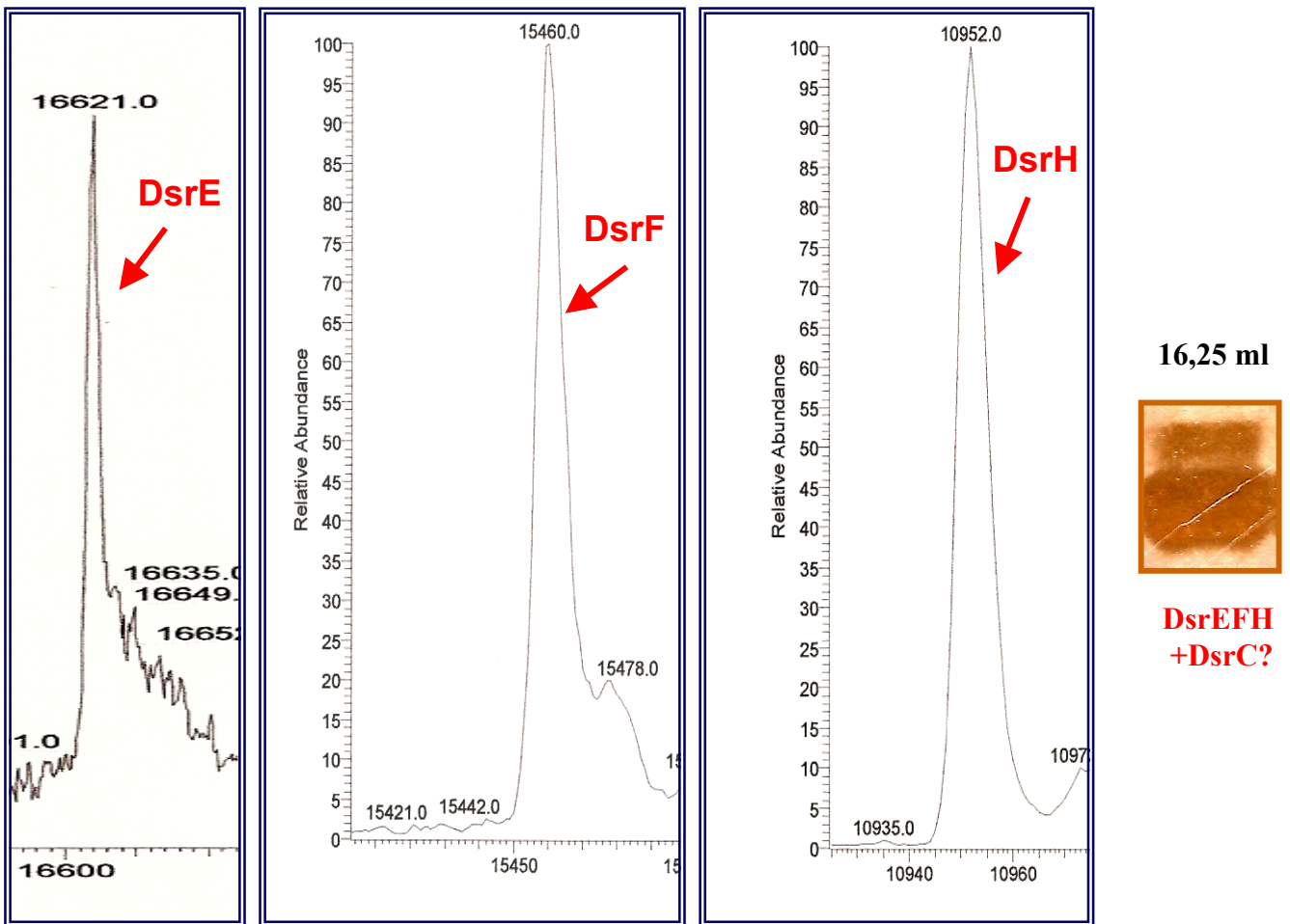


Abb. 3.50: ESI-MS-Spektren zum Nachweis der Interaktion der rekombinanten Proteine DsrEFH und DsrC. Die **langsame Proteinbande** enthält nur **DsrEFH**, kein DsrC .

3.18 Nachweis der Interaktion von rekombinantem DsrC-Dimer und DsrEFH aufgereinigt aus *A. vinosum*

Ein weiterer Nachweis, dass die Interaktion zwischen den Dsr-Proteinen spezifisch ist, sollte auch durch das folgende Experiment nochmals bestätigt werden.

Aufgereinigtes DsrEFH-Protein aus *A. vinosum* und aufgereinigtes rekombinantes dimeres DsrC-Protein wurden zusammenpipettiert, mit und ohne Inkubationspuffer (50 mM Hepes pH 7,8, 100 mM DTT und 1 M KCl) versetzt, und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Für die Negativkontrolle wurde dimeres DsrC und DsrEFH aus *A. vinosum* für sich alleine jeweils, einmal mit und ohne Inkubationspuffer (s.o.) versetzt und ebenfalls für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden alle Probenansätze in einem nativen Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die **Abb. 3.51** zeigt das Ergebnis der Inkubation:

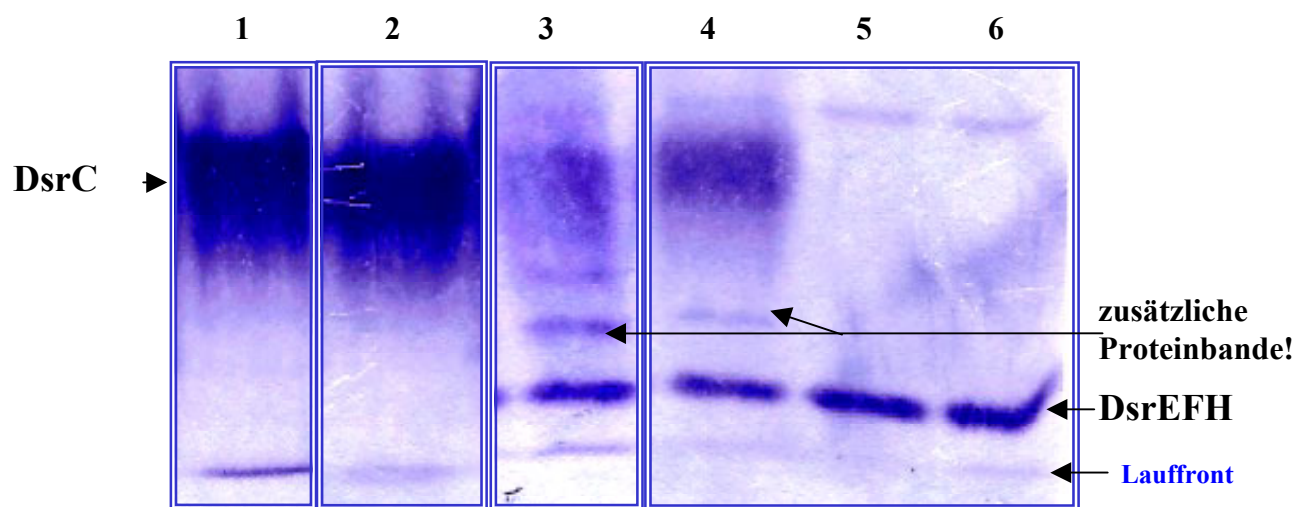


Abb. 3.51: Natives Proteingel (7,5 %). Nachweis der Interaktion DsrEFH aus *A. vinosum* mit rekombinantem DsrC-Dimer. Spur: 1. DsrC-Dimer ohne DTT; 2. DsrC-Dimer + 10 mM DTT; 3. DsrC-Dimer + DsrEFH (*A. vin.*) + 10 mM DTT ; 4. DsrC-Dimer + DsrEFH ohne DTT; 5. DsrEFH+ 10 mM DTT; 6. DsrEFH ohne DTT.

Die Inkubation von DsrEFH mit dem rekombinanten DsrC ruft zusätzliche Proteinbanden hervor, gleichgültig, ob die Proben mit oder ohne DTT inkubiert wurden. (s. Spur 3 u 4). Die Inkubation von DsrC und DsrEFH alleine für sich, mit und ohne DTT, zeigte keine Unterschiede. Die Proteine zeigten nur eine einzelne Bande. Dieses Experiment bestätigte die bereits vorangegangenen Ergebnisse .

Teil IV

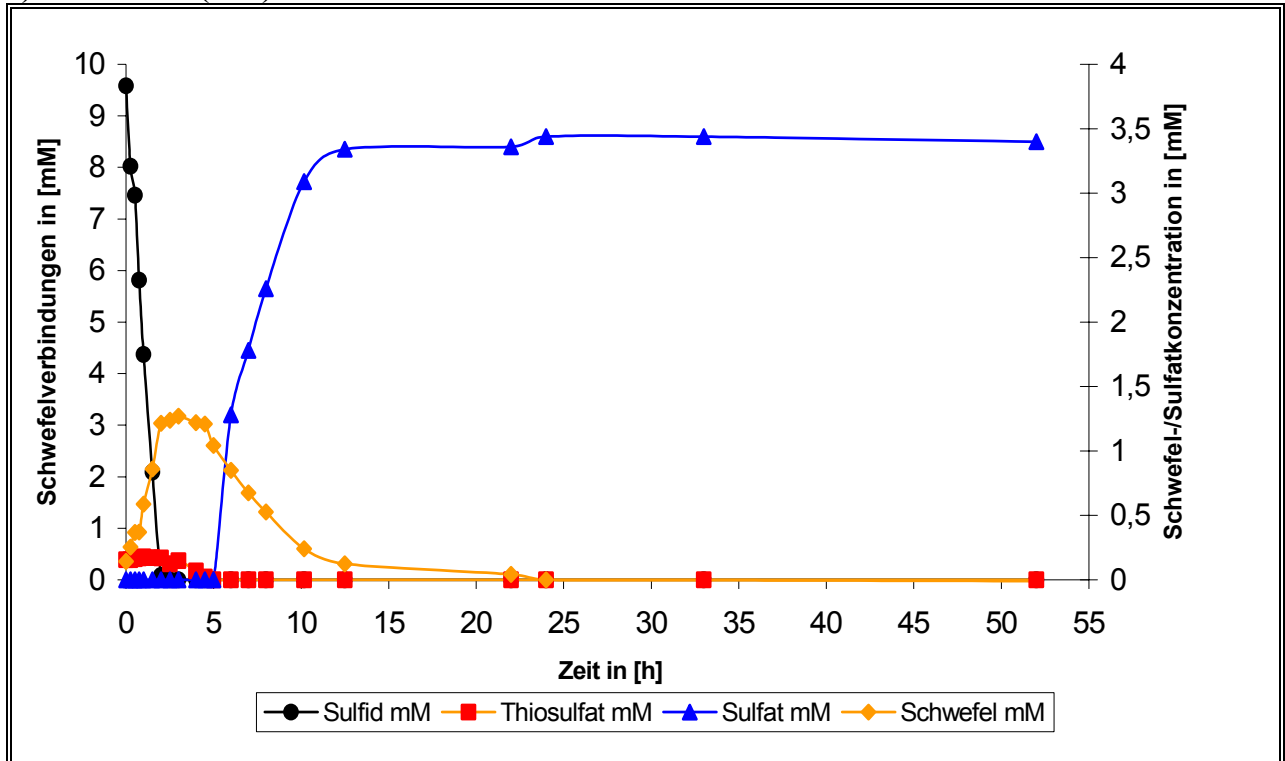
3.19 Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen

Die Erzeugung einer DsrEFH-defizienten Mutante in *Allochromatium vinosum* sollte helfen, die Funktion dieser Gene für den Schwefelstoffwechsel zu ergründen. Die $\Delta dsrEFH$ -Mutante wurde durch eine In-frame Mutagenese von Frauke Grimm hergestellt (Grimm, 2004). Der physiologische Effekt der Mutation der *dsrEFH*-Gene auf die Schwefeloxidation sollte durch Wachstumsexperimente untersucht werden. Erste Hinweise auf einen veränderten Phänotyp der $\Delta dsrEFH$ -Mutante im Vergleich zum *Allochromatium vinosum* Wildtyp wurden mit Hilfe von 100 ml Batch-Kulturen erzielt (Grimm, 2004). Für eine genauere Charakterisierung der $\Delta dsrEFH$ -Mutante von *A. vinosum* wurden hier im Rahmen dieser Arbeit Wachstumsversuche in einem Fermenter mit 1 l Kulturvolumen durchgeführt. Photoorganoheterotroph angezogene Vorkulturen der $\Delta dsrEFH$ -Mutante von *Allochromatium vinosum*, sowie vom *A. vinosum* Wildtyp RifA50, wurden dazu in ihrer exponentiellen Phase abzentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden im Rücklauf ihres Mediums resuspendiert und dann in 1 l Pfennig-Medium, einem Mineralsalzmedium, das 7 mM Sulfid als photosynthetischen Elektronendonator enthielt, inokkuliert. Um eine Aussage über den Umsatz der reduzierten Schwefelverbindungen durch die jeweilige Kultur machen zu können, wurden Proben aus den Fermentern gezogen. Mit Hilfe der HPLC-Analyse wurden die in den Proben enthaltenen Sulfid-, Thiosulfat-, Sulfit-, Sulfat- und Schwefelkonzentrationen bestimmt. Zudem wurde der Proteingehalt bestimmt, um eine Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten.

Das am Anfang der Fermenterexperimente noch in den Proben enthaltende Sulfid, findet sich später in Form von Sulfat wieder. Das Sulfid wurde von den Organismen vollständig abgebaut, jedoch wurde es nicht komplett zu Sulfat oxidiert, sondern nur etwa zur Hälfte, siehe **Abb. 3.52 a** (beim Wildtyp 3,5 mM Sulfat), **Abb. 3.52 b** (bei der $\Delta dsrEFH$ -Mutante 2,6 mM Sulfat). Diese Tatsache könnte darauf zurückgeführt werden, dass bei der Ermittlung der Konzentration der verschiedenen Schwefelverbindungen in den Proben unterschiedliche Messmethoden eingesetzt wurden, die sich nicht aufeinander abstimmen lassen. Die Sulfidoxidation und die Bildung von intrazellulären Schwefelkugeln setzte unmittelbar nach dem Animpfen der Kulturen auf Pfennigmedium ein. Die Oxidation von Thiosulfat, das als eine Verunreinigung im Sulfid enthalten ist, erfolgte nach Abbau des Sulfids (von der ersten bis zur fünften Stunde nach dem Animpfen der Kultur). Das Sulfid wurde innerhalb der ersten Stunde vollständig oxidiert. Die maximale Schwefelkonzentration wurde nach ca. 3 Stunden beim Wildtyp (RifA50), bzw. nach 4 3/4 Std. bei der $\Delta dsrEFH$ -Mutante erreicht. Beim *A. vinosum* Wildtyp (RifA50) begann die Oxidation des Schwefels zum Sulfat

bereits kurz nachdem das Thiosulfat und das Sulfid abgebaut worden waren, d.h. nach ca. 5 Stunden.

a) *A. vinosum* (WT) Rif50



b) *A. vinosum* $\Delta dsrEFH$

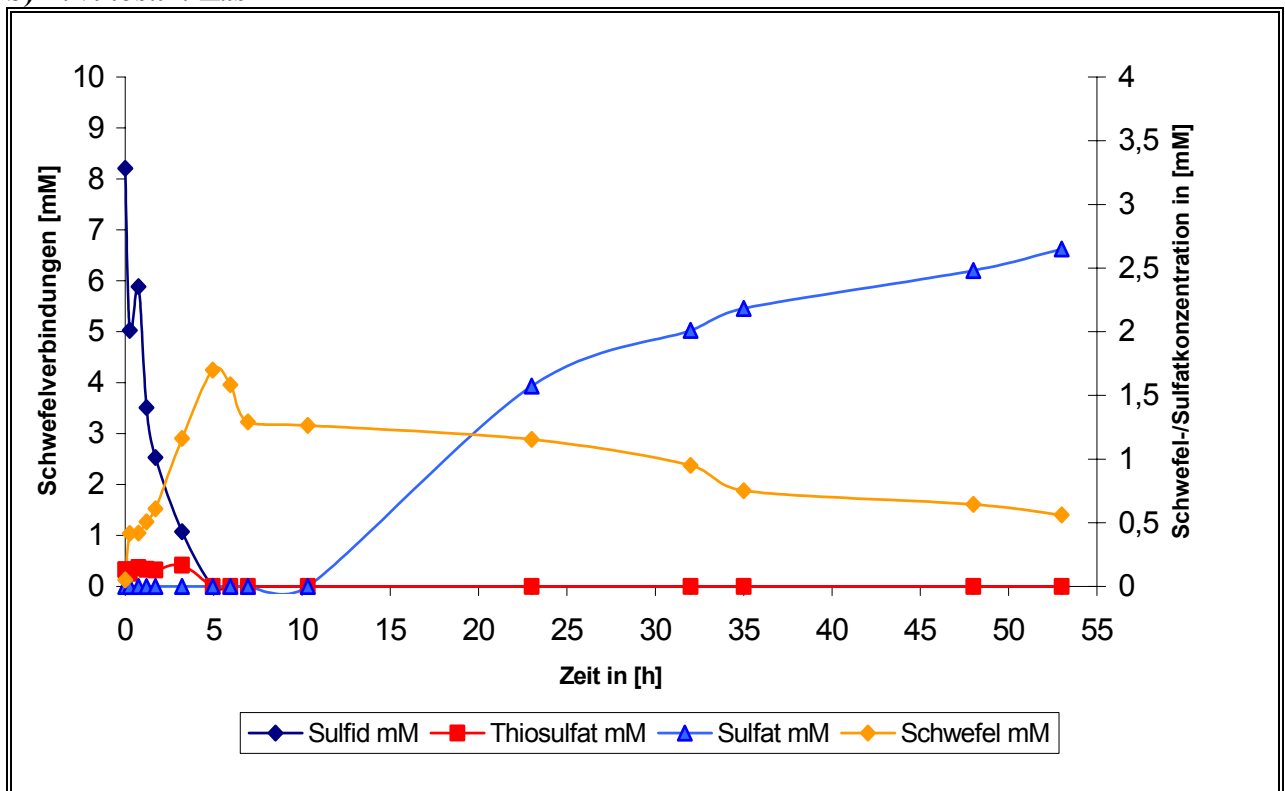


Abb. 3.52: Umsatz von Sulfid durch a) *Allochrodatum vinosum* Rif 50 und durch b) die Mutante *Allochrodatum* $\Delta dsrEFH$. Der Proteingehalt stieg in 24 Stunden beim Wildtyp von 0,206 mg/ml auf 0,237 mg/ml Protein an; bei der Mutante $\Delta dsrEFH$ stieg der Proteingehalt von 0,248 mg/ml innerhalb von 24 Stunden auf 0,267 mg/ml Protein an.

Erste messbare Sulfatwerte wurden beim RifA50 nach ca. 5 Stunden ermittelt, siehe **Abb. 3.52**, in der der zeitliche Verlauf der Sulfidoxidation zu Sulfat durch *A. vinosum* Wildtyp RifA50 und $\Delta dsrEFH$ -Mutante dargestellt ist. Bei der $\Delta dsrEFH$ -Mutante wurden Sulfatwerte erst nach ca. 23 Stunden gemessen. Die Oxidation des Schwefels zum Sulfat verzögert sich um 17 Stunden im Vergleich zum Wildtyp. Die $\Delta dsrEFH$ -Mutante schien somit noch in der Lage zu sein, den Schwefel abzubauen, wenn auch der Abbau des Schwefels sehr viel langsamer erfolgte als beim Wildtyp (**Abb. 3.52 a. u. b**). Die Abnahme des Schwefels in den Proben erfolgte bi-phasisch, wie an dem gebildeten Plateau zwischen der 25. und der 30. Stunde (**Abb. 3.52 b.**) zu erkennen ist. Danach wurde eine weitere Abnahme der Schwefelkonzentration und demzufolge ein leichter Anstieg der Sulfatkonzentration beobachtet. Der intrazellulär abgelagerte Schwefel wurde von der $\Delta dsrEFH$ -Mutante während der Versuchsdauer nicht komplett oxidiert. $\Delta dsrEFH$ baute den bei der Sulfidoxidation gebildeten Schwefel mit einer um 92% verringerten Oxidationsrate gegenüber dem Wildtyp ab (Mutante: 0,91 nmol/min·mg Protein) (Wildtyp: 12,04 nmol/min·mg Protein). Diese Ergebnisse zeigten, dass $\Delta dsrEFH$ tatsächlich in ihrem Schwefelstoffwechsel beeinträchtigt war.

4 Diskussion

4.1 DsrEFH aus *Allochromatium vinosum*

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung der cytoplasmatischen Proteine DsrE, DsrF, DsrH und DsrC aus dem Schwefelpurpurbakterium *Allochromatium vinosum*, um ihre physiologische Funktion im oxidativen Schwefelstoffwechsel zu klären. Zuerst wurde die tatsächliche Existenz der Proteine in der löslichen Proteinfraction bestätigt. DsrE, DsrF, DsrH und DsrC sind alles lösliche Proteine, die im Cytoplasma von *A. vinosum* vorliegen. Die Proteine DsrE, DsrF und DsrH wurden aus *A. vinosum* erstmals homogen aufgereinigt. Analysen der molekularen Massen und Western-Blot-Experimente zeigten, dass die drei Polypeptide Untereinheiten eines einzigen Proteins sind. Alle drei Polypeptide liegen im Holoprotein in einem Verhältnis 1:1:1 vor, s. **Abb. 3.7**. Die molekulare Masse des DsrEFH-Holo Proteins beträgt 83 kDa. Dies lässt den Schluss zu, dass DsrE, DsrF und DsrH in Form eines Proteinheterohexamers mit einer Struktur von $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ vorliegen.

Sulfidinduktionsexperimente zeigten, dass die Proteine DsrEFH nur unter photolithoautotrophen Bedingungen und nur in Gegenwart von Sulfid gebildet werden. Unter photoorganoheterotrophen Bedingungen waren die Proteine nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die Proteine für die Schwefeloxidation wichtig sind. Die Effekte einer Deletion der *dsrEFH*-Gene auf die Schwefeloxidation von *A. vinosum* wurden in dieser Arbeit durch vergleichende Wachstumsversuche untersucht. Erste Hinweise auf einen Phänotyp brachten Versuche in 100ml Batch-Kulturen, in denen die Zellen photomixotroph auf malathaltigem Medium mit Sulfid oder photolithotroph auf Thiosulfatmedium angezogen wurden (s. Grimm, 2004). *A. vinosum* $\Delta dsrEFH$ war unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr dazu in der Lage, den bei der Sulfid- bzw. bei der Thiosulfatoxidation gebildeten Schwefel abzubauen. Die deletierten Gene schienen demnach essentiell für die Schwefeloxidation zu sein. Die Ergebnisse des photolithotrophen Wachstums unter kontrollierten Bedingungen im Fermenter unterschieden sich jedoch von den Versuchen mit den 100ml Batch-Kulturen. Die Mutante $\Delta dsrEFH$ zeigte, dass sie unter den gegebenen Bedingungen noch in der Lage war den Schwefel zu oxidieren. Die Schwefeloxidation setzte deutlich verzögert gegenüber dem Wildtyp ein. Sulfat wurde erst nach 23 Stunden gefunden. Wie in der **Abb. 3.52** zu erkennen ist, erfolgte der Abbau des Schwefels bi-phasisch. Nach einem kleinen Plateau zwischen der 25. und 30. Stunde wurde ein weiterer Abbau des Schwefels beobachtet, dieser spiegelte sich auch in einem leichten Anstieg der Sulfatkonzentration wieder. *A. vinosum* $\Delta dsrEFH$ zeigte eine um 92 % verminderte Oxidationsrate im Vergleich zum Wildtyp (Wildtyp: 12,04 nmol/min x mg; Mutante: 0,91 nmol/min x mg). Das Ergebnis bestätigte, dass die Mutante in

ihrem Schwefelstoffwechsel eingeschränkt ist. Die deletierten Gene sind offensichtlich wichtig, wenn auch nicht essentiell für die Schwefeloxidation.

Nachdem die Proteine homogen aufgereinigt wurden, und auch gezeigt werden konnte, dass die Proteine wichtig sind für die Schwefeloxidation, war das nächste Ziel dieser Arbeit, der Funktion der Proteine DsrE, DsrF und DsrH aus *A. vinosum* näher zu kommen. Genbankvergleiche ergaben, dass das *dsrE*-Gen zu seinen direkt benachbarten Genen *dsrF* und *dsrH* homolog ist. Die entsprechenden Proteine sind außerdem homolog zu hypothetischen Proteinen aus *E. coli*, *H. influenzae*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* MTH1357, 58, 60 (Pott und Dahl, 1998). Bislang konnte jedoch für keines dieser homologen Proteine eine Funktion ermittelt werden. Ein Hinweis darauf, dass DsrF aus *A. vinosum* möglicherweise Schwefeltransferase-Aktivität ausüben könnte, stammte aus einer früheren Doktorarbeit (Schwarz, 2001). In dieser Arbeit konnte zwar für das isolierte und gereinigte DsrF-Protein *in vitro* geringe Schwefeltransferase-Aktivität nachgewiesen werden, weitere Versuche, die Schwefeltransferase-Aktivität auch *in vivo* nachzuweisen, waren jedoch erfolglos. Eine ungeeignete Methode zum Nachweis der Rhodaneseaktivität war auch die damals durchgeführte Aktivitätsfärbung. Weiterhin erfolglos war die getrennte Überexpression der Proteine DsrE, DsrF und DsrH in *E. coli*. DsrE, DsrF und DsrH, die als Fusionsproteine mit Thioredoxin in *E. coli* exprimiert wurden, konnten bei der späteren Aufreinigung nicht mehr vom Thioredoxin getrennt werden, und zudem wurde bei den Messungen zur Rhodaneseaktivität der Rohextrakte der drei Fusionsproteine im Vergleich zu den Rohextrakten vom *A. vinosum* Wildtyp nur eine Verringerung der spezifischen Aktivität festgestellt (Schwarz, 2001). DsrF verfügt über einen Cysteinrest, der potentiell für die Ausübung der Schwefeltransferase-Reaktion hätte geeignet sein können. Da der Cysteinrest im DsrF nicht konserviert ist, ist diese Reaktion eher nur artifiziell einzustufen. DsrE dagegen verfügt über einen hoch konservierten Cysteinrest. Somit ließ sich nicht ausschließen, dass DsrE eine Schwefeltransferase-Reaktion katalysieren könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen und um die von Schwarz (2001) nicht überzeugend dargestellte These der Schwefeltransferasefunktion von DsrF zu widerlegen, wurden in dieser Arbeit während der Aufreinigung der drei Proteine DsrEFH aus *A. vinosum* die Proteinfractionen auf Rhodaneseaktivität untersucht. Das im Ergebnisteil dargestellte Diagramm zur Bestimmung der Gesamtaktivität, sowie die Reinigungstabelle belegen, dass von homogen aufgereinigtem DsrEFH keine Rhodaneseaktivität ausgeübt wird. Ein weiterer Versuch zur Funktionsbestimmung des aufgereinigten DsrEFH-Proteinhexamers war der Nachweis von Polysulfid-Schwefeltransferase-Aktivität. Allerdings konnte für homogen aufgereinigtes DsrEFH keine Polysulfid-Schwefeltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

Da es mit den bis dato verfügbaren Informationen sehr schwierig war, eine Funktion für DsrEFH zu postulieren, mussten andere Wege beschritten werden. Nachdem klar war, dass die Proteine

DsrEFH aus *A. vinosum* zusammen gehören und ein Heterohexamere bilden, wurde zunächst eine gemeinsame Überexpression aller drei Proteine in *E. coli* durchgeführt. Dies war wichtig, da die Ausbeute an DsrEFH aus *A. vinosum* zu gering war, um weitergehende Untersuchungen durchzuführen. Das Anfügen eines aminoterminalen Oligohistidinrestes ermöglichte in dieser Arbeit eine schnelle und vereinfachte Reinigung des rekombinanten DsrEFH-Proteins und außerdem konnte die Ausbeute an aufgereinigtem Protein auf 15 mg pro Liter *E. coli* Kultur erhöht werden. Auf dieser Grundlage konnten nun weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um das hexamere Protein bezüglich seiner physiologischen Eigenschaften zu charakterisieren.

Bei der Betrachtung der Peptidsequenzen von DsrE, DsrF und DsrH fällt auf, dass DsrE und DsrF, je einen, DsrH dagegen zwei Cysteinreste besitzen. Um festzustellen, ob die Polypeptide in der hexameren Konformation möglicherweise über ihre Cysteinreste verknüpft sind, z.B. durch Ausbildung einer kovalenten Disulfidbrücke, wurde ein einfacher experimenteller Nachweis durchgeführt, der darauf beruhte, dass eine aufgereinigte DsrEFH-Proteinprobe mit reduzierenden und alkylierenden Agenzien inkubiert und elektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt wurde. Die Ergebnisse dieser Inkubationsexperimente zeigten, dass die drei Proteinuntereinheiten offensichtlich nicht über kovalente Disulfidbrücken verknüpft sind. Nach Aufkochen des rekombinanten Proteinhexamers ohne Reduktionsmittel waren zusätzliche Banden im SDS-Gel (zwischen 25-35 kDa) erkennbar (**Abb. 3.19** Ergebnisteil). Das bestätigte, dass die neuen Proteinbanden artifiziell gebildet wurden. Vermutlich handelt es sich hierbei um zusätzlich gebildete DsrEF-, DsrEH- bzw. DsrEE-Dimere. Zusätzliche Proteinbanden traten sonst unter reduzierenden und alkylierenden Bedingungen nicht auf. Mit Hilfe der Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS) wurde bestätigt, dass DsrEFH nicht über eine intermolekulare Disulfidbrücke verknüpft sind, da die Polypeptide bei der Ionisation auseinandergerissen wurden. Polypeptide, die über eine kovalente Bindung, z.B. über Disulfidbrücken zusammengehalten werden, würden bei einem Elektronenspray-Ionisationsprozess nicht auseinander fliegen. Massen die direkt auf DsrEF- oder DsrEH-Dimer hinweisen, wurden nicht gefunden. DsrE, DsrF und DsrH dürften demnach anders miteinander interagieren, möglicherweise über hydrophobe Bindungen (s. Strukturanalyse). Durch die ESI-MS-Analyse wurden die Peptidsequenzen und die aus der Nukleotidsequenz postulierten Massen für DsrE, F und H bestätigt. Für die aus *A. vinosum* isolierten Proteine wurden folgende molekulare Massen bestimmt: DsrE (14,590 kDa), DsrF (15,463 kDa) und DsrH (10,954 kDa). Bestätigt wurde auch, dass keine der Proteinuntereinheiten Addukte mit Schwefelverbindungen bildet. Ein großer Vorteil der Überproduktion rekombinanten DsrEFH-Proteins liegt darin, dass das DsrEFH für strukturelle Untersuchungen eingesetzt werden konnte. Die Analyse der dreidimensionalen Struktur von Proteinen kann sehr hilfreich für die Bestimmung der molekularen Funktion eines unbekanntes Proteins sein.

Bevor im nächsten Abschnitt die analysierte Struktur des DsrEFH-Heterohexamers näher diskutiert wird, werden zuerst die für DsrEFH durchgeführten Sequenzvergleiche diskutiert. Die mit Hilfe der ψ -Blast-Suche durchgeführten Sequenzvergleiche für die Proteine DsrE, DsrF und DsrH zeigten, dass es zu DsrEFH homologe Proteine in mehreren schwefeloxidierenden Bakterien, z. B. *T. denitrificans*, *C. tepidum*, *M. magnetotacticum*, *Magnetococcus* sp., gibt. DsrE, DsrF und DsrH homologe Proteine kommen auch in den Enterobacteriaceae, z.B. in *E. coli* CFT073 (entsprechende Proteine werden YheN, YheL, YheM genannt), *Shigella flexneri* oder in *Salmonella enterica*, vor. Weitere DsrEFH-Homologe werden gefunden bei einigen methanogenen Archaea, z.B. *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MTH1357, 58, 60), sowie auch noch bei anderen γ -Proteobakterien, beispielsweise *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas syringae*, *Azotobacter vinelandii*, *Erwinia carotovora*, *Vibrio vulnificus*. Unlängst wurden DsrEFH-Homologe in bislang noch nicht charakterisierten Organismen aus dem Sargasso Meer gefunden.

DsrEFH-homologe Proteine werden jedoch nicht in Sulfatreduzierern gefunden, was auf eine spezifische Funktion dieser Proteine bei der Schwefeloxidation hinweist (Dahl et al., 2005).

Ein zu DsrE homologes Protein ist auch das YchN-Protein aus *E. coli* K12, dessen entsprechendes *ychN*-Gen zufällig im offenen Leserahmen der *chaC-narL* Genregion von *E. coli* K12 gefunden wurde. Das YchN wurde bereits strukturell untersucht (Shin et al., 2002). Die Gruppe DsrE-homologer Proteine gehören zu einem Cluster orthologer Gruppen (COG1553), die in der NCBI Datenbank (National Center für Biotechnologische Informationen) niedergelegt sind (Tatusov et al, 2001). Der Sequenzvergleich der DsrE-Peptidsequenz mit DsrE-homologen Proteinen, darunter auch das YchN aus *E. coli* (s. **Abb. 3.**) zeigt, dass DsrE und das YchN einige identische Aminosäuren besitzen. Die Identität zwischen den Peptidsequenzen von YchN und DsrE ist jedoch deutlich geringer als die zwischen DsrE und zwischen den DsrE-homologen Proteinen, aus der Gruppe schwefeloxidierender Organismen, darunter *Thiobacillus denitrificans*, *Magnetococcus* sp., *Magnetospirillum magnetotacticum* und *Chlorobium tepidum*. Die Identität schwankt hier zwischen 60-45 %. Ähnlich hohe Identitätswerte lassen sich auch für DsrF- und DsrH-homologe Proteine aus schwefeloxidierenden Bakterien zeigen. Die hohe Identität der DsrEFH-Proteine unter den Schwefeloxidierern spricht dafür, dass die Proteine aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind. Stammbaumanalysen von DsrEFH zeigen, dass die Proteine DsrEFH aus *A. vinosum*, *T. denitrificans*, *M. magnetotacticum*, *C. tepidum* und *Magnetococcus* sp. zusammen in eine Gruppe fallen (Sander, 2005). [Dagegen liegen andere DsrEFH homologe Proteine, wie das YheN, YheM, YheL aus *E. coli* oder auch das YchN weit entfernt von dieser Gruppe (Sander, 2005)]. Zu DsrEFH gibt es auch homologe Proteine in *Thermotoga maritima*, das Tm0979, Tm0980 und Tm0981. Ein weiteres DsrE homologes Protein wurde in dem *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MTH1491) gefunden. Sequenzvergleiche dieser Proteine mit den DsrEFH-

Peptidsequenzen zeigten, dass zwar eine Reihe von Aminosäuren identisch ist, im Vergleich zu den DsrEFH-Homologen aus Schwefeloxidierern ist die Identität aber geringer.

Bei genauerer Betrachtung des DsrE Sequenzalignments (s. Ergebnisteil) fällt insbesondere der Cysteinrest an der Position 78 auf. Dieser Cysteinrest ist bei allen verglichenen DsrE-Homologen konserviert, auch beim Tm0981 aus *T. maritima*, sowie beim MTH1491 aus *M. thermoautotrophicum* und YchN aus *E. coli*. Offenbar handelt es sich hier um einen hoch konservierten Cysteinrest, der für die Proteine von funktioneller Bedeutung sein könnte. YchN aus *E. coli* und das Tm0981 aus *Thermotoga* besitzen noch ein zweites konserviertes Cystein, das Cys 81, das bei DsrE aus *A. vinosum* sowie bei den anderen DsrE-Homologen aus der Gruppe der Schwefeloxidierer nicht vorkommt. Statt des zweiten Cysteinrestes findet sich an dieser Stelle ein konservierter Alaninrest (Ala 81). Auffallend ist die Aminosäuresequenzabfolge **VCVAAAXRRG** (77-86) mit dem hoch konservierten Cys an der Position 78. Diese Aminosäuresequenzabfolge ist besonders gut konserviert bei allen verglichenen DsrE-Peptidsequenzen aus den Schwefeloxidierern, sowie bei dem YheN aus *E. coli*. Einige der DsrF-Homologen, z.B. die aus *E. coli*, *P. profundum*, *V. vulnificus*, besitzen einen zweiten konservierten Cysteinrest, (Cys 79) und die Aminosäureabfolge **VCAAXXXXRG** ist hier ähnlich wie bei DsrE. DsrF aus *A. vinosum* besitzt kein äquivalentes Cys an dieser Position, dafür aber einen Cysteinrest an der Position 40, der jedoch nicht konserviert ist. DsrF, DsrE, und DsrH zeigen bei einem Sequenzvergleich, dass sie sehr ähnliche Aminosäuresequenzen haben. Diese Proteine besitzen nicht nur eine sehr ähnliche Aminosäuresequenzabfolge, sondern sind sich auch in Sekundär- und Tertiärstruktur (später erläutert) recht ähnlich. Da DsrE, DsrF und DsrH recht ähnlich sind und zudem noch gemeinsam aufgereinigt wurden, könnten sie zusammen eine Funktion im Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* ausüben. Neben DsrE besitzt DsrH auch einen hoch konservierten Cysteinrest, das Cys 20. Cys 20 ist bei allen verglichenen DsrH-Homologen konserviert. Hoch konservierte Cysteinreste spielen eine entscheidende Rolle für die Funktion und die Regulation in Proteinen (Leichert et al., 2004). Die SH-Gruppen des Cysteins könnten der Stabilisierung der Struktur dienen durch Ausbildung einer kovalenten Disulfidbrücke, die im Falle des DsrEFH-Proteins jedoch keine Rolle spielt, da die drei Proteine nicht über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind. Cysteine sind auch für die Koordination von Metallionen nützlich. Hinweise auf Metalle gibt es in DsrEFH allerdings nicht. Insbesondere sind hoch konservierte Cysteinreste an Redoxreaktionen beteiligt, bei denen ein Transfer von Elektronen über einen Thiol-Disulfid-Wechsel erfolgen kann (Leichert et al., 2004). Möglicherweise könnten die konservierten Cysteine des DsrEFH aus *A. vinosum* eine Rolle bei Redoxreaktionen spielen.

Nachdem die DsrEFH-Peptidsequenzen hier nun beschrieben und diskutiert wurden, wird in dem folgenden Abschnitt die Struktur des DsrEFH-Proteins diskutiert. Für die Strukturanalyse musste

DsrEFH mit Selenomethionin überexprimiert und mit TCEP aufgereinigt werden. TCEP diente der Stabilisierung des zu kristallisierenden Proteins und Selenomethionin war für die Auflösung der Struktur mittels der SAD-Methode entscheidend. (s. Material & Methode). Das SeMetEFH-Protein wurde erfolgreich gewonnen und die Struktur des rekombinanten Selenomethionin enthaltenden DsrEFH-Proteins wurde Anfang 2005 erfolgreich aufgelöst. Die Kristallstrukturanalyse bestätigte, dass das DsrEFH ein Proteinheterohexamer ist. Das bereits oben erwähnte YchN aus *E. coli* K12 bildet ein Dimer aus Homotrimeren. Beide strukturell untersuchten Proteine besitzen eine zylindrische Ringstruktur, wie in **Abb. 4.1** zu erkennen ist.

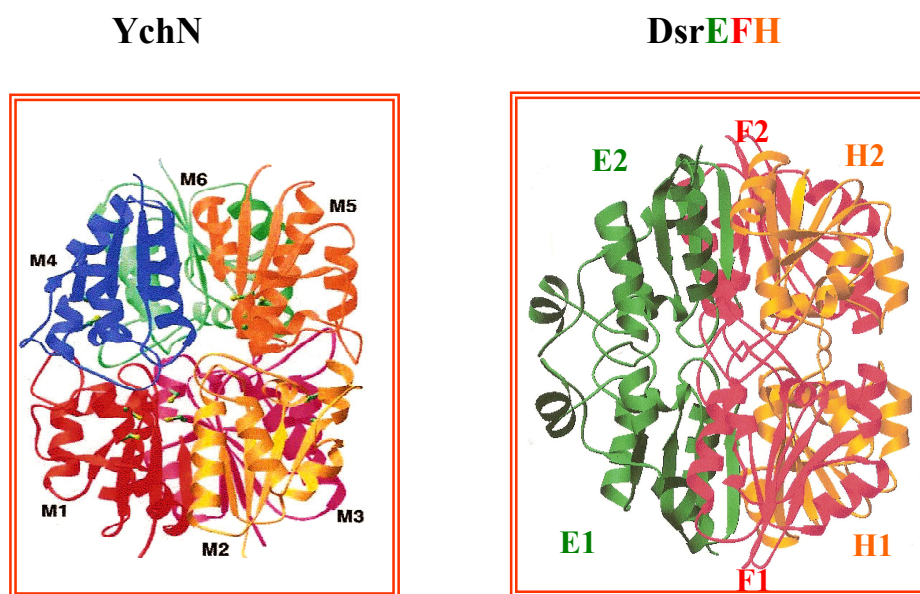


Abb. 4.1: Bänderdiagramme des YchN-Hexamers (PDB: 1XJ7) (Shin et al., 2002) aus *E. coli* K12 und des DsrEFH-Hexamers aus *A. vinosum*. E1,E2= DsrE; F1,F2= DsrF und H1,H2= DsrH

Bei der Betrachtung des Strukturbildes von DsrEFH ist zu erkennen, dass die Untereinheiten des DsrEFH-Hexamers asymmetrisch in einem Ring angeordnet sind. Die Bänderdiagramme der DsrE-, DsrF- und DsrH-Untereinheiten sind unterschiedlich gefärbt, um sie besser zu unterscheiden.

Die drei Untereinheiten des DsrEFH-Proteinhexamers besitzen wie das YchN eine typische Rossmann Faltung, d.h. ein typisches $\beta\alpha\beta$ -Motiv, in dem die β -Stränge zueinander parallel angeordnet sind und die α -Helices antiparallel zu einer Seite des β -Stranges liegen. Fünf dieser β -Stränge liegen in dem jeweiligen DsrE-, DsrF- und DsrH-Protein parallel zueinander und sind recht zentral angeordnet. DsrF besitzt an seinem C-Terminus noch eine besondere Faltungstopologie. Außer den fünf zentral und parallel laufenden β -Strängen liegen im C-terminalen Bereich zwei antiparallel angeordnete β -Stränge. Diese Anordnung zeigen DsrE und DsrH nicht. Von seiner Faltungstopologie scheint DsrE dem YchN-Protein sehr ähnlich zu sein. Alle beide Polypeptide besitzen eine 3_{10} -Helix, die an ähnlicher Position vorliegt. (DsrE: $\beta_1, \alpha_1, \beta_2, G_1, \alpha_2, \beta_3, \alpha_3, \alpha_4, \beta_4, \alpha_5$,

β_5 ; YchN: $\beta_1, \alpha_1, \beta_2, G1, \alpha_2, \alpha_3, \beta_3, \beta_4, \alpha_4, \beta_5$; G1 steht hier für eine 3_{10} -Helix). Eine 3_{10} Helix ist eine kürzere Version einer α -Helix, die aus 3 Aminosäureresten pro Windung besteht. Die 3_{10} Helix ist die abschließende kleine Windung des C-Terminus einer α -Helix. DsrF und DsrH besitzen ebenfalls 3_{10} Helices an ähnlichen Positionen. Strukturelle Informationen liegen auch zu dem bereits erwähnten YchN-Protein aus *Thermotoga maritima* (Tm0979) und zum MTH1491-Protein aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* MTH1491 vor (Gaspar et al., 2005; Christendat et al., 2001). Das untersuchte Protein aus *Thermotoga* soll zum DsrH-Protein aus *A. vinosum* homolog sein. Bei Betrachtung der Peptidsequenzen lassen sich einige Übereinstimmungen finden, jedoch scheinen beide Proteine sowohl strukturell als auch hinsichtlich der Faltung zu divergieren. YchN (Tm0979) aus *T. maritima* ist ein Dimer. Das Tm0979-Monomer besteht aus vier parallel angeordneten β -Strängen. Drei Helices liegen zur einen Seite des Faltblattes und eine vierte Helix zur anderen Seite. Im Zwischenraum des Dimers befinden sich vier Helices, die parallel zueinander liegen und die von zwei β -Faltblättern eingeschlossen werden. Das DsrH-Monomer aus *Allochromatium* dagegen zeigt fünf parallel laufende β -Faltblätter, die etwas gedreht sind. Von der einen Seite werden die β -Faltblätter von zwei gegenläufigen α -Helices und der anderen Seite von einer α -Helix umgeben, zudem läuft eine α -Helix quer zu dem zentralen β -Faltblatt und eine in gleicher Orientierung wie das vierte β -Faltblatt. Die zweite Helix der DsrH-Faltung könnte eine 3_{10} Helix darstellen. Das strukturell untersuchte Protein Tm0979 aus *Thermotoga* ist wahrscheinlich nur ein künstlich erzeugtes Proteinmodell, denn in unmittelbarer Nachbarschaft des Tm0979-Proteins liegen DsrF- (Tm0980) und DsrE- (Tm0981) homologe Proteine, die nicht mit in die strukturellen Untersuchungen von Gaspar und seinen Kollegen einbezogen wurden. Das DsrE homologe Protein aus *M. thermoautotrophicum* MTH 1491 scheint in seiner Sekundärstruktur eher dem YchN aus *T. maritima* zu ähneln als dem DsrE aus *A. vinosum* bzw. dem YchN aus *E. coli*. DsrEFH ist dem YchN aus *E. coli* in seiner Sekundär und Tertiärstruktur ähnlicher als zu den bisher strukturell untersuchten Proteinen aus *T. maritima* und aus *M. thermoautotrophicum*.

Im folgenden Abschnitt wird das mögliche aktive Zentrum des DsrE-Proteins näher betrachtet. In der auf der folgenden Seite dargestellten Abbildung wurden die potentiellen aktiven Zentren vom YchN-Hexamere (linke **Abb. 4.2**) und DsrE (rechte **Abb. 4.3**) gegenübergestellt. In dem YchN-Hexamere wurden neben den hoch konservierten Cysteinresten Cys 78 und Cys 81 noch weitere hoch konservierte Aminosäurereste gefunden, ein Glutaminsäurerest (Glu 16) und zwei Argininreste (Arg 23 und Arg 85). Bei Betrachtung der rechten Abbildung fällt auf, dass in dem Bereich um das hoch konservierte Cystein (Cys 78) von DsrE eine ähnliche Anordnung von Aminosäuren vorzufinden ist. Statt des zweiten Cysteinrestes Cys 81 im YchN-Hexamere, wird ein Alaninrest bei den Proteinen aus den Schwefeloxidierern gefunden. Arginin 85 ist hoch konserviert

in YchN und auch in DsrE von *A. vinosum*. Der nicht konservierte Threoninrest, der die beiden Cysteine Cys 78 und Cys 81 im YchN verbindet, wird im DsrE-Protein von einem hoch konservierten Alaninrest (Ala 80) ersetzt. Serin 43 und Methionin 42 sind ebenfalls Aminosäuren, die im aktiven Zentrum des YchN-Proteins liegen. An ihrer Stelle befinden sich in DsrE ein konservierter Histidinrest (His41) und ein Tyrosinrest (Tyr40). Beides sind hydrophobe Aminosäuren. Begrenzt wird das Cys 78 von unten sowohl beim YchN-Protein, als auch beim DsrE-Protein von einem Phenylalaninrest und einem Leucinrest. Das Phe 40 des YchN ist Phe 38 in DsrE und das Leu 101 des YchN ist Leu 112 in DsrE. Beide Aminosäuren sind hoch konserviert. Der konservierte Glutaminsäurerest 216 des YchN, der von einer anderen Untereinheit des Hexamers stammt wird bei DsrE ebenfalls in dieser Region wiedergefunden. Das Glutamat 224 ist ein hoch konservierter Rest und stammt von der DsrF-Untereinheit des DsrEFH-Proteinhexamers. Die ähnliche Anordnung der Aminosäuren um das Cys 78 in YchN und in DsrE lässt den Schluss zu, dass es sich hier um das aktive Zentrum der Proteine handelt. Die **Abb. 4.4** zeigt nochmals einen Gesamtüberblick über das aktive Zentrum des DsrE, mit dem Cys 78 im Zentrum. Außerdem sind die Wasserstoffbrückenbindungen eingezeichnet, über die das Cys 78 mit den umgebenden Aminosäuren interagiert.

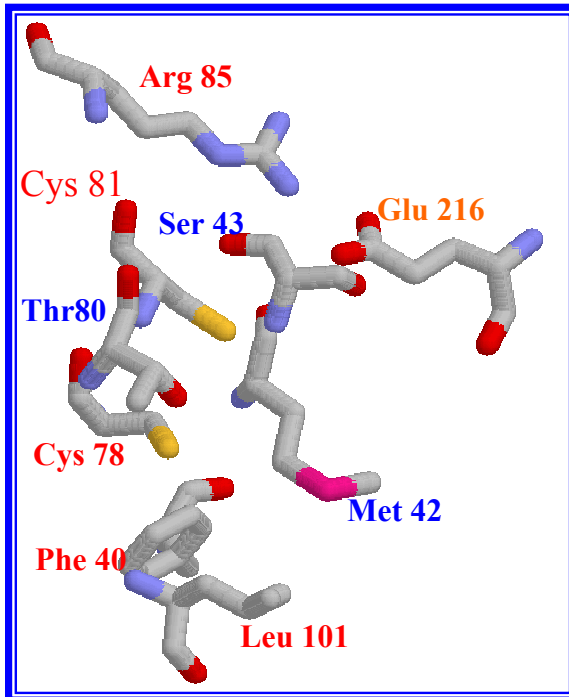


Abb. 4.2: Aktives Zentrum YchN

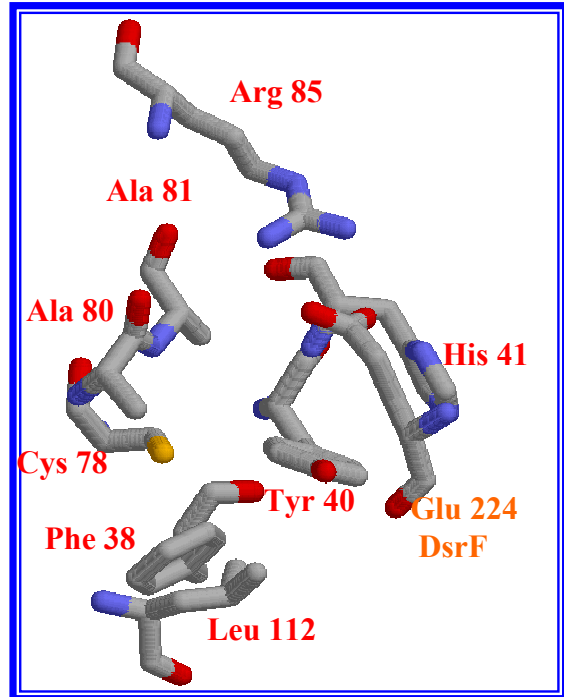


Abb. 4.3: Aktives Zentrum DsrE

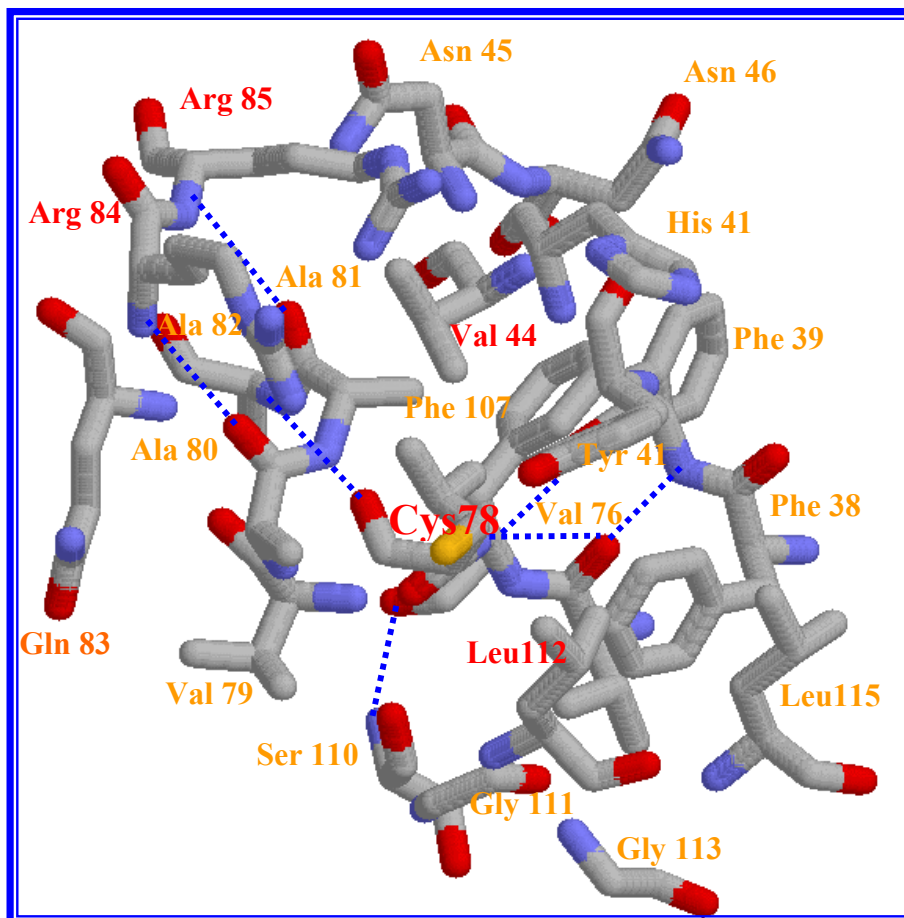


Abb. 4.4: Gesamtansicht des aktiven Zentrums von DsrE. Cys 78 wird von vielen hydrophoben Aminosäuren umgeben: hoch konservierte Reste sind rot, konservierte Reste orange hervorgehoben. Alle Reste sind konserviert in den Schwefeloxidierern. Wasserstoffbrückenbindungen sind als blau gestrichelte Linien dargestellt. Die Abb. 4.2, Abb. 4.3 und Abb. 4.4 wurden mit Hilfe des "Protein-Explorer von Chime" erstellt (Martz, 2002).

Das Cystein 78 wird von hydrophoben Aminosäureresten sowohl aus dem C-Terminus als auch aus dem N-Terminus umgeben (s. **Abb. 4.4**). Diese Aminosäuren sind in allen DsrE-Homologen aus schwefeloxidierenden Prokaryonten konserviert. Einige hydrophobe Aminosäuren sind hoch konserviert, wie z.B. Val 44 und Leu 112, die im YchN aus *E. coli* Val 46 und Leu 101 darstellen. Das Sauerstoffatom des Cys 78 ist mit dem N-Atom des Ala 82 über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden. Das Sauerstoffatom des Ala 81 interagiert mit dem N-Atom des Arg 85 über eine Wasserstoffbrücke. Vergleichbare Wasserstoffbrückenbindungen sind beim YchN-Protein nicht vorhanden. Zu einer Seite liegt das Cystein 78 des DsrE im Proteinmedium exponiert vor. Bei näherer Betrachtung der Oberflächenstruktur des DsrEFH-Proteinhexamers zeigt sich, dass das Schwefelatom zugänglich ist. Ebenfalls nahe an der Proteinoberfläche liegt das Cys 95 des DsrH-Proteins und das Cys 40 des DsrF-Proteins, dagegen liegt der hoch konservierte Cysteinrest Cys 20 des DsrH im Protein verborgen, s. **Abb. 4.5**.

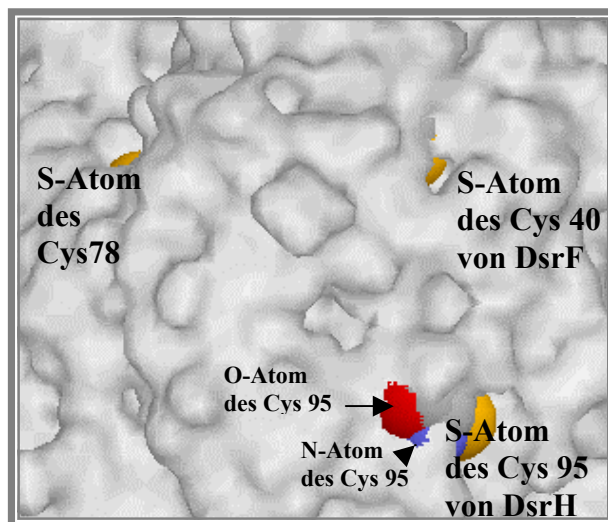


Abb. 4.5: Ausschnitt der Oberfläche des DsrEFH-Hexamers. Dargestellt sind die Cysteinreste von DsrF, DsrH und DsrE, die nahe an der Oberfläche liegen. Die Abbildung wurde mit dem "Protein-Explorer von Chime" erstellt (Martz, 2002).

Weder bei YchN aus *E. coli* noch bei DsrEFH aus *A. vinosum* können die Cysteinreste direkt über kovalente Disulfidbrücken interagieren, da die Abstände zwischen diesen viel zu groß sind. Dieses soll durch eine auf der folgenden Seite dargestellten **Abb. 4.6** verdeutlicht werden. Dargestellt sind die Distanzen zwischen den Cysteinresten des DsrEFH-Hexamers von *A. vinosum*. Der hoch konservierte Cysteinrest des DsrE (Cys 78) und der des DsrH (Cys 20) liegen in einem Abstand von 27,33 Å voneinander entfernt. Diese Distanz ist viel zu groß für die Ausbildung einer kovalenten Disulfidbrücke. Für die Ausbildung einer kovalenten Bindung sollten die Aminosäuren nicht mehr als 2 Å voneinander entfernt liegen. Die Distanzwerte zwischen Aminosäuren sollten gewöhnlich zwischen 2-4 Å liegen, um von einer Wechselwirkung sprechen zu können (Gray et al., 1996).

Da die Abstände zwischen den hier dargestellten Cysteinresten alle viel zu groß sind, können direkte Wechselwirkungen zwischen den Cysteinen ausgeschlossen werden. Für eine Annäherung der Cysteinreste müsste das Proteinhexamer einen Konformationswechsel durchführen.

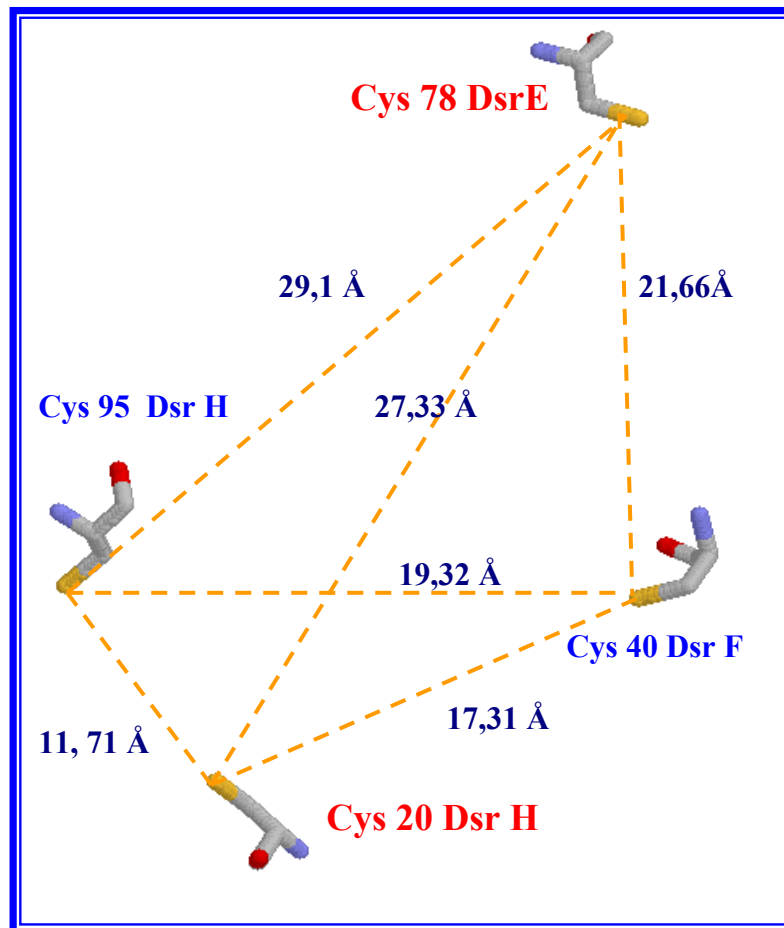


Abb. 4.6: Distanzen zwischen den Cysteinresten der DsrE-, DsrF- und DsrH-Proteinuntereinheiten; Å = Ångström Die Abbildung wurde mit dem Protein-Explorer von Chime erstellt (Martz, 2002).

Eine weitere Beobachtung, die bei der Analyse der Struktur des DsrEFH-Proteinhexamers gemacht wurde, ist dass in der Nähe des hoch konservierten Cysteinrestes Cys 20 des DsrH-Polypeptids zwei hydrophobe Aminosäurereste liegen, ein Histidin- und ein Tryptophanrest.

Beide Aminosäuren His 5 und Trp 101 sind Aminosäuren des DsrH-Polypeptids und liegen bei allen DsrH-Homologen konserviert vor. Das His 5 liegt N-terminal und das Trp 101 C-terminal. Die Distanzen zwischen dem His 5 und Trp 101 und dem Cys 20 des DsrH sind so klein, dass eine Wechselwirkung zwischen diesen Aminosäuren möglich ist (siehe nachfolgende **Abb. 4.6**).

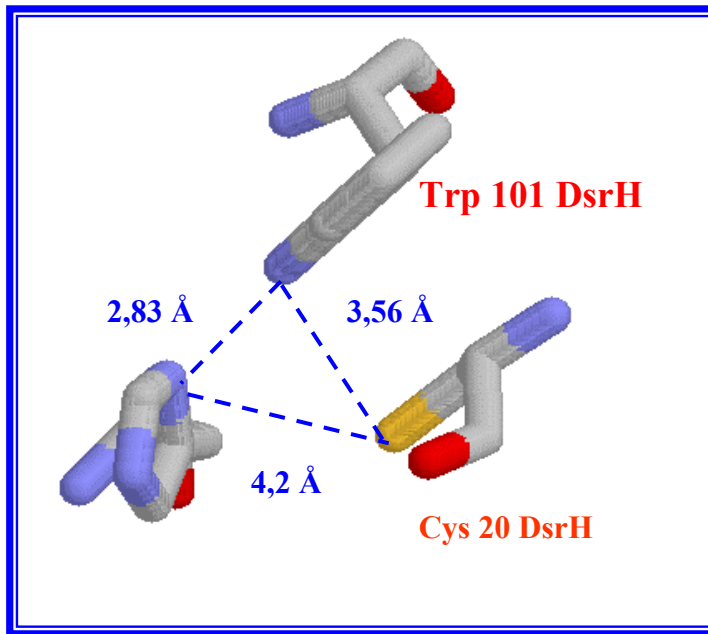


Abb. 4.7: Cys 20 des DsrH, umgeben von His 5 (N-Terminus) und Trp 101 (C-Terminus), sind hoch konservierte Aminosäuren der DsrH-Peptidsequenz. Die Abbildung wurde mit dem "Protein-Explorer von Chime" erstellt (Martz, 2002).

Nachdem nun mit der **Abb. 4.6** gezeigt werden konnte, dass die Cysteinreste in den Proteinuntereinheiten des Hexamers viel zu weit auseinander liegen, um untereinander über eine intermolekulare Disulfidbrücke zu interagieren, stellt sich die Frage, wie die Cysteinreste der Proteinuntereinheiten alternativ untereinander in Kontakt kommen können.

Eine Alternative wäre, dass die Aminosäuren in den Proteinen untereinander über hydrophobe Wechselwirkungen in Kontakt stehen. Eine hydrophobe Umgebung um einen aktiven Cysteinrest ist in Redox-Proteinen oft beobachtet worden (Fabianek et al., 2000; Shin et al. 2002).

In der **Abb. 4.4** ist zu erkennen, dass im Bereich um das aktive Cystein des DsrE auch sehr viele hydrophobe Aminosäuren liegen. Insbesondere häufen sich sehr viele hydrophobe Aminosäurereste mit aromatischen Ringen um das aktive Cystein (Cys 78) des DsrE an (s. **Abb. 4.8**), darunter sehr viele Phenylalanine, Tyrosine, sowie einige Histidin- und Tryptophanreste. Ähnlich wie bei einer Perlenkette reihen sich diese Aminosäuren zwischen den Cysteinresten auf. Viele dieser aromatischen Aminosäuren sind in der Peptidsequenz von DsrE konserviert, z.B. die Phenylalanine Phe 38 und Phe 39. Beide Phenylalaninreste sind konserviert bei allen DsrE-Homologen aus der Gruppe der Schwefeloxidierer, beim YheN aus *E. coli*, beim YchN aus *T. maritima* und auch bei dem YchN aus *E. coli* K12. Das Phe 38 des DsrE entspricht dem Phe 40 im YchN aus *E. coli* K12. Phe 40 ist ebenfalls konserviert in allen YchN homologen Proteinen. Die folgende **Abb. 4.7** zeigt die hydrophobe Kette von Aminosäuren zwischen den Cysteinen des DsrE, DsrF und DsrH.

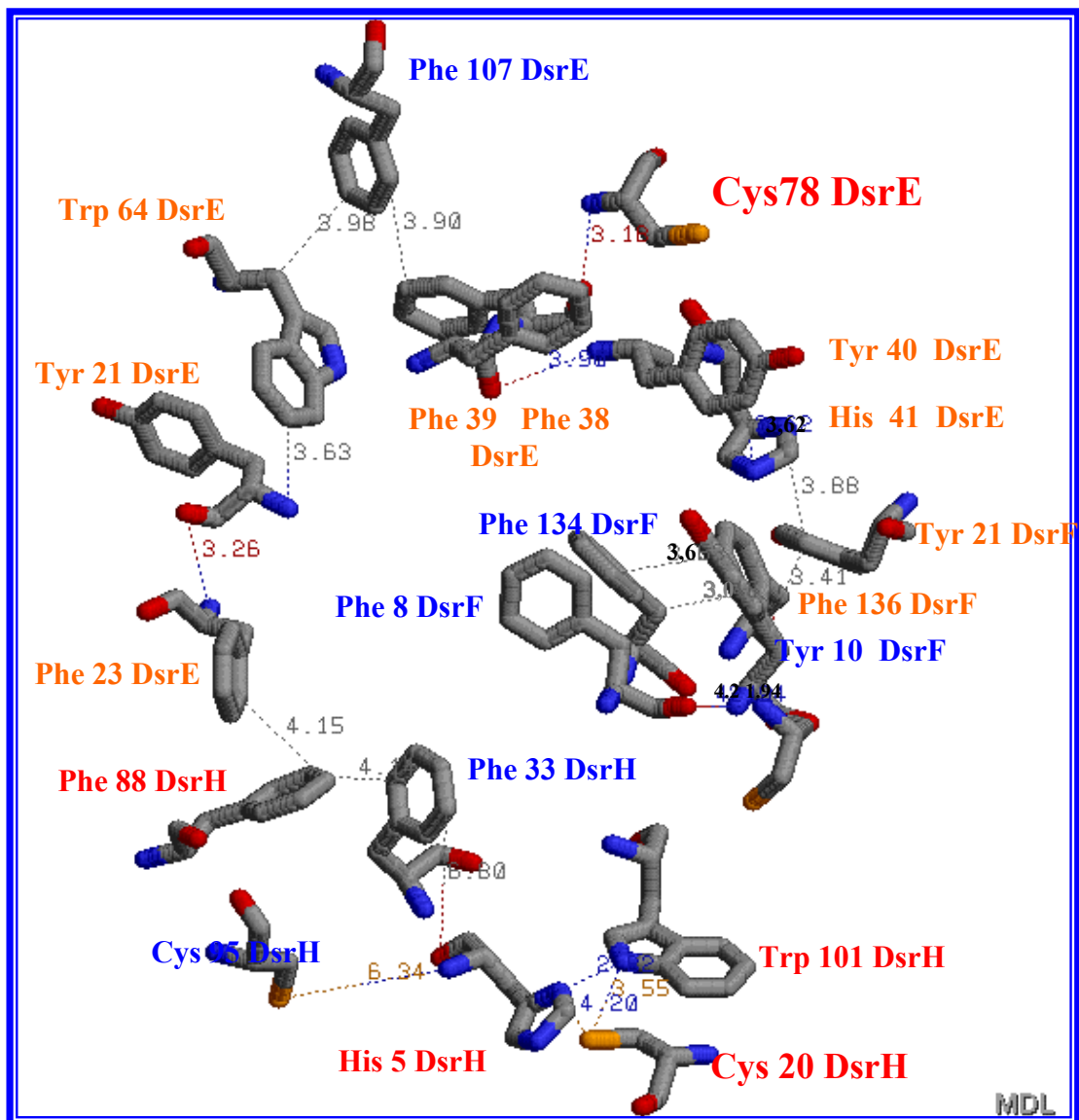


Abb. 4.8: Hydrophobe Kette von Aminosäuren zwischen den Cysteinresten des DsrEFH-Hexamers. Abstände zwischen den Aminosäuren sind in Ångström angegeben Die Abbildung wurde mit dem "Protein Explorer von Chime" erstellt (Martz, 2002).

In der **Abb. 4.8** sind die Abstände zwischen den hydrophoben Aminosäuren, meistens die Eckabstände zwischen den Ringen, aufgeführt. Aminosäuren, die bei allen DsrE-homologen Schwefeloxidierern konserviert vorliegen, sind orange, hoch konservierte Aminosäuren rot und nicht konservierte blau hervorgehoben worden. Zudem wurden die Distanzen zwischen den Aminosäuren berechnet, um zu sehen, ob die Abstände klein genug sind, dass eine Interaktion zwischen diesen Aminosäuren möglich ist. Die Distanzen zwischen den hydrophoben Aminosäuren, die zwischen den Cysteinen des DsrE und des DsrF liegen, betragen meistens 2-4 Å. Diese Abstände sind klein genug, dass zwischen den hydrophoben Aminosäuren eine Wechselwirkung erfolgen könnte. Vorstellbar wäre, dass die Cysteinreste der DsrE- und der DsrF-

Untereinheit über die Kette hydrophober Aminosäuren in Verbindung stehen. Eine Verbindung der hoch konservierten Cysteinreste der DsrE- und der DsrH-Untereinheiten in dem Hexamers über eine Kette hydrophober Aminosäuren ist eher unwahrscheinlich, da die Abstände zwischen den hydrophoben Aminosäuren teilweise größer sind als 4 Å. Eine weitere Beobachtung, die beim Betrachten der Struktur des Hexamers gemacht wurde, ist, dass zwischen der DsrH- und der DsrF-Untereinheit ein tiefer Spalt liegt (Abb. 4.9). Die Distanzen zwischen den hydrophoben Aminosäuren in diesem Bereich sind meist größer als 4 Å. Eine direkte Verbindung der Cysteinreste von DsrF und DsrH lässt sich über eine Kette von hydrophoben Aminosäuren nicht darstellen.

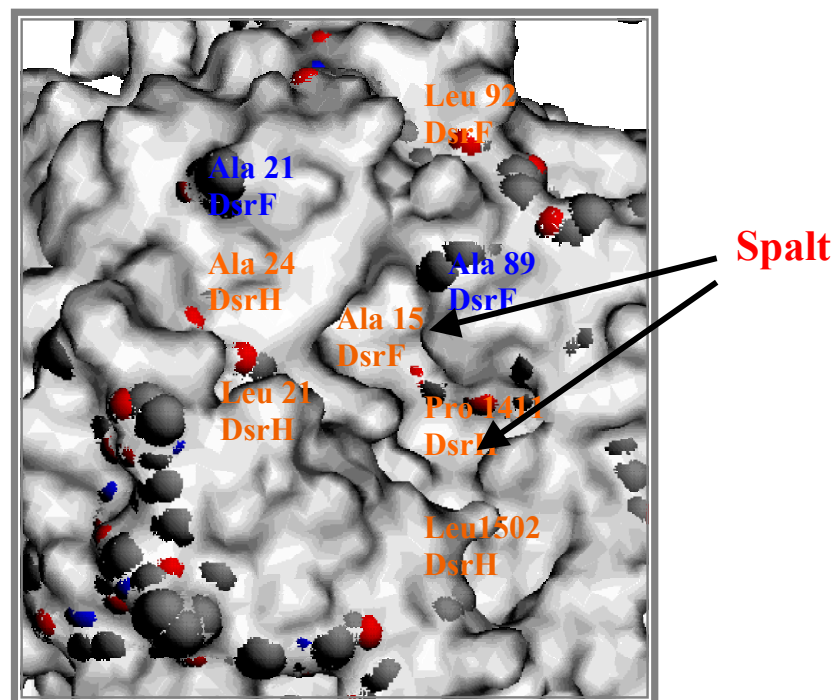


Abb. 4.9: Spalt zwischen den DsrF- und DsrH-Untereinheiten des Hexamers. Konservierte Aminosäurereste (bei allen Schwefeloxidierern) sind orange, nicht konservierte sind blau gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit dem "Protein Explorer von Chime" erstellt (Martz, 2002).

Die hydrophobe Umgebung um das aktive Cystein des DsrE könnte auch eine Rolle bei einem intermolekularen Elektronentransfers spielen. In Redox-Proteinen wurde beobachtet, dass Elektronenkopplungen über eine Kette von hydrophoben Aminosäureresten erfolgen können. Die hydrophoben Ketten umspannen den Raum zwischen zwei Redoxzentren. Die Eckabstände zwischen den hydrophoben Resten sollten dabei um 4 Å liegen. Ein Problem dieser Betrachtung ist, dass Elektronenkopplungen bislang nur in Redoxproteinen beobachtet wurden, die Eisen oder Molybdän als Kofaktoren besitzen (Gray und Winkler, 1996, Page et al., 2003). Die

Peptidsequenzen der Proteine DsrEFH weisen aber keine Bindungsstellen für derartige Kofaktoren auf. Hydrophobe Aminosäuren, wie das Tyrosin und das Tryptophan sind oft Bestandteil hydrophober Ketten in Redoxproteinen. Bei genauer Betrachtung der **Abb. 4.7** fällt auf, dass zwischen den konservierten Cysteinen von DsrE und DsrH auch einige hydrophobe Tryptophan- und Tyrosinreste liegen. Hydrophobe Aminosäuren mit aromatische Ringen, wie Tyrosin, oder Tryptophan besitzen delokalisierte π -Elektronenwolken, die es ermöglichen mit anderen π -Systemen in Wechselwirkung zu treten, um Elektronen zu übertragen. In Redox-Proteinen mit bekannter Struktur wurden Übertragungen von Elektronen durch das Proteinmedium über Entfernungen bis zu 14 Å beobachtet (Page et al., 1999). Andere Forscher, die sich mit dem Elektronentransfer in Proteinen intensiv beschäftigt haben, berichten, dass van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen essentiell für einen Elektronentransfer über Protein-Protein-Zwischenräume sind (Tezcan et al., 2001). Winkler und Gray postulierten, dass Kopplungen über kovalente und über Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen viel stärker sein können als zwischen den van-der-Waals-Abständen (Winkler und Gray 2005). Ob im DsrEFH-Proteinhexamer ein "Elektronen Tunneling " zwischen einem aktiven Cysteinrest (Cys 78) und einem anderen Cysteinrest des Hexamer stattfinden könnte, ist eher fraglich, da die Elektronen Distanzen von mehr als 14 Å überwinden müssten.

Eine hydrophobe Umgebung um einen aktiven Cysteinrest wurde auch bei den 2-Cys-Peroxiredoxinen beobachtet. Im Falle der Peroxiredoxine scheint die hydrophobe Umgebung dafür zu sorgen, dass der Thiolstatus des aktiven Cysteins aufrecht erhalten bleibt, bevor es sich an der Umsetzung von Peroxiden beteiligt (Schröder et al., 2000). Peroxiredoxine (Prxs) sind eine weitverbreitete Familie thiol-spezifischer antioxidierender Proteine, die eine Reduktion von Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit und Peroxiden katalysieren. In Säugetieren kontrollieren Peroxiredoxine die von Cytokinen induzierte Signaltransduktion (den Peroxid-Level) (Wood et al. 2002). Alle bislang charakterisierten Prxs besitzen einen strikt konservierten katalytischen Cysteinrest im N-Terminus, das peroxidative Cystein. Prxs teilen alle den gleichen grundlegenden katalytischen Mechanismus (Poole et al, 2004; Echalié et al., 2004). Eine Reduktion von Peroxid beginnt mit einem Angriff des katalytischen Cysteins (peroxidatives Cystein) auf ein Sauerstoffatom des Peroxids, wodurch die O-O Bindung gespalten wird. Die entstandene Sulfensäure wird von einem weiteren Cystein angegriffen (auflösendes Cystein), wodurch ein Disulfid entsteht und H₂O freigesetzt wird. Das auflösende Cystein kann von der gleichen Polypeptidkette oder von einem anderen Monomer im Dimer oder von einem Thioredoxin oder Glutathionredoxin stammen (Copley et. al 2004). Dass von DsrEFH eine Peroxiredoxin-Funktion ausgeübt werden kann, ist eher unwahrscheinlich. Gegen diese Vorstellung spricht erstens, dass im Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* keine Peroxide vorkommen, zweitens besitzt das DsrE-

Protein keinen zweiten Cysteinrest, der die Aufgabe des auflösenden Cysteins übernimmt. Vorstellbar wäre zwar, dass das Cys 20 des DsrH-Proteins eine solche Funktion übernehmen könnte, dagegen spricht aber die viel zu große Distanz zwischen den Cysteinresten der DsrE- und der DsrH-Untereinheiten (27 Å). Allerdings wurde bei Untersuchungen des aktiven Zentrums der 2-Cys-Peroxidasen beobachtet, dass die Schwefelatome des auflösenden und des peroxidativen Cysteins im reduzierten Zustand mehr als 13,8 Å voneinander entfernt vorliegen und dass für die Ausbildung einer Disulfidbrücke eine Konformationsänderung erfolgen muss (Alphey et al., 2000; Declercq et al., 2001). Im Falle von DsrEFH wäre eine Konformationsänderung vorstellbar, um die entfernt liegenden Cysteine näher zusammen zu bringen. In einem späteren Teil der Diskussion wird über die Konformationsänderung in DsrEFH nochmals diskutiert. Im Hinblick auf den Aufbau der aktiven Zentren von Peroxiredoxinen und von DsrEFH lassen sich kaum Übereinstimmungen finden. Alphey und seine Kollegen (Alphey et al., 2000) haben beobachtet, dass ein Wassermolekül das aktive Zentrum der Peroxiredoxine besetzt und dass es über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe des peroxidativen Cysteins (dem Cys 52) und dem NH₂ eines Arginins, sowie mit einem Threoninrest, interagiert. Ein äquivalentes Wassermolekül, das mit der Carbonylgruppe des Cysteins 78 und dem NH₂ eines Argininrestes über eine Wasserstoffbrücke verknüpft ist, lässt sich im aktiven Zentrum von DsrE nicht beobachten. Unterschiede zwischen den Prxs und dem DsrEFH bestehen auch im Aufbau ihrer Struktur. DsrE unterscheidet sich insbesondere in seiner Faltungstopologie von den Prxs. Prxs bilden ein siebensträngiges zentrales β -Faltblatt, das von 5 α -Helices umgeben wird. Ein unabhängiges, zweisträngiges β -Faltblatt liegt in einer Schleife, die die α -Helix 4 und das β -Faltblatt 8 verbindet. DsrE dagegen besitzt ein fünfsträngiges zentrales β -Faltblatt, das von 6 α -Helices umgeben wird. Sequenzvergleiche der DsrE-Peptidsequenz mit der Peptidsequenz von 2-Cys-Peroxiredoxinen lassen keine überzeugende Homologie erkennen. Um nochmals auf den katalytischen Zyklus zurückzukommen, der von Peroxiredoxinen durchgeführt wird, lässt sich im Hinblick auf das DsrEFH-Protein mit großer Wahrscheinlichkeit eine Peroxidasefunktion ausschließen. Vorstellbar wäre jedoch, dass DsrEFH eine Art Persulfidase-Funktion ausübt. Möglicherweise könnte es eine ähnliche Reaktion katalysieren, wie sie für die Peroxiredoxine (AphC) und die Flavoprotein-Reduktasen (AhpF) beschrieben wurden (Poole, 2004; Ritz et al., 2001, Wood et al., 2001), indem das DsrEFH statt des Peroxids ein Persulfid angreift und dieses in H₂S umwandelt, z.B. in folgender Weise:

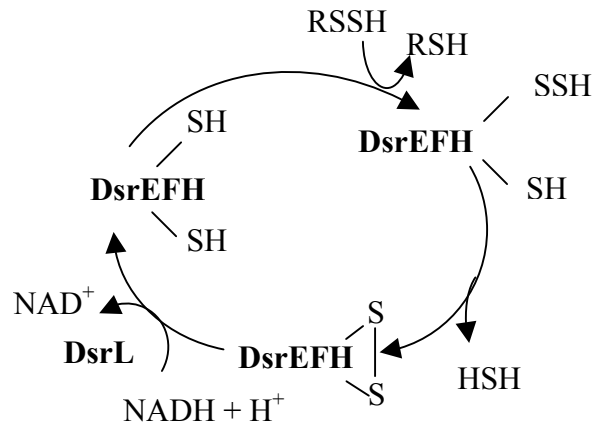


Abb. 4.10: Schematisches Modell für die **Persulfidase-Aktivität** von **DsrE**

Wie in der **Abb. 4.10** zu erkennen ist, wurde DsrL in die Reaktion mit einbezogen. DsrL würde in diesem Modell die Flavoprotein-Disulfid-Reduktase-Funktion übernehmen, die gewöhnlich die Aufgabe hat, die Peroxidasen während der Katalyse wieder zu regenerieren (Poole, 1996, 2000; Argyrou und Blanchard, 2004). Tatsächlich konnte jetzt für DsrL eine Diaphoraseaktivität gezeigt werden (Lübbe, 2005). Die Diaphorase könnte durchaus eine solche Reaktion, wie sie hier im Modell dargestellt ist, katalysieren. Die Blast-Suche zeigte, dass DsrL aus *A. vinosum* zu Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase-Proteinen homolog ist. Zu der Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase gehören die Flavin-Disulfid-Reduktasen, sowie alle Oxidoreduktasen (der Klasse 1 und 2), die NADH-Oxidasen und die Peroxidasen. Alle diese Enzyme besitzen eine NADH bindende Domäne und eine FAD bindende Domäne und in CXXC-Motiv. Das DsrL-Protein aus *A. vinosum* besitzt ebenfalls eine FAD und eine NADH bindende Domäne und in seinem C-Terminus ein CXXC-Motiv, das für eine derartige Redoxreaktion wichtig ist. Bislang konnte jedoch unter den gegebenen Bedingungen für DsrL keine Disulfid-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden (Lübbe, 2005). DsrL wurde zudem mit DsrAB, d.h. mit der dissimilatorischen Sirohämamid-Sulfitreduktase aus *A. vinosum* aufgereinigt, so dass es wahrscheinlicher ist, dass diese beiden Proteine in einer engeren funktionellen Wechselbeziehung stehen als DsrL mit DsrEFH. Für DsrL wurde jetzt auch noch eine andere Funktion im Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum* postuliert (Lübbe, 2005).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass es DsrE- und DsrF-ähnliche Domänen auch bei anderen Proteinen gibt. Bei einer Suche nach DsrE- bzw. DsrF-homologen Proteindomänen werden für diese Proteine ähnliche Domänen neben einem SirA-Protein gefunden (einem möglichen Redox-Protein, bzw. einem Regulatorprotein für die Bildung von Disulfidbindungen). DsrE/F - ähnliche Domänen werden auch bei Proteinen gefunden, die neben der SirA-Domäne noch eine Rhodanese ähnliche und eine Pyridine-Nukleotid-Disulfide-Oxidoreduktase-ähnliche Domäne

besitzen. Obwohl mit Hilfe der Strukturanalyse von DsrEFH sehr viele neue und wichtige Informationen über das Proteinhexamer hinzugewonnen wurden, kann noch keine konkrete Aussage zu der Funktion gemacht werden. Bisher konnte für keines der strukturell untersuchten DsrE verwandten Proteine eine Funktion ermittelt werden, weder für das YchN aus *T. maritima*, noch für das YchN aus *E. coli*, sowie auch nicht für das MTH1491-Protein aus dem *M. thermoautotrophicum*. Für das YchN aus *T. maritima* wurde eine Flavodoxin-ähnliche Funktion vorgeschlagen (Gaspar et al., 2005). Experimentelle Untersuchungen dazu waren aber erfolglos. Ein Problem dieser Studie war, dass die Forscher nur ein Protein strukturell untersuchten, das dem DsrH-Protein aus *A. vinosum* angeblich ähnlich ist. Jedoch besitzt auch *T. maritima* DsrE- und DsrF-homologe Proteine, die Tm0981- und Tm0980-Proteine. Die Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Proteine Tm0980 und Tm0981 mit dem strukturell untersuchten Tm0979 eine Einheit bilden, wie das DsrEFH aus *A. vinosum*. Um eine Funktion postulieren zu können, müssten wahrscheinlich alle drei Proteine in die experimentellen Untersuchungen mit einbezogen werden. Für das strukturell untersuchte YchN-Protein aus *E. coli* wurde eine 2-Cys-Peroxidoredoxin-Funktion, bzw. eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase Funktion vorgeschlagen (Shin et al., 2002). Die Peptidsequenzen des DsrEFH besitzen jedoch kein CXXC-Motiv, so dass eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase-Funktion auszuschließen ist. Unlängst haben Ritz und Mitarbeiter (Ritz et al., 2001) festgestellt, dass Peroxiredoxine aus *E. coli* konvertieren zwischen einer nativen Wildtypform (AphC) und einer neuen spontan mutierten Spezies (AphC*). Die Mutante hat keine Peroxidase-Aktivität mehr, sondern übt eine neue biologische Funktion aus, eine Art Disulfid-Reduktase-Aktivität. Die Disulfid-Reduktase vermittelt die Elektronen weiter an ein Glutathion/Glutaredoxin-System (Poole, 2004). Ein Charakteristikum dieser Disulfid-Reduktase ist, dass sie kein CXXC-Motiv mehr besitzt (Ritz et al., 2001). Wäre es möglich, dass DsrEFH eine Art Disulfid-Reduktase darstellt? Weitere Untersuchungen müssen nun folgen, um die tatsächliche in vivo Funktion dieser Proteine bestimmen zu können.

4.2 DsrC aus *A. vinosum* ist ein lösliches cytoplasmatisches Protein

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufreinigung von DsrC aus *A. vinosum*, um die Funktion des Proteins im Schwefelstoffwechsel des Organismus zu ermitteln. Anfängliche Versuche, DsrC direkt aus *A. vinosum* aufzureinigen, erwiesen sich als schwierig, da DsrC in einem ausgedehnten Bereich von Proteinfractionen enthalten war, in denen auch andere Dsr-Proteine wie DsrEFH, DsrAB und DsrL vorliegen. Es wurde zunächst eine Aufreinigung von rekombinantem DsrC in *E. coli* durchgeführt. Nach zwei Reinigungsschritten, Affinitätschromatographie auf Ni-Chelat und Gelfiltration, zeigte sich zum ersten Mal, dass das DsrC-Protein in zwei Zuständen vorkommen kann, als Monomer (13,8 kDa) und als Dimer (28,6 kDa). Eine Analyse der Massen dieser beiden aufgereinigten Proteine durch ESI-MS-Analyse bestätigte die beiden Konformationszustände des DsrC-Proteins (s. Ergebnisteil 3.11). Die Aufreinigung des rekombinanten DsrC erfolgte hier unter oxidischen Bedingungen im Gegensatz zu bisher aufgereinigten DsrC-homologen Proteinen (z.B. aus *P. aerophilum*, *P. islandicum*, etc.), die unter reduzierenden Bedingungen gereinigt wurden.

Um festzustellen, ob im DsrC-Dimer zwei Monomere über eine kovalente Disulfidbrücke verknüpft sind, wurde das dimere DsrC-Protein mit reduzierenden und alkylierenden Reagenzien behandelt. Dazu musste das dimere DsrC-Protein erst mit 10 mM Mercaptoethanol bei 37 °C für 2 Std. inkubiert und anschließend nochmals mit einem Überschuss Iodacetamid (20 mM) für zwei weitere Stunden bei 37 °C inkubiert werden, bevor die Proben aufgeköcht und elektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden. In dem SDS-Gel war keine dimere Proteinbande im Bereich von 29 kDa zu erkennen. In diesem Fall konnte das Iodacetamid, nach Reduktion des Dimers mit 2-Mercaptoethanol, die entstandenen freien Thiolgruppen angreifen und so modifizieren, dass keine Reorganisation zum Dimer mehr möglich war.

Zum Ende dieser Arbeit konnte durch leichte Veränderung des Aufreinigungsschemas noch DsrC aus dem Wildtyp *A. vinosum* gereinigt werden. Möglicherweise kann auch das lösliche cytoplasmatische DsrC-Protein zwei Zustände annehmen, d.h. die dimere und monomere Form. Erste Hinweise liegen vor, die jedoch noch weiterer Untersuchungen bedürfen.

Die Beobachtung, dass das rekombinante DsrC als Dimer und Monomer aufgereinigt wurde, wirft natürlich Fragen auf, z.B.: „Wie konnte das Dimer unter den reduzierenden Bedingungen des Cytoplasma in *E. coli* entstehen?“ Gewöhnlich entstehen Disulfide unter stressfreien Bedingungen nur in einer oxidierenden Umgebung, beispielsweise im Endoplasmatischen Reticulum eukaryontischer Zellen (Sevier et al., 2002). Normalerweise weisen die Sulfhydryl-Gruppen der meisten Cysteinreste von Proteinen in der reduzierten Umgebung des Cytoplasmas einen pKa > 8.0 auf und bleiben bei einem physiologischen pH-Wert protoniert. Somit dürften cytoplasmatisch lokalisierte Proteine keine Disulfidbrückenbindungen ausbilden (Rietsch et al., 1998). Allerdings

besitzen gewisse redoxempfindliche Proteine Cysteinreste, die auch bei neutralem pH-Wert als Thiolatanionen vorliegen. Aufgrund ihrer verringerten pKa-Werte, bedingt durch positiv geladene Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren, sind sie leichter für eine Oxidation angreifbar (Rietsch et al., 1998). Unlängst an Bakterien und Hefen durchgeführte Studien zeigten, dass oxidativer Stress Disulfidbindungen hervorrufen kann (Cumming et al., 2004; Linke et al., 2003). Disulfidbrückenbindungen spielen eine wichtige Rolle bei der Redox-Regulierung von Proteinen. Jakob und Linke (2003) konnten zeigen, dass eine durch oxidativen Stress induzierte Disulfidbindung ein sehr schneller Prozess ist. Ob oxidativer Stress im Falle des DsrC-Dimers eine Rolle spielen könnte, ist nicht zu beurteilen. Bislang wurden keine Arbeiten in Richtung oxidativem Stress durchgeführt. Wahrscheinlich hat die Ausbildung der Disulfidbrücke im DsrC-Dimer *in vivo* eine ganz andere Ursache und Funktion. Vorstellbar wäre, dass die bei der Sulfidoxidation durch die dissimilatorische Sulfitreduktase (DsrA/B) freiwerdenden Elektronen genutzt werden, um ein hypothetisches Disulfid zu reduzieren. Die daraus resultierenden Thiole könnten von dem DsrK der Heterodisulfidreduktase oxidiert werden, um das Disulfid wieder zu regenerieren (Pott und Dahl 1998). Das DsrC-Dimer könnte hierbei eine Rolle spielen, indem es den Elektronentransfer von der Sulfitreduktase zu den Membranproteinen weiterleitet und dabei einen Thiol-Disulfid-Wechsel durchführt. Bei Betrachtung der Peptidsequenz von DsrC fällt auf, dass viele Aminosäuren konserviert vorliegen. Das Vorkommen von DsrC-Homologen in allen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel betreibenden Prokaryonten deutet auf die essentielle Rolle der DsrC-Proteine hin (Dahl et al., 2005). Bereits früher durchgeführte Sulfidinduktionsexperimente zeigten, dass in *A. vinosum* unter photoorganoheterotrophen Bedingungen mit und ohne Zugabe von Sulfid das *dsrC* Gen konstitutiv transkribiert und translatiert wurde (Pott und Dahl, 1998, Dahl et al. 2005). Eine Wiederholung dieser Versuche auf Proteinebene während dieser Arbeit, bestätigte dass DsrC immer in geringen Mengen in den Zellen vorliegt, nach Zugabe von Sulfid zum Medium wurde das Protein jedoch verstärkt gebildet. DsrC spielt offensichtlich eine wichtige Rolle im Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum*. Die Schwefeloxidation mit einer DsrC-defizienten Mutante dürfte stark beeinträchtigt sein. Besonders auffällig ist der hoch konservierte C-terminale Bereich der DsrC-Peptidsequenz, in der auch die zwei Cysteinreste (Cys 100 und Cys 111) vorkommen. Diese Cysteinreste könnten für das DsrC-Protein von funktioneller Bedeutung sein, und möglicherweise ist eines dieser beiden Cysteinreste an der Disulfidbrückenbindung beteiligt. Um feststellen zu können, welche der beiden Cysteinreste für die Disulfidbrückenbindung verantwortlich ist, müsste einer der beiden Cysteinreste deletiert werden. Möglicherweise reicht es aus, wenn ein Cysteinrest gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wird, um zu sehen, ob die Mutation einen Effekt auf die Ausbildung des DsrC-Dimers hat oder nicht.

Unlängst wurde die Struktur des rekombinanten DsrC-Proteins von *A. vinosum* aufgeklärt. Die Struktur des rekombinanten DsrC-Proteins von *A. vinosum* wurde wie die Struktur rekombinanten DsrC-Proteins von *P. aerophilum* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, analysiert (Cort, Februar 2005). Die NMR-Spektroskopie (Nuklear-Magnetische-Resonanz-Spektroskopie) ist neben der Röntgenkristallographie die einzige Methode, mit der die Strukturen von Proteinen oder Nukleinsäuren auf atomarem Niveau aufgeklärt werden können. Der Vorteil gegenüber der Röntgenkristallographie besteht darin, dass die zu untersuchenden Proteine in Lösung bleiben und kein starres Gebilde wie ein Proteinkristall darstellen. Mit der NMR-Spektroskopie können Proteine bis zu eine Größe von 30 kDa analysiert werden. In der **Abb. 4.12** und **Abb. 4.11** sind die Struktur des DsrC aus *A. vinosum* und des DsrC aus *P. aerophilum* zum Vergleich nebeneinander dargestellt.

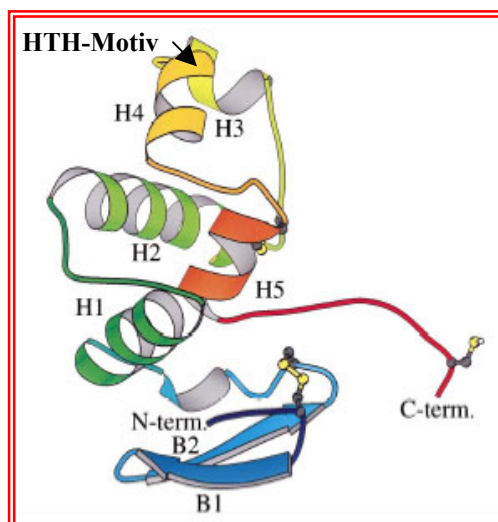


Abb. 4.12: Struktur von DsrC aus *Pyrobaculum aerophilum* Histag im C-Terminus (entnommen aus *Eur. J. Biochem.* 2001. 268: 5842-5850)

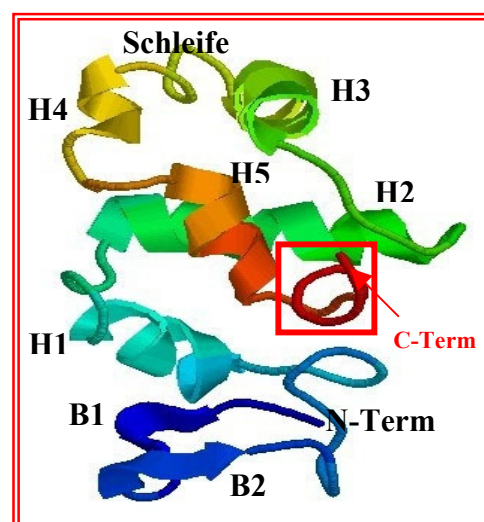


Abb. 4.11: Struktur von DsrC aus *Allochromatium .vinosum* Histag im N-Terminus (Februar 2005) H = Helix; B= β -Faltblatt

Bei der Betrachtung der Strukturbilder **Abb. 4.12** und **Abb. 4.11** zeigt sich, dass die Struktur des DsrC-Proteins aus *Pyrobaculum aerophilum* und die des rekombinanten DsrC-Proteins aus *A. vinosum* sehr ähnlich sind. Beide bestehen aus einem orthogonal helical angeordneten Bündel von α -Helices mit einer β -Haarnadelstruktur am C-Terminus. Die Faltung erinnert an eine Globin-Faltung, sowie an die Strukturen kleiner Cytochrome. Bislang konnte kein Protein mit annähernd ähnlicher Faltung identifiziert werden (Cort et al., 2001). Die DsrC-Peptidsequenz von *P. aerophilum* weist noch vier zusätzliche Cysteinreste auf. Diese Cysteinreste bilden im Protein Disulfidbrückenbindungen untereinander aus und dienen wahrscheinlich der Stabilisierung der DsrC-Proteinstruktur. Disulfidbrückenbindungen kommen zwischen dem Cys 5 und dem Cys 22

sowie dem Cys 66 und dem Cys 99 zustande. Diese vier Cysteine haben keine Äquivalente in DsrC aus *A. vinosum*. Die Struktur des DsrC-Proteins aus *P. aerophilum* besitzt noch ein Helix-Turn-Helix-ähnliches Motiv (Abb. 4.12), das zwischen der Helix 3 und Helix 4 liegt. Die Helix-Turn-Helix-Motive sind besondere Sekundärstrukturen von Proteinen, die bei DNA/Protein-Wechselwirkungen eine Rolle spielen (Wintjens und Rooman, 1996). Ein bekanntes Beispiel für ein Protein mit HTH-Motiv ist der lac-Repressor (Weaver, 1999). Das HTH-Motiv stellt einen extensiven Kontakt mit der Großen Furche der DNA her. Eine Helix lagert sich in der großen Furche der DNA an, deren Aminosäureseitenketten mit den Nukleotidbasen interagieren. Die andere Helix interagiert mit dem Rückgrat der DNA. Proteine mit einem HTH-Motiv binden oft als Dimer an die DNA. DsrC aus *A. vinosum* besitzt jedoch dieses HTH-Motiv nicht, da eine längere Schleifen-Region zwischen der Helix 3 und 4 liegt (s. Abb. 4.11). Im C-terminalen Bereich ähneln sich beide DsrC-Proteine, sie sind nahezu identisch aufgebaut (s. Abb. 4.13). Der C-Terminus, bestehend aus den sieben letzten Aminosäureresten, ragt aus der Mitte des Proteins hervor und erscheint im Gegensatz zum Rest des Proteins relativ unstrukturiert und flexibel. Die nachfolgende Abbildung zeigt zwei Strukturbilder von DsrC aus *A. vinosum*. Das erste Bild zeigt DsrC als Kalottenmodell, das zweite Bild zeigt DsrC als Bänderdiagramm (erstellt mit dem Protein-Explorer von MDL-Chime, Martz, 2002). In beiden Bildern wurden die hoch konservierten Cysteinreste hervorgehoben, Cys 111 als van-der-Waals-Radien im ersten Bild, im zweiten sind beide Cysteinreste als Ball- und Stab-Modell hervorgehoben worden.

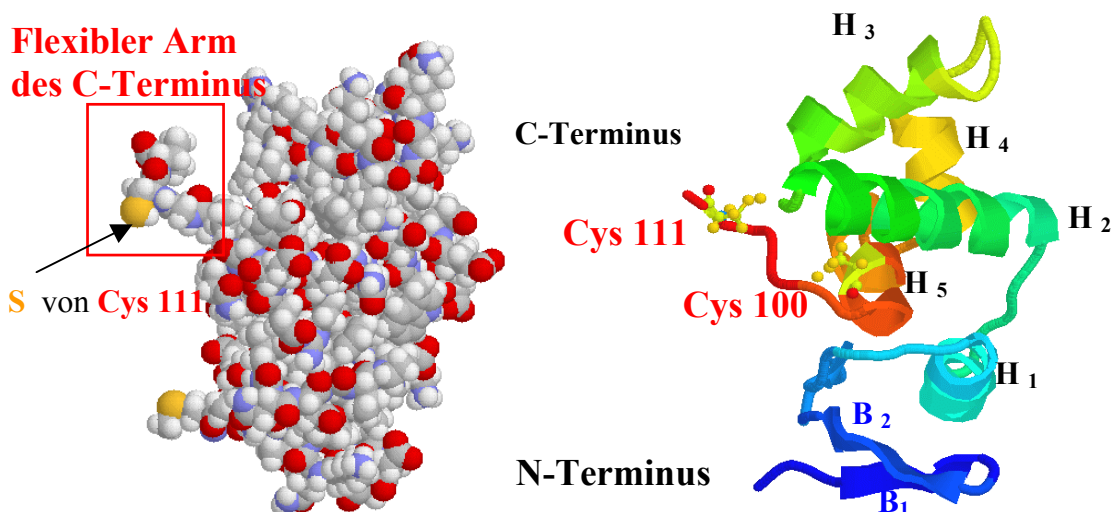


Abb. 4.13: DsrC, Links: Kalottenmodell von DsrC mit dem Cys 111 im flexiblen C-terminalen Arm. Rechts: Bänderdiagramm des DsrC von *A. vinosum* mit den hoch konservierten Cys100 und Cys 111 als Ball- und Stab-Modell. (Protein Explorer von MDL-Chime, Martz, 2002).

Der unstrukturierte flexible Arm enthält nicht nur den hoch konservierten Cysteinrest 111, sondern noch weitere hoch konservierte, hydrophobe Aminosäurereste, wie z.B. Leucin 105, Prolin 106, Prolin 108, Valin 112. Zusammen mit den hoch konservierten hydrophoben Resten könnte der Cysteinrest 111 funktionelle Bedeutung haben.

Nachdem die Struktur des DsrC-Proteins diskutiert wurde, werden nun zum Schluss noch die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsexperimente angesprochen. Es wurden Interaktionsuntersuchungen mit dem rekombinanten DsrEFH-Protein und dem rekombinanten DsrC-Protein durchgeführt um festzustellen, ob eine Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen möglich ist. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine Inkubation von DsrC mit dem DsrEFH einen Bandshift in den SDS-Gelen hervorruft. Zwischen den Hauptbanden für das DsrC- und das DsrEFH-Protein wurden zusätzliche Proteinbanden beobachtet. Diese zusätzlichen Proteinbanden waren spezifisch und traten nur dann auf, wenn die beiden Dsr-Proteine miteinander inkubiert wurden. Letztendlich bestätigte eine Gelfiltration des DsrC/DsrEFH-Inkubationsansatzes und die im Anschluss durchgeführte ESI-MS-Analyse einer Proteinprobe mit den langsameren Proteinbanden, dass die beiden Proteine nicht untereinander fest binden. In der untersuchten Probe lag nur das DsrEFH-Protein vor. Der beobachtete Bandshift deutete darauf hin, dass in einem der beiden Interaktionspartner, d.h. in DsrEFH, eine Veränderung hervorgerufen wurde. Die Konformationsänderung könnte in einer Multimerisierung, bzw. Oligomerisierung des DsrEFH-Proteinhexamers resultieren. Ein Beweis für eine Multimerisierung, bzw. Oligomerisierung des DsrEFH-Proteins ist die verlangsamte Laufgeschwindigkeit der zusätzlichen Proteinbanden im Vergleich zu der Proteinbande des DsrEFH-Hexamers in den nativen Gelen. Oligomerisierungen erlauben eine zusätzliche Kontrolle der Aktivität von Proteinen. Oligomere Proteine können allosterisch reguliert werden. Zudem sind oligomere Proteine resistenter gegenüber einem Abbau oder einer Denaturierung (Imperiali et al., 2005). Oligomerisierungen wurden beispielsweise auch bei den bereits erwähnten Peroxiredoxinen beobachtet, wo sie eine Rolle bei der Regulierung der Aktivität spielen (Wood et al., 2002; Wood et al., 2003 a, b; Schröder et al., 2000, Declercq et al., 2001). Oligomerisierungen der Prxs sind abhängig von dem Redoxzustand des Proteins. So wurde beobachtet, dass die Prxs in der reduzierten, bzw. überoxidierten Form als Decamere, im oxidierten Zustand als Homodimere vorliegen (Wood et al. 2003). Der Wechsel von der Dimer-Form zu der Decamer-Form ist mit einer Änderung der Konformation dieser Proteine verbunden. Eine Änderung der Konformation bewirkt, dass die weit entfernt liegenden Cysteine in den Prxs näher zusammenrücken. Vorstellbar wäre, dass eine durch die Inkubation von DsrEFH mit DsrC ausgelöste Konformationsänderung im Hexamer dazu führt, dass die weit entfernt liegenden Cysteinreste sich annähern können, um eine intermolekulare Disulfidbrücke auszubilden. Möglicherweise wird die Änderung von EFH dadurch ausgelöst, dass das DsrC von *A. vinosum*

über seinen flexiblen Arm einen Kontakt mit DsrEFH aufnimmt. Eine Kontaktaufnahme könnte beispielsweise über den Spalt, der zwischen den Proteinuntereinheiten DsrH und DsrF liegt, erfolgen. Der im flexiblen Arm liegende hoch konservierte Cysteinrest 111 des DsrC könnte mit dem hoch konservierten Cysteinrest des DsrH über eine Disulfidbrücke interagieren, sofern der Spalt groß genug ist und sofern die Cysteinreste beider Proteine sich nahe genug annähern können. Möglicherweise könnte das Cys 111 auch direkt mit dem aktiven Cystein 78 des DsrE eine Wechselwirkung eingehen. Das Cys 78 liegt relativ zugänglich an der Proteinoberfläche. Bei der Betrachtung des elektrostatischen Oberflächenpotentials beider Proteine, d.h. von DsrC und von DsrEFH, fällt auf, dass der Bereich um das aktive Cystein des DsrE positiv geladen ist, dagegen scheinen im flexiblen Arm des DsrC relativ negative Ladungen zu dominieren. Eine positiv geladene Oberfläche dient der Stabilisierung der Thiol-Form des Schwefels. Vorstellbar wäre, dass die beiden Proteine über eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion interagieren könnten. Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sind nukleophile Substitutionen, durch ein Thiol oder Thiolat als Nukleophil an einer Disulfidbindung, die die formale Oxidation des Nukleophils und die Reduktion der auszutauschenden Gruppe zur Folge hat. Diese Reaktionen sind die häufigsten Redoxreaktionen von Cysteinresten *in vivo*. Sie vermitteln z.B. die reversible Bildung struktureller Disulfide in Peptiden und Proteinen, die Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Fließgleichgewichtes, die Regulation von Enzymaktivitäten, die Redoxregulation zellulärer Signalwege und redoxkatalytische Prozesse (Jacob et al., 2003).

Eine weitere Besonderheit ist, dass oberhalb des Cys 78 ein Tunnel im Protein zu erkennen ist s. **Abb. 4.14** und **Abb. 3.27** im Ergebnisteil. Dieser Tunnel könnte einen Zugang zu einer Substratbindungstasche darstellen. Die folgende **Abb. 4.14** zeigt die elektrostatischen Oberflächenpotentiale von DsrC und von DsrEFH.

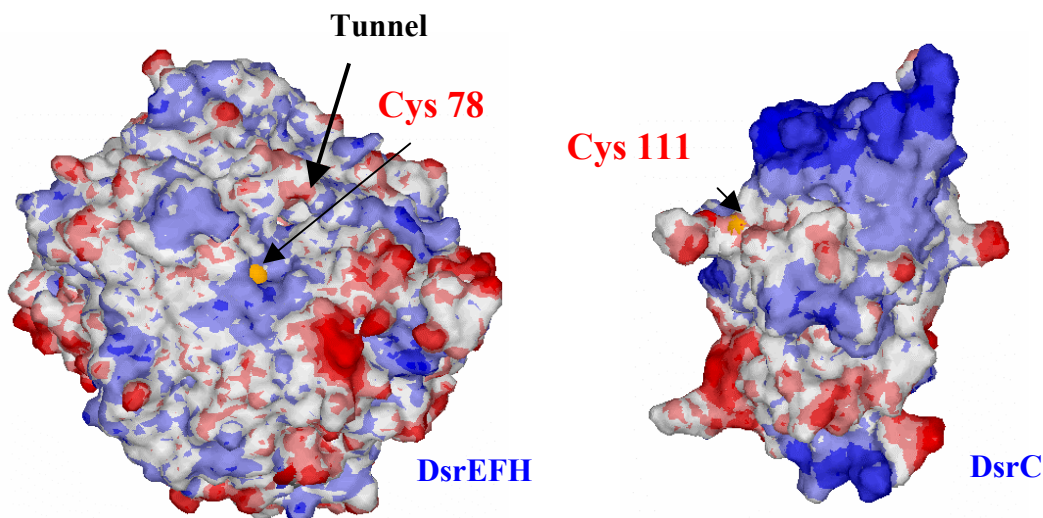


Abb. 4.14: Elektrostatisches Oberflächenpotential des DsrEFH-Hexamers und von DsrC. Die Bilder wurden erstellt mit Hilfe des Protein Explorer von MDL-Chime (Martz, 2002).

Um eine solche vorgeschlagene Interaktion zu überprüfen, würde eine Ko-Kristallisation des rekombinanten DsrEFH mit DsrC wahrscheinlich sehr hilfreich sein. Eine Ko-Kristallisation ist allerdings sehr aufwendig. Eine Alternative wäre die Untersuchung von Wechselwirkungen mittels spezifischer Computerprogramme für Protein-Docking, wie z.B. mit "BIGGER". Voraussetzung ist, dass die Strukturen der zu analysierenden Proteine bekannt sind. Die folgende **Abb. 4.15** soll zeigen, dass ein Protein-Docking von DsrEFH mit DsrC möglich ist.

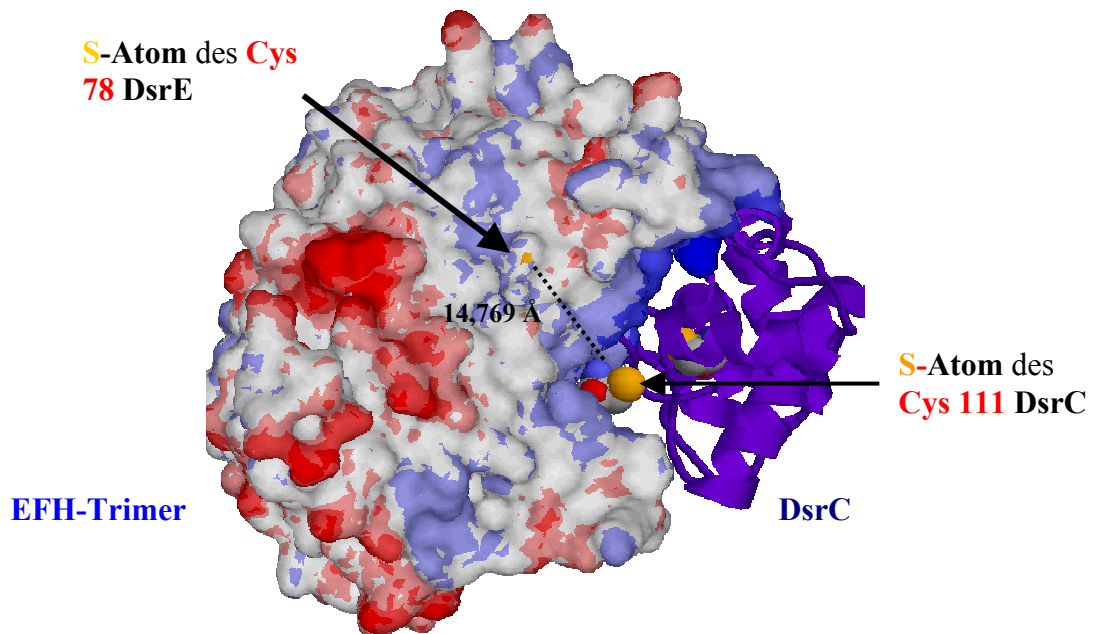


Abb. 4.15: Docking-Modell des DsrEFH-Trimers und des DsrC-Monomers, erstellt mit BIGGER (Dockingprogramm) (Palma, 2000). Dargestellt sind die Proteinoberfläche von DsrEFH (rot) und DsrC als Helix-Modell (blau). Essentielle Cysteinreste sind als van-der-Waals-Radien hervorgehoben.

Das Cys 111 des DsrC und das Cys 78 des DsrE liegen in diesem Modell zu weit auseinander (14,769 Å), zudem ist das aktive Zentrum, in dem sich der hoch konservierte Cysteinrest befindet, verborgen (s. **Abb. 4.15**). Die mit Hilfe von "BIGGER" oder auch anderen Docking-Programmen (z.B. ZDock, GRAMM usw.) berechneten Protein-Docking-Modelle sollten nicht zu sehr überbewertet werden. Diese automatischen Programme können meist keine korrekte Berechnung leisten, sondern liefern nur ideelle Modelle. Mit Sicherheit sind noch andere Protein-Protein - Wechselwirkungen möglich. Die tatsächliche *in vivo* Funktion der Proteine DsrEFH und DsrC lässt sich auf diese Weise nicht ermitteln. Neueren Erkenntnissen zufolge passt der DsrC-Arm in den Spalt des DsrEFH-Proteins. Eine Wechselwirkung beider Proteine dürfte in einem größeren Konformationswechsel des Hexamers resultieren (pers. Mitteilung Dong Hae Shin).

Alternativ könnte das DsrC aus *A. vinosum* auch mit dem $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer der dissimilatorischen Sirohämamid-Sulfitreduktase aus *A. vinosum* eine Wechselwirkung eingehen, sofern der flexible Arm in das aktive Zentrum der Sulfitreduktase reicht. DsvC aus Sulfatreduzierern ist oft mit der

Sulfitreduktase in einem äquimolaren Verhältnis gefunden worden, weshalb dem DsvC auch eine Funktion als dritte Untereinheit der Sulfitreduktase zugeschrieben wurde, die dann als $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Heterohexamer vorläge (Pierik et al., 1992). Eine Wechselwirkung zwischen der Gamma-untereinheit und dem $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer könnte den Elektronentransfer mit einem der beiden Cysteine Cys 111 oder Cys 100 und dem Sirohäm oder [4Fe-4S]-Kofaktoren erleichtern. Dem DsrC aus *P. aerophilum* ist außerdem eine Funktion in der Wahrnehmung eines bestimmten Zustandes des Sirohäms oder des [Fe₄-S₄]-Clusters zugeschrieben worden, die eine Anpassung anderer zellulärer Prozesse zur Folge haben könnte (Cort et al., 2001). Das DsrC-Protein aus *A. vinosum* konnte zusammen mit DsrAB, DsrE, DsrJ, DsrO und DsrK aus den Membranfraktionen aufgereinigt werden, was auf eine engere Wechselwirkung der Sulfitreduktase mit DsrC und DsrEFH, sowie mit dem Membrankomplex DsrMKJOP hindeutet (Dahl et al., 2005). Möglicherweise könnte DsrC gegebenenfalls in Kooperation mit DsrEFH eine Art Elektronen-Carrier-Funktion übernehmen, indem sie sich bei einer Vermittlung der Elektronen über Thiol-Disulfid-Wechselwirkungen von der Sulfitreduktase zum Membrankomplex beteiligen. Nach diesem Modell könnte das integrale Membranprotein DsrM als Quinon-Reduktase, DsrP als Quinol-Oxidase wirken, wobei letztendlich das c-Typ Cytochrom des DsrJ reduziert werden würde. Von DsrJ würden die Elektronen an das HiPIP-Protein weitergeleitet werden, dem primären Elektronendonator des photosynthetischen Reaktionszentrums (Dahl et al., 2005).

5 Zusammenfassung

- 1) Die Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Methode ermöglichte, dass die löslichen Dsr-Proteine, DsrE, DsrF und DsrH zum ersten Mal aus dem Cytoplasma des Schwefelpurpurbakteriums *A. vinosum* isoliert und homogen aufgereinigt werden konnten. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteine nicht einzeln sondern zusammen gehören und ein Proteinheterohexamer darstellen, mit einer Struktur von $\alpha_2\beta_2\gamma_2$.
- 2) Die Elektronen-Spray-Ionisations-Massenspektroskopie bestätigte die Peptidsequenzen und die bislang postulierten molekularen Massen für die Proteine DsrE, DsrF und DsrH aus *A. vinosum*, sowie auch die Massen der rekombinanten DsrEFH Proteine. Keine der drei Untereinheiten bildete Addukte mit Schwefelverbindungen.
- 3) Inkubationsuntersuchungen des rekombinanten DsrEFH-Proteins mit reduzierenden und alkylierenden Agenzien zeigten, dass die Proteine DsrE, DsrF und DsrH nicht über eine kovalente Disulfidbrücke verbunden sind.
- 4) Datenbankuntersuchungen zeigten, dass es DsrE-, DsrF- und DsrH-homologe Proteine in schwefeloxidierenden Bakterien gibt. Homologe DsrEFH Proteine gibt es in sulfatreduzierenden Organismen nicht. DsrEFH-homologe Proteine aus *C. tepidum*, *T. denitrificans*, *M. magnetotacticum*, und *Magnetococcus* sp. fallen mit dem DsrEFH aus *A. vinosum* in einer Gruppe zusammen (Sander, 2005) und weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad auf, der darauf hindeutet, dass diese aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind.
- 5) Die Röntgenkristallisationsmethode bestätigte dass DsrEFH ein Proteinheterohexamer ist. DsrE aus *A. vinosum* und das homologe YchN-Protein aus *E. coli* K12 besitzen einen hoch konservierten Cysteinrest (Cys78), der von vielen hydrophoben, Aminosäureresten in einer ähnlichen Anordnung umgeben wird. Eine hydrophobe Umgebung um hoch konservierte Cysteinreste könnte für die Funktionalität des Proteins essentiell sein. Möglicherweise handelt es sich um das aktive Zentrum der Proteine.
- 6) DsrEFH hat keine Rhodaneseaktivität.
- 7) Der Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen durch die Mutante $\Delta dsrEFH$ wurde im Vergleich zum Wildtyp analysiert. *A. vinosum* $\Delta dsrEFH$ zeigte eine um 92 % erniedrigte Schwefeloxidationsrate. Das lässt den Schluss zu, dass DsrEFH eine bedeutende Rolle in der Oxidation gespeicherten Schwefels spielt.
- 8) Ein unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgereinigtes rekombinantes DsrC-Protein kann zwei Konformationszustände annehmen. Das Monomer (13,6 kDa) und das Dimer (28,2 kDa) wurden mit Hilfe der ESI-MS-Analyse bestätigt. Die Disulfidbrücke im DsrC-Dimer konnte mit reduzierenden und alkylierenden Reagenzien gespalten werden.

- 9) Eine Strukturanalyse mittels der NMR-Spektroskopie zeigte, dass DsrC aus *A. vinosum* dem DsrC-Protein aus *P. aerophilum* sehr ähnlich ist. DsrC besteht aus einem orthogonal helical angeordnetem Bündel von α -Helices mit einer C-terminal liegenden unstrukturierten β -Haarnadel. Der unstrukturierte Arm, der aus der Mitte des Proteins herausragt, ist relativ flexibel und besteht aus sieben Aminosäureresten, die in allen bislang verglichenen DsrC-Proteinen aus Schwefeloxidierern und Sulfatreduzierern hoch konserviert sind. Die hoch konservierten Cysteinreste (Cys111 und Cys100) könnten einerseits essentiell sein für die Katalyse von Redoxreaktionen, andererseits aber auch stabilisierende Funktion für das DsrC-Protein haben.
- 10) Eine Inkubation des aufgereinigten rekombinanten DsrEFH mit DsrC ruft eine Veränderung in DsrEFH hervor, möglicherweise eine Änderung in seiner Konformation, die auf eine Multimerisierung des Proteins hindeuten könnte.

6 Literatur

- Adler, F., Holt, J., Dickey, R., van Vliet, B., und Maffett, T.** 1996. Molecular Visualization Programm Chime (Chemical mIME). <http://www.umass.edu/microbio/chime>
- Akhavan-Tafti, H.; DeSilva, R., Sugioka, K.; Handley, R.S.; Schaap, A.P.** 2001. Chemiluminescent acridan phosphat labelling compounds for detection in gels. *Luminescence*. **16**: 187-191.
- Alexander, K. und Volini, M.** 1987. Properties of an *Escherichia coli* rhodanese. *J. Biol. Chem.* **262**: 6595-6604.
- Alphey, M. S., Bond, C. S. T. E., Fairlamb, A. H., und Hunter W.N.** 2000. The structure of reduced Tryparedoxin Peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2-Cys-peroxiredoxins. *J. Mol. Biol* **300**: 903-916.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, 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.
- Argyrou, A. und und Blanchard, J. S.** 2004. Flavoprotein-Disulfid-Reductase: Advances in Chemistry an Function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **78**:89-142
- Ausubel, F. A., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1997. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bazaraal, M. und Helinski, D. R.** 1968. Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **36**: 185-194.
- Beffa, Pezet, R., und und Turian, G.** 1988. Endogenous elemental sulfur (S⁰) in dominant and germinating spores of *Phomopsis viticola* Sacc. *FEMS. Microbiol. Lett.* **50**:89-94.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. I., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., und Rose, D. J. M. B. u. S. Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Bonomi, F., Pagani S, Cerletti, P., und Cannella, C.** 1977. Rhodanese-Mediated sulfur transfer to succinat dehydrogenase. *Eur J Biochem.* **72**: 17-24.
- Bonomi, F., Pagani, S., und Kurtz, D. M., Jr.** 1985. Enzymic synthesis of the 4-iron-4-sulfur clusters of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **148**: 67-73.
- Bordo, D., Colnaghi, R., Deriu, D., Carpen, A., Storici, P., Pagani, S., und Bolognesi, M.** 1999. Crystallisation and preliminary Crystallographic investigations of rhodanese from *Azotobacter vinelandii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **55**: 1471-1473.
- 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.
- Brune, D. C.** 1995a. Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch.Microbiol.* **163**: 391-399.

- Brune, D. C.** 1995b. Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. *In*: R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*: 847-870 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,NL.
- Brüser, T., Deutzmann, R., und Dahl, C.** 1998. Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 329-336.
- Brüser, T., P. Lens, and H. G. Trüper.** 2000. The biological sulfur cycle. *In*: Lens, P. and Pol, L.H.(Hrsg), *Environmental Technologies to treat sulfur pollution*: 47-86 IWA Publishing, London.
- Bryantseva, 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.: Sulfide-oxidizing heliobacteria from thermal sulfidic springs. *Microbiology* **69**: 325-334.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocaine, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrik, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M., Weidman, J. F., Fuhrmann, J. L., Nguyen, D., Utterback, T. R., Kelley, J. M., Peterson, J. D., Sadow, P. W., Hanna, M. C., Cotton, M. D., Roberts, K. M., Hurst, M. A., Kaine, P. P., Borodovsky, M., Klenk, H. P., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R., und Venter, J. C.** 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**:1058-1073.
- Burton, C. P. und Akagi, J. M.** 1971. Observations on the rhodanese activity of *Desulfotomaculum nigrificans*. *J. Bacteriol.* **107**: 375-376.
- Carr, D. W., Stofko-Hahn, R., Fraser, I. D. C., Bishop, S. M., Acott, T. S., Brennan, R. G., und Scott, J. D.** 1991. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipatic helix binding motif. *J.Biol.Chem.* **266**:14188-14192.
- Carr, D. W. und Scott, J. D.** 1992. Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem.Sci.* **17**:246-249.
- Chandra, T. S. und Friedrich, C. G.** 1986. Tn₅-induced mutations affecting the sulfur-oxidizing ability (Sox) of *Thiosphaera pantotropha*. *J. Bacteriol.* **166**: 446-452.
- Cort, J. R., Santhana Mariappan, S. V., Kim, C.-Y., Park, M. S., Peat, T. S., Waldo, G. S., Terwillinger T.C., und Kennedy, M. A.** 2001. Solution structure of *Pyrobaculum aerophilum* DsrC, an archeal homologue of gamma subunit of dissimilatory sulfite reductase. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5842-5850.
- Christendat, D., Saridakis, V., Kim, Y., Kumar, P. A., Xu, X., Semesi, A., Joachimiak, A., Arrowsmith, C. H., und Edwards, A. M.** 2002. The crystal structure of hypothetical protein MTH1491 from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Protein Science* **11**: 1409-1414.
- Copley, S. D., Novak, W. R., und Babitt, P. C.** 2004. Divergence of function in the thioredoxin fold superfamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **43**: 13981-13995.

- Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H., und Schubert, D.** 2004. Protein Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm during oxidative stress. *J.Biol.Chem.* **279**: 21749-21758.
- Cupp-Vickery, J. R., Silberg, J. J., Ta, D. T., und Vickery, L. E.** 2004. Crystal structure of IscA, an iron-sulfur cluster assembly protein from *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **338**: 127-137.
- Dagert, M. und Ehrlich, S. D.** 1974. Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28.
- Dahl, C.** 1996. Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. *Microbiology* **142**: 3363-3372.
- Dahl, C., Kredich, N. M., Deutzmann, R., und Trüper, H. G.** 1993. Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1817-1828.
- Dahl, C.** 2000. Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren für die Photosynthese anoxygener phototropher Bakterien. *BIOspektrum* **4/2000**: 263-266.
- Dahl, C., Kuever, J., und Kräling, M.** 2001. Genes encoding a thiosulfate-oxidizing multienzyme complex in phototrophic and chemotrophic sulfur bacteria. *Biospektrum.* **7**: 98.
- Dahl, C., A. Prange, and R. Steudel.** 2002. Metabolism of natural polymeric sulfur compounds. In: Steinbüchel, A. (Hrsg.) *Miscellaneous biopolymers and biodegradation of synthetic polymers*: 35-62. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dahl, C., Rakhely, G., Pott-Sperling, A. S., Fodor, B., Takacs, M., Toth, A., Kräling, M., Györfi, K., Kovacs, A., Tusz, J., und Kovacs, K.** 1999. Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol.Lett.* **180**: 317-324
- Dahl, C. und Trüper, H. G.** 1994. Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria. *Meth.Enzymol.* **243**: 400-421.
- Debussche, L., Thibaut, D., Cameron, B., Crouzet, J., und Blanche, F.** 1990. Purification and characterization of cobyrinic acid *a,c*-diamide synthase from *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol.* **172**: 6239-6244.
- Declercq, J. P. u. E. C.** 2001. A twinned monoclinic crystal of human peroxiredoxins 5 with eight molecules in asymmetric unit. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr.* **57**: 1829-1835.
- Drenth, J.** 1999. Principles of X-Ray Crystallography. In Springer Advanced Textes in Chemistry: 203-243 2nd Edition , New York.
- Echalier, A., Trivelli, X., Corbier, C., Rouhier, N., Walker, O., Tsan, P., Jacquot, J.-P., Aubry, A., Krimm, I., und Lancelin, J.-M., und .** 2005. Crystal structure and solution NMR dynamics of a D (TypII) peroxiredoxin, glutaredoxin and thioredoxin dependent: A new insight into the peroxiredoxin oligomerism. *Biochemistry* **44**: 1755-1767.
- Fabianek, R. A., Hennecke, H., und Thony-Meyer, L.** 2000. Periplasmic protein thiol: disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS* **24**: 303-316.
- Fekkes, P. und Driessen, A. J.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mo. Biol. Rev.* **63**:161-173.

- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C. A., Gocayne, J. D., Scott, J. D., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrman, J. L., Geohagen, N. S. M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O., und Venter, J. C. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., und Fischer, J. 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2873-2882.
- Gaspar J.A., Liu C., Vassall K.A., Megelei G., Stephen R., Stathopoulos P.B., Pineda-Lucena A., Wu B., Yee A., Arrowsmith C.H., und Meiering E.M. 2005. A novel member of the YchN fold: Solution structure of the hypothetical protein Tm0979 from *Thermotoga maritima*. *Protein Science* **14**: 216-223.
- Gray, H. B. und Winkler, J. R. 2005. Long-Range electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 3534-3539.
- Gray, H. B. und Winkler, J. R. 1996. Electron transfer in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 537-561.
- Grimm, F. 2004. In-frame-Mutagenese der *dsrEFH*, *dsrC*, *dsrR* und *dsrS* in *A. vinosum*. Diplomarbeit, Universität, Bonn.
- Guerrero, R., Mas, J., und Pedros-Alio, C. 1984. Boyant density changes due to intracellular content of sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **137**: 350-356.
- van Gernerden, H. 1987. Competition between purple sulfur bacteria and green sulfur bacteria: role of sulfide, sulfur and polysulfides. In: Lindholm, T.(Hrsg.): *Ecology of photosynthetic prokaryotes with special reference to meromictic lakes and coastal lagoons*: 13-27. Academy Press, Abo.
- Hageage, G. J., Jr., Eanes, E. D., und Gherna, R. L. 1970. X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by *Chromatium* species. *J. Bacteriol.* **101**: 464-469.
- 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.
- Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerly, R. P., und Merritt, E. A. 1988. Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins* **4**: 77-88.
- Hensen, D. 2001. Molekularbiologische Analyse des *sox*-Genclusters des phototrophen Schwefelbakteriums *Allochromatium vinosum*. Diplomarbeit. University of Bonn.
- Hoppe, W. Z. 1957. *Elektrochemie* **61**: 1076-1083.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in phast system development unit. *Electrophoresis* **9**: 26-32.

- 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**: 941-951.
- 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.
- Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M., und Sies, H.** 2003. Schwefel und Selen: Bedeutung der Oxidationsstufe für Struktur und Funktion von Proteinen. *Angew. Chem.* **115**: 4890-4907
- 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.
- Kappler, U. und Dahl, C.** 2001. Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation (minireview). *FEMS Microbiol. Lett.* **203**:1-9.
- Kappler, U., Dahl, C., McEwan, A. G., und Trüper, H. G.** 1999. Enzymology and molecular biology of sulfite:acceptor oxidoreductase in *Thiobacillus novellus* and *Thiocapsa roseopersicina*. Biospektrum Sonderausgabe zur Frühjahrstagung der VAAM, Göttingen 50.
- Karkhoff-Schweizer, R. R., Bruschi, M., und Voordouw, G.** 1993. Expression of the γ -subunit gene of desulfoviridin-type dissimilatory sulfite reductase and of the α - and β -subunit genes is not coordinately regulated. *Eur. J. Biochem.* **211**: 501-507.
- Kleber, H.-P., D. Schlee, and W. Schöpp.** 1987. *Biochemisches Praktikum*: 247-248. (Hrsg). Gustav Fischer Verlag.
- Klein, A. R. und Thauer, R. K.** 1997. Overexpression of the coenzyme-F₄₂₀-dependent N^5, N^{10} -metylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase gene from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Eur. J. Biochem.* **245**:386-391.
- Klenk, H.-P., Clayton, R. A., Tomb, J.-F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, 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. F., 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, J. C.** 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Klimmek, O., Kreis, V., Klein, C., Simon, J., Wittershagen, A., und Kröger, A.** 1998. The function of the periplasmic Sud protein in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **253**: 263-269.
- Klimmek, O., Kröger, A., Studel, R., und Holdt, G.** 1991. Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulfide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Arch. Microbiol.* **155**: 177-182.
- Kumar, M. A. und Davidson, V. L.** 1992. Methods to identify and avoid artifical formation of interchain disulfid bonds when analyzing proteins by SDS-Page. *BioTechniques* **12**:198-202.

- Künel, A., Vaupel, M., Heim, S., Thauer, 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.
- Lämmli, U. K.** 1970: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 680-685.
- Leichert L.I. und Jakob U.** 2004. Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol* **2**: 1723-1737.
- Leahy, D. J., Erickson, H. P., Aukhil, I., Joshi, P., und Hendrickson, W. A.** 1994. Crystallization of a fragment of human fibronectin: introduction of methionine by site-directed mutagenesis to allow phasing via selenomethionine. *Proteins - Structure, function and Genetics* **19**: 48-54.
- Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I., und Erickson, H. P.** 1992. Structure of a fibronectin typ II domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**: 987-991.
- Leimkühler, S., Wuebbens, M. M., und Rajagopalan, K. V.** 2001. Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of molybdenum cofactor for biosynthesis of molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* **276**: 34695-34701.
- Linke, K. und Jakob, U.** 2003. Not every disulfid lasts forever: disulfid bond formation as redox switch. *Antioxidants & Redox Signaling* **5**: 425-432.
- Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. T.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **229**: 763-770.
- Lottspeich, F. ; und Zorbas, H.** 1998. Elektronenspray-Ionisations Massenspektroskopie. In *Bioanalytik*. Hrsg: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lübbe, Y.** 2005. Biochemische und Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion von DsrN und DsrL im assimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *A. vinosum*. Dissertation, Universität Bonn.
- Mander, G. und Hedderich, R.** 2000. A membrane protein of *Archaeoglobus fulgidus* similar to heterodisulfide reductase from methanogens. *Microbiology Health - Ecology - Biotechnology*, München **59**.
- Mander, G. J., Duin, E. C., Linder, D., Stetter, K. O., und Hedderich, R.** 2002. Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1895-1904.
- Mas, J. und van Gernerden, H.** 1987. Influence of sulfur accumulation and composition of sulfur globule on cell volume and bouyant density of *Chromatium vinosum*. *Arch.Microbiol.* **146**: 362-369.
- Martz, E.** 2002. Protein Explorer: Easy yet powerful macromolecular visualiztion. *Trends in Biochemical Science* **27**:107-109. Internet: [http:// proteinexplorer.org](http://proteinexplorer.org)
- Melino S., Cicero D.O., Forlani F., Pagani S., und Paci M.** 2004. The N-terminal rhodanese domain from *Azotobacter vinelandii* has a stable and folded structure independently of the C-terminal domain. *FEBS.* **577**, 403-408.

- 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.
- Molitor, M., Dahl, C., Molitor, I., Schäfer, U., Speich, N., Huber, R., Deutzmann, R., und Trüper, H. G.** 1998. A dissimilatory sirohaem-sulfite reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*. *Microbiology* **144**: 529-541.
- Pagani, S., Bonomi, F., und Cerletti, P.** 1984. Enzymic synthesis of the iron sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **142**: 361-366.
- Pagani, S., Eldrige, M., und Eady, R. R.** 1987. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Rhodanese-catalysed restoration of activity of the inactive 2Fe species of the Fe protein. *Biochem. J.* **244**: 485-488.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. und Dutton, L.** 1999. Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**: 47-52.
- Palma, P. N., Krippahl, L., Wampler, J. E., und Moura, J. J. G.** 2000. BIGGER: A new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **39**: 72-384.
- 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.
- 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.
- Pelanda, R., Vanoni, M. A., Perego, M., Piubelli, L., Galizzi, A., Curti, B., und Zanetti, G.** 1993. Glutamate synthase genes of the diazotroph *Azospirillum brasilense*. Cloning, sequencing, and analysis of functional domains. *J. Biol. Chem.* **268**: 3099-3106.
- Pfennig, N. und H. G. Trüper.** 1992. The family Chromatiaceae.: 3200-3221. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York.
- Pfennig, N. und H. G. Trüper.** 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.
- Pierik, A. J., Duyvis, M. G., van Helvoort, J. M. L. M., Wolbert, R. B. G., und Hagen, W. R.** 1992. The third subunit of desulfoviridin-type dissimilatory sulfite reductases. *Eur. J. Biochem.* **205**: 111-115.
- Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H., und Hol, W. G.** 1978a. The structure of bovin liver rhodanese. I. Structure determination at a 2,5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains. *J Mol Biol.* **123**: 557-594.
- Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H., Hol, W. G. J., Heinrikson, R. L., Keim, P., Weng, L., und Russell, J.** 1978b. The covalent and tertiary structure of bovin liver rhodanese. *Nature* **273**: 124-129.

- Poole, L. B. 1996. Flavin-Dependent Alkyl Hydroperoxid Reductase from *Salmonella typhimurium*. Cysteine disulfides involved in catalysis of peroxid reduction. *Biochemistry* **35**: 65-75.
- Poole, L. B., Reynolds, C. M., Wood, Z. A., Karplus, A., Ellis, H. R., und Calzi, M. L. 2000. AphF and other NADH: peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low M_r thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6126-6133.
- Poole, L. B., Karplus, P. A., und Clairborne, A. 2004. Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **44**: 325-347.
- Poole, L. B. 2005. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cyteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch. Biochem. Biophys* **433**: 240-254.
- Pott, A. S. und Dahl, C. 1998. Sirohaem-sulfite reductase and other proteins encoded in the *dsr*-locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144**: 1881-1894.
- Pott-Sperling, 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.
- Prieto, J. L., Pérez-Castiñeira, J. R., und Vega, J. M. 1997. Thiosulfate reductase from *Chlamydomonas*. *J. Plant Physiol.* **151**: 385-389.
- Ray, W. K., Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M., und Larson, T. J. 2000. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**: 2277-2284.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L., und Sweet, R. M. 1993. Crystal structure of globular domain of histon H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* **362**: 219-223.
- 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.
- 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.
- Rietsch, A. und Beckwith J. 1998. The genetics of disulfid bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 163-184.
- Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C. M., Poole, L. B., und Beckwith, J. 2001. Conversion of a peroxiredoxin into a disulfid reductase by triplet repeat expansion. *Science* **294**: 158-160.
- 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.

- Rossmann, M. und Blow, D.** 1962. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**: 45-52.
- Sander, J.** 2005. Biochemische, Molekulargenetische und Bioinformatische Untersuchungen zum DsrMJKOP-Komplex aus *A. vinosum*. Dissertation, Universität Bonn.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez, O., Ferrera, I., Dahl, C., und Mas, J.** 2001. *In vivo* role of APS reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **176**: 301-305.
- Sayle R.A. und Milner-White, E. J.** 1995. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 374.
- Schedel, M. und Trüper, H. G.** 1979a. Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **568**: 454-467.
- Schedel, M. und Trüper, H. G.** 1980. Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.* **124**: 205-210.
- Schedel, M., Vanselow, M., und Trüper, H. G.** 1979b. Siroheme sulfite reductase from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. *Arch. Microbiol.* **121**: 29-36.
- Schmidt, G. L., Nicolson, G. L., und Kamen, M. D.** 1971. Composition of the sulfur particle of *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **105**: 1137-1141.
- Schwarz, S.** 2001. Rhodanese und Thiosulfat-Reduktase im phototrophen Schwefelbakterium *Allochromatium vinosum*. Dissertation, Universität Bonn.
- Sevier, C. S. und Kaiser, C. A.** 2001. Formation and transfer of disulfide bonds in living cells. *Nat. Cell Biol.* **2**: 836-847.
- 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, A. J.** 1966. The role of tetrathionate in the oxidation of thiosulphate by *Chromatium* sp. strain D. *J. Gen. Microbiol.* **42**: 371-380.
- Smith, A. J. und Lascelles, J.** 1966. Thiosulphate metabolism and rhodanese in *Chromatium* sp. strain D. *J. Gen. Microbiol.* **42**: 357-370.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., und Klenk, D. C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Delughery, C., Lee, H.-M., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicare, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bish, D., Safer, H., Patwell, D., Prabhakar, S., McDougall, S., Shimer, G., Goyal, A., Pietrovski, S., Church, G. M., Daniels, C. J., Mao, J.-I., Rice, P., Nolling, J., und Reeve, J. N.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium*

thermoautotrophicum deltaH: functional analysis and comparative genomics. J.Bacteriol. **179**:7135-7155.

Sperling, D. 2001. Moleularbiologische und enzymologische Untersuchungen zum dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in *Allochroamatium vinosum*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Archaeoglobus veneficus*. Dissertation, Universität Bonn.

Sörbo, B. H. 1953a. Crystalline Rhodanese. Acta Chemica Scandinavica **7**: 1129-1136.

Sörbo, B. H. 1953b. Rhodanese. Acta Chemica Scandinavica **7**: 1137-1145.

Sörbo, B. H. 1955. Rhodanese. Meth.Enzymol. **2**: 334.

Steuber, J., Arendsen, A. F., Hagen, W. R., und Kroneck, P. M. H. 1995. Molecular properties of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex) and comparison with the enzyme from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Eur. J. Biochem. **233**: 873-879.

Studel, R., Holdt, G., Visscher, P. T., und van Gemerden, H. 1990. Search for polythionates in cultures of *Chromatium vinosum* after sulfide incubation. Arch. Microbiol. **155**: 432-437.

Tabita, R., Silver, M., und Lundgren, D. G. 1969. The rhodanese system of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. **47**: 1141-1145.

Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U. T., Rao, B. S., Kiryutin, B., Galperin, M. Y., Fedorova, N. D., und und Koonin, E. V. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. Nucleic Acids Res. **29**: 22-28.

Tezcan, F. A., Crane, B. R., Winkler, J. R., und und Gray, H. B. 2001. Electron tunneling in protein crytals. Proc Natl. Acad. Sci USA **98**: 5002-5006.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., und Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: 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.

Towbin, H., Staehelin, T. L., und Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4356.

Trüper, H. G. 1981. Photolithotrophic sulfur oxidation, p. 199-211. In: H. Bothe and A. Trebst (eds.), Biology of inorganic nitrogen and sulfur. Springer-Verlag, Berlin

Trüper, H. G. 1984. Microorganisms and the sulfur cycle. In: Müller, A. und Krebs, B (Hrsg.): Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio-, and cosmosphere and technology: 351-365. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Trüper, H. G. und Fischer, U. 1982. Anaerobic oxidation of sulphur compounds as electron donors for bacterial photosynthesis. Phil. Trans. R. Soc. Lond.B **298**: 529-542.

Trüper, H. G. and N. Pfennig. 1992. The family Chlorobiaceae. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer K-H. (Hrsg): The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications: 3583-3592. Springer Verlag, New York.

- Tse Sum Bui , B., Escalettes, F., Chottard, G., Florentin, D., und Marquett, A.** 2000. Enzyme-mediated sulfid production for reconstitution of [2Fe-2S] clusters into apo-biotin synthase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem* **267**: 2688-2694.
- Wallace, D. M.** 1987. Large and small-scale phenol extractions. *Meth. Enzymol.* **152**: 33-41.
- Wallace, D. M.** 1987b. Precipitation of nucleic acids. *Meth. Enzymol. Meth.Enzymol.* **152**:41-48.
- Walker, G. R., Feather, K. D., Davis, P. D., und und Hines, K. K.** 1995. SuperSignal™ CL-HRP: A new enhanced chemiluminescent substrat for the development of the horseradish peroxid lable in Western blotting applications. *J. of NIH Research* **7**: 76.
- Weaver, P. F., Wall, J. D., und Gest, H.** 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**:207-216.
- Weaver, R. F.** 1999. Regulation of gene expression in prokaryotes. *Molecular Biology* (Hrsg) McGraw-Hill, Boston 199-204.
- Westley J.** 1980. The enzymatic basis of detoxification. Ed.: In Jacoby W.B.: 245-261. *Academic Press, New York*.
- Williams, R. A. M., Kelley, S. M., Mottram, J. C., und und Coombs, G. H.** 2003. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase of *Leishmania* contains an unusual C-terminal extension and is involved in Thioredoin and antioxidant metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 1480-1486.
- Wintjens, R. u. Rومان, M.** 1996. Structural classification of HTH-DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J. Mol. Biol.* **262**: 294-313.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., und Hangtan, R. R.; Karplus. P. A.** 2002. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2 Cystein peroxiredoxin. *Biochemistry.* **41**: 5493-5040.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., und Karplus P.A.** 2003a. Peroxiredoxins evolution and regulation of hydrogen peroxid signaling. *Science* **300**: 650-653.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Robin, H. J., und Poole, L. B.** 2003b. Structure, mechanism regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* **28**: 32-40.
- Wood, W. B.** 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol. Biol.* **16**: 118-133.

Veröffentlichungen:

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 *Allochrochromatium vinosum*. *J.Bacteriol.* **187**: 1392-1404.

Tagungsbeiträge:

Schulte, A., Engels, S., Sander, J., und Dahl, C. 2002. Sulfur oxidation in *Allochrochromatium vinosum*: the *dsr* encoded proteins. Frühjahrstagung der VAAM, Göttingen, Biospektrum Sonderausgabe , 117. Ref Type: Abstract

Danksagung

In erster Linie danke ich besonders Frau Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl für die Betreuung und ihr Interesse an dieser Arbeit, für die hilfreichen Diskussionen über die Ergebnisse und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Dr. H.G. Trüper danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und für sein Interesse an diesem Thema.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Heino Prinz für seine freundliche Kooperationsbereitschaft und für die von Ihm persönlich durchgeführten ESI-MS- Analysen, der rekombinanten Proteine DsrEFH und DsrC, sowie für die DsrEFH-Proteine aus *A. vinosum*. Die ESI-MS Analysen erfolgten am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund.

Herrn Prof. Dr. Sung Hou Kim danke ich für sein Interesse und seine Kooperationsbereitschaft, die Struktur des rekombinanten DsrEFH Proteins von *A. vinosum* analysieren zu lassen. Ein besonderer Dank gilt auch seinem wissenschaftlichen Assistenten Herrn Dong Hae Shin, der sehr schnell und erfolgreich die Kristallisationsuntersuchungen zum rekombinanten DsrEFH Protein im Calvin Labor des Instituts für Biochemie, der Universität in Berkeley (Kalifornien) durchführte.

Herrn Dr. J. Cort, danke ich für seine Kooperationsbereitschaft, sowie für die von Ihm durchgeführte Analyse der Struktur des rekombinanten DsrC-Proteins von *A. vinosum*, die mit Hilfe der Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie analysiert wurde, am Institut für Umwelt und molekulare Wissenschaften in Richland (Washington)

Allen meinen Mitarbeitern der Schwefelarbeiten Gruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und deren stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Ich danke Frau Birgitt Hüttig für die Hilfe bei der Gewinnung und Aufreinigung des rekombinanten SeMetEFH-Proteins.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich, dass Sie mit Ihrer Geduld und Liebe mir den nötigen Rückhalt für das Studium und für diese Arbeit gegeben haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund für seine große Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit bedanken.